

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201691779 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.01.30(22) Дата подачи заявки
2014.12.04(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)(54) АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧЕСКИЕ К РЕЦЕПТОРУ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО
ФАКТОРА РОСТА 1, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/948,808

(32) 2014.03.06

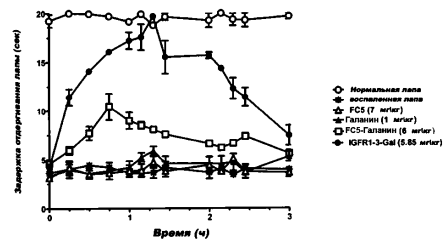
(33) US

(86) PCT/CA2014/000860

(87) WO 2015/131256 2015.09.11

(71) Заявитель:
НЭШНЛ РИСЕЧ КАУНСИЛ ОФ
КАНАДА (СА)(72) Изобретатель:
Станимирович Даника, Кеммерич
Кристин, Хаккани Арсалан С., Сули
Трайан, Арбаби-Гаруди Меди, Масси
Бернар, Жильбер Рено (СА)(74) Представитель:
Харин А.В., Стойко Г.В., Котов И.О.,
Буре Н.Н. (RU)

(57) Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) препятствует прохождению молекул массой больше чем 500 Да из крови в мозг. Рецепторно-опосредованный трансцитоз (RMT) облегчает прохождение через ГЭБ специфических молекул, которые связывают рецепторы на эндотелиальных клетках мозга, которые образуют ГЭБ. Обнаружены антитело или его фрагмент, связывающие рецептор инсулиноподобного фактора роста 1, которые проходят ГЭБ посредством RMT. Антитело или фрагмент используют для доставки молекулы груза через ГЭБ, где молекула груза может представлять собой терапевтический или диагностический агент. Антитело представляет собой верблюжий V_HN, полученный иммунизацией ламы полипептидом IGF1R, состоящим из 933 аминокислот. Гуманизированные формы верблюжьего V_HN также получены.



A1

201691779

201691779

A1

АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧЕСКИЕ К РЕЦЕПТОРУ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 1, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам, специфичным к рецептору инсулиноподобного фактора роста 1, их фрагментам, а также их применениям. Более конкретно, настоящее изобретение относится к антителам, специфичным к рецептору инсулиноподобного фактора роста 1 и их фрагментам, которые проходят гематоэнцефалический барьер, и их применениям.

Предшествующий уровень техники

Нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, являются растущим бременем на нашем стареющем обществе, потому что в настоящее время нет эффективных способов лечения этих инвалидизирующих состояний. Лечение, а также ранняя диагностика этих и других заболеваний, которые возникают в головном мозге, остаются сложной задачей, поскольку большинство подходящих терапевтических молекул и диагностик не могут проникнуть через плотный и сильно ограничивающий гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) (Abbott, 2013). ГЭБ представляет собой физический барьер, который образован эндотелиальными клетками головного мозга (ЭКМ), выстилающими кровеносные сосуды и соединяющимися друг с другом посредством плотных контактов (Abbott, 2013). Плотные контакты, образованные между ЭКМ, имеют важное значение для целостности ГЭБ и предотвращения парацеллюлярного переноса молекул размером более 500 дальтон (Да). Поскольку эндотелиальные клетки мозга демонстрируют очень низкий уровень пиноцитоза (Abbott, 2013), трансцеллюлярный перенос больших молекул ограничивается высоко специфическим рецепторно-опосредованным трансцитозом (RMT), и трансцитозом, опосредованным пассивной адсорбцией на основе заряда (Abbott, 2013; Pardridge, 2002). Кроме того, высокая плотность эффлюксных насосов, таких как Р-гликопротеин или белок множественной лекарственной резистентности-1 (MDR-1), способствует удалению нежелательных веществ из головного мозга (Abbott, 2013).

В то время как все эти характеристики защищают мозг от патогенов и токсинов, они в равной степени предотвращают проникновение большинства

терапевтических средств. На самом деле, менее 5% малых терапевтических молекул и практически никакие из крупных терапевтических средств могут пересекать ГЭБ в фармакологически значимых концентрациях (то есть достаточных, чтобы поразить мишень в центральной нервной системе (ЦНС) и вызвать фармакологический/терапевтический ответ), если они не являются специфически "переносимыми", то есть соединенными с молекулой переносчика. Из-за отсутствия эффективных "носителей" для транспортировки молекул через ГЭБ, многочисленные препараты против нейродегенеративных заболеваний были "заморожены" или исключены из дальнейших разработок, поскольку они не могут быть доставлены в мозг в достаточном количестве.

Различные подходы к введению больших молекул в мозг были исследованы. Например, целостность ГЭБ может быть нарушена, что приводит к негерметичности ГЭБ, что в свою очередь допускает неограниченный парацеллюлярный ввод больших молекул в мозг. Плотные контакты могут быть успешно ослаблены или разрушены различными подходами. Например, инъекция веществ, которые вызывают осмотический шок (например маннит, гипертонические растворы), в кровоток вызывает сжатие и приводит к разрушению плотных контактов, тем самым существенно нарушая ГЭБ (Guillaume, 2010). Другие модуляторы плотных контактов включают алкилглицерины, брадикинин и несколько его аналогов, а также вирусы, которые модулируют экспрессию белков, участвующих в поддержании плотных контактов (Erdlenbruch et al., 2003; Preston et al., 2008; Gan et al., 2013). Более локальное нарушение ГЭБ возможно путем применения ультразвука (Nhan et al., 2013). Тем не менее, временных промежутков, во время которых нарушается ГЭБ, достаточно для изменения гомеостаза мозга, что позволяет вредным химическим веществам, токсинам и патогенным микроорганизмам попадать в мозг; это может привести к серьезным побочным эффектам, например судорогам и отеку мозга, инфекции и, возможно, постоянным нейрпатологическим изменениям. Как было бы очевидно специалистам в данной области техники, повторные процедуры с использованием этих способов при хронических и диффузных заболеваниях мозга, влияющих на несколько областей мозга, являются непрактичными. Большинство из этих способов лечения являются дорогостоящими, требуют госпитализации, а также некоторые подходы требуют анестезии.

Другим подходом для обхода ГЭБ является прямой впрыск терапевтических молекул в спинномозговую жидкость (СМЖ), паренхимальное пространство или другие части мозга. Несколько способов доставки были разработаны, в том числе: игтрацеребральная (интрапаренхимальная), интравентрикулярная и интратекальная доставка через инфузионный насос или диффузионный насос с усиленной конвекцией (CED). Тем не менее, любой тип прямой инъекции в мозг или нитрацеребрального имплантата является инвазивной и дорогостоящей процедурой, так как она требует госпитализации, анестезии и часто хирургического вмешательства. Кроме того, низкая скорость диффузии терапевтических средств, особенно крупных биологических препаратов, внутри паренхимы мозга ограничивает проникновение терапевтических средств только небольшими участками, окружающими сайт инъекции/имплантации. Правильное размещение инъекций, катетеров и имплантатов является сложной задачей, при этом имея решающее значение для достижения диффузии лекарственного средства в область-мишень мозга. Кроме того, катетеры и имплантаты предоставляют сайт для развития инфекции и/или иммунного ответа против чужеродного материала.

При другой попытке увеличить доставку через ГЭБ, лекарства для ЦНС были модифицированы с целью увеличения их захвата мозгом. Такие модификации могут включать в себя изменение их поверхностного заряда, уменьшение размера молекулы, а также изменение липофильности лекарственных средств. Тем не менее, любые изменения для увеличения проникновения в мозг также могут изменить общую фармакологию лекарственного средства, в том числе его желаемую активность и/или специфичность. Кроме того, липофильные молекулы более склонны к выведению из мозга через Р-гликопротеиновый эффлюксный насос.

Наконец, были разработаны эндогенные механизмы транспорта через ГЭБ. Физиологические механизмы, позволяющие перенос больших молекул через ГЭБ, могут быть разделены на высоко специфический рецепторно-опосредованный трансцитоз (RMT) и неспецифический трансцитоз, опосредованный адсорбцией на основе заряда. Эндоцитоз инициируется при связывании специфического лиганда с его рецептором или при электростатическом взаимодействии между катионным лигандом или лекарственным средством и анионными функциональными группами на поверхности эндотелиальных клеток мозга (на люминальной

стороне), соответственно. Впоследствии, вновь сформированные эндосомы подвергаются транцитозу через клетку к аблюминальной стороне для высвобождения груза.

Поскольку транцитоз, опосредованный адсорбцией, является неспецифическим зарядо-опосредованным взаимодействием, он происходит во всех сосудистых руслах и органах, что ограничивает доступность лекарственного средства для доставки в мозг. Поэтому использование RMT пути остается единственным физиологическим, неинвазивным, при этом высоко рецепторно-специфическим способом доставки в мозг.

В настоящее время известны лишь немногие рецепторы, которые подвергаются RMT в ГЭБ и "переносят" через него свои природные лиганды: хорошо изученный рецептор трансферрина (TFR), рецептор инсулина (IR), белки 1 и 2, связанные с рецепторами липопротеинов низкой плотности (LRP-1 и -2), рецептор дифтерийного токсина и TMEM30A. Были разработаны пептиды, природные лиганды и антитела или фрагменты антител, которые связываются с этими рецепторами (Pardridge et al., 1991; Yu et al., 2011; Muruganandam et al., 2001; Abulrob et al., 2005; Demeule, 2008; Sumbria et al., 2013), функционирующими в качестве переносчиков лекарственных средств в мозг, которые используют эндогенные RMT пути. Тем не менее, на сегодняшний день только один пептид (Angioprep ANG1005, таргетирующий LRP-1) был проанализирован в фазе I клинических исследований, в то время как другие кандидаты изучаются в лабораторных условиях. RMT путь представляется наиболее перспективным путем для транспорта лекарственного средства в мозг, но в настоящее время подходы имеют ограничения, включая: неселективную экспрессию рецептора-мишени на ГЭБ, конкуренции между переносчиком и природными лигандами за рецептор, неэффективный транцитоз рецептора, а также лизосомальную деградацию эндоцитированных носителей (Xiao and Gun, 2013).

Отсутствие высокой производительности и высокой селективности переносчиков через ГЭБ задерживает разработку новых терапевтических и диагностических средств для заболеваний, происходящих в мозге, в том числе опухолей мозга и нейродегенеративных заболеваний. Существует явная необходимость в неинвазивном способе доставки мелких и крупных терапевтических и

диагностических молекул в фармакологически эффективных дозах в мозг без нарушения физиологии и гомеостаза ГЭБ.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам, специфичным к рецептору инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R) и их применениям. Более конкретно, настоящее изобретение относится к антителам, специфичным к рецептору инсулиноподобного фактора роста 1 и их фрагментам, которые проходят гематоэнцефалический барьер, и их применениям.

Настоящее изобретение относится к выделенным или очищенным антителам или их фрагментам, специфически связывающихся с эпитопом рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R), где антитело или его фрагмент, проходит гематоэнцефалический барьер, и где эпитоп специфически связывается с антителом с последовательностью SEQ ID NO:5. Эпитоп IGF1R может находиться во внеклеточном домене IGF1R.

Настоящее изобретение относится к выделенным или очищенным антителам или их фрагментам, содержащим

- последовательность области, определяющей комплементарность (CDR) 1 EYPSNFYA (SEQ ID NO: 1);
- последовательность CDR2 VSRDGLTT (SEQ ID NO: 2); и
- последовательность CDR3 AIVITGVWVKVDVNSRSYHY (SEQ ID NO: 3),

где указанное антитело или его фрагмент специфически связывается с рецептором инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R).

Например, не в рамках какого-либо ограничения, выделенным или очищенным антителом или его фрагментом, специфическим для IGF1R, может представлять собой

X₁V X₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCX₅ASEYPSNFYAMSWX₆RQAPGKX₇X₈EX₉V X₁₀
GVSRDGLTTLYADSVKGRFTX₁₁SRDNX₁₂KNTX₁₃X₁₄LQMNSX₁₅ 16AEDTAVYYCAIVITG
VWVKVDVNSRSYHYWGQGTX₁₇VTVSS (SEQ ID NO:4), где X₁ представляет собой E или Q; X₂ представляет собой K или Q; X₃ представляет собой V или E; X₄

представляет собой A или P; X₅ представляет собой V или A; X₆ представляет собой F или V; X₇ представляет собой E или G; X₈ представляет собой R или L; X₉ представляет собой F или W; X₁₀ представляет собой A или S; X₁₁ представляет собой M или I; X₁₂ представляет собой A или S; X₁₃ представляет собой V или L; X₁₄ представляет собой D или Y; X₁₅ представляют собой V или L; X₁₆ представляют собой K или R; и X₁₇ представляют собой Q или L,

или последовательность, по существу идентичную ей. В более конкретных неограничивающих примерах выделенные или очищенные антитела могут содержать последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVASEYPSNFYAMSWFRQAPGKEREFVAGVSRDGLT
TLYADSVKGRFTMSRDNAKNTVDLQMNSVKAEDTAVYYCAIVITGVWNKVDVNSRS
YHYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5), упоминается здесь как IGF1R-3;
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWVRQAPGKGLEWVSGVSRDGL
TTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVITGVWNKVDVNSRS
YHYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:6), упоминается здесь как IGF1R-3JH1;
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWVRQAPGKGLEWVAGVSRDGL
TTLYADSVKGRFTMSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVITGVWNKVDVNSR
SYHYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:7), упоминается здесь как IGF1R-3_H2;
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWFRQAPGKGLEFVAGVSRDGLT
TLYADSVKGRFTMSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVITGVWNKVDVNSRS
YHYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:8), упоминается здесь как IGF1R-3_H3;
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWFRQAPGKEREFVAGVSRDG
LTTLYADSVKGRFTMSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVITGVWNKVDVNSR
SYHYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:9), упоминается здесь как IGF1R-3_H4; и
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWFRQAPGKEREFVSGVSRDGL
TTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVITGVWNKVDVNSRSY
HYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:10), упоминается здесь как IGF1R-3_H5,

или последовательность, по существу идентичную им.

Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент, как описано выше, может быть однодоменным антителом (sdAb); sdAb могут иметь верблюжье происхождение.

Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент в рамках настоящего изобретения могут быть представлены в формате мультивалентного отображения. В формате мультивалентного отображения антитело или его фрагмент могут быть связаны с фрагментом Fc; фрагмент Fc является мышинным Fc2b или человеческим Fc1. Например, не в рамках какого-либо ограничения, выделенное или очищенное антитело или его фрагмент в мультивалентном отображении могут содержать последовательность SEQ ID NO:11 (упоминаемую здесь как слияние IGF1R-3 консенсус-Fc), SEQ ID NO:41 (упоминаемую здесь как слияние Fc-IGF1R-3 консенсус) или 12 (упоминаемую здесь как слияние IGF1R-3-Fc).

Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент, как описано здесь, могут проходить через гематоэнцефалический барьер.

Настоящее изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей выделенное или очищенное антитело или его фрагмент, как описано в настоящем документе. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, как описано выше, также предложен.

Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент, как описано в настоящем документе, могут быть иммобилизованы на поверхность.

Настоящее изобретение дополнительно относится к выделенному или очищенному антителу или его фрагменту, как описано в данном документе, связанному с молекулой груза; молекула груза может иметь молекулярную массу в диапазоне от около 1кДа до около 200 кДа. Молекулой груза, связанной с антителом или его фрагментом, может быть детектируемый агент, терапевтическое, лекарственное средство, пептид, фактор роста, цитокин, ловушка рецептора, химическое соединение, углеводный фрагмент, фермент, антитело или его фрагменты, молекулы на основе ДНК, вирусный вектор или цитотоксический агент; одна или несколько липосом или наноносителей, загруженных детектируемым агентом, терапевтическим, лекарственным средством, пептидом, ферментом, и антителом или его фрагментами, молекулами на основе ДНК, вирусными векторами или цитотоксическим агентом; или одна или несколько наночастиц, нанопроводов, нанотрубок или квантовых точек.

Кроме того, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей одно или более чем одно выделенное или очищенное антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

Также предложен способ детектирования IGF1R *in vitro*, причем способ включает

a) контактирование образца ткани с одним или более чем одним выделенным или очищенным антителом или его фрагментом, как описано в данном документе, связанным с детектируемым агентом; и

b) детектирование детектируемого агента, связанного с антителом или его фрагментом, связанным с IGF1R в образце ткани.

В способе, описанном выше, образцом может быть образец сыворотки, образец сосудистой ткани, образец опухолевой ткани или образец ткани мозга из человеческого или животного субъекта. В способе, описанном выше, стадия детектирования (стадия b)) может быть осуществлена с помощью оптической визуализации, иммуногистохимии, молекулярной диагностической визуализацией, ELISA (иммуно-ферментного анализа), визуализирующей масс-спектрометрии визуализации или другого подходящего способа.

Далее приведен способ детектирования экспрессии IGF1R *in vivo* у субъекта, причем указанный способ включает:

a) введение одного или более чем одного выделенного или очищенного антитела или его фрагмента, как описано в данном документе, связанного с детектируемым агентом, субъекту; и

b) детектирование детектируемого агента, связанного с антителом или его фрагментом, связанным с IGF1R.

В способе, описанном выше, стадия детектирования (стадия b)) может быть осуществлена с использованием PET (позитронно-эмиссионной томографии), SPECT (однофотонной эмиссионной компьютерной томографии), флуоресцентной

визуализации или любого другого подходящего способа.

Предложен способ транспортировки представляющей интерес молекулы через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), причем способ включает:

а) введение одного или более одного выделенного или очищенного антитела или его фрагмента, как описано в данном документе, связанного с представляющей интерес молекулой субъекту, где антитело или его фрагмент проходит через гематоэнцефалический барьер,

где одно или более чем одно антитело или его фрагмент переносит представляющую интерес молекулу через ГЭБ. В способе, как описано выше, представляющая интерес молекула может иметь молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 200 кДа; представляющей интерес молекулой может быть детектируемый агент, терапевтическое, лекарственное средство, пептид, фактор роста, цитокин, ловушка рецептора, химическое соединение, углеводный фрагмент, фермент, антитело или его фрагмент, молекула на основе ДНК, вирусный вектор или цитотоксический агент; одна или несколько липосом или наноносителей, загруженных детектируемым агентом, терапевтическим, лекарственным средством, пептидом, ферментом, антителом или его фрагментом, или цитотоксическим агентом; или одна или несколько наночастиц, нанопроводов, нанотрубок и или квантовых точек. В описанном способе введение может быть внутривенным (IV), подкожным (SC) или внутримышечным (IM).

Изобретение также охватывает способ определения количества молекулы груза, доставляемой через ГЭБ субъекта, где молекула груза связана с одним или более чем одним выделенным или очищенным антителом или его фрагментом, как описано в данном документе, причем способ включает

а) сбор спинномозговой жидкости (СМЖ) от субъекта; и

б) использование целевых методов протеомики для определения количества молекулы груза, связанной с одним или более чем одним выделенным или очищенным антителом или фрагментом в СМЖ.

Молекула груза может быть любой желаемой молекулой, включая молекулы груза, описанные выше; антитело или его фрагмент проходят через ГЭБ; молекула может быть "связана" с антителом или его фрагментом, как описано ранее. В описанном выше способе СМЖ берут у субъекта с использованием любого подходящего способа, известного в данной области. Количество СМЖ, необходимое для целевого метода протеомики на стадии b), может находиться в диапазоне от приблизительно 1 до 10 мкл. Целевые методы протеомики, используемые для определения количества одного или более чем одного антитела или его фрагмента, связанного с молекулой груза, могут быть любыми подходящими методами, известным в данной области техники. Например, не в рамках каких-либо ограничений, целевой метод протеомики может быть методом масс-спектрометрии, таким как мониторинг множественных реакций - изотипически меченые внутренние стандарты (MRM - ILIS).

Плохая доставка диагностических или лекарственных средств через плотный и высоко селективный ГЭБ компрометирует развитие способов лечения заболеваний мозга, таких как, но не ограничиваясь указанным, опухолей мозга и нейродегенеративных заболеваний. Отсутствие переносчиков для транспортировки молекул через ГЭБ задерживает разработку новых терапевтических и диагностических средств для таких заболеваний. Как описано в данном документе, был спродуцирован IGF1R-связывающий V_{НН} (вариабельный домен тяжелой цепи верблюдовых), который обеспечивает эффективную транспортную платформу для доставки лекарственных средств, конъюгированных с антителом, через ГЭБ до их мишеней в мозге. Описанное в данном документе антитело использует естественный RMT путь IGF1R от люминальной к аблюминальной стороне эндотелиальных клеток мозга, образующих ГЭБ. После связывания антитела с IGF1R, RMT инициируется и антитело вместе с конъюгированными молекулами (грузом) подвергается трансцитозу через клетку к аблюминальной стороне, где они оба выпускаются в микросреду мозга. Подтверждено, что IGF1R V_{НН} связывается с IGF1R (Фиг. 3 С), поглощается клетками ГЭБ (Фиг. 4) и переходит на аблюминальную сторону в модели ГЭБ *in vitro* (Фиг. 6 В). Исследования доставки лекарственного средства к мозгу *in vivo* показали также, что IGF1R V_{НН} "переносил" конъюгированный пептид (Галанин, около 3 кДа), а также большой слитый белок (около 80 кДа) через ГЭБ (Фиг. 9 А и В; Фиг. 6 D).

Результаты также показывают, что анти-IGF1R V_HH может экспрессироваться в слиянии с Fc фрагментом (кристаллизуемый фрагмент), чтобы пролонгировать циркуляционный период полувыведения примерно в 75 раза (около 25 часов по сравнению с примерно 20 мин для V_HH в отдельности). Этот слитый конструктор с высокой молекулярной массой (около 80 кДа) также эффективно может транспортироваться через ГЭБ. Длительный период полувыведения из плазмы значительно увеличивает СМЖ воздействие на IGF1R V_HH-mFc (mFc = мышинный Fc) конъюгат по сравнению только с V_HH и является полезным в доставке переносчика через ГЭБ для лечения хронических заболеваний с мишенями в ЦНС. Конъюгат легко обнаруживается в паренхиме мозга с использованием иммуно-флюоресцентного детектирования. Результаты показывают, что переносчика IGF1R V_HH может "переносить" большие молекулы (аналогичные по размеру: антителам, ферментам, факторам роста, пептидам, цитокинам, ловушкам рецепторов) через ГЭБ.

Таким образом, антитело-опосредованная доставка может быть не только полезной для краткосрочного лечения (например эпилептического припадка), но также может быть полезна для среднесрочного (например рака) и долгосрочного (например болезни Альцгеймера или болезни Паркинсона) лечения.

Дополнительные аспекты и преимущества настоящего изобретения будут очевидны в свете следующего описания. Подробные описания и примеры, демонстрирующие предпочтительные варианты осуществления изобретения, даются только в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в пределах объема настоящего изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники в свете идей настоящего изобретения.

Краткое описание фигур

Эти и другие признаки настоящего изобретения будут теперь описаны посредством примера, со ссылкой на прилагаемые чертежи, на которых:

На Фиг. 1 представлена схема рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R). IGF1R находится на поверхности клетки и содержит две субъединицы: альфа-субъединицу и бета-субъединицу. Альфа-субъединица (содержащая внеклеточную часть с сайтом связывания с инсулиноподобным фактором роста 1)

связана дисульфидной связью с бета-субъединицей (содержащей небольшой внеклеточный домен, трансмембранный участок и внутриклеточную часть). Рецептор IGF1 может образовывать димер. Фрагмент длиной в 933 аминокислоты, содержащий альфа-субъединицу и внеклеточную часть бета-субъединицы, как указано в сером поле, (M1 - F933, инвентарный № SwissProt P08069, см Фиг. 2) был рекомбинантно продуцирован и использован для иммунизации ламы.

На Фиг. 2 показана последовательность IGF1R (инвентарный № SwissProt P08069). Белковый фрагмент длиной в 933 аминокислоты, используемый для иммунизации и пэннинга, показан жирным шрифтом; полный эктодомен на 2 аминокислоты длиннее. Сайт расщепления фурином, разделяющий альфа и бета субъединицы, показан строчными буквами курсивом. Сигнальный пептид выделен жирным курсивом.

На Фиг. 3 А показана эксклюзионная хроматограмма IGF1R-связывающего V_{НН} IGF1R-3 и его гуманизированных вариантов (Н1, Н2, Н4, Н5), пропущенных через колонку с Superdex 75. Профиль предполагает, что эти V_{НН} мономерны и не агрегированы. Фиг. 3 В показывает температуру плавления (T_м), определенную с помощью кругового дихроизма (CD) для IGF1R-3 V_{НН} и его гуманизированных вариантов (Н1, Н2, Н3, Н4, Н5). Белки нагревали до температуры выше 90 °С и измерения проводили в CD, чтобы определить кривую плавления и T_м. Впоследствии IGF1R-3 V_{НН} охлаждали до комнатной температуры, нагревали еще раз и анализировали с помощью CD (нижняя кривая). Это позволило определить фракцию рефолдинга белка. Это не проводилось для гуманизированных версий. Фиг. 3 С показывает перекрытие сенсограммы поверхностного плазмонного резонанса (SPR) для связывания 0,1 – 10 нм IGF1R-3 V_{НН} и его гуманизированных вариантов (Н1, Н2, Н4, Н5) с рекомбинантной внеклеточной частью фрагмента человеческого IGF1R. Эти данные хорошо подходят к модели 1:1. Фиг. 3 D показывает сенсограммы SPR связывания IGF1R-3 V_{НН} с рекомбинантной внеклеточной частью фрагмента человеческого IGF1R в присутствии IGF1. IGF1 в 100-кратном избытке не влияет на связывание IGF1R-3 V_{НН}, что демонстрирует, что они оба связываются с различными эпитопами на рецепторе. Эксперимент повторяли дважды. Фиг. 3 Е показывает, что IGF1R-3 V_{НН} не связывается с рекомбинантной внеклеточной частью человеческого инсулинового рецептора (IR),

иммобилизованного на SPR поверхности, в то время как он связывается с контрольной поверхностью человеческого IGF1R (поверхность IGF1R обозначается *звездочкой). В качестве контроля, IGF1 и инсулин, природные лиганды двух рецепторов были распылены по поверхностям, связывание определяли, как и ожидалось: IGF-1 связывался с обоими рецепторами, в то время как связывание инсулина можно было наблюдать только на инсулиновом рецепторе.

На Фиг. 4 показаны результаты визуализации захвата клеток Су-5.5-меченного IGF1R-3 V_{НН} и контрольного V_{НН}. Су5.5-меченный IGF1R-3 V_{НН} (или FC5 V_{НН} в качестве положительного контроля, Muruganandam et al., 2002; Flaqqani et al., 2012) инкубировали с SV40 иммортализованными крысиными эндотелиальными клетками мозга (svARBEC) при температуре 4 °C (верхние блоки) или при 37 °C (нижние блоки) для оценки того, поглощается ли IGF1R-3 пассивно (4 °C) или с помощью активных механизмов (37 °C), таких, как рецепторно-опосредованный эндоцитоз. Совместное окрашивание агглютинином зародышей пшеницы и DAPI проводили для визуализации поверхности клетки и ядра, соответственно. Верхний блок: при инкубировании при 4 °C IGF1R-3 и FC5 V_{НН} были обнаружены вне клетки (стрелки), связанные с клеточной мембраной (сококализируются с агглютинином зародышей пшеницы). Нижний блок: при 37 °C и FC5 и IGF1R-3 V_{НН} накапливались внутри клеток в структурах, подобных везикулам (стрелки), вероятно эндосомах, что предполагает поглощение посредством механизма активного транспорта.

На Фиг. 5 А показана последовательность С-концевого слияния IGF1R-3 V_{НН} с мышинным фрагментом Fc. Схематическое изображение собранного слитого белка показано на Фиг. 5 В, причем IGF1R-3 V_{НН} показан черным цветом и мышинный Fc (CH2 и CH3) серым цветом.

