

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035517**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.29</p> <p>(21) Номер заявки
201691782</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2014.12.04</p> | <p>(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

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

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(31) 61/948,831</p> <p>(32) 2014.03.06</p> <p>(33) US</p> <p>(43) 2017.01.30</p> <p>(86) PCT/CA2014/000862</p> <p>(87) WO 2015/131258 2015.09.11</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НЭШНЛ РИСЕЧ КАУНСИЛ ОФ
КАНАДА (СА)</p> <p>(72) Изобретатель:
Станимирович Даника, Кеммерич
Кристин, Хаккани Арсалан С., Сули
Трайан, Арбаби-Гаруди Меди, Масси
Бернар, Жильбер Рено (СА)</p> <p>(74) Представитель:
Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.
(RU)</p> | <p>(56) WO-A1-2011150061
WO-A1-2011044542
Gabathuler R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases Neurobiol Dis Vol 37, Pages 48-57 January 2010 (01-2010) ISSN 0969-9961 Page 54, section bridging left and right columns</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

(57) Изобретение относится к однодоменному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, специфически связывающемуся с рецептором инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R), содержащему последовательность области, определяющей комплементарность (CDR) 1 GRTIDNYA (SEQ ID NO:1); последовательность CDR2 IDWGDGGX (SEQ ID NO:2), где X представляет собой А или Т; и последовательность CDR3 AMARQSRVNLDVARYDY (SEQ ID NO:3). Изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей указанное антитело, вектору для экспрессии указанного антитела, композиции для доставки терапевтических и диагностических молекул в фармакологически эффективных дозах в мозг субъекта, содержащей указанное антитело, способам детектирования IGF1R in vitro и детектирования экспрессии IGF1R у субъекта in vivo с помощью заявленного антитела, способу переноса карго-молекулы через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) с помощью заявленного антитела, а также способу количественного определения количества карго-молекулы, доставляемой через ГЭБ субъекта. Изобретение позволяет осуществлять доставку мелких и крупных терапевтических и диагностических молекул в фармакологически эффективных дозах в мозг без нарушения физиологии и гомеостаза ГЭБ.

035517 B1

035517 B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам, специфическим к рецептору инсулиноподобного фактора роста 1, их фрагментам, а также их применениям. Более конкретно настоящее изобретение относится к антителам, специфическим 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 высокоспецифическим рецепторно-опосредованным транцитозом (RMT) и транцитозом, 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 терапевтически активных молекул могут и практически никакие из крупных терапевтических средств не 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 "переносчиков" 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.

Были исследованы различные подходы к введению больших молекул в мозг. 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 терапевтически активных молекул в спинномозговую жидкость (СМЖ), паренхимальное пространство или другие части мозга. Несколько способов доставки были разработаны, в том числе интрацеребральная (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 интрацеребральный имплантат 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 играя 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.

В 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 высокоспецифический рецепторно-опосредованный трансцитоз (RMT) и неспецифический трансцитоз, опосредованный адсорбцией на основе заряда. Эндцитоз 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 трансцитозу через клетку к аблюминальной стороне для высвобождения груза.

Поскольку трансцитоз, 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 высокорепеторно-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), инсулиновый рецептор (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 (Ангиопеп ANGI005, таргетирующий LRP-1) был проанализирован на 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 трансцитоз рецептора, а также лизосомальную деградацию эндцитозированных переносчиков (Xiao and Gun, 2013).

Отсутствие высокой производительности и высокой селективности переносчиков через ГЭБ задерживает разработку новых терапевтических и диагностических средств для лечения 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, специфическим к рецептору инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R), и их применениям. Более конкретно настоящее изобретение относится к антителам, специфическим 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), 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 и может содержать последовательность FENFLHNSIFVPR (SEQ ID NO: 11) или ее фрагменты.