На Фиг. 6 А показана блок-схема, обобщающая использование модели ГЭБ in vitro для оценки способности различных V_{НН} преодолеть гематоэнцефалический барьер. Эквимолярные количества (5,6 мкМ) положительного (FC5) и отрицательного контроля (A20.1, с *Clostridium difficile* токсин А-связывающий V_{НН}; и EG2, EGFR (рецептор эпидермального фактора роста)- связывающий V_{НН}). V_{НН} и IGF1R-3 тестировали одновременно на их способность пересекать крысиную

модель ГЭБ. SV40-иммортиализованные эндотелиальные клетки мозга взрослой крысы (svARBEC) выращивали в монослое на мембране вставки в присутствии крысиной астроцитарно-кондиционированной среды в нижней камере и стандартной среды в верхней камере. После совместного добавления эквимольных количеств различных V_{NH} на люминальную сторону модели ГЭБ, образцы были взяты из нижней камеры после 15, 30 и 60 мин. Концентрации каждого V_{NH} затем количественно измерялись с помощью масс-спектрометрии (мониторинг множественных реакций - изотипически меченые внутренние стандарты; MRM-ILIS) в этих образцах. Значение P_{app} [$Q_r / DT =$ общее количество в приемном отделении в зависимости от времени; $A =$ площадь монослоя клеток; $C_0 =$ начальная концентрация дозированного раствора] обычно используется для определения способности молекулы к пересечению гематоэнцефалического барьера. На Фиг. 6 В приведены значения P_{app} из четырех совместно введенных V_{NH} . IGF1R-3 имеет значительно большее значение P_{app} , чем FC5, в то время как отрицательные контроли имеют очень низкие значения P_{app} , что указывает на облегченный перенос FC5 и IGF1R-3 V_{NH} по сравнению с очень низким неспецифическим транспортом или парацеллюлярным транспортом контрольных V_{NH} . Результаты представляют собой средние значения P_{app} , полученные в 5-6 независимых экспериментах. Фиг. 6 С показывает значения P_{app} гуманизированных IGF1R-3 однодоменных антител (H1, H2, H3, H4, H5) (черные столбики) по сравнению с A20.1 V_{NH} (серые столбики), которые были протестированы в качестве контроля в той же лунке (среднее значение A20.1 обозначается серой пунктирной линией). Фиг. 6 D показывает значения P_{app} IGF1R-3 V_{NH} и IGF1R-3-mFc (черные столбики) наряду с FC5 V_{NH} и A20.1 V_{NH} , которые были протестированы в качестве контроля в тех же лунках.

На Фиг. 7 показана фармакинетика IGF1R-3-mFc в плазме и СМЖ при системном (в хвостовую вену) введении 5 мг/кг. В мостомозжечковую цистерну вводили канюлю для серийного отбора СМЖ (1 - 48 ч). Уровни IGF1R-3-mFc в плазме и СМЖ определяли с помощью метода MRM-ILIS, который "отслеживает" и количественно определяет специфические белковые пептидные сигнатуры. Уровни альбумина в СМЖ были одновременно определены MRM. Все образцы СМЖ, имеющие соотношение плазмы/СМЖ ниже 1500, были исключены как потенциально загрязненные кровью. Соотношение плазмы/СМЖ составляло 0,5% для IGF1R-3-mFc через 24 ч после системной инъекции слитого белка.

Соотношение плазмы/СМЖ А20.1 mFc (0,04% через 24 ч), введенного в той же дозе (5 мг / кг), измеренное в предыдущих экспериментах, показано в светло-сером цвете для сравнения.

На Фиг. 8 А показана схема химического синтеза конъюгата IGF1R-3 V_HH-Галанин. IGF1R-3 сначала конъюгировали с группой NHS сульфо-SMCC (сульфосукцинимидил-4(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат) кросс-линкера (1); затем малеимид-активированный IGF1R-3-сульфо-SMCC конъюгировали с галанином с пониженным содержанием цистеина (2). На Фиг. 8 В показан IGF1R-3 (дорожка 2), IGF1R3-SMCC (дорожка 3) и конъюгат IGF1R-3-галанин (дорожка 4) в SDS-PAGE геле (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия). Характер "полос" указывает на присоединение 1-2 молекул Галанина к IGF1R-3.

На Фиг. 9 показана IGF1R-3-опосредованная доставка в мозг химически конъюгированного пептида Галанина. На Фиг. 9 А представлен график, показывающий способность IGF1R-3 доставлять фармакологически эффективные дозы анальгетического пептида Галанина (3,2 кДа) в мозг с использованием болевой модели Харгривса. В этой модели локализованную хроническую боль индуцируют у самцов крыс линии Wistar (4-6 недельного возраста) путем введения 100 мкл полного адъюванта Фройнда (CFA) в поверхность левой стопы, вызывая тем самым в течение нескольких часов местное воспаление. После инъекции в хвостовую вену ГЭБ-переносчика конъюгата V_HH-лекарственное средство или только Галанина, крыс помещают в плексигласовые шкафы, установленные на поверхности стекла. Тепловой раздражитель ориентирован на воспаленную или контралатеральную лапу с помощью углового зеркала. Задержка между применением раздражителя и реакцией лапы (облизывание или взмах лапой) интерпретируется как мера анальгетического эффекта (ингибирование тепловой гипералгезии). Пептид Галанин сам по себе не может проникать через ГЭБ, о чем свидетельствует отсутствие анальгетического эффекта после системной (в хвостовую вену) инъекции 1 мг/кг Галанина (сплошные треугольники). Системное введение конъюгата IGF1R-3-Галанин (5,85 мг/кг) вызывало дозозависимый анальгетический эффект в течение 3-часового периода, более выраженный, чем это наблюдалось с 6 мг/кг дозой конъюгата FC5-Галанин. Фиг. 9 В показывает эти результаты в виде площади под кривой (AUC) фармакодинамического ответа по

сравнению с максимально возможным эффектом (MPE, контрольная лапа). 5,85 мг/кг IGF1R-3-галанина индуцировало 65% MPE в течение 3-часового периода, демонстрируя значительное проникновение в мозг конъюгата по сравнению с одним только галанином после системной инъекции (менее 5% MPE). На Фиг. 9 С показан временный анальгетический эффект, индуцированный после системной инъекции 3 мг/кг конъюгата IGF1R-3-Галанин, который исчезает через 3 ч после инъекции. Вторая инъекция той же дозы спустя 1 ч произвела подобный, лишь слегка ослабленный анальгетический ответ.

На Фиг. 10 показано иммуно-детектирование IGF1R-3mFc в секциях мозга через 24 ч после введения в хвостовую вену дозы 6 мг/кг. Перфузии с PBS (натрий-фосфатный буфер) проводили на крысах и секции мозга (12 мкм) были получены с использованием вибратора. IGF1R-3mFc был иммуно-детектирован с использованием анти-мышинных Fc антител (красный, красный канал показан только на вставках). Кровеносные сосуды в секции мозга (дорсальный стриатум, Фиг. 10 А, теменная кора головного мозга, Фиг. 10 В) были детектированы с использованием лектина RCA1 (зеленый). IGF1R-3mFc может быть детектирован как в обоих сосудах, так и вне сосудов (т.е. в паренхиме головного мозга, перенесенный через ГЭБ), как показано стрелками.

На Фиг. 11 показано, что IGF1R-3 не пересекается с инсулиновой или IGF1 передачей сигнала через инсулиновый рецептор или IGF1R. Фиг. 11 А представляет собой характерную картину Вестерн блоттинга, демонстрирующую, что ни IGF1R-3, ни какой-либо из других протестированных анти-IGF1R V_HN (IGF1R-1, -4, -5 или -6) не индуцирует фосфорилирование протеинкиназы В в прямом направлении по отдельности при 100 нМ концентрации. Также присутствие 100 нМ IGF1R-3 или любого из других анти-IGF1R V_HN не ингибирует фосфорилирование протеинкиназы В, индуцированное 10 мкг/мл инсулина. Количественное определение плотностей полос Вестерн блоттинга из 3 независимых экспериментов показано на гистограмме (среднее +/- SD (стандартное отклонение)) под изображением геля. На Фиг. 11 В представлена характерная картина Вестерн блоттинга, показывающая, что ни IGF1R-3, ни любые другие протестированные анти-IGF1R V_HN (IGF1R -4, -5 или -6) при 100 нМ не индуцируют фосфорилирование протеинкиназы В сами по себе и не ингибируют IGF1-1 индуцированное фосфорилирование протеинкиназы В (т.е.

передачу сигнала), вызванное при стимуляции 200 нг/мл IGF-1. Количественное определение плотностей полос Вестерн блоттинга из 3 независимых экспериментов показано на гистограмме (среднее +/- SD) под изображением геля. Фиг. 11 С показывает Вестерн блоттинги фосфорилированных IGF1R. Клетки инкубировали либо с 100 нМ или 500 нМ IGF1R-3, либо любым другим анти-IGF1R V_HH (IGF1R-1, -4 или -5), слитыми на своем С-конце с мышинным Fc (например IGF1R-3-mFc) по отдельности или стимулировали 200 нг/мл IGF-1 в присутствии соответствующих слитых белков IGF1R-V_HH-mFc. Вестерн блоттинги показывают, что ни один из слитых конструкций не ингибировал IGF-1 индуцированное фосфорилирование IGF1R и не индуцировал фосфорилирование рецептора сам по себе.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам, специфичным к рецептору инсулиноподобного фактора роста 1, их фрагментам, а также их применениям. Более конкретно, настоящее изобретение относится к антителам, специфичным к рецептору инсулиноподобного фактора роста 1 и их фрагментам, которые проходят гематоэнцефалический барьер, и их применениям.

Настоящее изобретение относится к выделенным или очищенным антителам или их фрагментам, специфически связывающимся с эпитопом рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R), причем антитело или его фрагмент переносится через гематоэнцефалический барьер, и эпитоп специфически связывается с антителом с последовательностью SEQ ID NO:5. Эпитоп IGF1R может находиться во внеклеточном домене IGF1R.

Настоящее изобретение относится к выделенным или очищенным антителам или их фрагментам, содержащим

- последовательность области, определяющей комплементарность (CDR) 1 EYPSNFYA (SEQ ID NO:1);
- последовательность CDR2 VSRDGLTT (SEQ ID NO:2); и
- последовательность CDR3 AIVITGVWNKVDVNSRSYHY (SEQ ID NO:3),

где антитело или его фрагмент специфически связывается с рецептором инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R).

Термин "антитело", также называемый в данной области "иммуноглобулин" (Ig), используемый в данном документе, относится к белку, построенному из спаренных тяжелых и легких полипептидных цепей; существуют различные изоформы Ig, включая IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Когда антитело сложено правильно, каждая цепь укладывается в некоторое число отдельных глобулярных доменов, соединенных более линейными полипептидными последовательностями. Например, легкая цепь иммуноглобулина укладывается в переменный (V_L) и константный (C_L) домен, в то время как тяжелая цепь укладывается в переменный (V_H) и три константных (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) домена. Взаимодействие переменных доменов тяжелой и легкой цепи (V_H и V_L) приводит к образованию области связывания антигена (Fv). Каждый домен имеет устойчивую структуру, знакомую специалистам в данной области техники.

Переменные области легкой и тяжелой цепи отвечают за связывание антигена-мишени и, следовательно, могут демонстрировать значительное разнообразие последовательностей у разных антител. Константные области демонстрируют меньшее разнообразие последовательностей и отвечают за связывание ряда природных белков для выявления важных биохимических событий. Переменная область антитела содержит антиген-связывающие детерминанты молекулы и, таким образом, определяет специфичность антитела к его антигену-мишени. Большая часть различий последовательностей связана с шестью гиперпеременными областями, по три в переменных областях тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепи; гиперпеременные области объединяются для формирования антиген-связывающего сайта и вносят свой вклад в связывание и узнавание антигенной детерминанты. Специфичность и аффинность антитела к его антигену определяется структурой гиперпеременных областей, а также их размером, формой и химией поверхности, которую они представляют антигену. Существуют различные схемы для идентификации областей гиперпеременности, двумя наиболее распространенными из которых являются указанные у Kabat и Chothia and Lesk. Kabat et al (1991) определяют "области, определяющие комплементарность" (CDR) на основе переменности последовательности в антиген-связывающих областях доменов V_H и V_L . Chothia и Lesk (1987) определяют "гиперпеременные петли" (H или L) на основе расположения областей структурной петли в доменах V_H и V_L . Поскольку эти индивидуальные схемы определяют CDR и области гиперпеременной петли, которые являются

смежными или перекрывающимися, специалисты в данной области техники, касающейся антител, часто используют термины "CDR" и "гипервариабельная петля" взаимозаменяемо, и они могут быть так использованы в данном документе. CDR/петли называются здесь в соответствии с более поздней системой нумерации IMGT (Lefranc, M.-P. et al., 2003), которая была разработана для упрощения сравнения вариабельных доменов. В этой системе консервативные аминокислоты (такие как Cys23, Trp41, Cys104, Phe/Trp118 и гидрофобный остаток в позиции 89) всегда имеют ту же позицию. Кроме того, обеспечивается стандартизированное разграничение каркасных областей (FR1: позиции от 1 до 26; FR2: от 39 до 55; FR3: от 66 до 104; и FR4: 118 до 129) и CDR (CDR1: 27 до 38, CDR2: 56 до 65; и CDR3: от 105 до 117).

"Фрагмент антитела", упоминаемый здесь, может включать в себя любой подходящий антиген-связывающий фрагмент антитела, известный в данной области. Фрагмент антитела может быть фрагментом природного антитела или может быть получен путем обработки природных антител или с помощью рекомбинантных способов. Например, фрагмент антитела может включать в себя, но не ограничивается указанным, Fv, одноцепочечный Fv (ScFv, молекула, состоящая из V_H и V_L , связанных пептидным линкером), Fab, F(ab')₂, однодоменное антитело (sdAb; фрагмент, состоящий из одного V_H или V_L), и мультивалентные презентации любого из них. Фрагменты антител, такие как только что описанные, могут потребовать линкерных последовательностей, дисульфидных связей или другой тип ковалентной связи для связи различных частей фрагментов; специалисты в данной области техники знакомы с требованиями различных типов фрагментов и различными подходами к их построению.

В неограничивающем примере фрагмент антитела может быть sdAb, полученным из природных источников. Тяжелые цепи антител верблюжьего происхождения (Hamers-Casterman et al, 1993) не имеют легких цепей и, следовательно, их антиген-связывающие сайты состоят из одного домена, называемого V_HH . sdAb также наблюдается у акул и называется V_{NAR} (Nuttall et al, 2003). Другое sdAb может быть сконструировано на основе тяжелой и легкой цепи человеческого Ig (Jespers et al, 2004; To et al, 2005). Используемый в данном описании термин "sdAb" включает sdAb, непосредственно выделенные из источника V_H , V_HH , V_L , или

V_{NAF} любого происхождения посредством фагового отображения или других технологий, sdAb, полученные из вышеупомянутых sdAb, рекомбинантные sdAb, а также sdAb, генерируемые посредством дальнейшей модификации таких sdAb гуманизацией, созревaniem аффинности, стабилизацией, солюбилизацией, верблюдизацией или другими способами инженерии антител. Также охватываются настоящим изобретением гомологи, производные или фрагменты, которые сохраняют антиген-связывающую функцию и специфичность sdAb.

SdAb обладают требуемыми свойствами для молекул антител, такими как высокая термостабильность, высокая устойчивость к детергентам, относительно высокая устойчивость к протеазам (Dumoulin et al, 2002) и высокий выход (Arbabi-Ghahroudi et al, 1997); также могут быть созданы высоко аффинные sdAb выделением из иммунной библиотеки (Li et al, 2009) или путем созревания аффинности *in vitro* (Davies & Riechmann, 1996). Дальнейшие модификации для повышения стабильности, такие как введение неканонических дисульфидных связей (Hussack et al, 2011; Kim et al, 2012), также могут быть применены к sdAb.

Специалист в данной области техники должен быть хорошо знаком со структурой однодоменного антитела (см, например, 3DWT, 2P42 в Protein Data Bank). SdAb содержит один домен иммуноглобулина, который сохраняет характерную для иммуноглобулина укладку цепи; в первую очередь, три CDR/гипервариабельные петли образуют антиген-связывающий сайт. Тем не менее, и, как должно быть понятно специалистам в данной области техники, не все CDR могут потребоваться для связывания антигена. Например, и не ограничиваясь этим, один, два, или три CDR могут внести свой вклад в связывание и распознавание антигена с помощью sdAb согласно настоящему изобретению. CDR из sdAb или вариабельного домена упоминаются здесь как CDR1, CDR2 и CDR3 и пронумерованы, как это определено у Lefranc, M.-P. et al. (2003).

Антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению является специфичными к рецептору инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R), находящемуся на поверхности клеток. IGF1R содержит альфа-субъединицу, которая включает внеклеточную часть, имеющую участок связывания инсулиноподобного фактора роста 1, соединенную дисульфидной связью с бета-субъединицей, которая содержит небольшой внеклеточный домен,

трансмембранный участок и внутриклеточную часть. Рецептор IGF1 компонуется в гомодимер или может образовывать гетеродимер с рецептором инсулина. Последовательность IGF1R может быть, но не ограничивается этим, такой, как показано на Фиг. 2 (инвентарный № SwissProt P08069; SEQ ID NO:13), или последовательностью, по существу идентичной ей.

Антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, не должны мешать передаче сигналов через инсулиновый рецептор (IR) или IGF1R. В частности, антитела или их фрагменты, описанные в данном документе, не должны ингибировать фосфорилирование протеинкиназы B, индуцированное инсулином, и они не должны индуцировать фосфорилирование IR самостоятельно или ингибировать вызванную инсулином передачу сигнала; кроме того, антитела или их фрагменты, описанные в данном документе, не должны ингибировать IGF-1-индуцированное фосфорилирование IGF1R. К тому же, они не должны связываться с инсулиновым рецептором.

Как было указано выше, антитело или его фрагмент могут являться sdAb. SdAb может иметь верблюжье происхождение или быть полученным из верблюжьих V_HH , и, таким образом, могут быть основаны на верблюжьих каркасных областях; В качестве альтернативы, CDR, описанные выше, могут быть привиты на V_{NAR} , V_HH , V_H или V_L каркасные области. В еще одном альтернативном варианте, гипервариабельные петли, описанные выше, могут быть привиты на каркасные области других типов фрагментов антител (Fv, ScFv, FAB) из любого источника (например, мышинные) или белки аналогичного размера и характера, на которые может быть привита CDR (например, см. Nicaise et al, 2004).

Настоящее изобретение дополнительно включает антитело или фрагмент, который "гуманизирован" с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники, например, но не ограничиваясь ими, CDR прививкой и облицовкой. Гуманизация фрагмента антитела или антитела содержит замену аминокислоты в последовательности на ее человеческий аналог, который содержится в человеческой консенсусной последовательности, без потери антиген-связывающей способности или специфичности; такой подход уменьшает иммуногенность антитела или его фрагмента при введении человеку. В процессе прививки CDR, одна или более чем одна из CDR, определенных в

настоящем документе, может быть слита или привита к вариабельной области человека (V_H или V_L), другому человеческому антителу (IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), другим человеческим каркасным областям фрагментов антител (Fv, ScFv, Fab) или другим белкам аналогичного размера и природы, на которые могут быть привиты CDR (Nicaise et al, 2004). В таком случае, конформация указанной одной или более чем одной гипервариабельной петли вероятно сохраняется и аффинность и специфичность sdAb к своей мишени (т.е. IGF1R) вероятно минимально затронуты. CDR-прививка известна в данной области техники и описана в по меньшей мере в следующих документах: патент США № 6180370, патент США № 5693761, патент США № 6054297, патент США № 5859205, и Европейский патент № 626390. Облицовка также упоминается в данной области как "шлифовка вариабельной области" и включает в себя гуманизацию гидрофильных областей антитела или фрагмента; таким образом, скрытые негуманизированные остатки, которые могут быть важны для конформации CDR, сохраняются, в то время как потенциал для иммунологической реакции против гидрофильных областей сведен к минимуму. Облицовка известна в данной области техники и описана по меньшей мере в следующих документах: в патенте США № 5869619, в патенте США № 5766886, патент США № 5821123, и Европейском патенте № 519596. Специалисты в данной области техники также достаточно знакомы со способами получения таких гуманизированных фрагментов антител и гуманизации аминокислотных позиций.

Например, но без каких-либо ограничений, выделенное или очищенное антитело или его фрагмент, специфичные к IGF1R, может иметь последовательность $X_1VX_2LX_3ESGGGLVQX_4GGSLRLSCX_5ASEYPSNFYAMSWX_6RQAPGKX_7X_8EX_9V X_{10}G$
 $VSRDGLTTLYADSVKGRFTX_{11}SRDNX_{12}KNTX_{13}X_{14}LQMNSX_{15}X_{16}AEDTAVYYCAIVITG$
 $VWVKVDVNSRSYHYWGQGTX_{17}VTVSS$ (SEQ ID NO:4), где X_1 представляет собой E или Q; X_2 представляет собой K или Q; X_3 представляет собой V или E; X_4 представляет собой A или P; X_5 представляет собой V или A; X_6 представляет собой F или V; X_7 представляет собой E или G; X_8 представляет собой R или L; X_9 представляет собой F или W; X_{10} представляет собой A или S; X_{11} представляет собой M или I; X_{12} представляет собой A или S; X_{13} представляет собой V или L; X_{14} представляет собой D или Y; X_{15} представляет собой V или L; X_{16} представляют собой K или R; и X_{17} представляет собой Q или L, или последовательность, по существу идентичную ей. В качестве альтернативы,

выделенное или очищенное антитело может содержать последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVASEYPSNFYAMSWFRQAPGKEREFFVAGVS
RDGLTTLYADSVKGRFTMSRDNAKNTVDLQMNSVKAEDTAVYYCAIVITGVWN
KVDVNSRS YHYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5), упоминаемой здесь как
IGF1R-3;

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWVRQAPGKGLEWVSGV
SRDGLTTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVITGVWN
KVDVNSRS YHYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:6), упоминаемой здесь как
IGF1R-3_H1;

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWVRQAPGKGLEWVAGV
SRDGLTTLYADSVKGRFTMSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVITGVW
NKVDVNSR SYHYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:7), упоминаемой здесь как
IGF1R-3JH2;

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWFRQAPGKGLEFVAGVS
RDGLTTLYADSVKGRFTMSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVITGVWN
KVDVNSRS YHYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:8), упоминаемой здесь как
IGF1R-3JH3;

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWFRQAPGKEREFFVAG
VSRDGLTTLYADSVKGRFTMSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVITGV
WNKVDVNSR SYHYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:9), упоминаемой здесь
как IGF1R-3_H4; и

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWFRQAPGKEREFFVSGVS
RDGLTTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVITGVWNK
VDVNSRSY HYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:10), упоминаемой здесь как
IGF1R-3_H5,

или последовательности, по существу идентичной им.

По существу идентичные последовательности могут содержать одну или несколько консервативных аминокислотных мутаций. Известно, что одна или несколько консервативных аминокислотных мутаций в референсной последовательности могут дать мутантный пептид без существенного изменения физиологических, химических, физико-химических или функциональных свойств по сравнению с референсной последовательностью; в таком случае, референсная и мутантная последовательности будут считаться "по существу идентичными"

полипептидами. Консервативное аминокислотное замещение определяется здесь как замещение аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток со сходными химическими свойствами (например, размер, заряд или полярность). Эти консервативные аминокислотные мутации могут произойти в каркасных областях sdAb при сохранении последовательностей CDR, перечисленных выше, а также общей структуры CDR антитела или его фрагмента; таким образом, специфичность и связывание антитела сохраняются.

В качестве неограничивающего примера, консервативная мутация может быть замещением аминокислоты. Такое консервативное аминокислотное замещение может замещать основную, нейтральную, гидрофобную или кислую аминокислоту на другую из той же группы. Под термином "основная аминокислота" подразумеваются гидрофильные аминокислоты, имеющие боковую цепь со значением pK больше 7, которые, как правило, положительно заряжены при физиологическом значении pH . Основные аминокислоты включают гистидин (His или H), аргинин (Arg или R) и лизин (Lys или K). Под термином "нейтральная аминокислота" (также "полярная аминокислота") подразумевают гидрофильные аминокислоты, имеющие боковую цепь, которая не заряжена при физиологическом значении pH , но которая имеет по крайней мере одну связь, в которой пара электронов, общая для двух атомов, находится ближе к одному из атомов. Полярные аминокислоты включают серин (Ser или S), треонин (Thr или T), цистеин (Cys или C), тирозин (Tyr или Y), аспарагин (Asn или N) и глутамин (Gln или Q). Термин "гидрофобная аминокислота" (также "неполярная аминокислота") включает аминокислоты, проявляющие гидрофобность выше нуля в соответствии с нормированной консенсусной шкалой гидрофобности Айзенберга (1984). Гидрофобные аминокислоты включают пролин (Pro или P), изолейцин (Ile или I), фенилаланин (Phe или F), валин (Val или V), лейцин (Leu или L), триптофан (Trp или W), метионин (Met, или M), аланин (Ala или A) и глицин (Gly или G). "Кислая аминокислота" относится к гидрофильным аминокислотам, имеющим боковую цепь со значением pK меньше 7, которые, как правило, отрицательно заряжены при физиологическом значении pH . Кислые аминокислоты включают глутамат (Glu или E) и аспартат (Asp или D).

Идентичность последовательности используется для оценки сходства двух последовательностей; она определяется путем вычисления процента остатков,

которые являются одинаковыми, когда две последовательности выравнивают для максимального соответствия между позициями остатков. Любой известный способ может быть использован для вычисления идентичности последовательностей; например, существует компьютерное программное обеспечение для расчета идентичности последовательности. Не в рамках каких-либо ограничений, идентичность последовательности может быть рассчитана с помощью программного обеспечения, такого как NCBI BLAST2, поддерживаемого Швейцарским институтом биоинформатики (его можно найти по адресу ca.expasy.org/tools/blast/), BLAST-P, Blast-N или FASTA-N, или любого другого подходящего программного обеспечения, которое известно в данной области техники.

По существу идентичные последовательности согласно настоящему изобретению могут быть по меньшей мере на 90% идентичны; в другом примере по существу идентичные последовательности могут быть по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, или 100% идентичны, или на любое другое значение между указанными, на уровне аминокислотной последовательности, описанном в данном документе. Важно то, что по существу идентичные последовательности сохраняют активность и специфичность референсной последовательности. В неограничивающем варианте воплощения разница в идентичности последовательностей может быть из-за мутации(й) консервативной аминокислоты. В качестве неограничивающего примера, настоящее изобретение может быть направлено на антитело или его фрагмент, содержащий последовательность по меньшей мере на 95%, 98% или 99% идентичную последовательности антител, описанных в настоящем документе.

Антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению может также содержать дополнительные последовательности для помощи в экспрессии, детектировании или очистке рекомбинантного антитела или его фрагмента. Могут быть использованы любые такие последовательности или метки, известные специалистам в данной области. Например, не в рамках каких-либо ограничений, антитело или его фрагмент может включать в себя таргетирующую или сигнальную последовательность (например, но не ограничиваясь указанным, OmpA), метку детектирования/очистки (например, но не ограничиваясь указанным, с-Мус, His5 или His6), или их комбинации. В другом примере дополнительная

последовательность может быть биотиновым сайтом узнавания как, например, описанный Cronan et al в WO 95/04069 или Cronan et al в WO/2004/076670. Как также известно специалистам в этой области техники, линкерные последовательности могут быть использованы в сочетании с дополнительными последовательностями или метками, или могут служить в качестве метки детектирования/очистки.

Антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению также могут быть в формате мультивалентного отображения, также называемом здесь мультивалентной презентацией. Мультимеризация может быть достигнута любым подходящим способом, известным в данной области техники. Например, не в рамках каких-либо ограничений, мультимеризация может быть достигнута с помощью молекул самосборки, таких, как описаны у Zhang et al (2004a; 2004b) и в W02003/046560, где пентатела получают путем экспрессии слитого белка, содержащего антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению, и домен пентамеризации В-субъединицы семейства токсинов AB₅ (Merritt & Hol, 1995). Мультимер также может быть сформирован с использованием доменов мультимеризации, описанных у Zhu et al. (2010); эта форма, называемая здесь "combody" формой, является слиянием антитела или его фрагмента согласно настоящему изобретению с суперспиральным пептидом, образующим мультимерную молекулу (Zhu et al., 2010). Другие формы мультивалентной презентации также охватываются настоящим изобретением. Например, не в рамках каких-либо ограничений, антитело или его фрагмент могут быть представлены в виде димера, тримера или любого другого подходящего олигомера. Это может быть достигнуто с помощью способов, известных в данной области техники, например, с помощью соединения прямым связыванием (Nielson et al, 2000), c-Jun/Fos взаимодействия (Kruif & Logtenberg, 1996), "Выступы-во-впадины" взаимодействия (Ridgway et al, 1996).