Настоящее изобретение относится к выделенному или очищенному антителу или его фрагменту, содержащему

последовательность области, определяющей комплементарность (CDR) 1 GRTIDNYA (SEQ ID NO: 1);

последовательность CDR2 IDWGDGGX (SEQ ID NO: 2), где X представляет собой A или T; и

последовательность CDR3 AMARQSRVNLDVARYDY (SEQ ID NO: 3),

где указанное антитело или его фрагмент специфически связывается с рецептором инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R). В одном из вариантов осуществления выделенное или очищенное антитело или его фрагмент содержит последовательность CDR2 IDWGDGGA.

Например, не в рамках какого-либо ограничения, выделенным или очищенным антителом или его фрагментом, специфическим к IGF1R, может являться

X₁VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCX₅X₆SGGTVSPTAMGWX₇RQAPGKX₈X₉EX₁₀VX₁₁
 X₁VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWX₅RQAPGKX₆X₇EX₈VX₉TID
 WGDGGX₁₀RYANSVKGRFTISRDNX₁₁KX₁₂TX₁₃YLQMNX₁₄LX₁₅X₁₆EDTAVYX₁₇CAMAR
 QSRVNLDVARYDYWGQGTX₁₈VTVSS (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 S; X₆ представляет собой D или G; X₇ представляет собой L или R; X₈ представляет собой F или W; X₉ представляет собой A или S; X₁₀ представляет собой A или T; X₁₁ представляет собой A или S; X₁₂ представляет собой G или N; X₁₃ представляет собой M или L; X₁₄ представляет собой N или R; X₁₅ представляет собой E или R; X₁₆ представляет собой P или A; X₁₇ представляет собой S или Y; и X₁₈ представляет собой Q или L,

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

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDFVATIDWGDG
 GARYANSVKGRFTISRDNKGTMYLQMNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDY
 WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5), упоминаемой здесь как IGF1R-5;

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWRQAPGKGLEWVSTIDWGDG
 GTRYANSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCAMARQSRVNLDVARYDY
 WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:6), упоминаемой здесь как IGF1R-5_H1;

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWRQAPGKGLEWVATIDWGDG
 GTRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNLSRAEDTAVYCAMARQSRVNLDVARYDY
 WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:7), упоминаемой здесь как IGF1R-5_H2;

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKGLEFVATIDWGDG
 TRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNLSRAEDTAVYCAMARQSRVNLDVARYDY
 GGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:8), упоминаемой здесь как IGF1R-5_H3;

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDFVATIDWGDG
 GTRYANSVKGRFTISRDNKGTMYLQMNLSRAEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDY
 WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:9), упоминаемой здесь как IGF1R-5_H5; и

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDFVSTIDWGDG
 GTRYANSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCAMARQSRVNLDVARYDY
 WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 10), упоминаемой здесь как IGF1R-5_H6,

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. Антитела или их фрагменты могут связываться с эпитопом, содержащим последовательность FENFLHNSIFVPR (SEQ ID NO: 11).

Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент в рамках настоящего изобретения может быть представлено в формате мультивалентного отображения. В формате мультивалентного отображения антитело или его фрагмент может быть связано с Fc-фрагментом; Fc-фрагмент может быть мышинным Fc2b или человеческим Fc1. Например, не в рамках какого-либо ограничения, выделенное или очищенное антитело или его фрагмент в мультивалентном отображении может содержать последовательность SEQ ID NO: 42 (упоминаемую здесь как IGF1R-5-mFc консенсус) или 43 (упоминаемую здесь как mFc-IGF1R-5 консенсус), SEQ ID NO: 12 (упоминаемую здесь как IGF1R-5-mFc) или 13 (упоминаемую здесь как mFc-IGF1R-5).

Выделенное или очищенное антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, в любом формате может проходить 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, может быть иммобилизовано на поверхность.

Настоящее изобретение дополнительно относится к выделенному или очищенному антителу или его фрагменту, как описано в данном документе, связанному с карго-молекулой; карго-молекула может иметь молекулярную массу в диапазоне от около 1 до около 200 кДа. Карго-молекулой, связанной с антителом или его фрагментом, может быть детектируемый агент, терапевтическое средство, лекарственное средство, пептид, фактор роста, цитокин, ловушка рецептора, химическое соединение, углеводный

фрагмент, фермент, антитело или его фрагменты, молекула на основе ДНК, вирусный вектор или цитотоксический агент; одна или несколько липосом или наноносителей, загруженных детектируемым агентом, терапевтическим средством, лекарственным средством, пептидом, ферментом, антителом или его фрагментами, молекулой на основе ДНК, вирусным вектором 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:

- а) 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
- б) 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 б)) может быть осуществлена с помощью оптической визуализации, иммуногистохимии, молекулярной диагностической визуализацией, ELISA (иммуноферментного анализа), визуализирующей масс-спектрометрии или другого подходящего способа.

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

- а) введение одного или более чем одного выделенного или очищенного антитела или его фрагмента, как описано в данном документе, связанного с детектируемым агентом, субъекту; и
- б) детектирование детектируемого агента, связанного с антителом или его фрагментом, связанным с IGF1R.

В способе, описанном выше, стадия детектирования (стадия б)) может быть осуществлена с использованием PET (позитронно-эмиссионной томографии), СПЕКТ (однофотонной эмиссионной компьютерной томографии), флуоресцентной визуализации или любого другого подходящего способа.

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

- а) введение одного или более чем одного выделенного или очищенного антитела или его фрагмента, как описано в данном документе, связанного с представляющей интерес молекулой, субъекту, причем выделенное или очищенное антитело или его фрагмент проходит 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 средство, 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, загруженных детектируемым агентом, терапевтическим средством, лекарственным средством, пептидом, ферментом, антителом или его фрагментом, молекулой на основе ДНК, вирусным вектором или цитотоксическим агентом; или одна или несколько наночастиц, нанопроводов, нанотрубок или квантовых точек. В описанном способе введение может быть внутривенным (*iv*), подкожным (*sc*) или внутримышечным (*im*).

Изобретение также охватывает способ определения количества карго-молекулы, доставляемой через ГЭБ субъекта, где карго-молекула 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) у субъекта; и
- б) использование целевых методов протеомики для определения количества карго-молекулы, связанной с одним или более чем одним выделенным или очищенным антителом или фрагментом, в СМЖ.

Карго-молекула может быть любой желаемой молекулой, включая карго-молекулы, описанные выше; антитело или его фрагмент проходит 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 б), 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 карго-молекулой, 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 мониторинг множественных реакций с использованием изотопически меченых внутренних стандартов (MRM-ILIS).

Плохая доставка диагностических или лекарственных средств через плотный и высокоселективный ГЭБ компрометирует развитие способов лечения заболеваний мозга, таких как, но не ограничиваясь указанным, опухолей мозга и нейродегенеративных заболеваний. Отсутствие переносчиков для транспорти-

ровки молекул через ГЭБ задерживает разработку новых терапевтических и диагностических средств для таких заболеваний. Как описано в данном документе, был спродуцирован IGF1R-связывающий V_HN (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 инициируется RMT и антитело вместе с конъюгированными молекулами (грузом) подвергается трансцитозу через клетку к аблюминальной стороне, где они оба выпускаются в микросреду мозга. Это первая идентификация и демонстрация анти-IGF1R связывающего доменного антитела, которое проходит ГЭБ посредством RMT. Подтверждено, что IGF1R V_HN связывается с IGF1R (фиг. 2B), поглощается клетками ГЭБ (фиг. 4) и переходит на аблюминальную сторону в модели ГЭБ *in vitro* (фиг. 5B). Исследования доставки лекарственного средства к мозгу *in vivo* показали также, что IGF1R V_HN "переносил" конъюгированный пептид (Галанин, около 3 кДа), а также большой слитый белок (около 80 кДа) через ГЭБ (фиг. 7A и 7B; фиг. 9).