Другим способом, известным в данной области для мультимеризации, является димеризация антитела или его фрагмента с использованием домена Fc, например, но не ограничиваясь указанным, человеческих доменов Fc. Домены Fc могут быть выбраны из различных классов, в том числе, но не ограничиваясь указанным, IgG, IgM или различных подклассов, включая, но не ограничиваясь указанным, IgG1, IgG2 и т.д. При таком подходе ген Fc встраивают в вектор вместе

с геном sdAb для создания слитого белка sdAb-Fc (Bell et al, 2010; Iqbal et al, 2010); слитый белок рекомбинантно экспрессируют, затем очищают. Например, не в рамках каких-либо ограничений, форматы мультивалентного отображения могут включать в себя химерные или гуманизированные форматы анти-IGF1R-3 V_HH, связанного с доменом Fc, или би- или три-специфические слитые антитела с двумя или тремя анти-IGF1R-3 V_HH, распознающими уникальные эпитопы. Такие антитела можно легко спроектировать и получить, они могут значительно продлить период полужизни в сыворотке sdAb и они могут быть подходящими реагентами для визуализации опухолей (Bell et al., 2010).

Домен Fc в мультимерном комплексе, как описано выше, может представлять собой любой подходящий Fc-фрагмент, известный в данной области техники. Фрагмент Fc может быть получен из любого подходящего источника. Например, Fc может быть мышиноного или человеческого происхождения. В конкретном неограничивающем примере Fc может быть мышинным Fc2b фрагментом или человеческим Fc1 фрагментом (Bell et al, 2010; Iqbal et al, 2010). Фрагмент Fc может быть слит с N-терминальным или C-терминальным концом анти-IGF1R-3 V_HH или гуманизированных вариантов согласно настоящему изобретению. В конкретном неограничивающем примере мультимеризованные выделенные или очищенные антитела или фрагменты, как описано выше, могут содержать последовательность SEQ ID NO:11, 41, или 12.

Каждая субъединица мультимеров, описанных выше, может содержать одинаковые или различные антитела или их фрагменты согласно настоящему изобретению, которые могут иметь одинаковую или различную специфичность. Кроме того, домены мультимеризации могут быть связаны с антителом или фрагментом антитела с использованием линкера по мере необходимости; такой линкер должен иметь достаточную длину и соответствующий состав, чтобы обеспечить гибкое крепление двух молекул, но он не должен мешать антиген-связывающим свойствам антитела.

Антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, могут проходить через гематоэнцефалический барьер. Мозг отделен от остальной части тела посредством специализированной эндотелиальной ткани, известной как гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Эндотелиальные клетки ГЭБ соединены

плотными контактами и эффективно предотвращают попадание множества терапевтических соединений в мозг. В дополнение к низкой скорости везикулярного транспорта еще одной особенностью ГЭБ является наличие ферментативного барьера (ов) и высокого уровня (уровней) экспрессии АТФ-зависимых транспортеров на аблюминальной (со стороны мозга) стороне ГЭБ, в том числе Р-гликопротеина (Gottesman et al., 1993; Watanabe, 1995), который активно транспортирует различные молекулы из головного мозга в кровоток (Samuels, 1993). Лишь небольшие (<500 дальтон) и гидрофобные (Pardridge, 1995) молекулы могут легко проникать через ГЭБ. Таким образом, способность антитела или его фрагмента, как описано выше, специфически связываться с поверхностным рецептором, поглощаться в эндотелиальных клетках головного мозга и подвергаться трансцитозу через ГЭБ, уклоняясь от лизосомальной деградации, полезна в области неврологии.

Настоящее изобретение охватывает также нуклеотидные последовательности, кодирующие молекулы, как описано в настоящем документе. Учитывая вырожденность генетического кода, некоторое число нуклеотидных последовательностей будет обладать эффектом кодирования полипептида, что будет понятно специалисту в данной области техники. Нуклеотидная последовательность может быть кодон-оптимизирована для экспрессии в различных микроорганизмах. Настоящее изобретение также относится к векторам, содержащим нуклеиновые кислоты, описанные выше. Кроме того, изобретение охватывает клетки, содержащие нуклеиновую кислоту и/или вектор, описанные выше.

Настоящее изобретение дополнительно относится к выделенным или очищенным антителам или их фрагментам, иммобилизованным на поверхность с использованием различных методик; например, не в рамках каких-либо ограничений, антитело или его фрагмент могут быть связаны или спарены с поверхностью с помощью спаривания His-меткой, биотинового связывания, ковалентного связывания, адсорбции и тому подобное. Иммобилизация антитела или его фрагмента согласно настоящему изобретению может быть полезна в различных применениях для захвата, очистки или выделения белков. Твердая поверхность может представлять собой любую подходящую поверхность, например, но не ограничиваясь указанным, поверхность лунки

микротитрационного планшета, каналы сенсорных чипов поверхностного плазмонного резонанса (SPR), мембраны, шарики (такие как магнитные или сефарозные шарики или основанные на других хроматографических смолах), стекло, пластик, нержавеющая сталь, пленка или любую другую полезную поверхность, такую как наночастицы, нанопровода и поверхности кантилевера.

Изобретение также включает антитело или его фрагмент, как описано выше, связанное с молекулой груза. Молекула груза может представлять собой любую подходящую молекулу, которая поставляется через ГЭБ антителом или его фрагментом. Молекула груза может иметь молекулярную массу в диапазоне от около 1 кДа до около 200 кДа; например, молекула груза может иметь молекулярную массу около 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 или 200 кДа, или любую массу в промежутке между указанными массами, или любой диапазон масс, определенный с помощью любых двух указанных выше масс. В конкретных, неограничивающих примерах, молекула груза может иметь молекулярную массу 1 кДа (например, но не ограничиваясь указанным, малая молекула, такая как Су5.5), 1-10 кДа (например, но не ограничиваясь указанным, пептид, такой как галанин, 3 кДа), около 80 кДа (например, но не ограничиваясь указанным, фрагмент Fc, фермент, белок, антитело и т.д.), или около 200 кДа (например, но не ограничиваясь указанным, моноклональное антитело).

Например, не в рамках каких-либо ограничений, молекулой груза может быть детектируемый агент, терапевтический агент, лекарственное средство, пептид, фермент, фактор роста, цитокин, ловушка рецептора, антитело или его фрагмент (например IgG, ScFv, Fab, V_HH, V_H, V_L и т.д.), химическое соединение, углеводный фрагмент, молекулы на основе ДНК (антисмысловый олигонуклеотид, микроРНК, миРНК, плаزمид), цитотоксический агент, вирусный вектор (адено-, ленти-, ретро-), одна или более липосом или наноносителей, загруженных любым из ранее перечисленных типов молекул груза, или одна или несколько наночастиц, нанопроводов, нанотрубок или квантовых точек. Молекула груза, как это описано выше, может быть детектируемым агентом. Например, IGF1R-специфическое антитело или его фрагмент может быть связано с радиоактивным изотопом, парамагнитной меткой, фторофором, флуоресцентным агентом, ближним

инфракрасным (NIR, например Cy5.5) фторохромом или красителем, экзогенным микропузырем, аффинной меткой, детектируемой молекулой на основе белка, нуклеотидом, квантовыми точками, наночастицей, нанопроводом или нанотрубкой или любым другим подходящим агентом, который может быть обнаружен с помощью способов визуализации. Антитело или его фрагмент могут быть связаны с молекулой груза с использованием любого способа, известного в данной области (рекомбинантной технологии, химической конъюгации и т.д.).

Молекула груза, как описано в настоящем документе, может быть связана, что также названо здесь "конъюгирована", с антителом или его фрагментом любым подходящим способом, известным в данной области техники. Например, не в рамках каких-либо ограничений, молекула груза может быть связана с пептидом посредством ковалентной связи или ионного взаимодействия. Связь может быть достигнута за счет химической реакции сшивки или путем слияния с использованием методологии рекомбинантной ДНК в сочетании с любой системой экспрессии пептидов, такой как бактерии, дрожжи или системы, основанные на клетках млекопитающих. При конъюгации молекулы груза с антителом или его фрагментом может быть использован подходящий линкер. Способы связывания антитела или его фрагмента с молекулой груза, такой как терапевтический или детектируемый агент, хорошо известны специалистам в данной области техники.

В одном неограничивающем примере молекулой груза может быть детектируемая метка, радиоактивный изотоп, парамагнитная метка, такая как гадолиний или оксид железа, фторофор, ближний инфракрасный (NIR) фторохром или краситель, экзогенный микропузырь, аффинная метка (например, биотин, авидин и т.д.), ферменты или любой другой подходящий агент, который может быть обнаружен с помощью диагностических способов визуализации. В конкретном неограничивающем примере анти-IGF1R-3 или его фрагмент может быть связан с красителем ближней инфракрасной флуоресцентной визуализации (NIRF), например, не в рамках каких-либо ограничений, Cy5.5, Alexa680, Dylight680 или Dylight800.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ *in vitro* детектирования IGF1R, включающий контактирование образца ткани с одним или более чем одним выделенным или очищенным антителом или его

фрагментом согласно настоящему изобретению, связанным с детектируемым агентом. Комплекс IGF1R-антитело можно затем обнаружить с помощью технологий детектирования и/или визуализации, известных в данной области техники. Образец ткани в способе, описанном выше, может представлять собой любой подходящий образец ткани, например, но не ограничиваясь указанным, образец сыворотки, образец ткани сосудов, образец опухолевой ткани или ткани головного мозга; образец ткани может быть из организма человека или животного. Стадия контактирования осуществляется в подходящих условиях для формирования комплекса между антителом или его фрагментом и IGF1R, известных специалистам в этой области техники. Стадия детектирования может быть осуществлена любым подходящим способом, известным в данной области техники, например, но не ограничиваясь указанным, с помощью оптической визуализации, иммуногистохимии, молекулярной диагностической визуализации, ELISA (иммуно-ферментный анализ), визуализирующей масс-спектрометрии или другим подходящим способом. Например, не в рамках каких-либо ограничений, выделенное или очищенное антитело или его фрагмент, связанный с детектируемым агентом, могут быть использованы в иммунологических исследованиях (IA), включая, но не ограничиваясь указанным, ферментативные IA (EIA), ELISA, "быстрый захват антигена", "быстрые хроматографические IA", и "быстрые EIA". (Например, см Planche et al, 2008; Sloan et al, 2008; Russmann et al, 2007; Musher et al, 2007; Turgeon et al, 2003; Fenner et al, 2008).

Настоящее изобретение также описывает способ детектирования экспрессии IGF1R в субъекте *in vivo*. Способ включает в себя введение одного или более одного выделенного или очищенного антитела или его фрагмента, как описано в данном документе, связанного с детектируемым агентом, субъекту, затем детектирование меченого антитела или его фрагмента, связанного с IGF1R. Стадия детектирования может включать в себя любой подходящий способ, известный в данной области техники, например, но не ограничиваясь указанным, PET, SPECT или флуоресцентную визуализацию или любой другой подходящий способ. Способ, как описано выше, может быть полезным при выявлении экспрессии IGF1R в кровеносных сосудах или тканях, например, но не ограничиваясь указанным, в опухолевых тканях.

Стадия детектирования *in vivo* способами, описанными выше, может включать визуализацию всего тела для диагностических целей или локальную визуализацию в специфических сайтах, таких как, но не ограничиваясь указанным, сосуды головного мозга или опухоли сосудов головного мозга, в количественном выражении для оценки прогрессирования заболевания или ответа субъекта на режим лечения. Стадией детектирования способами, описанными выше, может быть иммуногистохимия или технология неинвазивной (молекулярной) диагностической визуализации, в том числе, но не ограничиваясь указанным:

-оптическая визуализация;

-позитронно-эмиссионная томография (PET), в которой детектируемый агент представляет собой изотопы, такие как ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{62}Cu , ^{124}I , ^{76}Br , ^{82}Rb и ^{68}Ga , причем ^{18}F является наиболее клинически используемым;

- однофотонная эмиссионная компьютерная томография (SPECT), в которой детектируемый агент представляет собой радиотрейсер, такой как $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{123}I , ^{201}Tl , ^{133}Xe , в зависимости от конкретного применения;

- магнитно-резонансная томография (MRI), в котором детектируемым агентом может быть, например, но не ограничиваясь указанным, гадолиний, наночастицы оксида железа и наночастицы железа-кобальта, покрытые углеродом, тем самым повышающие чувствительность MRI для обнаружения бляшек.

- контрастная ультразвуковая эхография (CEUS) или ультразвук, где детектируемым агентом является по меньшей мере один активный акустически активный и газонаполненный микропузырь. Ультразвук является распространенной технологией для скрининга и раннего выявления заболеваний человека. Это дешевле MRI или сцинтиграфии и безопаснее, чем технологии молекулярной визуализации, такие как радионуклидная визуализация, так как не связано с радиацией.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу транспортировки представляющий интерес молекулы через гематоэнцефалический барьер. Способ включает введение молекулы, связанной с антителом или его фрагментом, как описано в настоящем документе, субъекту; антитело или его фрагмент проходят гематоэнцефалический барьер. Молекула может быть любой желаемой молекулой, в том числе молекулой груза, как было описано ранее; молекула может быть "связана" с антителом или его фрагментом с использованием любого подходящего способа, включая, но не ограничиваясь указанным, конъюгацию или

экспрессию в слитом белке. Введение может быть осуществлено любым подходящим способом, например посредством парентерального введения, включая, но не ограничиваясь указанным, внутривенное (IV), подкожные (SC) и внутримышечное (IM) введение. В этом способе антитело или его фрагмент согласно данному изобретению являются "переносят" представляющую интерес молекулу через ГЭБ к мишени в мозге.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей одно или более выделенное или очищенное антитело или его фрагмент, как описано в настоящем документе. Композиция может содержать одно антитело или фрагмент, как описано выше, или может представлять собой смесь антител или их фрагментов. Кроме того, в композиции, содержащей смесь антител или фрагментов согласно настоящему изобретению, антитела могут иметь такую же специфичность или могут отличаться по своей специфичностью; например, не в рамках каких-либо ограничений, композиция может содержать антитела или их фрагменты, специфичные к IGF1R (тот же или другой эпитоп).

Композиция может также содержать фармацевтически приемлемый разбавитель, эксципиент или носитель. Разбавитель, эксципиент или носитель может представлять собой любой подходящий разбавитель, эксципиент или носитель, известный в данной области, и должен быть совместим с другими ингредиентами композиции, со способом доставки композиции и не являться вредным для субъекта. Композиция может быть в любой подходящей форме; например, композиция может предоставляться в форме суспензии, форме порошка (например, но ограничиваясь указанным, лиофилизированной или инкапсулированной), в форме капсул или таблеток. Например, не в рамках каких-либо ограничений, когда композиция предоставлена в форме суспензии, носитель может содержать воду, физиологический раствор, подходящий буфер или добавки для улучшения растворимости и/или стабильности; реконструкция для получения суспензии осуществляются в буфере при подходящем pH, чтобы обеспечить жизнеспособность антитела или его фрагмента. Сухие порошки могут также включать добавки для улучшения стабильности и/или носители для увеличения массы/объем; например, не в рамках каких-либо ограничений, композиция сухого порошка может содержать сахарозу или трегалозу. В конкретном неограничивающем примере композиция может быть сформирована

таким образом, чтобы доставить антитела или их фрагменты в желудочно-кишечный тракт субъекта. Таким образом, композиция может включать в себя инкапсуляцию, высвобождение со временем или другие подходящие технологии для доставки антитела или его фрагмента. В компетенции специалиста в данной области техники приготовить подходящие композиции, содержащие настоящие соединения.

Изобретение также относится к способу количественного определения количества молекулы груза, доставляемой через ГЭБ субъекта, в котором молекула груза связана с одним или более выделенным или очищенным антителом или его фрагментом, как описано в настоящем документе, причем способ включает стадии а) сбора спинномозговой жидкости (СМЖ) у субъекта; и б) использования целевых методов протеомики для определения количества молекулы груза, связанного с одним или более антителом или его фрагментом в спинномозговой жидкости.

Молекула груза может представлять собой любую желаемую молекулу, в том числе молекулы груза, описанные ранее; выделенное или очищенное антитело или его фрагмент проходит через гематоэнцефалический барьер; и молекула может быть "связана" с антителом или его фрагментом с использованием любого подходящего способа, включая, но не ограничиваясь указанным, конъюгацию или экспрессию в слитом белке, как описано выше. В описанном выше способе СМЖ берут у субъекта с использованием любого подходящего способа, известного в данной области. Количество СМЖ, необходимое для целевого метода протеомики на стадии б), может находиться в диапазоне от приблизительно 1 до 10 мкл; например, количество необходимой спинномозговой жидкости может составлять около 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, или 10 мкл, или любое количество между этими значениями, или любой диапазон, определяемый только что описанными значениями. Антитело или его фрагмент, связанное с молекулой груза, может быть введено субъекту до сбора спинномозговой жидкости. Может потребоваться подходящая задержка между введением и доставкой антитела или его фрагмента, связанного с молекулой груза, через ГЭБ. Задержка может составлять по меньшей мере 30 минут после введения антитела или фрагмента, связанного с молекулой груза; например, не в рамках каких-либо ограничений, задержка может составлять по меньшей мере 30

минут, 1 час, 1,5 час, 2 часа, 2,5 часа, 3 часа, 3,5 часа, 4 часа, 4,5 часа, или 5 часов. Целевые методы протеомики, используемые для определения количества одного или более антитела или его фрагмента, связанного с молекулой груза, могут быть любыми подходящими методами, известными в данной области техники. Например, не в рамках каких-либо ограничений, целевой метод протеомики может быть методом масс-спектрометрии, таким как, но не ограничиваясь указанным, мониторинг множественных реакций с использованием изотопически меченных внутренних стандартов (MRM-ILIS; см, например, Naqqani et al., 2013), Преимущество MRM состоит в том, что он позволяет провести быструю, чувствительную и специфическую количественную оценку немеченых целевых аналитов (например, антитела или его фрагмента, как описано в настоящем документе) в биологическом образце. Возможность мультиплексирования анализа позволяет количественно оценить антитела или их фрагменты и молекулу груза.

Настоящее изобретение будет проиллюстрировано на следующих примерах. Тем не менее, следует понимать, что эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны использоваться для ограничения объема настоящего изобретения каким-либо образом.

Пример 1: Очистка рекомбинантного фрагмента IGF1R

Рекомбинантный фрагмент внеклеточного домена IGF1R длиной в 933 аминокислоты (показан серой рамкой на Фиг. 1; см. также аминокислоты 1-933 SEQ ID NO: 13) был подготовлен. Фрагмент состоит из N-терминального 30 аминокислотного сигнального пептида, полной альфа-субъединицы, сайта фуринового расщепления (RKRR, SEQ ID NO: 14; отделяющего альфа и бета субъединицы), а также большей части внеклеточной части бета-субъединицы (Фиг. 1 и 2).

Клонирование. Последовательность IGF1R эктодомена, представляющего интерес, амплифицировали с помощью ПЦР (полимеразная цепная реакция) с использованием следующих праймеров:

5'-CGGGATCCGCCACCATGAAGTCTGGCTCCGGAG-3' (прямой; SEQ ID NO:15)

5'-GCT CT AG AT CAGAAGTTTT CAT AT CCT GTTTTGG-3' (обратный; SEQ ID NO:16)

и субклонировали в сайт SmaI pUC19. Последовательность IGF1R⁹³³ затем

субклонировали в pCDN4/Мус-His (Invitrogen), чтобы создать р IGF1R⁹³³-His для экспрессии His-меченого эктодомена, как описано ранее (Samani et al. 2004).

Переходная трансфекция. Частицы лентивируса, экспрессирующие IGF1R⁹³³-His, были получены в пакующей клеточной линии 293SF-PacLV, как подробно описано ранее (Broussau et al., 2008). Вкратце, клетки были трансфицированы вектором с использованием полиэтиленимина. Свежую среду (LC-SFM (бессывороточная среда с низким кальцием)), содержащую 1 мкг/мл доксициклина и 10 мкг/мл кумата, добавляли к клеткам через 5 часов после трансфекции, и супернатант, содержащий LV частицы, был собран после 48-72 часов, его концентрировали с помощью ультрацентрифугирования при 100000 g в течение 2ч при температуре 4 °C на подложке 20% сахарозы (Gaillet B et al. 2007), ресуспендировали в LC-SFM среде, дополненной 1% FBS (фетальная бычья сыворотка), и хранили при -70 °C до использования.

Стабильная экспрессия. Стабильная клеточная линия, 293SF-cum2-CR5-IGF1R-His, была сгенерирована трансдукцией клеточных линий 293SF-Cum2 с соответствующими лентивирусными частицами с использованием протокола, описанного ранее (Gaillet B et al. 2010). Вкратце, 0,5-1,0 X 10⁵ 293SF-Cum2 клеток высевали в 24-луночных планшетах в 200 мкл LC-SFM среды без декстрансульфата. Суспензия LV была получена смешиванием 200-500 мкл LV с 8 мкг/мл полибрена и инкубированием в течение 30 минут при 37 °C. Свежеприготовленную суспензию LV добавляли к клеткам через 4 часа после посева. После 24 часов 500 мкл среды с добавлением декстрансульфата добавляли к клеткам. Для повышения уровня экспрессии клетки были вновь трансдуцированы до 6 раз с использованием того же протокола после 3-4 суток восстановления клеток. Наконец, клетки были размножены в 6-ти луночных планшетах и колбах шейкерах.

Крупномасштабное производство белка и очистка. Клон, идентифицированный как самый высокопроизводительный, был размножен в колбах шейкерах или центрифужных колбах. Продуцирование белка инициировали добавлением 1 мкг/мл кумата к свежей среде, после чего 24 ч инкубировали при 37 °C и 4-8-суток инкубировали при 30 °C. Клетки удаляли центрифугированием и супернатант фильтровали и концентрировали (10x) с использованием систем

тангентальной поточной фильтрации (кассеты ультрафильтрации Pellicon, EMD Millipore).

IGF1R⁹³³-His очищали с использованием колонки HisPrep (GE Healthcare) в соответствии с инструкциями изготовителя. Вкратце, концентрированный образец наносили на His-Prep FF (16/10) колонку (GE Healthcare), калибровали и промывали 50 мМ фосфатом натрия, 300 мМ NaCl, 5 мМ имидазолом с pH 7,5 и элюировали 50 мМ фосфатом натрия, 300 мМ NaCl, 500 мМ имидазолом, pH 7,5. Стадию элюирования с 0,1 М цитратом натрия pH 4,5 - pH 2,5 использовали для элюирования белка и собирали пиковые фракции. Смену буфера осуществляли путем ультрафильтрации с использованием 50 кДа отсекающей мембраны или обессоливающей колонки с буфером, содержащим 50 мМ фосфата натрия, 150 мМ NaCl и 0,01% Tween-80, pH 7,2. Чистоту обоих белков проверяли с помощью SDS-PAGE и хранили их при -80 °C до использования (см. последующие примеры).

Пример 2: Иммунизация ламы и сывороточный ответ
Для выделения V_HN, нацеленных на внеклеточный домен IGF1R, лама была иммунизирована рекомбинантным IGF1R933-His фрагментом, полученным в Примере 1.

Одного самца ламы (*Lama glama*) иммунизировали путем подкожной инъекции IGF1R933-His рекомбинантного антигена (Пример 1) в нижнюю часть спины. В 1 сутки 200 мкг антигена, разведенного в PBS до 1 мл вводили вместе с 1 мл полного адъюванта Фройнда (Sigma, St. Louis, MO). Еще три инъекции 100 мкг IGF1R933-His антигена с неполным адъювантом Фройнда (Sigma) были выполнены на 22, 36 и 50 сутки. Окончательную инъекцию 100 мкг антигена без адъюванта проводили на 77 сутки. Преиммунизированная кровь отбирались до первой инъекции на 1 сутки и служила в качестве отрицательного контроля. Пробы крови (10-15 мл) собирали в 29, 43, 57 и 84 сутки. Кровь, взятая на 84 сутки, была обработана немедленно с выделением мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Кровь разводили 1:1 с PBS и PBMC выделяли из крови с помощью Lymphoprep Tube (Axis Shield). Клетки подсчитывали и хранили в виде аликвот приблизительно 1×10^7 клеток при температуре -80 °C для последующего использования.

Преиммунизированную и постиммунизированную общую сыворотку анализировали на специфический ответ на IGF1R⁹³³-His антиген с помощью ELISA на 57 сутки. Сыворотка ламы с 84 суток была фракционирована как описано ранее (Doyle et al, 2008). Полученные фракции A1 (HCAb), A2 (HCAb), G1 (HCAb) и G2 (cIgG) анализировали на специфическое связывание с IGF1R⁹³³-His антигеном с помощью ELISA. Вкратце, 5 мкг IGF1R⁹³³-His рекомбинантного антигена, разведенного в PBS, инкубировали в течение ночи (100 мкл/лунку, 18 ч, 4 °C) в 96-луночных планшетах Maxisorp (Nalgene, Nunc) для покрытия планшетов. Планшеты блокировали бычьим сывороточным альбумином (BSA), промывали PBS-T (PBS + 0,05% (об/об) Tween-20) и наносили серийные разведения преиммунизированной общей сыворотки, постиммунизированной общей сыворотки (57 сутки) и фракционированной сыворотки (84 сутки). После инкубации при комнатной температуре в течение 1,5 ч планшеты промывали PBS-T перед добавлением козьего анти-лама IgG (1:1,000 в PBS) и инкубацией в течение 1 ч при 37 °C. После промывания PBS-T добавляли свиной анти-козий IgG HRP (пероксидаза хрена) конъюгат (1: 3,000 в PBS) и планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37 °C. Окончательную PBS-T промывку проводили перед добавлением 100 мкл/лунку субстрата TMB (тетраметилбензидиновый субстрат) (KPL, Gaithersburg, MD); субстрат инкубировали в течение 10 мин. Реакцию останавливали с помощью 100 мкл/лунку 1 М H₃PO₄. Оптическую плотность считывали при длине волны 450 нм.

Пример 3: Построение библиотеки и выбор IGF1R связывающих V_HH Библиотека V_HH гипериммунизированной ламы была построена на основе РНК, выделенной из РВМС в Примере 2.

Построение библиотеки и пэннинг проводили, по существу, как описано ранее (Arbabi- Ghahroudi et al, 2009a, 2009b; Tanha et al, 2003). Общую РНК выделяли из приблизительно 10⁷ РВМС, собранных на 84 сутки постиммунизации (Пример 2) с помощью QIAamp мини набора для выделения РНК из крови (Qiagen). Около 5 мкг общей РНК использовали в качестве матрицы для синтеза первой цепи кДНК с олиго dT праймерами с использованием набора для синтеза первой цепи синтеза кДНК (GE Healthcare). кДНК амплифицировали с

помощью эквимольной смеси трех смысловых праймеров, специфичных к вариабельной области:

MJ1: 5'-GCCAGCCGGCCATGGCCSMKGTGCAGCTGGTGGAKTCTGGG
GGA- 3' (SEQ ID NO:17)

MJ2: 5'-GCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGG
GGA- 3' (SEQ ID NO:18)

MJ3: 5'-GCCAGCCGGCCATGGCCCAGGCTCAGGTACAGCTGGTGGAG
TCT- 3' (SEQ ID NO:19),

и двух антисмысловых CH₂-специфичных праймеров:

CH2: 5'-CGCCATCAAGGTACCAGTTGA-3' (SEQ ID NO:20)

CH_{2b3}: 5'-GGGGTACCTGTCATCCACGGACCAGCTGA-3' (SEQ ID NO:21).