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

Таким образом, антителоопосредованная 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, использованный 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. Предполагаемый эпитоп, с которым может связываться IGF1R-5 V_HN, подчеркнут.

На фиг. 3A показана эксклюзионная хроматограмма IGF1R-связывающего V_HN IGF1R-5, пропущенного через колонку с Superdex 75. Профиль предполагает, что V_HN является мономерным и не агрегатным. Фиг. 3B показывает температуру плавления (T_m), определенную с помощью кругового дихроизма (CD) для IGF1R-5 V_HN и его гуманизированных вариантов (обозначенных 5H1, 5H2, 5H3, 5H5, 5H6). Белки нагревали до температуры выше 90°C и измерения проводили в CD устройстве, чтобы определить кривую плавления (черные или закрашенные круги) и T_m. Впоследствии белки охлаждали до комнатной температуры, нагревали еще раз и анализировали с помощью CD (серая кривая или квадраты). Это позволило определить долю рефолдинга белка. Фиг. 3C показывает перекрытие сенсограммы поверхностного плазмонного резонанса (SPR) для связывания 0,1-10 нМ IGF1R-5 V_HN и его гуманизированных вариантов (обозначенных 5H1, 5H2, 5H3, 5H5, 5H6) с рекомбинантной внеклеточной частью фрагмента человеческого IGF1R (h-IGF1R). Данные, полученные этим специфическим способом и с помощью этой экспериментальной установки, соответствуют модели 1:1, давая значения K_D в низком наномолярном (нМ) диапазоне (0,6-16,4 нМ), как подробно раскрыто в табл. 2. Фиг. 3D показывает сенсограммы SPR

связывания IGF1R-5 V_HH с рекомбинантной внеклеточной частью фрагмента человеческого IGF1R и последующего присоединения IGF1, который может одновременно связываться с рецептором. Данный эксперимент повторили дважды, как показано на графике.

На фиг. 4 показаны результаты визуализации захвата клеток Су-5.5-меченного IGF1R-5 V_HH и контрольного V_HH. Су5.5-меченный IGF1R-5 V_HH (или FC5 V_HH в качестве положительного контроля, Murganandam et al., 2002; Naqqani 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-5 пассивно (4°C) или с помощью механизмов активного транспорта (37°C), таких как рецепторно-опосредованный эндоцитоз. Совместное окрашивание агглютинином зародышей пшеницы и DAPI (4',6-диамидин-2-фенилиндол) проводили для визуализации поверхности клетки и ядра соответственно. Верхний блок: при инкубировании при 4°C IGF1R-5 и FC5 V_HH были обнаружены вне клеток (стрелки), связанные с клеточной мембраной (солокализуются с агглютинином зародышей пшеницы). Нижний блок: при 37°C и FC5 и IGF1R-5 V_HH накапливались внутри клеток в структурах, подобных везикулам (стрелки), вероятно эндосомах, что предполагает поглощение посредством механизма активного транспорта.

На фиг. 5А показана последовательность С-концевого слияния IGF1R-5 V_HH с мышинным Fc-фрагментом (IGF1R-5-mFc), тогда как на фиг. 5В показана последовательность N-концевого слияния (mFc-IGF1R-5-Gal). Схематическое изображение собранного слитого белка показано на фиг. 5С. IGF1R-5 V_HH показаны черным цветом и мышинные Fc (CH2 и CH3) показаны серым цветом на фиг. 5А-С.

На фиг. 6А показана блок-схема, обобщающая использование модели ГЭБ in vitro для оценки способности различных V_HH преодолевать гематоэнцефалический барьер. Эквивалентные количества (5,6 или 1,25 мкМ) положительного (FC5) и отрицательного контроля (A20.1, с Clostridium difficile токсин А-связывающий V_HH; и EG2, EGFR (рецептор эпидермального фактора роста)- связывающий V_HH) V_HH и IGF1R-5 тестировали одновременно на их способность пересекать крысиную модель ГЭБ. SV40-иммортализованные 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 эквивалентных количеств различных V_HH на люминальную сторону модели ГЭБ образцы были взяты из нижней камеры через 15, 30 и 60 мин. Концентрации каждого V_HH затем количественно измерялись с помощью масс-спектрометрии (мониторинг множественных реакций с использованием изотопически меченых внутренних стандартов; MRM-ILIS) в этих образцах. Значение P_{app} [Q_t/DT - общее количество в приемном отделении в зависимости от времени; А - площадь монослоя клеток; С₀ - начальная концентрация дозированного раствора] обычно используется для определения способности молекулы к пересечению гематоэнцефалического барьера. На фиг. 6В приведены значения P_{app} четырех совместно введенных V_HH. IGF1R-5 имеет схожее значение P_{app} с FC5, в то время как отрицательные контроли имеют очень низкие значения P_{app}, что указывает на облегченный перенос FC5 и IGF1R-5 V_HH по сравнению с очень низким неспецифическим транспортом или парацеллюлярным транспортом контрольных V_HH. Результаты представляют собой средние значения P_{app}, полученные в 5-6 независимых экспериментах. Фиг. 6С показывает значения P_{app} гуманизированных IGF1R-5 однодоменных антител (H1, H2, H3, H5, H6) (черные столбики) по сравнению с A20.1 V_HH (белые столбики), которые были протестированы в качестве контроля в той же лунке (средние значения FC5 и A20.1 обозначены серой пунктирной линией). Фиг. 6D показывает значения P_{app} N-концевого и С-концевого слияния IGF1R-5 V_HH с мышинным Fc (светло серый) по сравнению с A20.1 - мышинный Fc (A20.1mFc) (темно серый), которое было протестировано в той же лунке в качестве контроля и имело очень низкое значение P_{app}. Средние значения P_{app} FC5-Fc (FC5 слитый с Fc), FC5 (V_HH), IGF1R-5 (V_HH) и A20.1 (V_HH) показаны пунктирными линиями для сравнения.

На фиг. 7 показана схема химического синтеза конъюгата IGF1R-5 V_HH-Галанин. IGF1R-5 сначала конъюгировали с группой NHS сульфо-SMCC (сульфосукцинимидил-4(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат) кросс-линкера (1); затем maleimidaктивированный IGF1R-5-сульфо-SMCC конъюгировали с восстановленным цистеином Галанина (2).

На фиг. 8 показана IGF1R-5-опосредованная доставка в мозг химически конъюгированного пептида Галанина. На фиг. 8А представлен график, демонстрирующий способность IGF1R-5 доставлять фармакологически эффективные дозы конъюгированного 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 адьюванта 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 3 мг/кг Галанина (серые закрашенные круги). Системное введение конъюгата IGF1R-5-Галанин (2,93 мг/кг или 5,85 мг/кг) индуцирует дозозависимый анальгетический эффект в течение 3 ч, более выраженный, чем эффект, наблюдаемый для 6 мг/кг конъюгата FCS-Галанин. Фиг. 8B показывает эти результаты в виде площади под кривой (AUC) фармакодинамики ответа по сравнению с максимально возможным эффектом (MPE, контрольная лапа). 2,93 мг/кг IGF1R-5-Галанина индуцировали 28% MPE, тогда как 5,85 мг/кг IGF1R-5-Галанина индуцировали 55% MPE в течение 3-часового периода, демонстрируя значительное проникновение в мозг конъюгата по сравнению с Галанином отдельно после систематической инъекции (менее 5% MPE). На фиг. 8C показан график, демонстрирующий способность mFc-IGF1R-5-Галанина подавлять тепловую гипералгезию в болевой модели Харгривса после внутривенной инъекции различных концентраций. На фиг. 8D показан дозозависимый ответ (процент ингибирования на пике ответа) тепловой гипералгезии в модели Харгривса после iv инъекции либо конъюгата IGF1R-5-mFc-Gal, либо конъюгата mFc-IGF1R-5-Gal.