Вкратце, реакционная смесь ПЦР была создана в общем объеме 50 мкл со следующими компонентами: 1-3 мкл кДНК, 5 пмоль смеси MJ1-3 праймеров, 5 пмоль CH₂ или CH_{2b3} праймеров, 5 мкл 10x реакционного буфера, 1 мкл 10 мМ дНТФ, 2,5 единицы Taq ДНК полимеразы (Hoffmann-La Roche). Протокол ПЦР состоял из (I) начальной стадии при 94 °C в течение 3 мин, (II) затем 30 циклов при 94 °C в течение 1 мин, 55 °C в течение 30 сек, 72 °C в течение 30 сек и (III) конечной стадии элонгации при 72 °C в течение 7 мин. Амплифицированные продукты ПЦР прогоняли в 2% агарозном геле и наблюдали две основные полосы: полосу приблизительно 850 п.о. (пара оснований), что соответствует обычному IgG, и вторую полосу около 600 п.о., соответствующую V_HH-CH₂ области тяжелой цепи верблюжьего антитела. Меньшие полосы вырезали и очищали с использованием набора для гель экстракции QIAquick (Qiagen) и повторно амплифицировали во второй ПЦР в общем объеме 50 мкл с использованием 1 мкл (30 нг) матричной ДНК, 5 пмоль каждого из MJ7 (5'-CATGTGTAGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCC-3' SEQ ID NO:22) и MJ8 праймеров (5'-CATGTGTAGATTCCTGGCCGGCCTGGCCTGAGGAGACGGTGAKKTG G-3' SEQ ID NO:23), 5 мкл 10x реакционного буфера, 1 мкл 10 мМ дНТФ, 2,5 единицы Taq ДНК полимеразы. Протокол ПЦР состоял из (I) начальной стадии при 94 °C в течение 3 мин, (II) 30 циклов при 94 °C в течение 30 сек, 57 °C в течение 30 сек и 72 °C в течение 1 мин и (III) конечной стадии элонгации при 72 °C в течение 7 мин. Амплифицированные продукты ПЦР в диапазоне от 340 п.о. до 420 п.о., соответствующие V_HH фрагментам тяжелой цепи антитела, очищали с использованием набора для очистки ПЦР QiagenQIAquick (Qiagen), расщепляли

рестриктазой SfiI (New England Biolabs) и снова очищали с использованием такого же набора.

80 мкг фагмидного вектора pMED1 (Arbabi-Ghahroudi et al, 2009b) расщепляли с помощью SfiI в течение ночи при 50 °С. Для того, чтобы свести к минимуму самолигирование, добавляли 20 единиц рестриктаз XhoI и PstI, чтобы отсечь вырезанные фрагменты, и реакцию расщепления инкубировали в течение еще 2 ч при 37 °С. 60 мкг расщепленной фагмидной ДНК лигировали с 6 мкг расщепленных (SfiI в течение 5 ч при 50 °С) V_{HH} фрагментов (мольное соотношение 1:1) в течение 3 ч при комнатной температуре с использованием системой быстрого ДНК лигирования LigaFast (Promega) в соответствии с инструкцией изготовителя. Лигированные плазмиды очищали с использованием набора для очистки ПЦР QIAquick (Qiagen), элюировали в конечном объеме 100 мкл и трансформировали в электрокомпетентные TG1 *E.coli* (Stratagene), используя 5 мкл аликвоты лигированной ДНК на реакцию трансформации, как описано ранее (Arbabi-Ghahroudi et al, 2009b). Размер библиотеки был определен как 5×10^7 , как описано в Arbabi-Ghahroudi et al, 2009b. 20 клонов были секвенированы и содержали все уникальные последовательности V_{HH}. *E.coli*, содержащая библиотеку, культивировали в течение 2-3 ч при 37 °С, 250 оборотов в минуту в присутствии 2% (масса/объем) глюкозы. Затем бактерии осаждали, снова суспендировали в 2xYT/Amp/Glu (2xYT среда(экстракт дрожжей + триптон) с 100 мкг/мл ампициллина и 2% (масса/объем) глюкозы) с 35% (об/об) глицерина и хранили при -80 °С в небольших аликвотах.

Пэннинг эксперименты по существу проводили как описано у Arbabi et al, 1997. Два миллилитра библиотеки ($2,0 \times 10^{10}$ бактерий) размораживали на льду и выращивали в 2xYT/Amp/Glu в течение приблизительно 2 часов при 37 °С ($A_{600} = 0,4-0,5$). *E.coli* были впоследствии инфицированы 20x избытком M13K07 хелпер-фага (New England Biolabs) в течение 1 ч при 37 °С. Затем культуру центрифугировали при 4 °С и гранулы инфицированных бактерий повторно суспендировали в 200 мл 2xYT/Amp с 50 мкг/мл канамицина и инкубировали при 37 °С и 250 оборотах в минуту. Частицы фага в супернатанте культуры инкубировали с 1/5 объема 20% ПЭГ(полиэтиленгликоль) 8000/2,5M NaCl на льду в течение 1 ч и центрифугировали при 10000 оборотах в минуту в течение 15 мин. Гранулы фага повторно суспендировали в 1,5 мл стерильном PBS, титровали и

использовали в качестве входного фага для пэннинга. Для раунда пэннинга 1 96-луночные планшеты Maxisorp™ покрывали 10 мкг рекомбинантного IGF1R⁹³³-His на лунку в 100 мкл PBS в течение ночи при температуре 4 °С. Лунки промывали PBS и блокировали PBS с 1% (масса/объем) казеином в течение 2 ч при температуре 37 °С. Приблизительно 10¹² фагов были добавлены в лунки после блокировки и инкубированы в течение 2 ч при 37 °С. После 10-кратного промывания PBS/0,1% (об/об) Tween-20 связанные фаги элюировали с помощью 0,1 М триэтиламина, нейтрализовали (50 мкл 1М Трис-HCl, pH 7,4) и смешивали с экспоненциально растущей TG1 *E.coli*. Проводили титрование элюированного фага и инфицированные бактерии повторно инфицировали M13K07 и выращивали в течение ночи при 37 °С. Очищенный фаг выращенной в течение ночи культуры использовали в качестве входного для следующего раунда пэннинга. Пэннинг продолжали еще в течение трех раундов. Использовали тот же самый протокол, как описано выше, за исключением того, что количество рекомбинантного антигена, использованного для покрытия чашек, было уменьшено до 7 мкг, 5 мкг и 5 мкг для второго, третьего и четвертого раундов пэннинга соответственно.

Отдельные колонии TG1, полученные после четвертого раунда пэннинга, были подвергнуты фаговому ELISA скринингу, по существу, как описано в другом документе (Doyle et al, 2008), за исключением того, что 5 мкг/мл IGF1R⁹³³-His рекомбинантного антигена использовали для покрытия микротитрационных планшетов. Все положительные клоны были направлены на секвенирование ДНК. Уникальные клоны, которые давали высокие фаговые ELISA сигналы, были выбраны для крупномасштабной экспрессии и очистки с использованием известных методов (Пример 4). Клон с дублированным IGF1R-3 был идентифицирован для дальнейшего изучения; его последовательность показана ниже.

```
QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVASEYPSNFYAMSWFRQAPGKEREFVAGVSRDGLT  
TLYADSVKGRFTMSRDNAKNTVDLQMN SVKAEDTAVYYCAIVITGVWNKVDVNSRSYH  
YWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:3)
```

Пример 4: Гуманизация IGF1R-3

Для того чтобы избежать потенциальной иммуногенности IGF1R-3, полученного от ламы, при применении в качестве переносчика терапевтических агентов через ГЭБ, полученные от верблюда sdAb были "гуманизированы" мутацией

"верблюжьих" остатков в V_HH. Следует отметить, что с целью гуманизации нумерацию по Kabat (Kabat et al, 1991) использовали для идентификации CDR остатков.

3D-моделирование структуры верблюжьих V_HH. Матричные структуры, аналогичные IGF1R-3 V_HH, были идентифицированы с помощью поиска BLAST в Protein Data Bank (PDB). 3D структура IGF1R-3 была аппроксимирована с помощью моделирования гомологии, основанного на 4KRP|B (код PDB | ID цепи) в качестве основной матрицы, с дополнительными данными от 4FHB|D. Структура IGF1R-3 V_HH была затем построена путем введения мутации основной структуры матрицы последовательности IGF1R-3; это включало 35 мутации в различных позициях. Модель IGF1R-3 V_HH была затем усовершенствована путем энергетической минимизации с помощью AMBER силового поля и ступенчатого освобождения ограничений, начиная от CDR петель, которые были ослаблены в первую очередь, и до тяжелых атомов основной цепи каркасной области, которая была полностью расслаблена только на последней стадии. CDR-H3 петля модели V_HH затем была доработана путем конформационной выборки Монте-Карло-минимизации (MCM), в которой двугранные углы в CDR-H3 области отбирались с последующей минимизацией энергии.

Выбор каркасов человеческих тяжелых цепей для верблюжьей CDR. Каркас человеческой тяжелой цепи был выбран стандартным сравнением гомологии последовательностей в базах данных зародышевой линии человека (VBASE), в сравнении с другими базами данных последовательностей (GenBank и SwissProt), а также в сравнении с консенсусными человеческими каркасными последовательностями. Поиски BLAST были проведены, чтобы получить совпадения последовательностей с самой высокой гомологией только в каркасной области (то есть, исключая CDR), с сопоставлением длины CDR. Ближайшие человеческие каркасы, определенные для IGF1R-3 V_HH, соответствовали человеческой VH-3 подгруппе. Несколько человеческих зародышевых каркасных VH-3 последовательностей, которые наиболее близки к IGF1R-3 V_HH, также были сохранены в дополнение к человеческой VH-3 консенсусной последовательности. В IGF1R-3 V_HH каркасных последовательностях 18 мутаций необходимо для того, чтобы прийти к человеческой VH-3 консенсусной последовательности для 100% гуманизации каркаса.

Определение каркасных остатков для обратных мутаций. Модель IGF1R-3 V_HH и ее полностью гуманизированный аналог характеризовались для оценки индекса человечности, индекса предрасположенности к контакту с антигеном, для определения CDR, канонических остатков, необычных каркасных остатков, потенциальных сайтов гликозилирования, скрытых остатков, остатков зоны Верньера, а также близости к CDR. Анализ этих данных позволил сконструировать несколько гуманизированных вариантов для анти-IGF1R V_HH, причем каждый вариант имел различное количество обратных мутаций до родительских верблюжьих остатков в различных позициях. 5 гуманизированных вариантов были разработаны для IGF1R-3 V_HH (IGF1R-3_H1 - IGF1R-3_H5), где варианты содержат до 10 обратных мутаций. Некоторые из этих верблюжьих остатков с обратными мутациями были скрыты внутри ядра домена V_HH и, следовательно, не индуцировали иммунный ответ.

Пример 5: Экспрессия и очистка выбранных конструкторов V_HH IGF1R-3, определенных в Примере 3, и гуманизированные варианты, сконструированные в Примере 4 (совместно именуемые здесь "V_HH конструкторы") субклонировали в экспрессирующие плазмиды для белковой экспрессии и очистки.

Очищали р фагмидный вектор, содержащий ДНК с IGF1R-3 V_HH конструктором, с использованием набора Miniprep (Qiagen). IGF1R-связывающий V_HH IGF1R-3 был амплифицирован путем ПЦР из фагмидного вектора pMED1, с добавлением N-терминального сайта расщепления BbsI и сайта расщепления BamHI на C-конце, с использованием праймеров:

5'-TATGAAGACACCAGGCCAGGTAAGCTGGAGGAGTCT-3' (прямой; SEQ ID NO:24)

5'-TTGTTCCGATCCTGAGGAGACGGTGACCTG-3' (обратный; SEQ ID NO:25)

ПЦР-фрагмент и экспрессионный вектор pSJF2H расщепляли рестриктазами BbsI и BamHI (NEB) в соответствии с инструкциями изготовителя. После расщепления каждый расщепленный IGF1R-3 V_HH фрагмент лигировали с расщепленным экспрессионным вектором pSJF2H с использованием способов, аналогичных тем, которые описаны у Arbabi-Ghahroudi et al. (2009b); Продукты лигирования были затем трансформированы в электрокомпетентные TG1 *E.coli*. Клоны были отобраны на LB-чашках с агаром + 100 мкг/мл ампициллина и верифицированы

секвенированием ДНК.

Гуманизированные клоны были синтезированы и непосредственно клонированы в pSJF2H аналогично тому, как описано выше, и затем трансформированы в TG1 *E.coli* и отобраны, как описано выше.

Экспрессия белка. Все IGF1R-3 V_{NH} экспрессировали в TG1 *E.coli*. Полученную в течение ночи культуру в LB/Amp/Glu среде (LB среде с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и 1% глюкозы) пересевали при разведении 1:100 в 1 л LB/Amp/Glu. Экспрессию белка индуцировали при OD₆₀₀ (оптическая плотность) 0,8 - 0,9 добавлением IPTG (изопропилтиогаалактозид) до конечной концентрации 0,2 мМ. Культуру выращивали при 220 оборотах в минуту в течение ночи при температуре 37 °С. Бактерии гранулировали центрифугированием при 6000 оборотах в минуту в течение 12 мин; гранулы повторно суспендировали в 35 мл холодного буфера TES (0,2М Трис-Cl pH 8,0, 20% сахарозы, 0,5 мМ ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота)). Суспензию инкубировали на льду и встряхивали через каждые 10 мин в течение 1 часа. Затем добавляли 45 мл холодного TES (1/8 объема от общего объема) и немедленно встряхивали в течение 1 минуты и в течение 15 секунд каждые 10 мин после этого в течение 1 часа для извлечения белка из периплазмы. Полученный супернатант, содержащий V_{NH}, фильтровали через 0,22 мкм мембрану и диализировали в течение ночи посредством буфера А иммобилизационной металл-аффинной хроматографии (IMAC) (10 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота) pH 7,0, 500 мМ NaCl). Белок очищали с использованием колонки HiTrap Chelating HP (GE Healthcare), как описано ранее (Arbabi-Ghahroudi 2009b). Элюированные белковые фракции анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттинга, прежде чем диализировали против PBS, как описано ранее (Arbabi-Ghahroudi 2009b). Очищенные белковые фракции объединяли и диализировали против PBS + 3 мМ ЭДТА, и определяли концентрацию белка.

Пример 6: Биофизическая характеристика анти-IGF1R V_{NH} IGF1R-3 Анти-IGF1R V_{NH} IGF1R-3 конструкции, экспрессированные и очищенные в Примере 4, были охарактеризованы с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC), анализа температуры плавления и анализа поверхностного плазмонного резонанса

Эксклюзионная хроматография: эксклюзионная хроматография с использованием Superdex™ 75 (GE Healthcare) была проведена для устранения любых возможных агрегатов до начала анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В качестве рабочего буфера использовали 10 мМ HEPES, pH 7,4, содержащий 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА и 0,005% P20. Концентрации фракций, используемых для SPR анализа, определяли путем измерения оптической плотности при длине волны 280 нм. По результатам анализа SEC IGF1R3 V_{НН} и его гуманизированные варианты Н1, Н2, Н4 и Н5 были мономерными в расчете на элюирующий объем по сравнению со стандартами (Фиг. 3 А).

Температура плавления: Термическую стабильность IGF1R-3 V_{НН} и гуманизированных конструкторов оценивали с использованием измерения температуры плавления (T_m) с помощью CD-спектроскопии. Спектрополяриметр Jasco J-815, оснащенный термоэлектрической системой контроля температуры типа Peltier (Jasco, Easton, MD, USA), был использован для проведения экспериментов. Использовалась CD-кювета с длиной пути 1 мм. Спектры регистрировали в диапазоне длин волн от 180 до 260 нм со скоростью сканирования 50 нм/мин, цифровое время интегрирования (DIT) 4 сек, ширина полосы 1 нм, шаг данных 1 нм и время интегрирования 1 сек. Для измерения температуры плавления или T_m (Greenfield, 2006a; 2006b) спектры CD были записаны в температурном диапазоне от 30 °C до 96 °C. Все спектры CD были вычтены из бланкового значения, соответствующего спектрам буфера. Измерения проводились с концентрацией 50 мкг/мл V_{НН} в 100 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,4. Денатурацию белка, вызванную нагреванием, контролировали при 210 нм для всех вариантов. Фракция фолдинга (ff) была получена по формуле, описанной в (Greenfield, 2006a; 2006b);

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

где $[\Theta]_T$ представляет собой молярную эллиптичность при любой температуре, $[\Theta]_F$ представляет собой молярную эллиптичность полностью уложенного белка при температуре 30 °C и $[\Theta]_U$ представляет собой молярную эллиптичность развернутого белка при 90 °C. Температуру плавления (T_m) получали в средней точке кривой развертывания (фракция фолдинга (ff) в зависимости от температуры) с помощью подбора кривой нелинейной регрессии (сигмовидное уравнение Больцмана) с использованием графического программного

обеспечения GraphPad Prism (версия 4.02 для Windows). Температуры плавления (T_m) V_{NH} были определены на основе данных эллиптичности, предполагающих два состояния системы, что находится в соответствии с наблюдаемыми кривыми денатурации, соответствующими резкому переходу к денатурации. Значения T_m были взяты в средней точке сигмоидальных кривых денатурации фракции фолдинга (ff) в зависимости от температуры. Результаты показаны на Фиг. 3 В. Температуры плавления наиболее гуманизованных V_{NH} были улучшены (повышены) по сравнению с IGF1R-3 V_{NH} , что предполагает улучшенные биофизические свойства.

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR): Связывание мономерных IGF1R-3 V_{NH} конструкторов с иммобилизованным рекомбинантным человеческим IGF1R (Пример 1) определяли с помощью SPR с использованием BIACORE 3000 (GE Healthcare). Около 3000 Резонансных единиц (RU) рекомбинантного человеческого IGF1R иммобилизовали на сенсорном чипе CM5. Иммобилизацию проводили при концентрации 10 мкг/мл в 10 мМ ацетате при pH 4,0 с использованием набора для связывания амина, поставляемого изготовителем. Оставшиеся сайты связывания блокировали с помощью 1 М этаноламина с pH 8,5. Блокированная этаноламином поверхность была использована в качестве референсной поверхности. Для исследований связывания анализы проводились при 25 °C в 10 мМ HEPES, pH 7,4, содержащем 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА и 0,005% поверхностно-активное вещество P20 (полиоксиэтиленсорбитан; GE Healthcare). Различные концентрации IGF1R-3 V_{NH} вводили через иммобилизованный человеческий IGF1R или инсулиновый рецептор (IR) и референсные поверхности при скорости потока 20 мкл/мин. Поверхность регенерировали 10 мМ глицином, pH 2,0 со временем контакта 24 секунды. Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения BIAevaluation 4.1 (GE Healthcare). Сенсограммы на Фиг 3 С показывают, что данные хорошо подходят к модели 1: 1, что дает K_D и "скорости диссоциации", показанные в Таблице 1. Это указывает на то, что IGF1R-3 V_{NH} и гуманизованные варианты являются высокоаффинными однодоменными антителами, связывающимися с внеклеточным доменом человека и крысы IGF1R.

Таблица 1. Аффинность IGF1R-3 конструкторов к человеческому IGF1R, как определено посредством SPR

	K_D (нМ)	k_d (s^{-1})
--	------------	--------------------

IGF1R-3	1,3	$1,3 \times 10^{-4}$
IGF1R-3 H1	47	$2,3 \times 10^{-3}$
IGF1R-3 H2	6,6	$7,2 \times 10^{-4}$
IGF1R-3 H4	1,4	$5,5 \times 10^{-4}$
IGF1R-3 H5	7,5	$2,5 \times 10^{-3}$

Анализы SPR были в дальнейшем использованы для демонстрации того, что IGF1R-3 V_{HH} не связывается с тем же эпитопом на рецепторе что и природный лиганд IGF-1 (Фиг. 3 D). Эксперимент планировали, проводили и анализировали, как описано выше. Связывание с поверхностью свежемобилизованного человеческого IGF1R изучалось путем инъекции человеческого IGF1 при концентрации $25 \times K_D$ с последующей совместной инъекцией IGF1R-3 при концентрации $25 \times K_D$ при скорости потока 20 мкл/мин и временем инъекции 5 минут. Поверхности регенерировали промывкой рабочим буфером. Данные анализировали, как описано выше. Природный лиганд IGF1 связывал рецептор с насыщением, достигающим 70RU; IGF1R-3 V_{HH} связывался с комплексом IGF1R - IGF1 с ожидаемым -265RU (в относительных единицах; насыщение связывания). Одновременное связывание IGF1R-3 V_{HH} и IGF1 с рецептором показывает, что они оба связываются с различными эпитопами.

Перекрестную реактивность связывания IGF1R-3 V_{HH} с человеческим инсулиновым рецептором также оценивали с помощью SPR. Эксперимент планировали, проводили и анализировали, как описано выше. Вкратце, кроме человеческого IGF1R, приблизительно 4000 резонансных единиц (RU) рекомбинантного человеческого инсулинового рецептора (R & D Systems) иммобилизовали на отдельной лунке сенсорного чипа CM5. Связывание со свежемобилизованным человеческим инсулиновым рецептором и IGF1R анализировали с помощью инъекций IGF1R-3 V_{HH} (1 нМ), инсулина (100 нМ) и человеческого IGF1 (100 нМ) при скорости потока 20 мкл/мин и временем впрыска 1 минута. Поверхности регенерировали промывкой рабочим буфером. В то время, как связывание с IGF1R можно было наблюдать (на Фиг. 3 E отмечены звездочкой *), связывания с поверхности инсулинового рецептора не наблюдалось, что предполагает, что IGF1R-3 не может связываться с инсулиновым рецептором. В качестве контроля IGF1 и инсулин, природные лиганды двух рецепторов, пропускали через поверхность и связывание было обнаружено, как и ожидалось:

IGF1 связывался с обоими рецепторами, в то время как связывание инсулина можно было наблюдать только для инсулинового рецептора.

Пример 7: Поглощение IGF1R-3 эндотелиальными клетками головного мозга
Для того, чтобы определить, поглощается ли IGF1R-3 клетками, клетки svARBEC инкубировали с Cy5-5-меченным IGF1R-3.

IGF1R-3 V_HH метили NHS-Cy5.5. Мечение проводилось через устойчивую аминную связь между первичными аминами (на N-конце и/или на лизиновых боковых цепях белка) и NHS сложного эфира. Как правило, 10% об/об 1M карбонатного/бикарбонатного буфера (759 mM бикарбоната, 258 mM карбоната) pH 9,3 добавляли в 4 мг V_HH, приготовленного в PBS (1,06 mM K₂HPO₄, 154 mM NaCl, 5,6 mM Na₂HPO₄), pH 7,4 и доводили до конечной концентрации 4 мг/мл. NHS-Cy5.5, растворенный в DMSO (диметилсульфоксид) при 10 мг/мл, добавляли при 2X мольном соотношении красителя к белку. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч с несколькими инверсиями в 1,5 мл микроцентрифужной трубке. После инкубации несвязанный краситель и би-продукты реакции фильтровали с помощью обессоливающих колонок для центрифугирования Zeba, 7K MWCO (Pierce) и измеряли с помощью спектрофотометра Beckman DU530 (компании Beckman Coulter). Cy5.5-меченные IGF1R-3 или FC5 в качестве положительного контроля (1мг/мл) инкубировали с SV40 иммортализованными эндотелиальными клетками мозга крысы (svARBEC) при 4 °C (Фиг. 4, верхние блоки), что позволяло протекать только пассивному, неспецифическому транспортному механизму, или при температуре 37 °C (Фиг. 4, нижние блоки) для протекания активного транспорта, такого как рецепторно-опосредованный эндоцитоз. Совместное окрашивание агглютинином зародышей пшеницы и DAPI проводили для визуализации поверхности клетки и ядра соответственно. Клетки наблюдали под флуоресцентным микроскопом и получали изображения.

В случае инкубации при 4 °C IGF1R-3 был обнаружен вне клеток совместно локализующийся с клеточной мембраной, окрашенной агглютинином зародышей пшеницы. В противоположность этому, при инкубации при 37 °C IGF1R-3 накапливался в везикулах внутри клеток, вероятно эндосомах, что предполагает, что поглощение антител клетками происходит путем активного транспортного

механизма. Подобное поведение наблюдалось и для FC5, для которого ранее было показано, что он попадает в клетки с помощью энергозависимого эндоцитоза с помощью везикул с клатриновым покрытием (Abulrob *et al.* 2005).

Пример 8: Получение IGF1R-3-mFc конструктора
Конструктор, содержащий IGF1R-3 V_HH, слитый с кристализуемым фрагментом мышинового антитела (Fc; mFc2b), получали, экспрессировали и выделяли. Последовательность C-терминального IGF1R-3- mFc конструктора показана на Фиг. 5 А, схема молекулы показана на Фиг. 5 В. Слитый белок (~ 80 кДа) также содержал N-терминальный сигнальный пептид (MEFGLSWVFLVAILKGVQC; SEQ ID NO: 40), который не показан в последовательности на Фиг. 5 А.

IGF1R-3 кДНК клонировали в экспрессионный вектор млекопитающих рТТ5 (Durocher, 2002), содержащий мышинный фрагмент Fc2b. Полиплексы полученного вектора были предварительно получены смешиванием 25 мл раствора плазмидной ДНК, содержащего 187,5 мкг рТТ5-IR5mFc2b, 56,25 мкг рТТ- AKTdd (активированный мутант протеинкиназы B), 18,75 мкг рТТo-GFP (для контроля эффективности трансфекции) и 112,5 мкг ДНК яичек лосося (Sigma-Aldrich); и 25 мл раствора PEI (полиэтиленимин), содержащего 1,125 мг PEIproTM (PolyPlus Transfection), оба сделаны в F17 среде. Смесь инкубировали в течение 10 минут перед добавлением к культуре клеток. 450 мл культуры клеток CHO, стабильно экспрессирующих усеченный белок EBNA1 (CHO-3E7), выращенных в среде F17 (Invitrogen), трансфицировали с 50 мл полиплексов. Через двадцать четыре часа после трансфекции в культуру добавляли 12,5 мл 40% (масса/объем) раствора триптона N1 (Organotechnie) и 1,25 мл 200 мМ раствора вальпроевой кислоты. Культуру собирали через 8 суток после трансфекции и очищали центрифугированием. Очищенную среду фильтровали через 0,22 мкм мембрану перед нанесением на колонку, заполненную 5 мл смолы протеина-A MabSelect SuRe (GE Healthcare). После загрузки колонку промывали 5 объемами натрий-фосфатного буфера pH 7,1 (PBS) и антитела элюировали 100 мМ буфером с цитратом натрия pH 3,0. Фракции, содержащие элюированные антитела, объединяли, и смену буфера осуществляли путем загрузки на обессоливающую колонку Esopo-Pac (BioRad), калиброванную в PBS. Обессоленные антитела затем стерильно фильтровали при пропускании через Millex GP (Millipore) фильтр (0,22 мкм) и аликвотировали.

Пример 9: Транспорт IGF1R-3 и IGF1R-3mFc через модель гематоэнцефалического барьера in vitro

Для того, чтобы оценить, проходит ли IGF1R-3 V_HH и конструктор из Примера 8 через гематоэнцефалический барьер, был проведен анализ in vitro, как описано ниже. Блок-схема эксперимента показана на Фиг. 6 А.

SV40-иммортиализованные эндотелиальные клетки мозга взрослой крысы (Sv-ARBEC) были использованы для создания модели гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) in vitro, как описано ранее (Garberg et al., 2005; Haqqani et al., 2012). Sv-ARBEC (80000 клеток/мембрану) высевали на 0,1 мг/мл вставки культуры ткани, покрытые коллагеном типа I хвоста крыс (размер пор - 1 мкм; площадь поверхности 0,9 см², Falcon) в 1 мл среды роста. Нижняя камера узла вставки содержала 2 мл среды роста, дополненной кондиционированной средой иммортиализованных неонатальных крысиных астроцитов в соотношении 1:1 (об/об). Эквимолярные количества (5,6 мкм) положительных (FC5) или отрицательных контролей (A20.1, *Clostridium difficile* токсин А связывающий V_HH; и EG2, EGFR связывающий V_HH) и IGF1R-3 тестировали на их способность проникать через эту крысиную модель ГЭБ in vitro. После экспозиции эквимолярных количеств sdAb на люминальной стороне ГЭБ, через 15, 30 и 60 мин с аблюминальной стороны были взяты образцы. Содержание sdAb в каждом образце затем количественно оценивали с помощью масс-спектрометрии (MRM - ILIS), как описано у Haqqani et al.(2012)) (см. описание метода ниже).