На фиг. 9 показана фармакокинетика IGF1 R-5-mFc и контрольного V_HH, слияния A 20.1 мышинный Fc (A20.1-mFc) в плазме и СМЖ после системного (в хвостовую вену) введения 5 мг/кг. СМЖ серийно канюлировали из мостомозжечковой цистерны (1-48 ч). Уровни IGF1R-5-mFc и A20.1-mFc в плазме и СМЖ определяли с помощью 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. Период полувыведения из плазмы IGF1R-5-mFc и A20.1-mFc были схожими (23 и 25 ч соответственно). Соотношение плазмы/СМЖ составляло 2 и 0,04% для IGF1R-5-mFc и A20.1-mFc соответственно через 24 ч после системной инъекции слитого белка.

На фиг. 10 показано иммунодетектирование IGF1R-5-mFc в секциях мозга через 48 ч после введения в хвостовую вену дозы 5 мг/кг. Крысам проводили смертельные перфузии с PBS и секции мозга (35 мкм) получали с использованием вибратора. IGF1R-5-mFc был иммунодетектирован с использованием антимышиного Fc антитела. Кровеносные сосуды в секции коры головного мозга были детектированы с использованием лектина RCA1 (агглютинин Ricinus Communis 1) (слева наверху). Астроциты были детектированы в той же секции с помощью антитела против глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) (справа наверху). IGF1R-5-mFc может быть детектирован как в обоих сосудах, так и вне сосудов (т.е. в паренхиме головного мозга, перенесенный через ГЭБ) (слева снизу), как показано стрелками. Композитный микроснимок всех окрашиваний показан справа снизу, демонстрирующий переход IGF1R-5-mFc с люминальной стороны кровеносного сосуда, через ГЭБ в паренхиму головного мозга.

На фиг. 11 показано, что IGF1R-5 не пересекается с инсулиновой или IGF1 передачей сигнала через инсулиновый рецептор или IGF1R. Фиг. 11A представляет собой характерную картину вестерн-блоттинга, демонстрирующую, что ни IGF1R-5, ни какой-либо из других протестированных анти-IGF1R V_HH (IGF1R-1, -3, -4 или -6) по отдельности не индуцирует фосфорилирование протеинкиназы B в прямом направлении при 100 нМ концентрации. Также присутствие 100 нМ IGF1R-5 или любого из других анти-IGF1R V_HH не ингибирует фосфорилирование протеинкиназы B, 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. 11B представлена характерная картина вестерн-блоттинга, показывающая, что ни IGF1R-5, ни любые другие протестированные анти-IGF1R V_HH (IGF1R, -3, -4 или -6) при 100 нМ не индуцируют фосфорилирование протеинкиназы B сами по себе и не ингибируют IGF-1 индуцированное фосфорилирование протеинкиназы B (т.е. передачу сигнала), вызванное стимуляцией 200 нг/мл IGF-1. Количественное определение плотностей полос вестерн-блоттинга из 3 независимых экспериментов показано на гистограмме (среднее +/-SD) под изображением геля. Фиг. 11C показывает вестерн-блоттинги фосфорилированных IGF1R. Клетки инкубировали либо с 100 нМ или 500 нМ IGF1R-5, либо с любым другим анти-IGF1R V_HH (IGF1R-1, -3 или -4), слитым на C-конце с мышинным Fc (например IGF1R-5-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 конструкторов не ингибировал IGF-1 индуцированное фосфорилирование IGF1R и не индуцировал фосфорилирование рецептора сам по себе.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам, специфическим к рецептору инсулиноподобного фактора роста 1, их фрагментам, а также их применениям. Более конкретно настоящее изобретение относится к антителам, специфическим 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 и может содержать последовательность FENFLHNSIFVPR (SEQ ID NO: 11) или ее фрагменты.

Настоящее изобретение дополнительно относится к выделенным или очищенным антителам или их

фрагментам, содержащим

последовательность области, определяющей комплементарность (CDR) 1 GRTIDNYA (SEQ ID NO: 1);

последовательность CDR2 IDWGDGGX (SEQ ID NO: 2), где X представляет собой A или T; и

последовательность CDR3 AMARQSRVNLDVARYDY (SEQ ID NO: 3),

где антитело или его фрагмент специфически связывается с рецептором инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R). В одном из вариантов осуществления выделенное или очищенное антитело или его фрагмент содержит последовательность CDR2 IDWGDGGA.

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 цепей (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 цепей 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 антигенсвязывающие 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 антигенсвязывающего 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 изменчивости последовательности в антигенсвязывающих 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 "гиперпеременная петля" взаимозаменяемо, и они могут быть так использованы в данном документе. CDR/петля называется здесь в соответствии с более поздней системой нумерации IMGT (Lefranc, M.-P. et al., 2003), которая была разработана для упрощения сравнения переменных 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 антигенсвязывающий 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 связывания 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 антигенсвязывающие 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 цепей 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_{NAR} 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, созреванием аффинности, стабилизацией, солубилизацией, верблюдизацией или другими способами инженерии антител. Также охва-

тываются 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 высокоаффинные 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 антигенсвязывающий 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, одна, две 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 специфическим 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 IGF1R 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: 14), или последовательностью, по существу, идентичной ей.

Антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, не должно 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 может являться sdAb. SdAb может иметь верблужье происхождение или быть полученным из верблужьих V_H и, таким образом, может быть основано на верблужьих каркасных областях; В качестве альтернативы CDR, описанные выше, могут быть привиты на V_{NAR} , V_{NH} , 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 фрагмент антитела, который "гуманизован" с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники, например, но не ограничиваясь указанным, 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 антигенсвязывающей 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), каркасным областям фрагментов антител (Fv, ScFv, Fab) или 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 по меньшей мере в следующих документах: патентах США №№ 6180370, 5693761, 6054297, 5859205 и Европейском патенте № 626390. Облицовка также упоминается в данной области как "шлифовка вариабельной области" и включает в себя гуманизацию гидрофильных областей антитела или фрагмента; таким образом, скрытые негуманизованные 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 патентах США №№ 5766886, 5821123 и Европейском патенте № 519596. Специалисты в данной области техники также достаточно знакомы со способами получения таких гуманизованных фрагментов антител и гуманизации аминокислотных позиций.

Например, не в рамках каких-либо ограничений, выделенное или очищенное антитело или его фрагмент, специфическое к IGF1R, может иметь последовательность

X₁VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSRLRLSCAASGRTIDNYAMAWX₅RQAPGKX₆X₇EX₈VX₉TID
WGDGGX₁₀RYANSVKGRFTISRDNX₁₁KX₁₂TX₁₃YLMNX₁₄LX₁₅X₁₆EDTAVYX₁₇CAMAR
QSRVNLDVARYDYWGQGTGX₁₈VTVSS (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 S; X₆ представляет собой D или G; X₇ представляет собой L или R; X₈ представляет собой F или W; X₉ представляет собой A или S; X₁₀ представляет собой A или T; X₁₁ представляет собой A или S; X₁₂ представляет собой G или N; X₁₃ представляет собой M или L; X₁₄ представляет собой N или R; X₁₅ представляет собой E или R; X₁₆ представляет собой P или A; X₁₇ представляет собой S или Y; и X₁₈ 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

QVKLEESGGGLVQAGGSRLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDFVATIDWGDG
GARYANSVKGRFTISRDNKGTMYLQMNNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDY
WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5), упоминаемой здесь как IGF1R-5;