Определение коэффициента эффективной проницаемости: количественные значения могут быть непосредственно нанесены или значения P_{app} (коэффициент эффективной проницаемости) могут быть определены по заданной формуле (Фиг. 6 А) и нанесены на график. Значение P_{app} обычно используется для определения способности молекулы к прохождению гематоэнцефалического барьера. [Q_t/dt = общая сумма в приемном отделении в зависимости от времени; A = площадь монослоя клеток; C_0 = начальная концентрация дозированного раствора], значения P_{app} являются мерой удельной проницаемости соединения через эндотелиальный монослой мозга.

Результаты показаны на Фиг. 6 В-Д. Приведенные результаты являются средними значениями P_{app} , полученными из нескольких независимых экспериментов. Оба

отрицательных контроля имеют очень низкое значение P_{app} , указывая, что неспецифический транспорт или парацеллюлярный перенос этих V_{NH} через модель ГЭБ минимальны. IGF1R-3 V_{NH} имеет высокое значение P_{app} , что указывает на высокую скорость переноса в *in vitro* модели ГЭБ. P_{app} для IGF1R-3 V_{NH} был примерно в 3 раза выше, чем у положительного контроля — ГЭБ-проницаемого V_{NH} FC5 (WO 02/057445). Результаты показывают, что IGF1R-3 подвергается облегченному межклеточному транспорту через эндотелиальные клетки мозга *in vitro* и может иметь аналогичные свойства *in vivo*. Гуманизированные IGF1R-3 V_{NH} варианты H1, H2, H3 и H4 имели на 20-30% сниженное значение P_{app} по сравнению с IGF1R3 V_{NH} , в то время как вариант H5 демонстрировал значения P_{app} , сходные IGF1R-3 V_{NH} (Фиг. 6 C).

Значение P_{app} для IGF1R-3mFc (Фиг. 6 D) было значительно снижено по сравнению с IGF1R V_{NH} , тем не менее все еще в 2,5 раза выше, чем значение P_{app} положительного контроля FC5 (Фиг. 6 D). Эти данные свидетельствуют либо об направленности связывания IGF1R-3 с Fc, либо о том, что бивалентный формат снижает его способность к пересечению ГЭБ по сравнению с мономерным IGF1R-3. Стоит отметить, что конструкторы, содержащие IGF1R-5 или гуманизированную версию, связанную с молекулой груза (молекулярная масса ~ 110 кДа или 180 кДа), также пересекали ГЭБ (данные не показаны).

Абсолютное определение количества V_{NH} с использованием способа MRM - ILIS. Эти способы описаны у Naqqani et al. (2012). Вкратце, для проведения SRM (мониторинг селективных реакций, также известного как мониторинг множественных реакций (MRM)) анализа V_{NH} каждый V_{NH} сначала анализировали с помощью nanoLC-MS/MS с использованием зависимого от данных сбора для идентификации всех ионизируемых пептидов. Для каждого пептида были выбраны от 3 до 5 наиболее интенсивных ионных фрагментов. Первоначальный анализ SRM проводили для мониторинга этих фрагментов в аттомольных количествах расщепления (около 100-300 амоль). Фрагменты, которые показали соотношения интенсивности, воспроизводимые при низких количествах (т.е. имели $r^2 \geq 0,95$ по Пирсону по сравнению с более высокими количествами), считались стабильными и были выбраны для конечного анализа SRM. Для дальнейшей оптимизации анализа время элюирования для каждого пептида было также включено, причем пептиды, которые имели близкие m/z (отношение массы к заряду) и время

элюирования не выбирали.

Типичный мультиплексированный анализ SRM V_{NH} в клеточных средах или биологических жидкостях (сыворотке или спинномозговой жидкости (СМЖ)) включал в себя впрыскивание известного количества ILIS (0,1-10 нМ) с последующей инъекцией 100-400 нг СМЖ или белков культуральной среды (0,3-1 мкл) или около 50-100 нг сывороточных белков (1-3 нанолитра) в систему nanoLC-MS. Предшественник m/z каждого целевого пептидного иона был выбран из ионной ловушки (а остальные несвязанные ионы были отброшены) в указанное для мишени время элюирования, с последующей индуцированной столкновениями диссоциацией (CID) фрагментацией и выбором только нужных ионных фрагментов в ионной ловушке для мониторинга с помощью детектора. Для количественного анализа необработанные файлы, созданные LTQ (ThermoFisher), преобразовывали в стандартный формат данных масс-спектрометрии mzXML и интенсивности извлекали с помощью программного обеспечения Q-MRM (Quantitative-MRM; see Haqqani et al. 2012), которое является модифицированной версией программного обеспечения MatchRx. Для каждого V_{NH} извлеченные ионные хроматограммы генерировали для каждого из его ионных фрагментов, которые состояли из объединенных интенсивностей в пределах 0,25 Да фрагмента m/z в течение всего времени элюирования. Для того, чтобы получить окончательное значение интенсивности для каждого фрагмента, были суммированы все интенсивности в течение 0,5 мин ожидаемого времени удерживания. V_{NH} был определен как обнаруживаемый в образце, если фрагменты по меньшей мере одного из его пептидов показали ожидаемые соотношения интенсивности, т.е. конечные значения интенсивности показали сильную корреляцию Пирсона $r \geq 0.95$ и $p < 0,05$ по сравнению с конечными значениями интенсивностей соответствующего чистого V_{NH} .

Образцы, содержащие смеси V_{NH} (среда, сыворотка, СМЖ) восстанавливали, алкилировали и расщепляли трипсином, как описано ранее (Haqqani et al., 2012; Gergov et al., 2003). Продукты расщепления (триптические пептиды) подкисляли уксусной кислотой (конечная концентрация 5%) и анализировали на обратно-фазовом nanoAcquity UPLC (сверхэффективный жидкостный хроматограф) (Waters, Milford, MA) в сочетании с масс-спектрометром LTQ XL ETD или LTQ Orbitrap ETD (ThermoFisher, Waltham, MA). Нужные аликвоты образца

инъецировали и загружали в 300 мкм I.D. * 0,5 мм 3 мкм PerMaps C18 ловушку (ThermoFisher), затем элюировали на 100 мкм I.D. * 10 см 1:07 мкм BEH130C18 nanoLC колонке (Waters) с использованием градиента 0% - 20% ацетонитрила (в 0,1% формиате) в течение 1 минуты, 20% - 46% в 16 мин, и 46% - 95% в течение 1 мин при скорости потока 400 нл/мин. Элюированные пептиды ионизировали в масс-спектрометре с ионизацией электрораспылением (ESI) для MS/MS и SRM анализов с использованием CID для фрагментации пептидных ионов. CID проводили с гелием в качестве газа столкновения при нормированной энергии столкновения 35% и 30 мс временем активации. Время ионной инъекции в линейную ионную ловушку было скорректировано с помощью инструмента с целевым значением автоматического контроля усиления (AGC) 6×10^3 и максимальным временем аккумуляции 200 мс.

Эти V_NH-специфические пептиды, используемые для детектирования и количественного определения каждого V_NH в мультиплексном анализе, приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Пептиды, используемые при nanoLC-SRM детектировании FC5, FC5-ILIS, EG2, A20.1, IGF-1R-5 и альбумина. (a) в различных описанных исследованиях анализы были мультиплексированы в различных комбинациях для одновременного наблюдения в одном и том же образце; (b) тяжело-меченный пептид; (c) пределы детектирования и количественного определения SRM для каждого пептида составляли 1,5-2,5 нг/мл. 1 нг/мл соответствует приблизительно 60-70 пМ V_NH. A20-1, как описано у in Hussack et al, 2011 b; EG2 как описано у Iqbal et al, 2010.

Белок	Сигнатуры	SEQ ID NO:	уникальные
IGF1R3	EFVAGVSR	26	Да
	LSCVASEYPSNFYAMSWFR	27	Да
	NTVDLQMNSVK	28	Да
	SYHYWGQGTQVTVSSGSEQK	29	Да
FC5	ITWGGDNTFYSNSVK	30	Да
FC5-ILIS	ITWGGDNTFYSNSVK ^(b)	30	Да
A20.1	TTYADSVK	31	Да
	EFVAAGSSTGR	32	Да
	TFSMDPMAWFR	33	Да
	DEYAYWGQGTQVTVSSGQAGQGSEQK	34	Да
EG2	DFSDYVMGWFR	35	Да
	LEESGGGLVQAGDSLRL	36	Да
	NMVYLMNSLKPEDTAVYYCAVNSAGTYVSPR	37	Да
Альбумин	APQVSTPTLVEAAR	38	Да

Пример 10: Уровни IGF1R-3-mFc в СМЖ и плазме

Анализ *in vivo* проводили, чтобы определить, способен ли IGF1R-3-mFc (Пример 8) проходить в мозг и в частности в спинномозговую жидкость (СМЖ), а также для количественного определения присутствия в СМЖ и сыворотке.

Животных содержали поодиночке в полипропиленовых клетках и давали свободный доступ к пище и воде. Эксперименты проводились в 12 часовом свето-темновом цикле при температуре 24 °C и относительной влажности 50 ± 5%. Все процедуры на животных были одобрены Комитетом по уходу за животными и находились в соответствии с руководствами Канадского совета по уходу за животными.

Использовали самцов крыс линии Wistar 8-10-недельного возраста (диапазон веса, 230-250 г). Для получения образца СМЖ мех на области шеи и головы животных выбривали и затем их помещали в камеру из плексигласа и умеренно анестезировали 3% изофлураном; СМЖ была собрана по существу как описано у Nirogi et al (2009). Анестезированных крыс помещали в инструмент с металлическим каркасом (любезно предоставленный доктором Vinicio Granados-Soto; CINVESTAV, Мексика) и иммобилизовали с использованием ручек для ушей. Положение головы животного поддерживали под углом примерно 45° вниз. Поверхность в виде ромба между затылочным бугром и шейным позвонком была сделана видимой путем протирания ватой, пропитанной этанолом (75%), вдоль этой поверхности. 27G игла была покрыта ПЭ-10 трубкой (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) 10 см в длину и соединена со 100 см³ инсулиновым шприцем, была вставлена горизонтально и по центру в большую цистерну для сбора СМЖ без разреза. Две точки сопротивления (щелчки) вдоль пути иглы можно легко ощутить из-за разрыва кожи и разрыхления атланта-затылочной мембраны. Когда игла проходила вторую точку сопротивления, СМЖ собирали (40-100 мкл) через иглу, применяя осторожное всасывание инсулиновым шприцем. После отбора образцов СМЖ соответствующую кровь собирали пункцией сердца после торакотомии и помещали в вакуумные контейнеры-пробирки (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) со сгустком активатора и геля, а затем центрифугировали при 3,000 g в течение 15 мин. Сыворотка была удалена с помощью микропипетки и образец быстро замораживали до -80 °C до дальнейшего анализа.

Сыворотку и СМЖ собирали через 24 ч после внутривенного введения 6 мг/кг IGF1R-3mFc или A20.1mFc. Образцы сыворотки и образцы СМЖ анализировали с помощью масс-спектрометрии и на основе количественной оценки nanoLC-SRM, как описано в Примере 7.

Сбор СМЖ является деликатной процедурой, во время которой СМЖ может легко загрязниться кровью. Так как количества V_{NH} , как ожидается, будут значительно меньше в спинномозговой жидкости (<0,1%), чем в крови, даже незначительное загрязнение кровью может поставить под угрозу ценность отдельного образца СМЖ. В связи с этим необходимо было разработать строгие критерии исключения образцов СМЖ, загрязненных кровью. Для оценки соотношения альбумина в крови-СМЖ метод nanoLC-SRM был разработан для количественного определения уровня альбумина в плазме крови и спинномозговой жидкости. Пептид альбумин APQVSTPTLVEAAR (SEQ ID NO: 38) был выбран на основании своего уникального времени удерживания и значения m/z (Mol Pharm) для достижения минимальной интерференции с другими пиками пептидов в мультиплексном анализе. Интенсивность пептида определяли количественно в обоих образцах СМЖ и плазмы с использованием SRM анализа, как описано выше. Соотношение альбумина рассчитывалось следующим образом для каждой крысы:

Соотношение Альбумина = Интенсивность на нл проанализированной плазмы / Интенсивность на нл проанализированной СМЖ

Соотношение 1500 и ниже рассматривалось как загрязнение кровью.

Результаты показаны на Фиг. 7. На фигуре показано, что уровни IGF1R-3Fc в СМЖ составляли 0,5% от уровней сыворотки по сравнению с 0,04% A20.1Fc контрольного антитела. Отрицательный контроль A20.1Fc (75kD) демонстрировал соотношение сыворотки / СМЖ через 24 ч, аналогичное тем, которые описаны в литературе для молекул подобного размера. Типичное (поясничное) соотношение в сыворотке / СМЖ для альбумина (60kD) в равновесном состоянии составляет 0,1%, тогда как соотношение сыворотки / СМЖ для IgG составляет 0,07 (Shen et al., 2004; Lin, 2008). Соотношение IGF1R3-Fc в сыворотке / СМЖ на 24 ч в 11 раз выше, чем для A20.1mFc. Также было показано, что дополнительные конструкторы ~ 110 кДа переносились через ГЭБ с помощью IGF1R-3 или гуманизированной версии (данные не показаны).

Пример 11: Конъюгация IGF1R-3 с галанином

Для того, чтобы определить, способен ли IGF1R-3 V_{NH} пересечь гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в *in vivo* и 'переносить' через ГЭБ молекулу, которая не может пересечь ГЭБ самостоятельно, нейропептид Галанин был химически конъюгирован с IGF1R-3 V_{NH} и системно введен. Галанин является нейроактивным пептидом, который производит обезболивающее действие путем связывания GalR1 и GalR2, экспрессируемых в ткани головного мозга. При периферическом введении галанин не имеет обезболивающего действия, поскольку он не может пересечь ГЭБ сам по себе (Robertson et al., 2011).

IGF1R-3 V_{NH} был конъюгирован с фрагментом крысиного Галанина (Gal) с модифицированным цистеамидом С-концом (Biomatic) (GWTLNSAGYLLGPH AIDN HRSFSDKHGLT-цистеамид, SEQ ID NO: 39). Схема конъюгации показана на Фиг. 8 А.

Вкратце, 5 мг IGF1R-3 V_{NH} (Пример 4) в 0,5X PBS, 2,5 мМ ЭДТА при [2 мг / мл] смешивали с 436,4 мкл 2,5 мг/мл сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата (сульфо-SMCC) (7,5x избыточное мольное отношение). Затем смесь продували газообразным азотом и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре (RT) для реагирования эфирного NHS остатка сульфо-SMCC с аминогруппами V_{NH}. Впоследствии, непрореагировавший сульфо-SMCC был удален из активированного малеимидом IGF1R-5 V_{NH} с использованием 10 мл колонки 7K Zeba (Pierce). До загрузки образца колонку промывали 3 раза 5 мл PBS и центрифугировали при 1000 g в течение 2 мин. После загрузки образца колонку заполняли 200 мкл PBS и центрифугировали в течение 2 мин при 1000 g. Что касается конструкторов IGF1R-Fc, 5 мг подвергали взаимодействию с ~ 68 мкл сульфо-SMCC (6,5x избыточное мольное отношение) таким же образом, как описано выше.

Отдельно и одновременно, Галанин с модифицированным цистеамидом С-концом (Gal-суа) получали путем растворения 10 мг лиофилизированного порошка в 10 мл воды без эндотоксинов, чтобы получить 1 мг/мл маточный раствор (порошок Gal-суа содержал небольшое количество DTT (дитиотриетол) для предотвращения образования дисульфидных мостиков во время очистки). Наконец, добавляли 100

мкл 0,5 М ЭДТА (конечная концентрация 5 мМ).

Очищенный активированный малеимидом IGF1R-3 V_{НН} (2,6 мл) разбавляли до 5 мл 0,5X PBS, 2,5 мМ ЭДТА, а затем 5 мл Gal-суа был добавлен во время вортексирования. Образцы продували азотом, герметизировали и инкубировали в течение ночи при температуре 4 °С. На следующий день непрореагировавший Gal-суа был удален с помощью колонок Amicon-15 10K и 30K (Millipore) соответственно. Образец добавляли в колонку и центрифугировали при 4000 g в течение 7 минут до тех пор, пока объем не был уменьшен до 5 мл. 5 мл 0,5X PBS, 2,5 мМ ЭДТА добавляли к оставшимся 5 мл образца во вставке колонки и центрифугировали снова, пока объем образца не был уменьшен до 4 мл. Затем конъюгированные образцы добавляли в 10 мл колонку 7K Zeba (Pierce), приготовленную, как описано выше, а затем центрифугировали в течение 2 мин при 1000 g.

Конъюгированные образцы IGF1R-3-Gal затем прогоняли в 16% или 10% SDS-PAGE невосстанавливающим геле и окрашивали серебром, чтобы подтвердить изменения молекулярной массы после конъюгации. Реакцию титровали до достижения соотношения ~ от 1 до 2 молекул Галанина на V_{НН}. Результаты подтверждали присоединение Галанина к IGF1R-3 V_{НН} (см. Фиг. 8 В).

Удаление эндотоксина и определение уровней эндотоксина: эндотоксины были удалены с помощью Amicon Ultra колонок для центрифугирования с целлюлозной мембраной (Millipore), отсекающих молекулярную массу (MWCO). В первую очередь 15 мл образца V_{НН} пропускали через колонку Amicon-15-50K MWCO центрифугированием при 4000 g в течение 10 минут; элюировали и собирали. Этот продукт элюирования затем добавляли в колонку Amicon-15-10K MWCO и центрифугировали при 4000 g 7-10 минут, что приводило к уменьшению объема супернатанта с 15 мл до 7,5 мл. Объем супернатанта в колонке регулировали обратно до 15 мл, добавляя PBS. Колонку центрифугировали снова, как описано выше. Супернатант собирали и уровни эндотоксина измеряли системой EndoSafe-PTS с использованием картриджей с диапазоном чувствительности 10-0,1 EU/мл (единиц эндотоксина на единицу) (Charles River Laboratories International). 25 мкл образца загружали в каждую из 4 лунок на картридже и разбавляли при необходимости. Только образцы с EU менее 1 на 1 мг были использованы для

исследований на животных.

Пример 12: Транспорт IGF1R-3-Gal с использованием модели Харгривса

Для того, чтобы оценить, переносится ли IGF1R-3-Gal (Пример 11) через гематоэнцефалический барьер, был использован ранее описанный в международной патентной публикации WO 2011/127580 анализ *in vivo*.

Была использована крысиная модель воспалительной гипералгезии, схожая с описанной у Hargreaves et al. (1988). Животных содержали в группах по три (модель Харгривса) в полипропиленовой клетке и предоставляли свободный доступ к пище и воде. Эксперименты проводились в 12 ч свето-темновом цикле при температуре 24 °C и относительной влажности 50 ± 5%. Все процедуры на животных были одобрены Комитетом по уходу за животными и находились в соответствии с руководствами Канадского совета по уходу за животными.

В этой модели самцам крыс линии Wistar 6-8 недельного возраста (диапазон веса 230-250 г) вводили небольшие объемы (100 мкл иглой 30-го калибра) адьюванта Фройнда (CFA, убитые нагреванием *M. tuberculosis* (Sigma), суспендированные в эмульсии масло:физиологический раствор 1:1) в правую заднюю лапу под неглубокой изофлурановой анестезией (3%). CFA индуцировал высвобождение провоспалительных веществ, которые активировали ноцирецепторы и создавали состояние хронической боли и гипералгезию (повышенная чувствительности к вредному теплу). Задержку отдергивания лапы измеряли с помощью применения лучевого стимула в плантарной поверхности обеих задних лап (воспаленная и невоспаленная контрольная лапа), используя плантарное устройство Анальгезиометр для стимуляции лапы (IITC Model # 336TG Life Science, Inc.). Время, затраченное животным на ответное облизывание или встряхивание лапы, было интерпретировано как положительный ответ (Задержка отдергивания лапы). Интенсивность света лампы была скорректирована, чтобы выявить базовые задержки отдергивания лапы от 17 до 20 с в обеих задних лапах перед введением CFA. Если ответ не происходил в течение 20 секунд, световой луч автоматически выключался во избежание повреждения тканей и лапе присваивался максимальный балл.

Через два дня после инъекции CFA и до введения соединений, животных

акклиматизировали в устройстве анальгезиометра в течение по меньшей мере 60 мин с целью уменьшения стресса и предотвращения ложных положительных ответов. Базовые условия были измерены в обеих лапах, чтобы проверить развитую боль (тепловая гипералгезия); невоспаленная лапа был использована в качестве контроля в сравнении с инъецированной лапой. Животные с задержкой отдергивания лапы более чем 6 с для "воспаленной лапы" и менее чем 17 с для "нормальной лапы", были исключены из эксперимента.

Для того, чтобы определить, переносится ли IGF1R-3-Gal через гематоэнцефалический барьер и может ли связываться с рецепторами-мишенями (GalR1 и 2) в паренхиме головного мозга, крысы получали одну инъекцию в хвостовую вену IGF1R-3-Галанина (2,93 мг / кг или 5,85 мг / кг; EU эндотоксина менее 1) или контрольного соединения через три дня после инъекции CFA. Задержку отдергивания лапы (PWL) тестировали для каждой задней лапы (воспаленных и невоспаленных) каждые 15 мин в течение 3-х часов. Увеличение задержки отдергивания лапы указывало на успешную индукцию анальгезии, которая может быть достигнута только путем успешной доставки Галанина в паренхиму головного мозга с помощью IGF1R-3. Галанин может вызвать анальгезию, только когда присутствует в паренхиме головного мозга и сам по себе не может пересечь неповрежденный ГЭБ (Robertson et al., 2011).

Результаты были проанализированы как временные динамики задержек отдергивания лапы (PWL, сек) в зависимости от времени (мин или ч) (Фиг. 9 А). Фиг. 9 В показывает те же результаты в виде площади под кривой (AUC) и сравнивает его с % от максимально возможного эффекта (% MPE). Фиг. 9 С показывает, что повторное впрыскивание той же дозы IGF1R3-Галанина через 1 час после окончания анальгетического ответа от первой инъекции производит подобный анальгетический ответ как и первая инъекция.

Результаты показывают, что внутривенное введение Галанина не уменьшало боль по сравнению с PBS. В отличие от этого, одна инъекция FC5-Gal или IGF1R3-Gal производило измеримый анальгетический эффект, что дает основание полагать, что V_{HH} переносил Галанин через ГЭБ, чтобы произвести анальгетическое действие путем связывания с GalR1 и/или 2 в паренхиме головного мозга. Эффект IGF1R-3-Gal является дозозависимым и значительно более выраженным, чем

индуцированный FC5-Gal, что дает основание полагать, что рецептор IGF1R имеет более высокий уровень транспорта через ГЭБ, чем предполагаемый FC5 рецептор. Повторное дозирование производит подобный анальгетический ответ, что предлагает быстрый оборот (производительность) переносчика рецептора IGF1R. Результаты показывают, что IGF1R-3 V_{HH} может "переносить" молекулы по меньшей мере 3000 Да через ГЭБ с использованием пути рецепторно-опосредованного трансцитоза (комбинированная MW конъюгата антитело-пептид составляет около 18 кДа). Активный, рецепторно-опосредованный транспорт необходим, так как известно, что ГЭБ предотвращает прохождение всех гидрофильных молекул больше 0,5 кДа.

Пример 13: Иммунодетекция IGF1R-3-mFc

Для того, чтобы убедиться, что высокие уровни IGF1R-3Fc, обнаруженные в спинномозговой жидкости после периферического введения, происходят по меньшей мере частично из внеклеточного пространства паренхимы, другими словами, что неповрежденный конструктор пересекает ГЭБ, была проведена иммунодетекция IGF1R-3-mFc в мозге крысы.

Вкратце, мозг животных собирали сразу после перфузии животных PBS через 24 ч после введения 6 мг/кг в хвостовую вену IGF1R-3-mFc или A20.1mFc. Мозг замораживали и разрезали на криотоме на 12 мкм секции. Секции выдерживали в течение 10 мин при RT в 100% метаноле, отмывали 3 раза в PBS и инкубировали в течение 1 ч в 10% нормальной козьей сыворотке (NGS), содержащей 0,3% Тритон X-100 в 1x PBS. Козий анти-M-IgG FCY-Cy3 (Cat#115-165-071, Jackson Immuno Research, lot#106360) 1:200 в 5% NGS, содержащей 0,3% Тритон X-100 в 1x PBS, инкубировали в течение ночи при 4 °C. Секции промывали три раза в 1x PBS, затем добавляли лектин для окрашивания сосудистой системы RCAI (Cat # FL-1081, Vector) 1: 500 в 1xPBS в течение 10 мин. После промывки три раза 1xPBS секции покрывали покровным стеклом во флуоресцентной закрепляющей среде Dako (Cat # S3023, Dako) и к ним добавляли 2 мкг/мл Hoechst (Cat # H3570, Invitrogen) для окрашивания ядер. Фотографии делали с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus 1X81 с использованием 10X и 60X объективов и каналов, как показано в Таблице 3.

Таблица 3. Объективы и каналы, использованные во флуоресцентной

микроскопии

	Флуоресцентная молекула	Возбуждение (нм)	Эмиссия (нм)
RCAl-сосуды	FITC	495	518
Hoechst33342-ядра	Hoechst	350	461
IGF1R-3-m-Fc	Cy3	531	593

Результаты показаны на Фиг. 10. Иммунодетекция мышинового Fc показала сильное окрашивание сосудов головного мозга в различных участках головного мозга, а также окрашивание периваскулярной паренхимы мозга, что указывает на то, что IGF1R-3Fc накапливался в сосудах головного мозга, а также переносился через ГЭБ в окружающую паренхиму мозга. Напротив, mFc-специфичное окрашивание не было обнаружено у A20.1mFc инъецированных животных. Полученные результаты подтверждают утверждение, что повышенные уровни IGF1R-3FC в СМЖ свидетельствуют о прохождении конструктора через ГЭБ. Это дополнительно существенно подтверждается наблюдением, что Галанин, связанный с IGF1R-3, индуцировал фармакологическую реакцию (анальгезия) на паренхимальных GalR1 и GalR2 рецепторах. В совокупности, результаты прохождения через ГЭБ *in vitro*, результаты фармакокинетики *in vivo* (уровни в сыворотке/СМЖ) и результаты фармакодинамики (модель Харгривса) показывают, что IGF1R-3 V_HN переносится через неповрежденный ГЭБ значительно более высокими темпами, чем другие V_HN путем активного рецепторно-опосредованного трансцитоза, вызванного его связыванием с эпитопами IGF1R, и что он может "переносить" неспособные в ином случае проникать через ГЭБ молекулы (1-80 кДа).

Пример 14: IGF1R-3 влияние на "физиологическую" функцию IGF1R

С точки зрения безопасности, важно показать, что антитело согласно изобретению не мешают физиологической функции рецептора - т.е., передаче сигнала, индуцированной его природным лигандом, IGF-1- при связывании его рецептора для доставки лекарственных средств с помощью рецепторно-опосредованного трансцитоза. С учетом этого, важно продемонстрировать, что IGF1R-3 V_HN или IGF1R-3-mFc не мешают физиологической передаче сигналов через IGF1R или инсулиновый рецептор (IR), индуцированной их природными лигандами.

Для того, чтобы определить, индуцирует ли IGF1R-3 передачу сигнала через IGF1R или IR по отдельности, или мешает передаче сигнала, стимулируемой

природными лигандами рецептора, IGF-1 или инсулином, было определено их влияние на фосфорилирование самих рецепторов или рецептор-стимулированной прямой киназы, протеинкиназы B, в SV-ARBEС клетках.

SV-ARBEС клетки выращивали для слияния в основной среде M199, дополненной пептоном, D-глюкозой, BME (основная питательная среда Игла) аминокислотами, BME витаминами, раствором антибиотика/антимикотика и фетальной бычьей сывороткой в соответствии с известными способами. Клетки переносили в бессывороточную среду за 18 ч до обработки. IGF1R-3 V_HH или IGF1R-3-Fc слияния (100 нМ или 500 нМ) добавляли к клеткам за 1 ч до добавления 200 нг/мл IGF-1, 10 мкл/мл инсулина или носителя. Клетки инкубировали с лигандами или носителем в течение 20 минут, а затем дважды промывали в сбалансированном солевом растворе Хэнка. Затем клетки лизировали с использованием буфера 1x RIPA (буфер для радиоиммунопреципитации) (Cell Signaling Technology), дополненного 1% Тритон-Х 100 и ингибиторами протеаз (Sigma). Клетки подвергали 2 x 20 с импульсам в водяной бане ультразвуковым и лизаты очищали центрифугированием при 14,000 об/мин в течение 10 минут. Концентрацию белка определяли с помощью системы анализа белка DC (Bio-Rad Laboratories). Равные по мкм образцы белка были разделяли в 4-20% градиентном SDS полиакриламидном геле при 125 В и переносили на PVDF (поливинилиден фторид) мембрану. Фосфо-протеинкиназу B (Ser 473) определяли с помощью инкубации в течение ночи при разведении 1:1000 первичного антитела против данной мишени (технология клеточной передачи сигнала), с последующей инкубацией со вторичным козьим антителом против кроличьего IgG-HRP, с последующим взаимодействием с ECL Plus реагентом и визуализацией на автордиографической пленке. Значения денситиометрии были определены с использованием программного обеспечения Un-Scan-LT (Silk Scientific Inc.).

Результаты показаны на Фиг. 11. Вестерн-блоттинг фосфорилирования протеинкиназы B показал, что IGF1R-3 не ингибирует фосфорилирование протеинкиназы B, индуцированное 10 мкг/мл инсулина или 200 нг/мл IGF-1 при совместном применении с 100 нМ IGF1R -3 или IGF1R-3-mFc или 500 нМ IGF1R-3-mFc. V_HH или Fc слияния также не индуцировали сами по себе передачу сигнала протеинкиназой B (Фиг. 11 А, 11 В и 11 С, с надписью "-5"). Результаты показывают, что даже в бивалентном отображении в формате Fc слияния IGF1R-3 не вызывает

димеризацию рецептора и прямую передачу сигнала, и, следовательно, не нарушает функцию рецептора в присутствии природного лиганда. Эта особенность IGF1R-3 ("молчаливое связывание") имеет важное значение для его применения в качестве переносчика терапевтических агентов через ГЭБ, так как она дает благоприятный профиль безопасности.

Варианты осуществления и примеры, описанные здесь, являются иллюстративными и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения, как заявлено. Вариации вышеописанных вариантов осуществления, включая альтернативы, модификации и эквиваленты, охватываются по намерению авторов изобретения формулой изобретения. Кроме того, описанная совокупность признаков может не являться необходимой для изобретательского решения.

Ссылки

Все патенты, патентные заявки и публикации, упомянутые в настоящем документе и во всей заявке, включены в данное описание в качестве ссылки.

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 transmigrating single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J Neurochem.* 2005 Nov;95(4):1201-14.

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., Hiramata, 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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

Lin, J. H. CSF as a surrogate for assessing CNS exposure: an industrial perspective, *Curr. Drug Metab* 2008, 9, 46-59.

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 transmigrate across human blood-brain barrier endothelium. *FASEB J.* 2002 Feb;16(2):240-2.

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.

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.

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.

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.

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.

Riissmann, 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)

Shen, D. D.; Artru, A. A.; Adkison, K. K. Principles and applicability of CSF sampling for the assessment of CNS drug delivery and pharmacodynamics, Adv. Drug Deliv. Rev. 2004, 56, 1825-1857.

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.

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.

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.

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.

Zhang, J., Tanha, J., Hiram, 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.

Европейский патент № 519596

Европейский патент № 626390

Патент США № 5693761

Патент США № 5766886

Патент США № 5821123

Патент США № 5859205

Патент США № 5869619

Патент США № 6054297

Патент США № 6180370

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> НЭШНЛ РИСЕЧ КАУНСИЛ ОФ КАНАДА
СТАНИМИРОВИЧ, Даника
КЕММЕРИЧ, Кристин
СУЛЕА, Трайан
АРБАБИ-ГАРУДИ, Меди
ХАККАНИ, Арсалан
ЖИЛЬБЕР, Рено
МАССИ, Бернар

<120> АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧЕСКИЕ К РЕЦЕПТОРУ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 1, И
ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> 12596-98

<150> 61/948,808

<151> 2014-03-06

<160> 41

<170> Версия PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> IGF1R-3 CDR1

<400> 1

Glu Tyr Pro Ser Asn Phe Tyr Ala
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> IGF1R-3 CDR2

<400> 2

Val Ser Arg Asp Gly Leu Thr Thr
1 5

<210> 3

<211> 20

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> IGF1R-3 CDR3

<400> 3

Ala Ile Val Ile Thr Gly Val Trp Asn Lys Val Asp Val Asn Ser Arg
1 5 10 15

Ser Tyr His Tyr
20

<210> 4
<211> 127
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGF1R-3 консенсусная

<220>
<221> Область интереса
<222> (1)..(1)
<223> Хаа Glu или Gln

<220>
<221> Область интереса
<222> (3)..(3)
<223> Хаа Lys или Gln

<220>
<221> Область интереса
<222> (5)..(5)
<223> Хаа Val или Glu

<220>
<221> Область интереса
<222> (14)..(14)
<223> Хаа Ala или Pro

<220>
<221> Область интереса
<222> (23)..(23)
<223> Хаа Val или Ala

<220>
<221> Область интереса
<222> (37)..(37)
<223> Хаа Val или Phe

<220>
<221> Область интереса
<222> (44)..(44)
<223> Хаа Gly или Glu

<220>
<221> Область интереса
<222> (45)..(45)
<223> Хаа Leu или Arg

<220>
<221> Область интереса
<222> (47)..(47)
<223> Хаа Phe или Trp

<220>
<221> Область интереса
<222> (49)..(49)
<223> Хаа Ala или Ser

<220>
<221> Область интереса
<222> (70)..(70)
<223> Xaa Met или Ile

<220>
<221> Область интереса
<222> (75)..(75)
<223> Xaa Ala или Ser

<220>
<221> Область интереса
<222> (79)..(79)
<223> Xaa Leu или Val

<220>
<221> Область интереса
<222> (80)..(80)
<223> Xaa Asp или Tyr

<220>
<221> Область интереса
<222> (86)..(86)
<223> Xaa Val или Leu

<220>
<221> Область интереса
<222> (87)..(87)
<223> Xaa Lys или Arg

<220>
<221> Область интереса
<222> (122)..(122)
<223> Xaa Gln или Leu

<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 Ala Ser Glu Tyr Pro Ser Asn Phe Tyr
20 25 30

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

Xaa Gly Val Ser Arg Asp Gly Leu Thr Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ile Val Ile Thr Gly Val Trp Asn Lys Val Asp Val Asn Ser Arg
100 105 110

Ser Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 5
<211> 127
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGF1R-3 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 Val Ala Ser Glu Tyr Pro Ser Asn Phe Tyr
20 25 30

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

Ala Gly Val Ser Arg Asp Gly Leu Thr Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Asp
65 70 75 80

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

Ala Ile Val Ile Thr Gly Val Trp Asn Lys Val Asp Val Asn Ser Arg
100 105 110

Ser Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 6
<211> 127
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGF1R-3_H1

<400> 6

Glu 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 Ala Ser Glu Tyr Pro Ser Asn Phe Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Val Ser Arg Asp Gly Leu Thr Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Ser Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 7

<211> 127

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> IGF1R-3_H2

<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 Ala Ser Glu Tyr Pro Ser Asn Phe Tyr
20 25 30

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

Ala Gly Val Ser Arg Asp Gly Leu Thr Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Met 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 Ile Val Ile Thr Gly Val Trp Asn Lys Val Asp Val Asn Ser Arg
100 105 110

Ser Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

125

<210> 8
<211> 127
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGF1R-3_H3

<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 Ala Ser Glu Tyr Pro Ser Asn Phe Tyr
20 25 30

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

Ala Gly Val Ser Arg Asp Gly Leu Thr Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Met 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 Ile Val Ile Thr Gly Val Trp Asn Lys Val Asp Val Asn Ser Arg
100 105 110

Ser Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 9
<211> 127
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGF1R-3_H4

<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 Ala Ser Glu Tyr Pro Ser Asn Phe Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35

40

45

Ala Gly Val Ser Arg Asp Gly Leu Thr Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Met 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 Ile Val Ile Thr Gly Val Trp Asn Lys Val Asp Val Asn Ser Arg
100 105 110

Ser Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 10
<211> 127
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGF1R-3_H5

<400> 10

Glu 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 Ala Ser Glu Tyr Pro Ser Asn Phe Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Val Ser Arg Asp Gly Leu Thr Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Ser Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 11
<211> 373
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGF1R-3 консенсусный-Fc слияние

<220>
<221> Область интереса
<222> (1)..(1)
<223> Xaa Glu или Gln

<220>
<221> Область интереса
<222> (3)..(3)
<223> Xaa Lys или Gln

<220>
<221> Область интереса
<222> (5)..(5)
<223> Xaa Val или Glu

<220>
<221> Область интереса
<222> (14)..(14)
<223> Xaa Ala или Pro

<220>
<221> Область интереса
<222> (23)..(23)
<223> Xaa Val или Ala

<220>
<221> Область интереса
<222> (37)..(37)
<223> Xaa Val или Phe

<220>
<221> Область интереса
<222> (44)..(44)
<223> Xaa Gly или Glu

<220>
<221> Область интереса
<222> (45)..(45)
<223> Xaa Leu или Arg

<220>
<221> Область интереса
<222> (47)..(47)
<223> Xaa Phe или Trp

<220>
<221> Область интереса
<222> (49)..(49)
<223> Xaa Ala или Ser

<220>
<221> Область интереса
<222> (70)..(70)
<223> Xaa Met или Ile

<220>
<221> Область интереса
<222> (75)..(75)
<223> Xaa Ala или Ser

<220>
<221> Область интереса
<222> (79)..(79)
<223> Xaa Leu или Val

<220>
<221> Область интереса
<222> (80)..(80)
<223> Xaa Asp или Tyr

<220>
<221> Область интереса
<222> (86)..(86)
<223> Xaa Val или Leu

<220>
<221> Область интереса
<222> (87)..(87)
<223> Xaa Lys или Arg

<220>
<221> Область интереса
<222> (122)..(122)
<223> Xaa Gln или Leu

<400> 11

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 Ala Ser Glu Tyr Pro Ser Asn Phe Tyr
20 25 30

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

Xaa Gly Val Ser Arg Asp Gly Leu Thr Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ile Val Ile Thr Gly Val Trp Asn Lys Val Asp Val Asn Ser Arg
100 105 110

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

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

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

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

Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu
 325 330 335

Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn
 340 345 350

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

Arg Ser Pro Gly Lys
 370

<210> 12
<211> 375
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGF1R-3-Fc fusion

<400> 12

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

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

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

Phe Val Ala Gly Val Ser Arg Asp Gly Leu Thr Thr Leu Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Ser Arg Ser Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Met Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr
130 135 140

Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro
145 150 155 160

Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys
165 170 175

Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val
180 185 190

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

Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr

210

215

220

Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
225 230 235 240

Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu
245 250 255

Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg
260 265 270

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

Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp
290 295 300

Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys
305 310 315 320

Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser
325 330 335

Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser
340 345 350

Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr
355 360 365

Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 13
<211> 1367
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGF1R

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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> 14
<211> 4
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Сайт расщепления фурином

<400> 14

Arg Lys Arg Arg
1

<210> 15
<211> 33
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Прямой праймер

<400> 15
cgggatccgc caccatgaag tctggctccg gag

33

<210> 16
<211> 34
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Обратный праймер

<400> 16
gctctagatc agaagttttc atatcctggt ttgg

34

<210> 17
<211> 45
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> MJ1 праймер

<400> 17

gcccagccgg ccatggccsm kgtgcagctg gtggaktctg gggga 45

<210> 18

<211> 45

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> MJ2 праймер

<400> 18

gcccagccgg ccatggccsa ggtaaagctg gaggagtctg gggga 45

<210> 19

<211> 45

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> MJ3 праймер

<400> 19

gcccagccgg ccatggccsa ggctcaggta cagctgggtgg agtct 45

<210> 20

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> SN2 праймер

<400> 20

cgccatcaag gtaccagttg a 21

<210> 21

<211> 29

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> SN2b3 праймер

<400> 21

ggggtacstg tcatccacgg assagctga 29

<210> 22

<211> 34

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> MJ7 праймер

<400> 22

catgtgtaga ctccggccs agccggccat ggcc 34

<210> 23

<211> 47
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> MJ8 праймер

<400> 23
catgtgtaga ttcctggccg gcctggcctg aggagacggt gacctgg 47

<210> 24
<211> 38
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Прямой праймер

<400> 24
tatgaagaca ccaggcccaag gtaaagctgg aggagtct 38

<210> 25
<211> 30
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Обратный праймер

<400> 25
ttgttcggat cctgaggaga cggtgacctg 30

<210> 26
<211> 8
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGF1R-3 пептид

<400> 26

Glu Phe Val Ala Gly Val Ser Arg
1 5

<210> 27
<211> 19
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGF1R-3 пептид

<400> 27

Leu Ser Cys Val Ala Ser Glu Tyr Pro Ser Asn Phe Tyr Ala Met Ser
1 5 10 15

Trp Phe Arg

<210> 28
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGF1R-3 пептид

<400> 28

Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Val Lys
1 5 10

<210> 29
<211> 20
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGF1R-3 пептид

<400> 29

Ser Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
1 5 10 15

Ser Glu Gln Lys
20

<210> 30
<211> 15
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FC5 и FC5-ILIS пептид

<400> 30

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

<210> 31
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> A20.1 пептид

<400> 31

Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5

<210> 32

<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> A20.1 пептид

<400> 32

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

<210> 33
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> A20.1 пептид

<400> 33

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

<210> 34
<211> 26
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> A20.1 пептид

<400> 34

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> 35
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> EG2 пептид

<400> 35

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

<210> 36
<211> 16
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> EG2 пептид

<400> 36

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

<210> 37

<211> 32

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> EG2 пептид

<400> 37

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> 38

<211> 14

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Альбуминовый пептид

<400> 38

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

<210> 39

<211> 39

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Галанин-cys

<400> 39

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 Cys Tyr Ser
20 25 30

Thr Glu Ala Met Ile Asp Glu
35

<210> 40

<211> 19
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Сигнальный пептид

<400> 40

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

Val Gln Cys

<210> 41
<211> 374
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Fc-IGF1R-3 консенсусное слияние

<220>
<221> Область интереса
<222> (248)..(248)
<223> Xaa Glu или Gln

<220>
<221> Область интереса
<222> (250)..(250)
<223> Xaa Lys или Gln

<220>
<221> Область интереса
<222> (252)..(252)
<223> Xaa Val или Glu

<220>
<221> Область интереса
<222> (261)..(261)
<223> Xaa Ala или Pro

<220>
<221> Область интереса
<222> (270)..(270)
<223> Xaa Val или Ala

<220>
<221> Область интереса
<222> (284)..(284)
<223> Xaa Val или Phe

<220>
<221> Область интереса
<222> (291)..(291)
<223> Xaa Gly или Glu

<220>
<221> Область интереса
<222> (292)..(292)

<223> Хаа Leu или Arg
 <220>
 <221> Область интереса
 <222> (294)..(294)
 <223> Хаа Phe или Trp
 <220>
 <221> Область интереса
 <222> (296)..(296)
 <223> Хаа Ala или Ser
 <220>
 <221> Область интереса
 <222> (317)..(317)
 <223> Хаа Met или Ile
 <220>
 <221> Область интереса
 <222> (322)..(322)
 <223> Хаа Ala или Ser
 <220>
 <221> Область интереса
 <222> (326)..(326)
 <223> Хаа Leu или Val
 <220>
 <221> Область интереса
 <222> (327)..(327)
 <223> Хаа Asp или Tyr
 <220>
 <221> Область интереса
 <222> (333)..(333)
 <223> Хаа Val или Leu
 <220>
 <221> Область интереса
 <222> (334)..(334)
 <223> Хаа Lys или Arg
 <220>
 <221> Область интереса
 <222> (369)..(369)
 <223> Хаа Gln или Leu
 <400> 41

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

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 Ala Ser
 260 265 270

Glu Tyr Pro Ser Asn Phe Tyr Ala Met Ser Trp Xaa Arg Gln Ala Pro
 275 280 285

Gly Lys Xaa Xaa Glu Xaa Val Xaa Gly Val Ser Arg Asp Gly Leu Thr
 290 295 300

Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Xaa Ser Arg Asp
 305 310 315 320

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

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ile Val Ile Thr Gly Val Trp Asn
340 345 350

Lys Val Asp Val Asn Ser Arg Ser Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
355 360 365

Xaa Val Thr Val Ser Ser
370

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент, специфически связывающееся с эпитопом рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R), где антитело или его фрагмент проходит гематоэнцефалический барьер, и где эпитоп специфически связывается с антителом с последовательностью SEQ ID NO:5.

2. Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент, содержащее последовательность области, определяющей комплементарность (CDR) 1 EYPSNFYA (SEQ ID NO:1); последовательность CDR2 VSRDGLTT (SEQ ID NO:2); и последовательность CDR3 AIVITGVWVKVDVNSRSYHY (SEQ ID NO:3),

где указанное антитело или его фрагмент является специфическим для рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R).

3. Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент по п.1 или п. 2, содержащее последовательность

$X_1VX_2LX_3ESGGGLVQX_4GGSLRLSCX_5ASEYPSNFYAMSWX_6RQAPGKX_7X_8EX_9VX_{10}GVSRDGLTTLYADSVKGRFTX_{11}SRDNX_{12}KNTX_{13}X_{14}LQMNSX_{15}X_{16}AEDTAVYYCAIVITGVWVKVDVNSRSYHYWGQGTGX_{17}VTVSS$ (SEQ ID NO:4), где X_1 представляет собой E или Q; X_2 представляет собой K или Q; X_3 представляет собой V или E; X_4 представляет собой A или P; X_5 представляет собой V или A; X_6 представляет собой F или V; X_7 представляет собой E или G; X_8 представляет собой R или L; X_9 представляет собой F или W; X_{10} представляет собой A или S; X_{11} представляет собой M или I; X_{12} представляет собой A или S; X_{13} представляет собой V или L; X_{14} представляет собой D или Y; X_{15} представляет собой V или L; X_{16} представляют собой K или R; и X_{17} представляют собой Q или L,

или по существу идентичную ей последовательность.

4. Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-3, содержащее последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVASEYPSNFYAMSWFRQAPGKEREFVAGVS
RDGLTTLYADSVKGRFTMSRDNAKNTVDLQMNSVKAEDTAVYYCAIVITGVWN
KVDVNSRS YHYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5),

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWVRQAPGKGLEWVSGV
SRDGLTTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVITGVWN
KVDVNSRS YHYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:6),

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWVRQAPGKGLEWVAGV
SRDGLTTLYADSVKGRFTMSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVITGVW
NKVDVNSR SYHYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:7),

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWFRQAPGKGLEFVAGVS
RDGLTTLYADSVKGRFTMSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVITGVWN
KVDVNSRS YHYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:8),

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWFRQAPGKEREFVAGVS
RDGLTTLYADSVKGRFTMSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVITGVWN
KVDVNSR SYHYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:9), и

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWFRQAPGKEREFVSGVS
RDGLTTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVITGVWNK
VDVNSRSY HYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:10),

или по существу идентичной им последовательности.

5. Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-4, где антитело представляет собой однодоменное антитело (sdAb).

6. Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент по п. 5, где sdAb имеет верблюжье происхождение.

7. Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент по любому из пп.1-6, где антитело или его фрагмент находятся в формате мультивалентного отображения.

8. Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент по п. 7, где антитело или его фрагмент связаны с фрагментом Fc.

9. Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент по п. 8, где фрагмент Fc является мышинным Fc2b или человеческим Fc1.

10. Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент по п. 9, содержащее последовательность SEQ ID NO:11, 41 или 12.

11. Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 2-10, где выделенное или очищенное антитело или его фрагмент проходит через гематоэнцефалический барьер.

12. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая выделенное или очищенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-11.

13. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 12.

14. Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-13, где антитело или его фрагмент иммобилизованы на поверхность.

15. Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-13, где антитело или его фрагмент связаны с молекулой груза.

16. Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент по п. 15, где молекула груза имеет молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 200 кДа.

17. Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент по п. 15 или п. 16, где молекула груза представляет собой детектируемый агент, терапевтический агент, лекарственное средство, пептид, фактор роста, цитокин, ловушку рецептора, химическое соединение, углеводный фрагмент, фермент, антитело или его фрагмент, молекулу на основе ДНК, вирусный вектор или цитотоксическое средство; одну или несколько липосом или наноносителей, загруженных детектируемым агентом, терапевтическим агентом, лекарственным средством,

пептидом, ферментом, антителом или его фрагментом, молекулой на основе ДНК, вирусным вектором или цитотоксическим агентом; или одну или более наночастицу, нанопровод, нанотрубку или квантовые точки.

18. Композиция, содержащая одно или более чем одно выделенное или очищенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-11 и 14-17 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

19. *In vitro* способ детектирования IGF1R, включающий
а) контактирование образца ткани с одним или более чем одним выделенным или очищенным антителом или его фрагментом по любому из пп. 1 - 11, связанным с детектируемым агентом; и
б) детектирование детектируемого агента, связанного с антителом или его фрагментом, связанным с IGF1R в образце ткани.

20. Способ по п. 19, где образец представляет собой образец сыворотки, образец сосудистой ткани, образец опухолевой ткани или образец ткани мозга человека или животного.

21. Способ по п. 19 или п. 20, где стадию детектирования (стадию б) осуществляют с помощью оптической визуализации, иммуногистохимии, молекулярной диагностической визуализации, ELISA (иммуно-ферментного анализа), визуализирующей масс-спектрометрии или другого подходящего способа.

22. *In vivo* способ детектирования экспрессии IGF1R у субъекта, включающий:
а) введение одного или более чем одного выделенного или очищенного антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-13, связанного с детектируемым агентом, субъекту; и
б) детектирование детектируемого агента, связанного с антителом или его фрагментом, связанным с IGF1R.

23. Способ по п. 22, где стадию детектирования (стадию б)) выполняют с помощью PET (позитронной эмиссионной томографии), SPECT (однофотонной эмиссионной компьютерной томографии), флуоресцентной визуализации или любого другого

подходящего способа.

24. Способ транспортировки молекулы груза через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), включающий:

а) введение одного или более чем одного выделенного или очищенного антитела или его фрагмента по п. 11, связанного с молекулой груза, субъекту,

где одно или более чем одно антитело или его фрагмент переносит молекулу груза через ГЭБ.

25. Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент по п. 24, где молекула груза имеет молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 200 кДа.

26. Способ по п. 24 или п. 25, где молекула груза представляет собой детектируемый агент, терапевтический агент, лекарственное средство, пептид, фактор роста, цитокин, ловушку рецептора, химическое соединение, углеводный фрагмент, фермент, антитело или его фрагмент, молекулу на основе ДНК, вирусный вектор, или цитотоксическое средство; одну или несколько липосом или наноносителей, загруженных детектируемым агентом, терапевтическим агентом, лекарственным средством, пептидом, ферментом, антителом или его фрагментом, молекулой на основе ДНК, вирусным вектором или цитотоксическим агентом; или одну или более наночастицу, нанопровод, нанотрубку или квантовые точки.

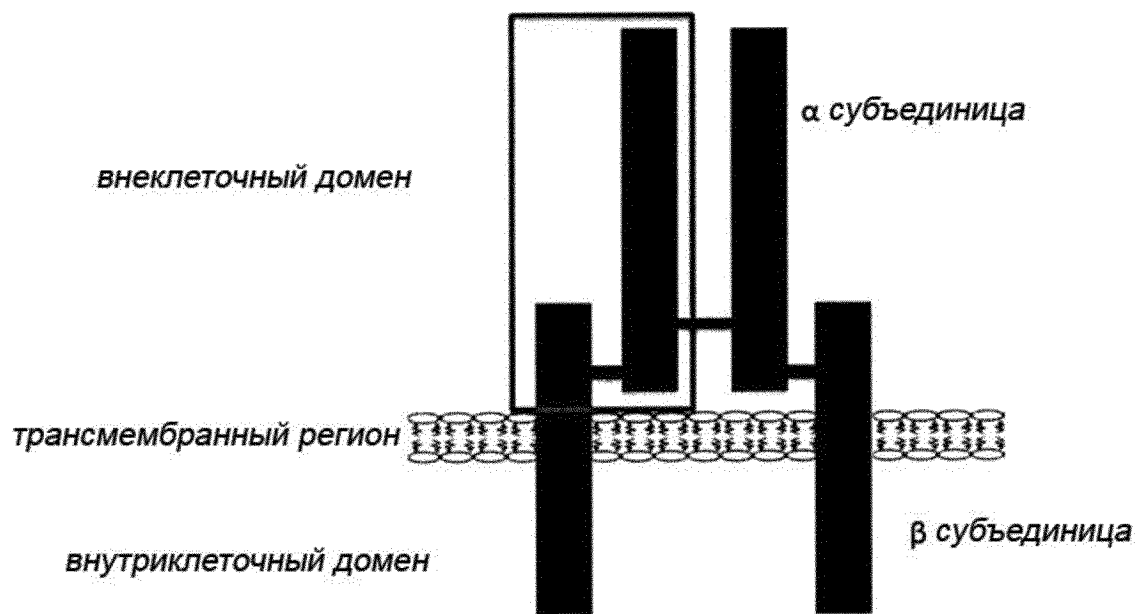
27. Способ по любому из любому из пп. 24-26, где введение осуществляют внутривенно (IV), подкожно (SC) или внутримышечно (IM).

28. Способ количественного определения количества молекулы груза, доставляемой через ГЭБ субъекта, где молекула груза связана с одним или более чем одним выделенным или очищенным антителом или его фрагментом по п. 11, причем способ включает

а) сбор спинномозговой жидкости (СМЖ) у субъекта; и

б) использование целевых методов протеомики для определения количества молекулы груза, связанной с одним или более чем одним выделенным или очищенным антителом или его фрагментом в СМЖ.

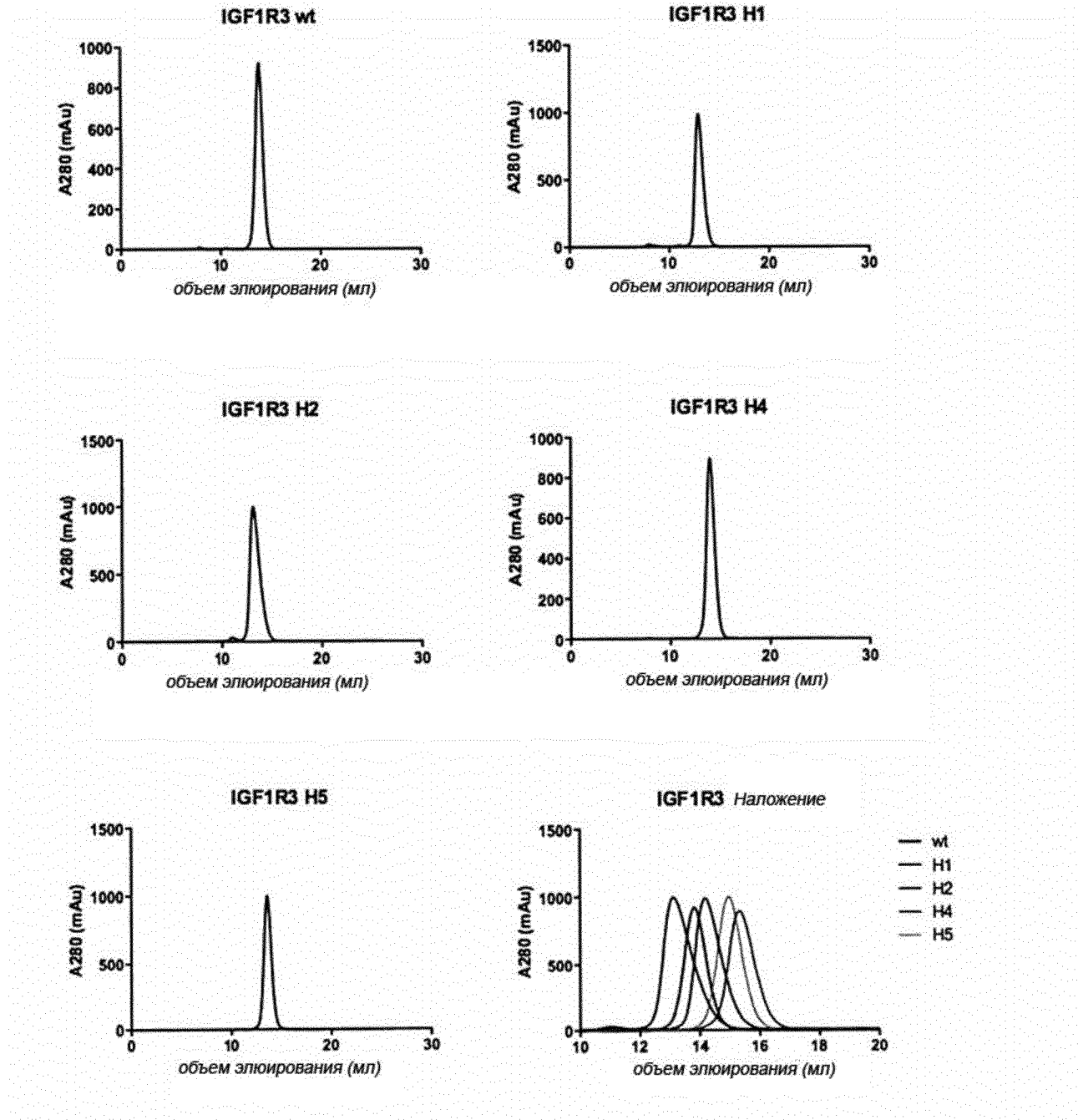
Фиг. 1



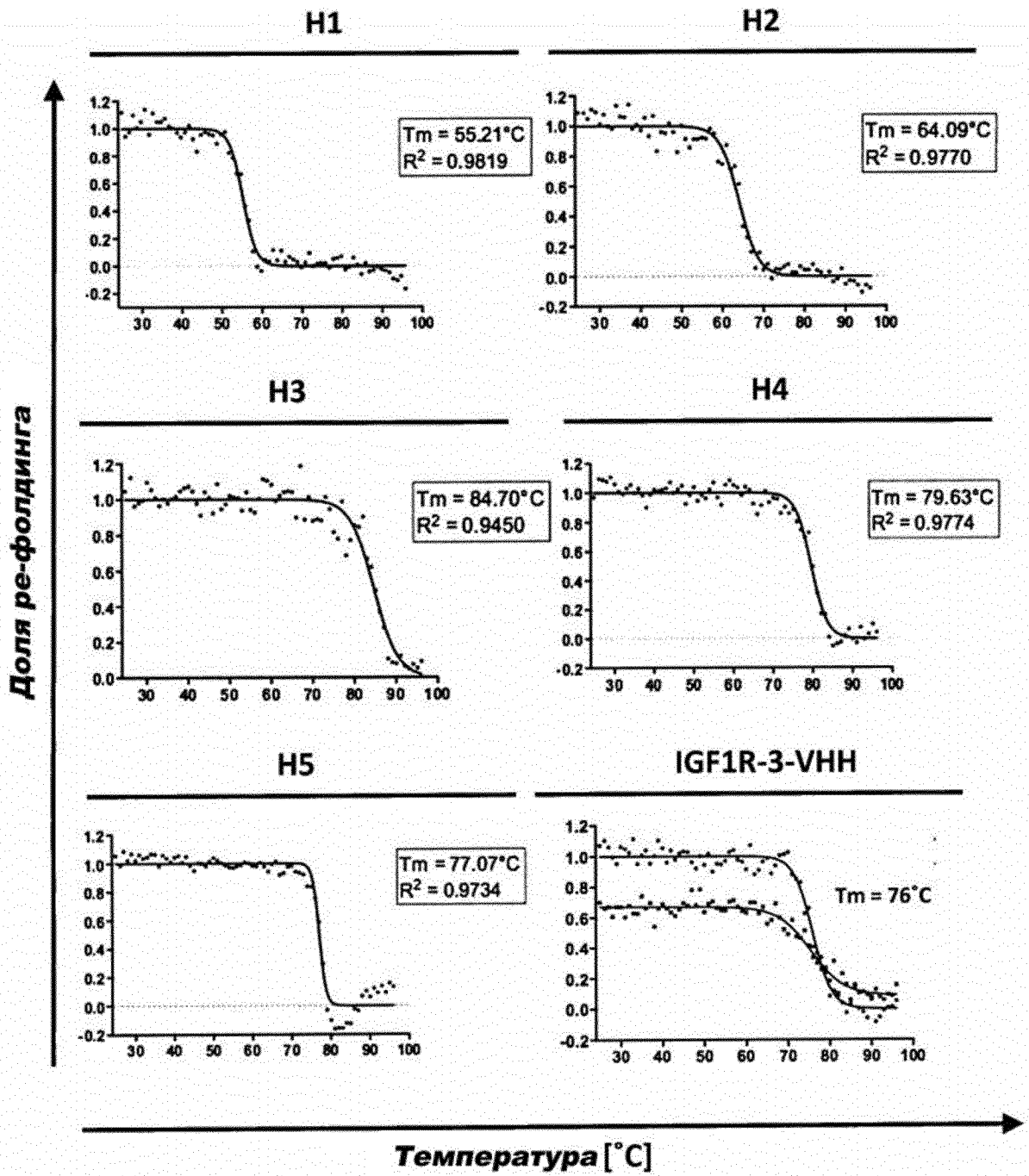
Фиг. 2

MKSGSGGGSP	TSLWGLLFLS	AALSLWPTSG	EICGPGIDIR	NDYQQLKRLE	NCTVIEGYLH	60
ILLISKAEDY	RSYRFPKLTV	ITEYLLLFRV	AGLES LGDLF	PNLTVIRGWK	LFYNYALVIF	120
EMTNLKDIGL	YNLRNITRGA	IRIEKNADLC	YLSTVDWSLI	LDAVSNNYIV	GNKPPKECGD	180
LCPGTMEEKP	MCEKTTINNE	YNYRCWTTNR	CQKMC PSTCG	KRACTENNEC	CHPECLGSCS	240
APDNDTACVA	CRHYYYAGVC	VPACPPNTYR	FEGWRCVDRD	FCANILSAES	SDSEGFVIHD	300
GECMQECPSG	FIRNGSQSMY	CIPCEGPCPK	VCEEKKT KT	IDSV TSAQML	QGCTIFKGNL	360
LINIRRGNNI	ASELENFMGL	IEVVTGYVKI	RHSHALVSL S	FLKNLRLILG	EEQLEGNY SF	420
YVLDNQNLQQ	LWDWDHRNLT	IKAGKMYFAF	NPKLCVSEIY	RMEEVTG TKG	RQSKGDINTR	480
NNGERASCES	DVLHFTSTTT	SKNRIITWH	RYP PPDYRDL	ISFTVYYKEA	PFKNVTEYDG	540
QDACGSNSWN	MVDVDLPPNK	DVEPGILLHG	LKPWTQYAVY	VKAVTLTMVE	NDHIRGAKSE	600
ILYIRTNASV	PSIPLDVLSA	SNSSSQ LIVK	WNPPSLPNGN	LSYYIVRWQR	QPQDGYLYRH	660
NYCSKDKIPI	RKYADGTIDI	EEVTENPKTE	VCGGEGPCC	ACPKTEAEKQ	AEKEEAEYRK	720
VFENFLHNSI	FVPRPEkrkr	DVMQVANTTM	SSRSRNTTAA	DTYNITDPEE	LETEY PPFES	780
RVDNKERTVI	SNLRPFTLYR	IDIHSCNHEA	EKLGC SASNF	VFARTMPAEG	ADDIPGPVTW	840
EPRPENSIFL	KWPEPENPNG	LILMYEIKYG	SQVEDQRECV	SRQEYRKYGG	AKLNRLNPGN	900
YTARIQATSL	SGNGSWTDPV	FFYVQAKTGY	ENFIHLI IAL	PVAVLLIVGG	LVIMLYVFHR	960
KRNNSRLGNG	VLYASVNPEY	FSAADVYVPD	EWEVAREKIT	MSRELQGGSF	GMVYEGVAKG	1020
VVKDEPETRV	AIKTVNEAAS	MRERIEFLNE	ASVMKEFNCH	HVVRL LGVVS	QGQPTLVIME	1080
LMTRGDLKSY	LRSLRPEMEN	NPVLAPPSLS	KMIQMAGEIA	DGMAYLNANK	FVHRDLAARN	1140
CMVAEDFTVK	IGDFGMTRDI	YETDYRKGK	KGLLPVRWMS	PESLKDGVFT	TYS DVWSFGV	1200
VLWEIATLAE	QPYQGLSNEQ	VLR FVMEGGL	LDKPDNCPDM	LFELMRMCWQ	YNPKMRPSFL	1260
EIISSIKEEM	EPGFREV SFY	YSEENKLPEP	EELDLEPENM	ESVPLDPSAS	SSSLPLPDRH	1320
SGHKAENGP	PGVLVLRASF	DERQPYAHMN	GGRKNERALP	LPQSSTC		1367

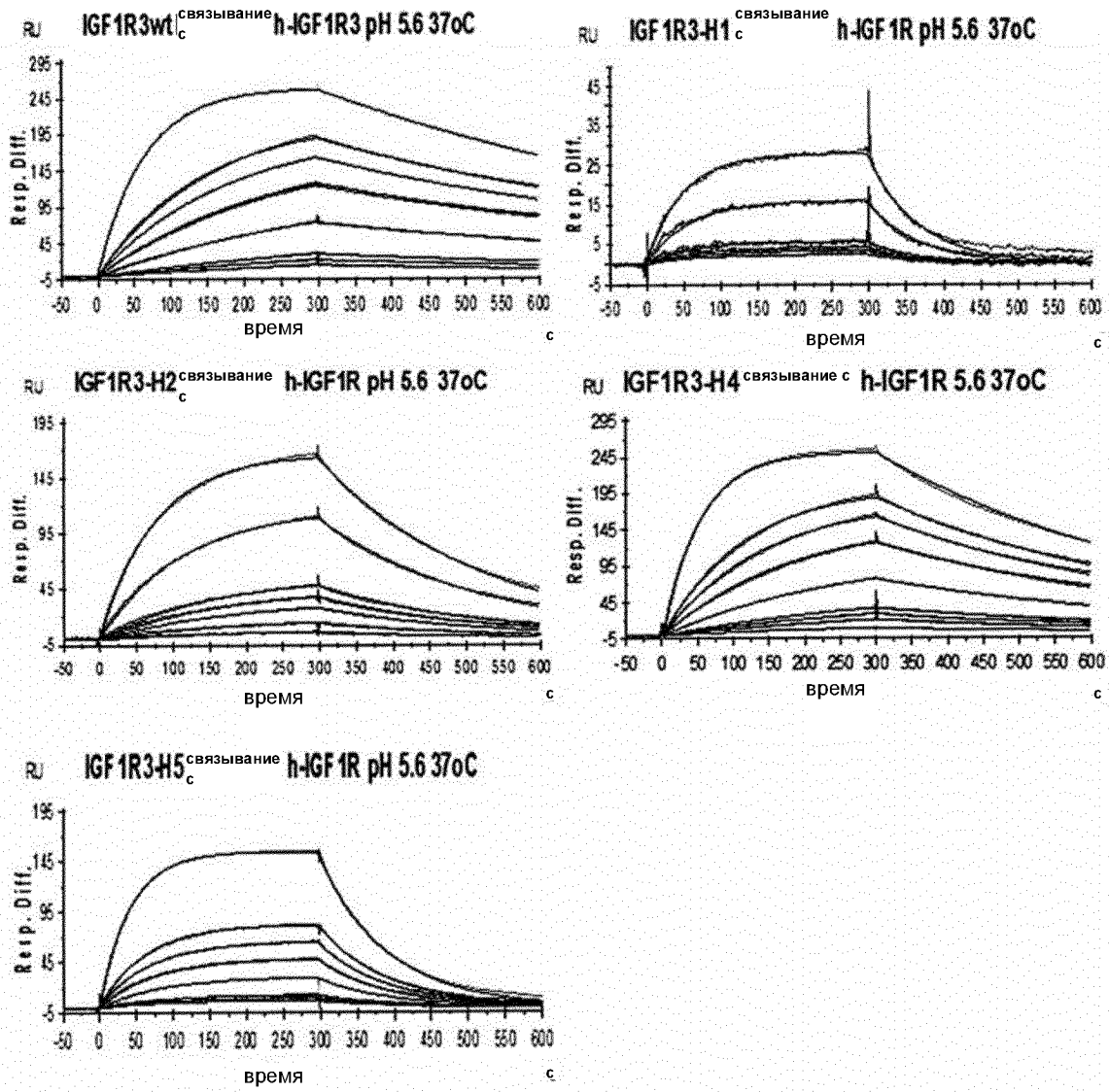
Фиг. 3 А



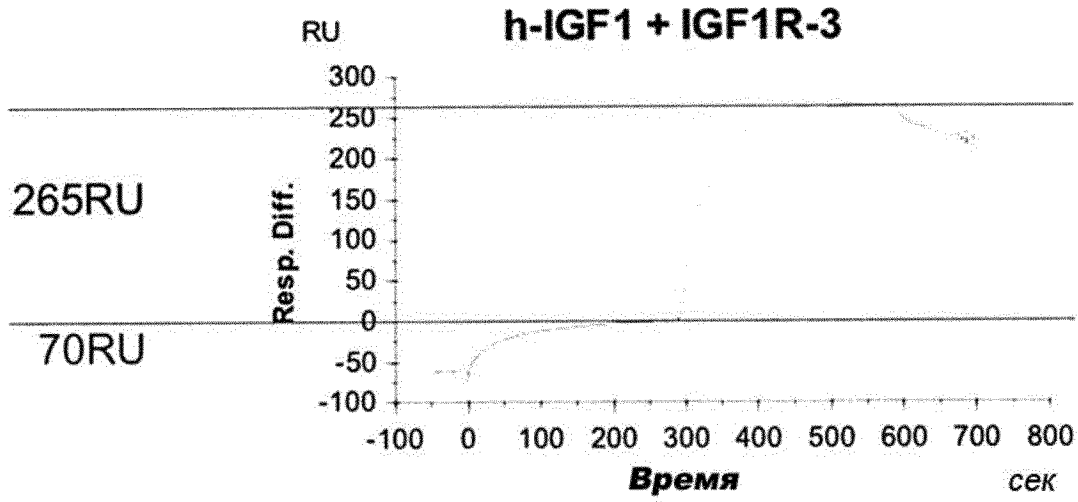
Фиг. 3 В



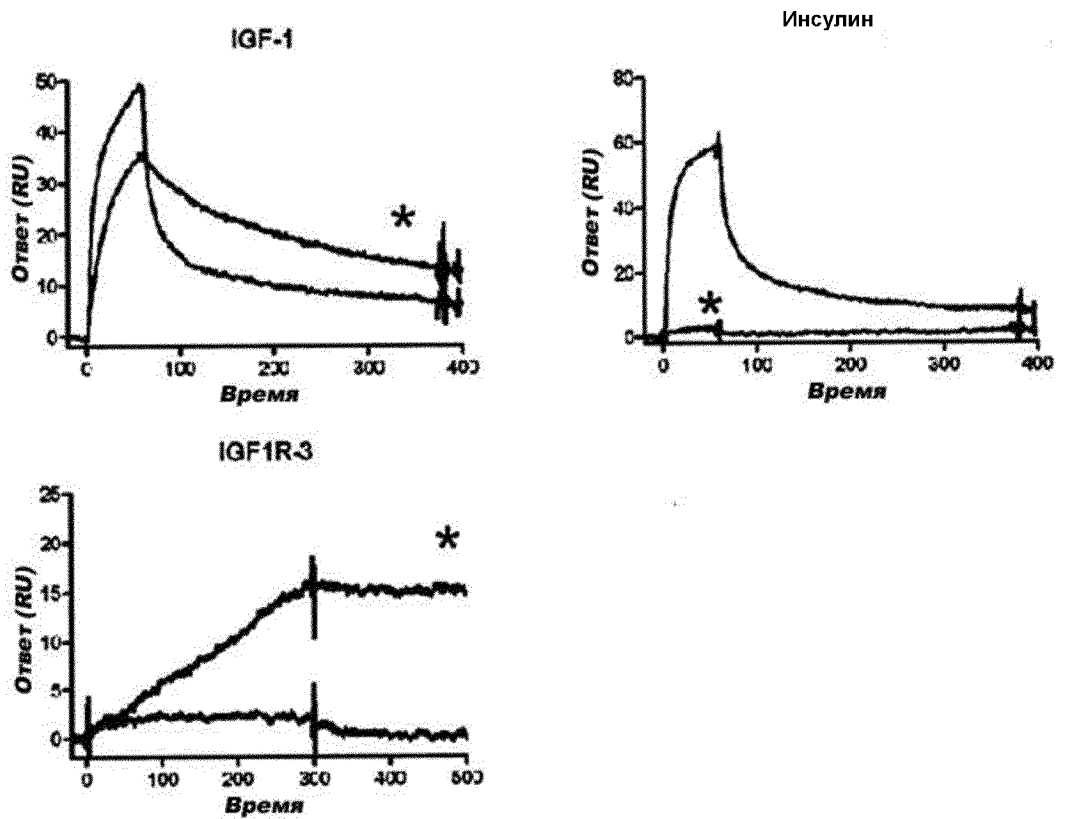
Фиг. 3 С



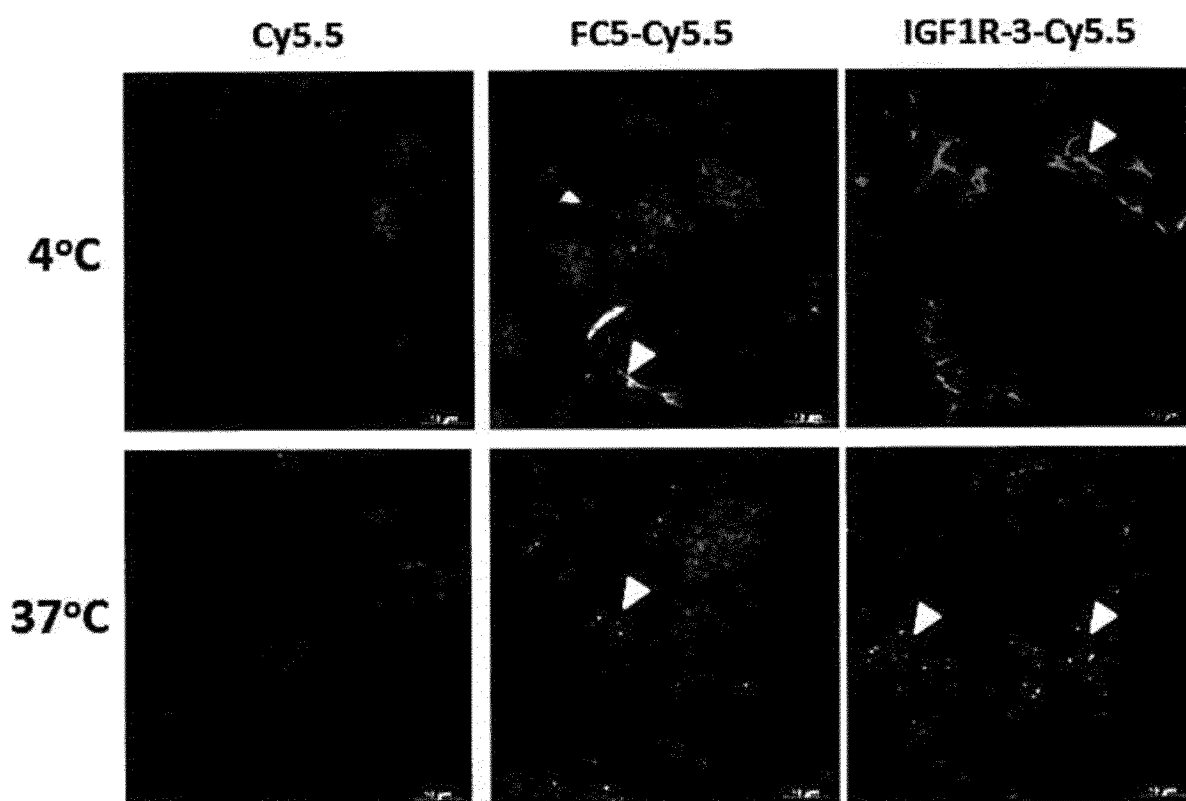
Фиг. 3 D



Фиг. 3 E



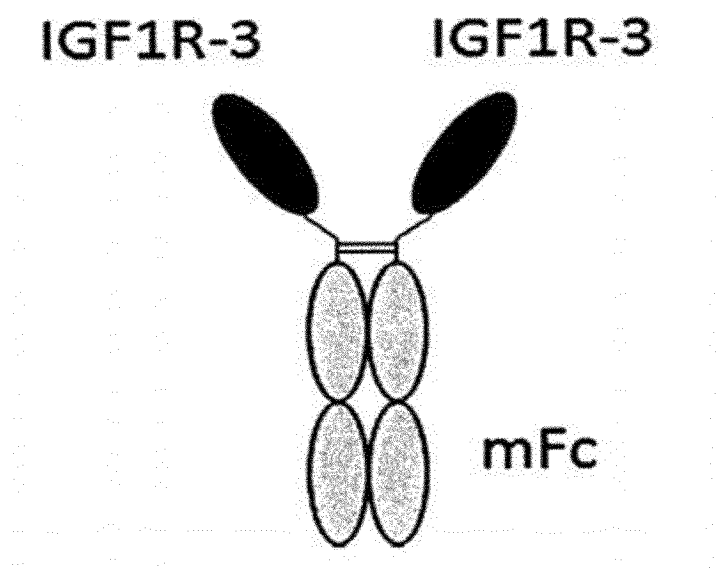
Фиг. 4



Фиг. 5 А

QAQVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVASEYPSNFYAMSWFRQAPGKEREFVAGVSRDGLTTLV
 ADSVKGRFTMSRDNAKNTVDLQMNSVKAEDTAVVYCAIVITGVWNKVDVNSRSYHYWGQ
 GTQVTVSSMTVDKKLEPSGPISTINPCPPCKECHKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISLTPK
 VTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQQDWMSGKE
 FKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSN
 GHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKWEKTDSEFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK

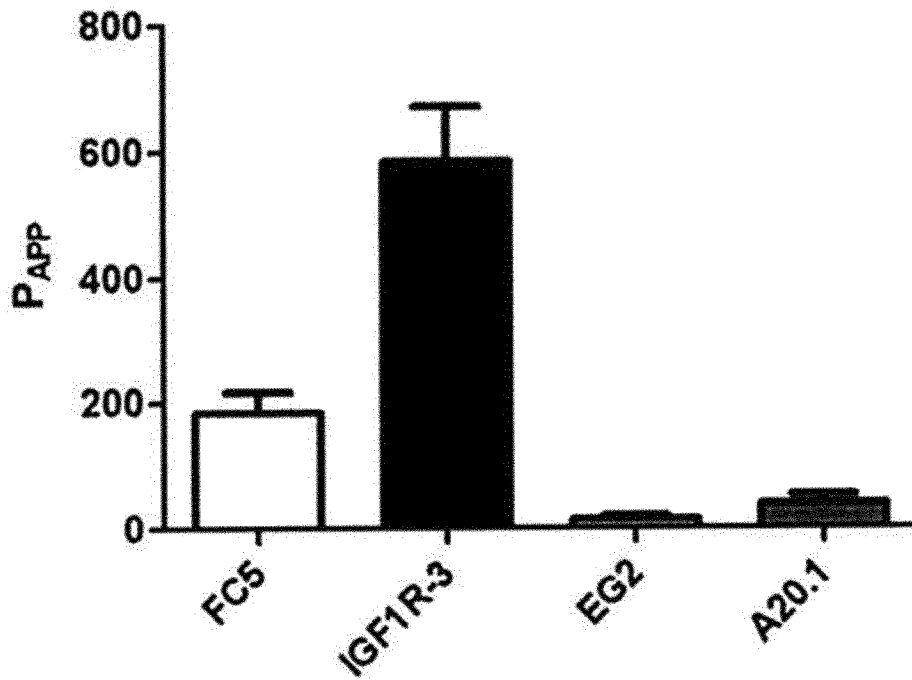
Фиг. 5 В



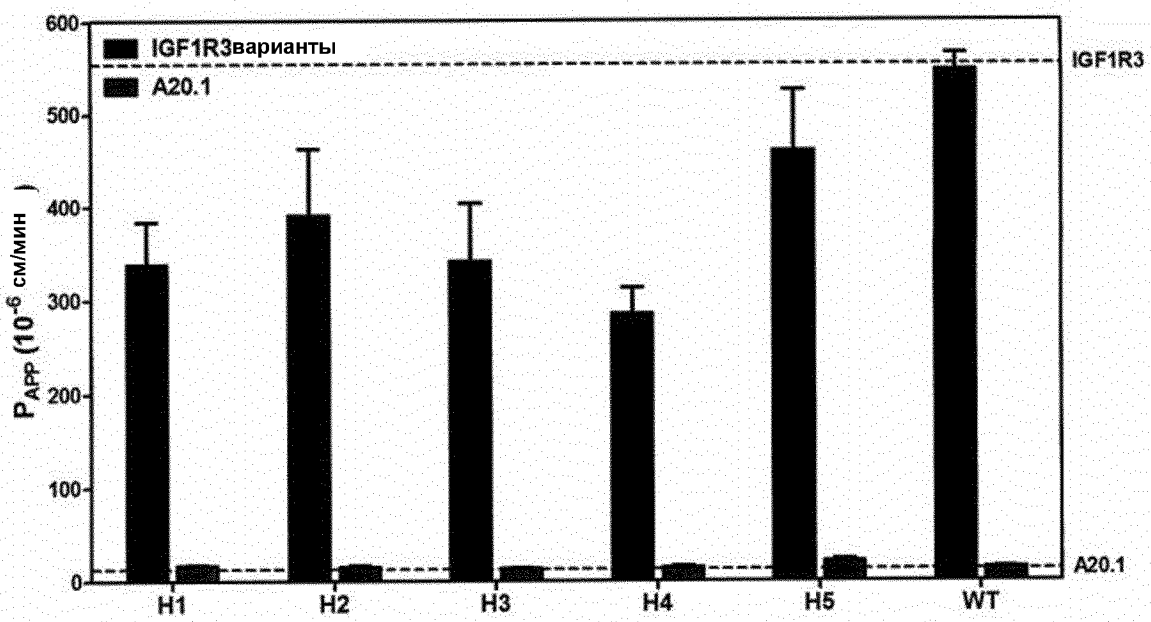
Фиг. 6 А



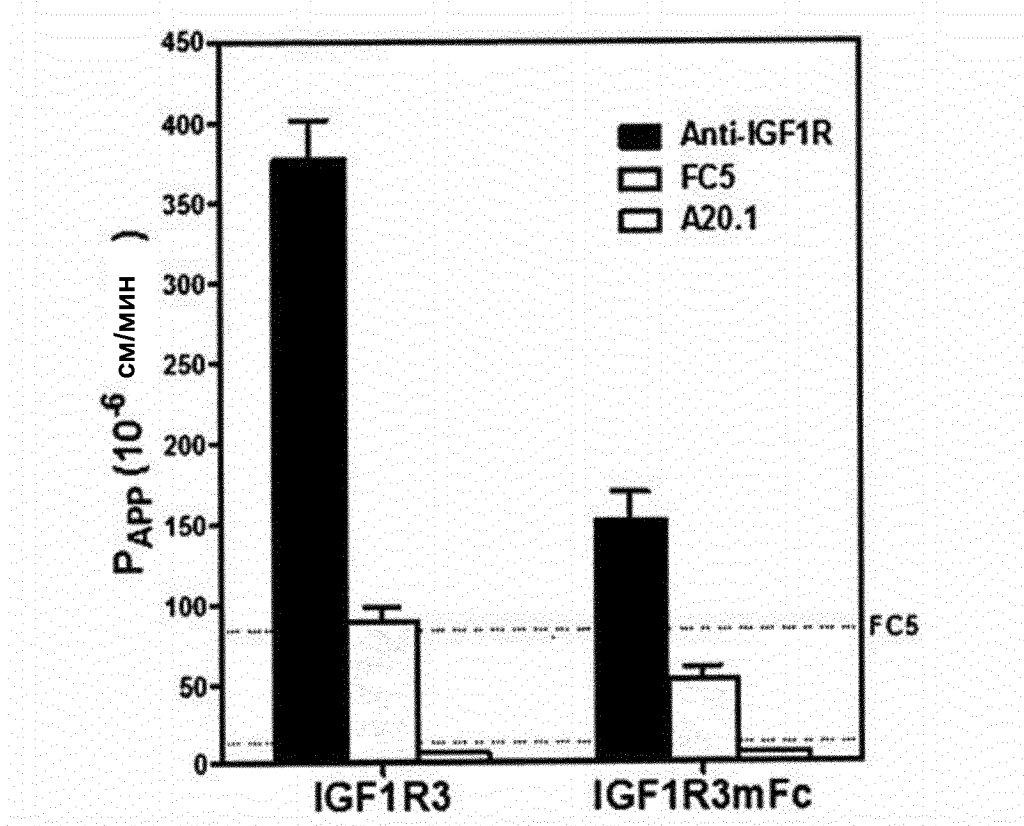
Фиг. 6 В



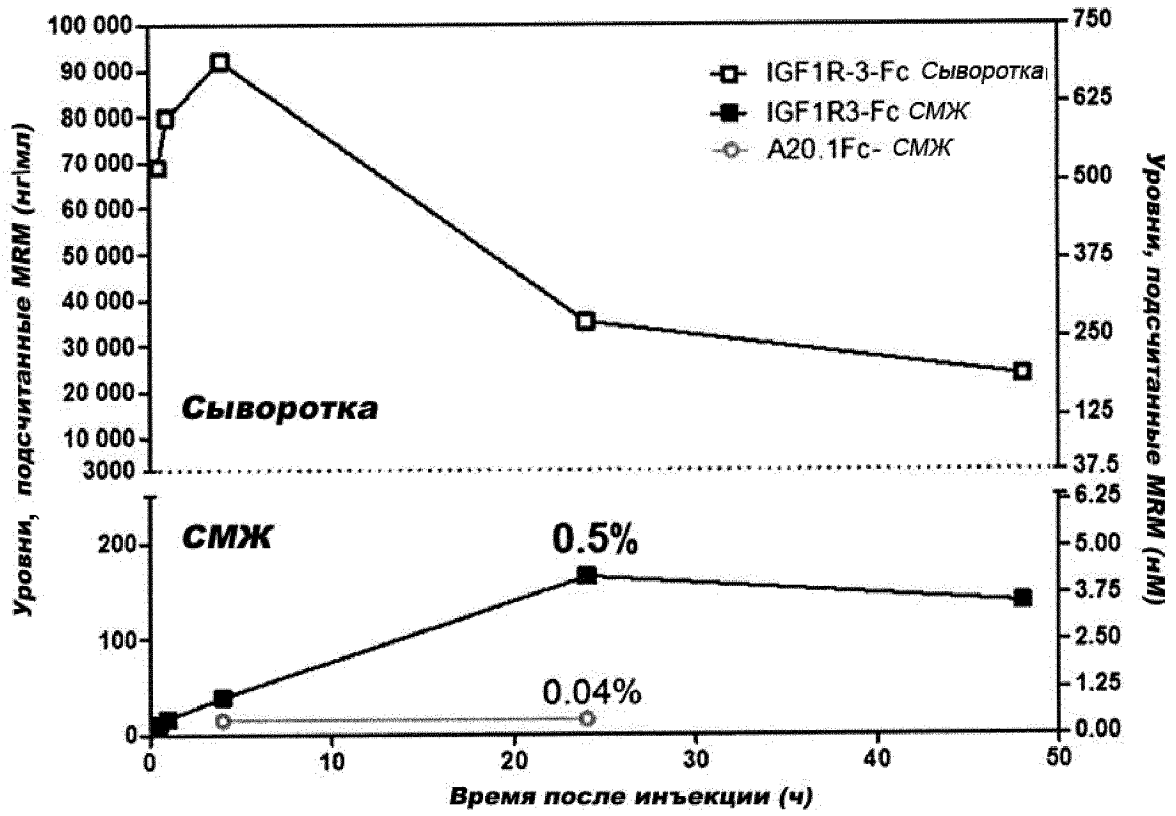
Фиг. 6 С



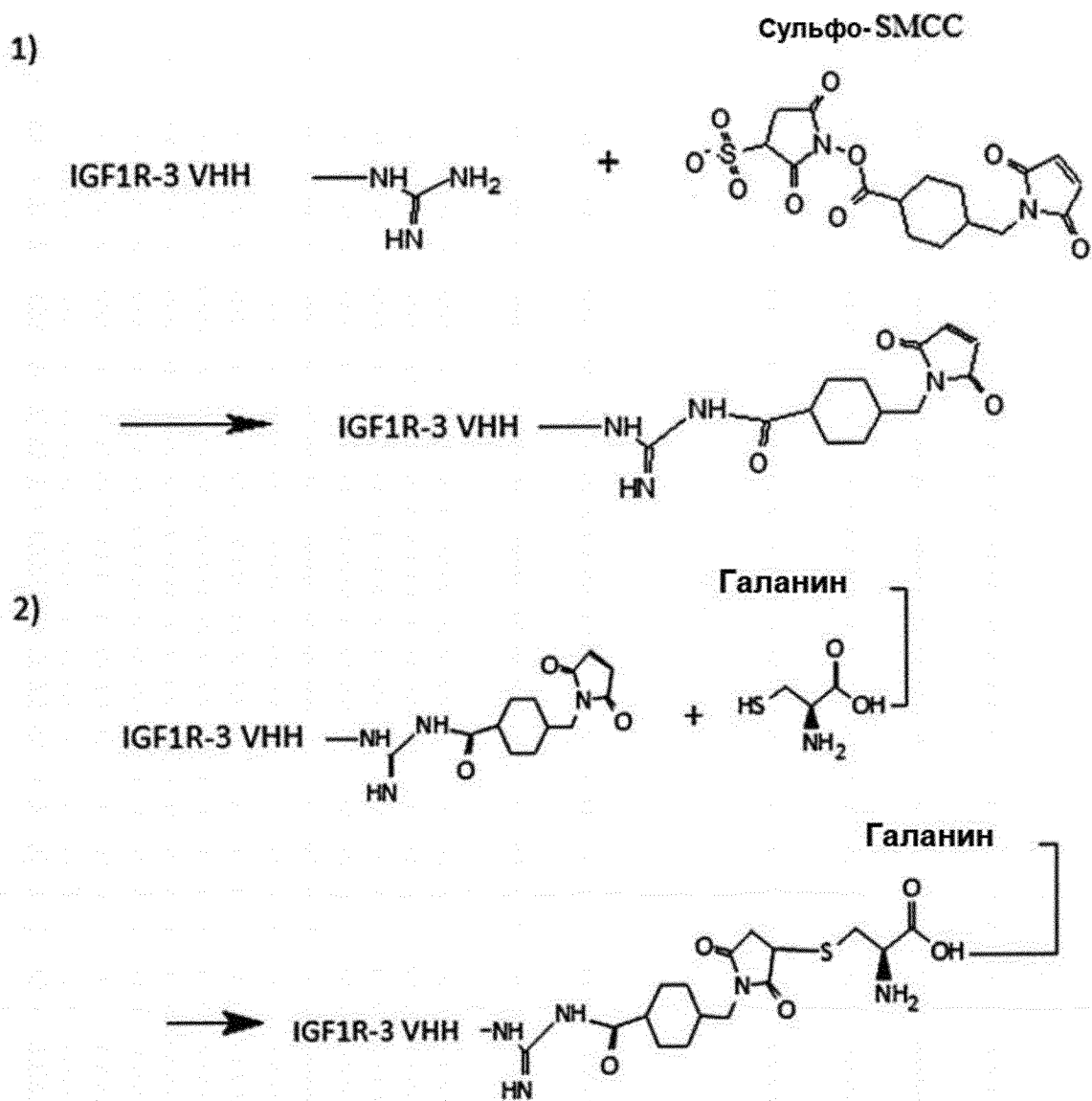
Фиг. 6 D



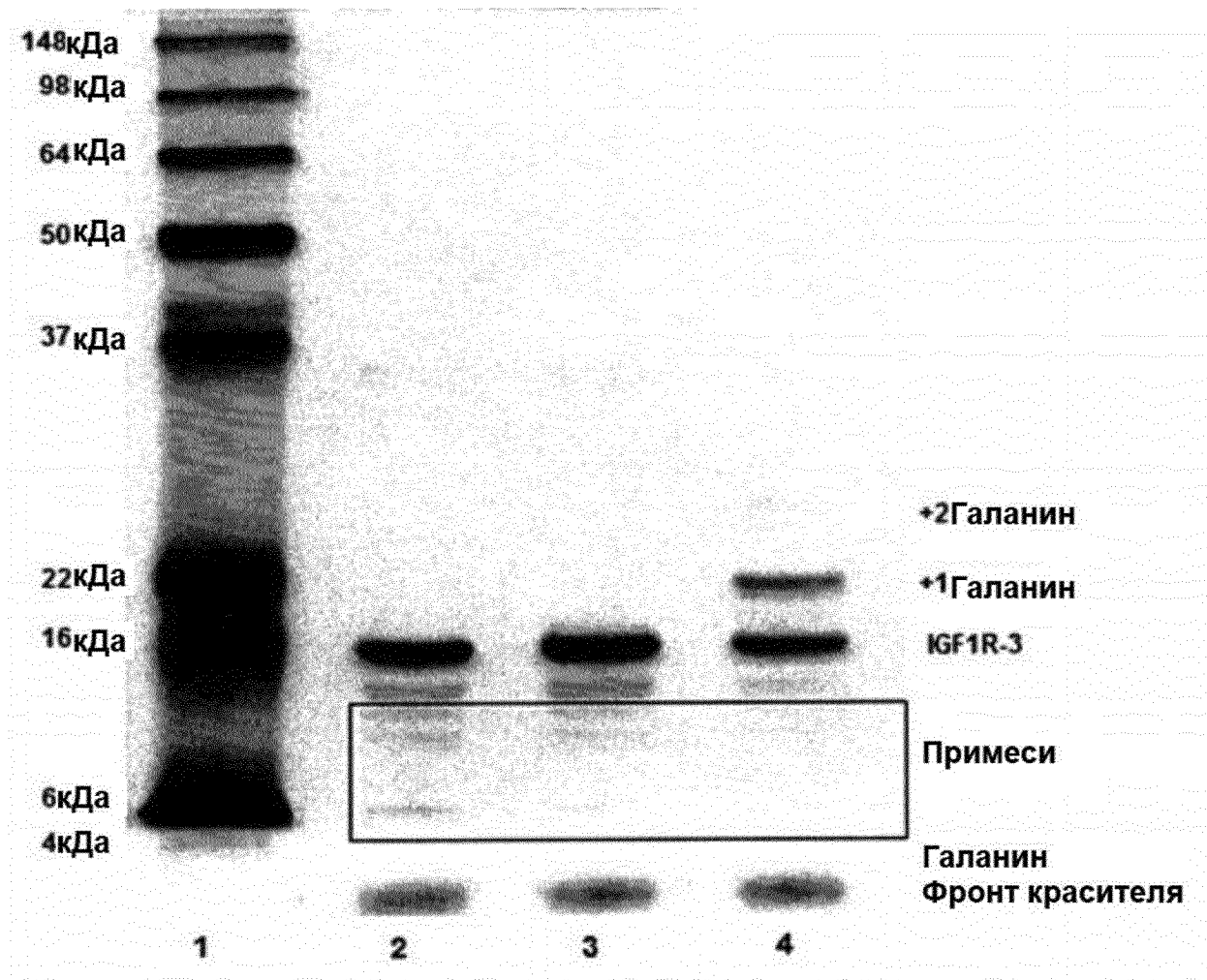
Фиг. 7



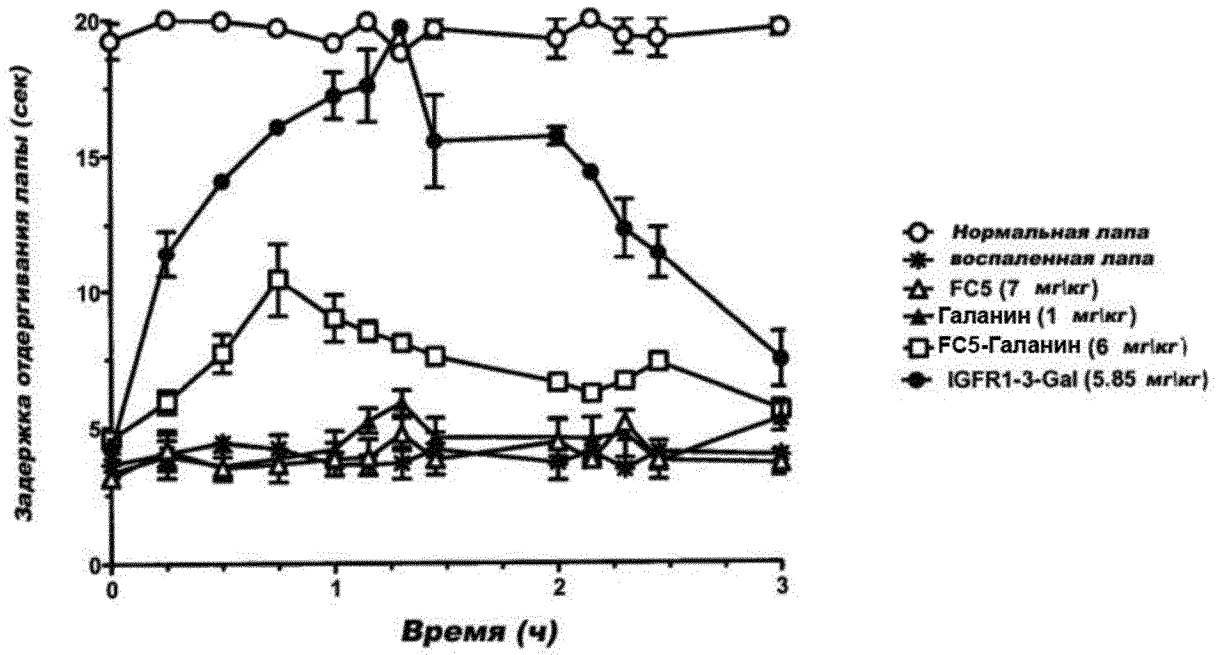
Фиг. 8 А



Фиг. 8 В



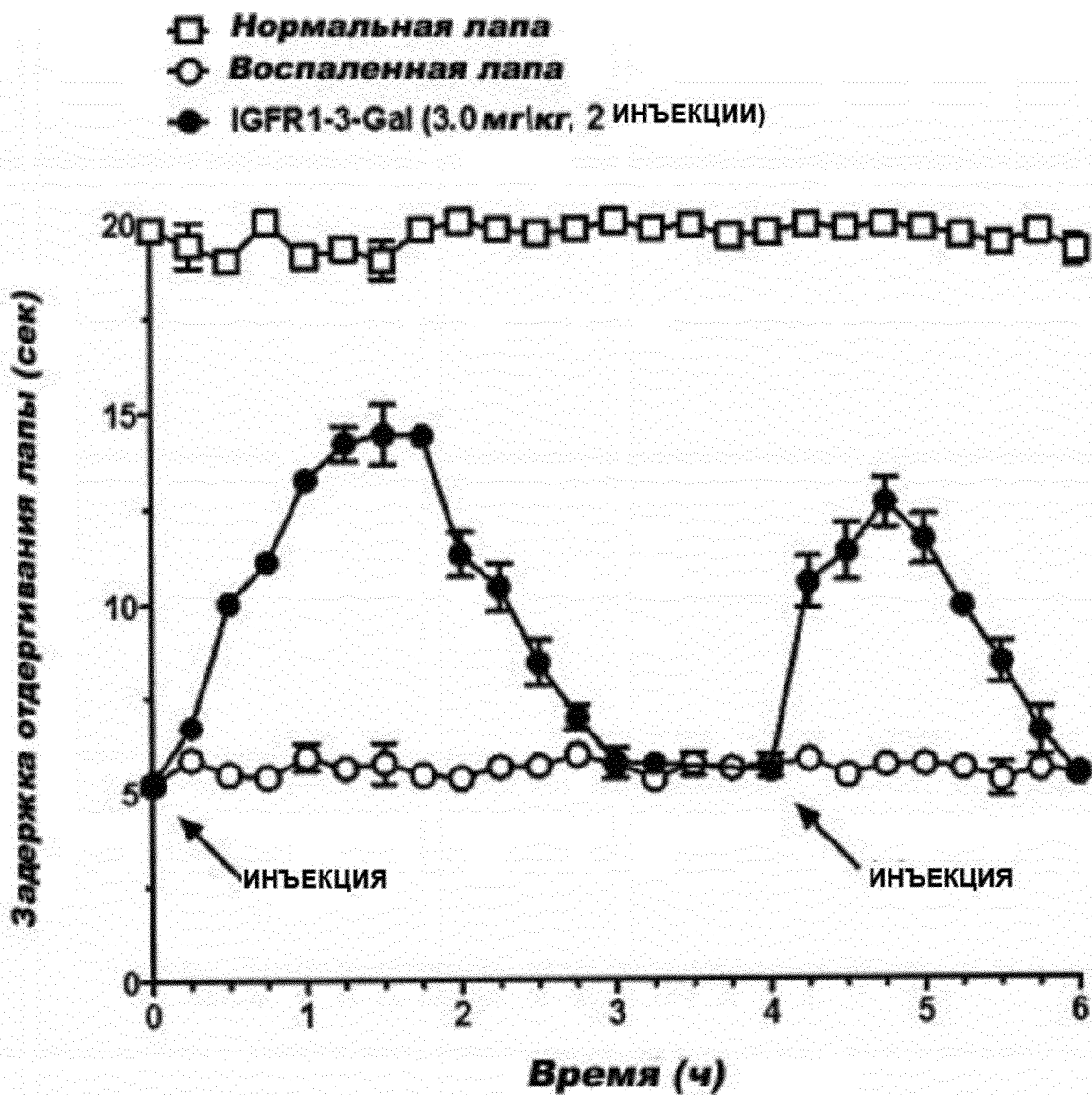
Фиг. 9 А



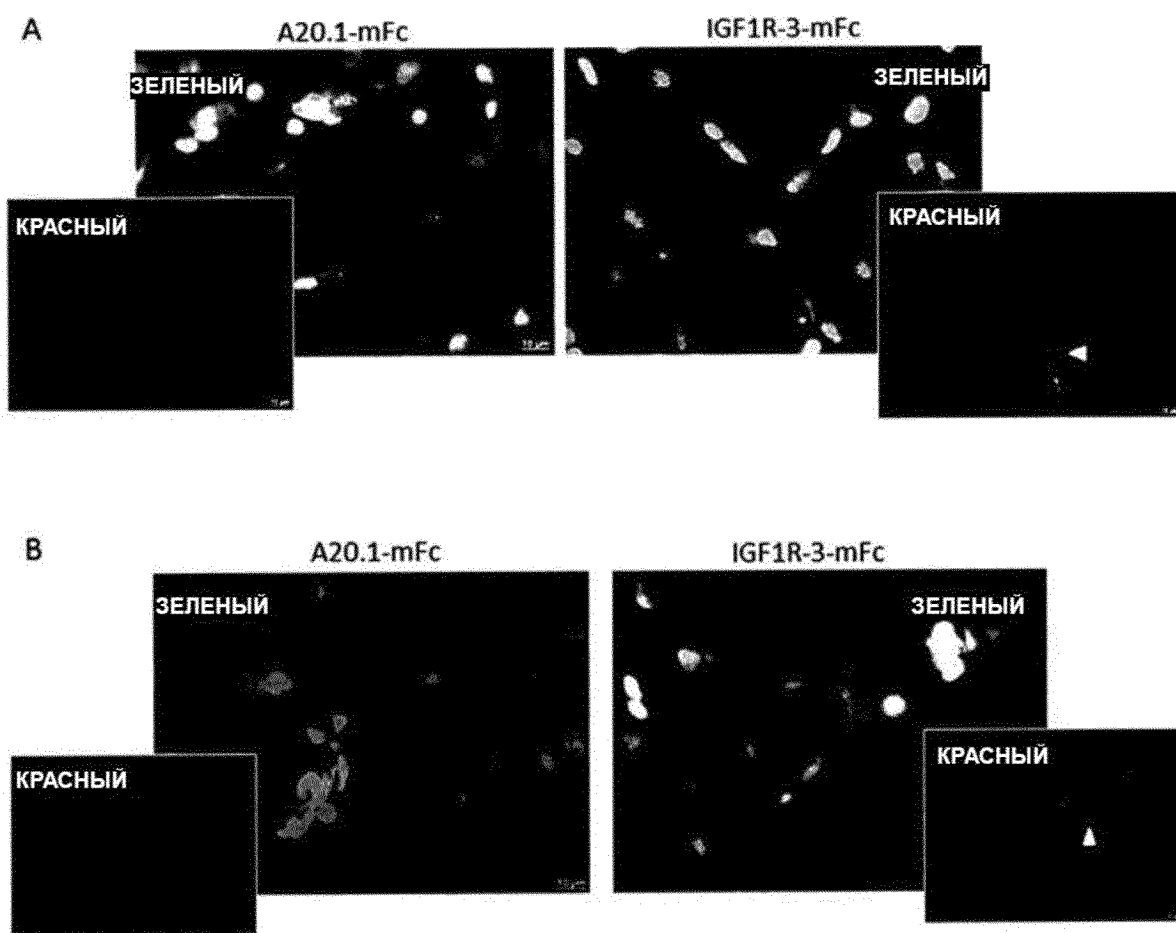
Фиг. 9 В



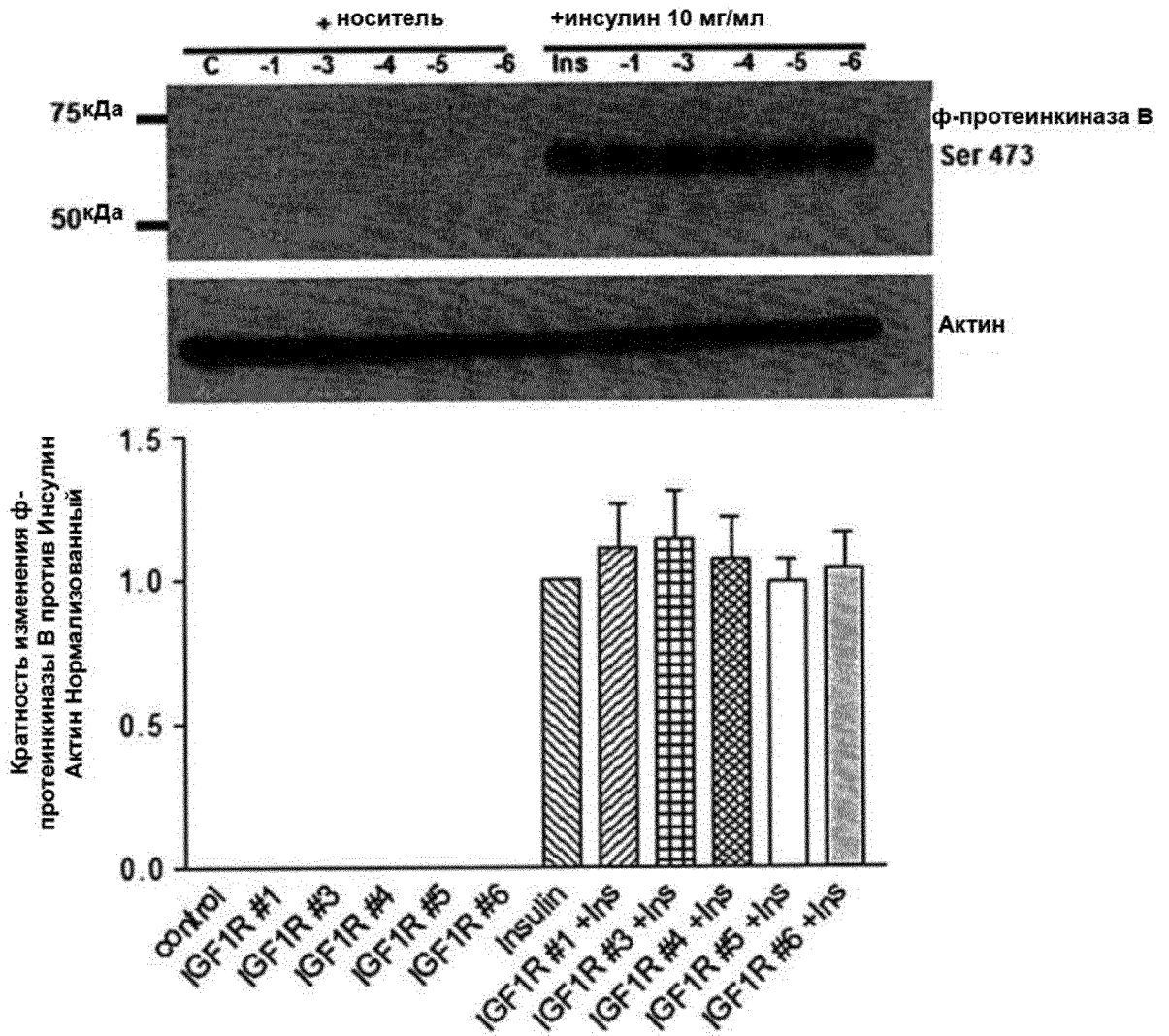
Фиг. 9 С



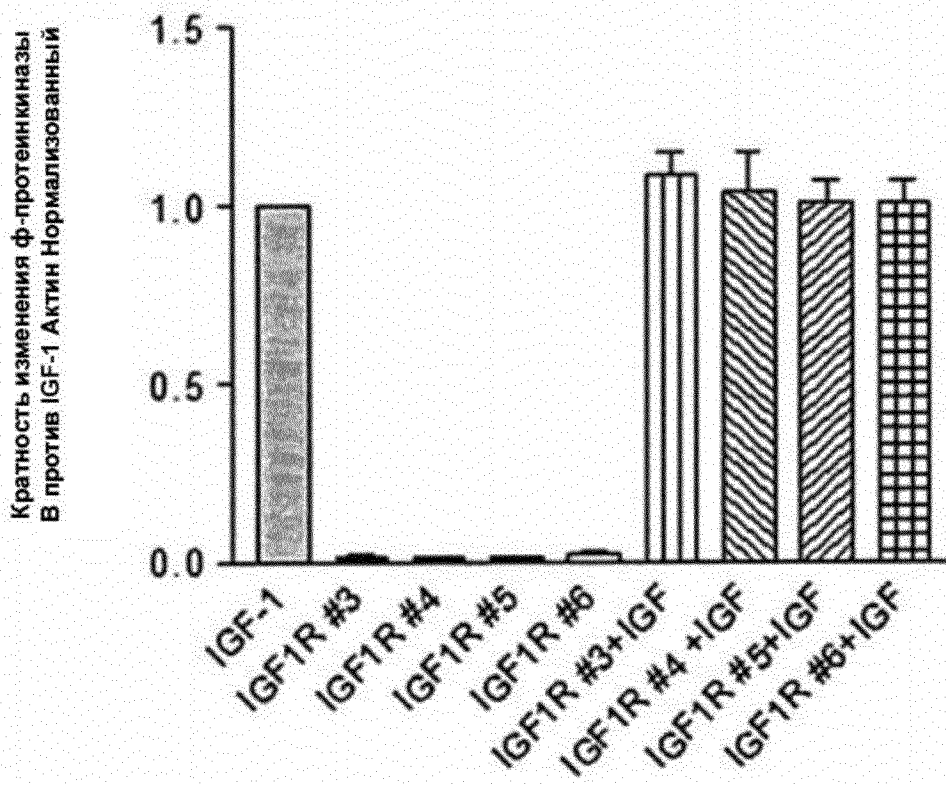
Фиг. 10



Фиг. 11 А



Фиг. 11 В



Фиг. 11 С