EVQLVESGGGLVQPGGSRLRLSCAASGRTIDNYAMAWRQAPGKGLEWVSTIDWGDG
GTRYANSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDY
WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:6), упоминаемой здесь как IGF1R-5_H1;

QVQLVESGGGLVQPGGSRLRLSCAASGRTIDNYAMAWRQAPGKGLEWVATIDWGDG
GTRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDY
WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:7), упоминаемой здесь как IGF1R-5_H2;

QVQLVESGGGLVQPGGSRLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKGLEFVATIDWGDG
TRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDY
GQGTQVTVSS (SEQ ID NO:8), упоминаемой здесь как IGF1R-5_H3;

QVQLVESGGGLVQPGGSRLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDFVATIDWGDG
GTRYANSVKGRFTISRDNKGTMYLQMNSLRAEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDY
WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:9), упоминаемой здесь как IGF1R-5_H5; и

EVQLVESGGGLVQPGGSRLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDFVSTIDWGDG
GTRYANSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDY
WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 10), упоминаемой здесь как IGF1R-5_H6,

или последовательность, по существу, идентичную 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 меньшей 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 ами-

нокислота" (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 рК меньше 7, которые, как правило, отрицательно заряжены при физиологическом значении рН. Кислые аминокислоты включают глутамат (Glu или E) и аспарат (Asp или D).

Идентичность последовательности используется для оценки сходства двух последовательностей; она определяется путем вычисления процента остатков, которые являются одинаковыми, когда две последовательности выравниваются 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, описанной 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, содержащее 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 может 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 WO 2003/046560, где пентамера 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. Другие формы мультивалентной презентации также охватываются настоящим изобретением. Например, не в рамках каких-либо ограничений, антитело или его фрагмент может быть представлено 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), с-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 форматы анти-IGF1R-5 V_HH, связанного с доменом Fc, или би- или трис-

специфические слитые антитела с двумя или тремя анти-IGF1R-5 V_HH, распознающими уникальные эпитопы. Такие антитела можно легко спроектировать и получить, они могут значительно продлить период полувыведения из сыворотки 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. Fc-фрагмент 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). В конкретном неограничивающем примере мультимеризованное выделенное или очищенное антитело или фрагмент, как описано выше, может содержать последовательность SEQ ID NO: 42, 43, 12 или 13.

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 антигенсвязывающим свойствам антитела.

Антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, может 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 кровотока (Samuels, 1993). Лишь небольшие (менее 500 Да) 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 эндотелиальными клетками головного мозга и подвергаться транцитозу 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 кодооптимизирована 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 поверхности с использованием различных методик; например, не в рамках каких-либо ограничений, антитело или его фрагмент может быть связано или спарено с поверхностью с помощью His-метки, 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, нержавеющей сталь, пленку или любую другую полезную поверхность, такую как наночастицы, нанопровода и поверхности кантилевера.

Изобретение также включает антитело или его фрагмент, как описано выше, связанное с карго-молекулой. Карго-молекула может представлять собой любую подходящую молекулу, которая поставляется через ГЭБ антителом или его фрагментом. Карго-молекула может иметь молекулярную массу в диапазоне от около 1 до около 200 кДа; например карго-молекула 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 карго-молекула 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, Fc-фрагмент, фермент, белок, антитело и т.д.) или около 200 кДа (например, но не ограничиваясь указанным, моноклональное антитело).

Например, не в рамках каких-либо ограничений, карго-молекулой 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, плазида), цитотоксический агент, вирусный вектор (адено-, ленти-, ретро-), одна или более липосом или наноносителей, загруженных любым из ранее перечисленных типов карго-молекул, или одна или несколько наночастиц, нанопроводов, нанотрубок или квантовых точек. Карго-молекула, 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 карго-молекулой с использованием любого способа, известного в данной области (рекомбинантной технологии, химической конъюгации и т.д.).

Карго-молекула, 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, карго-молекула 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 карго-молекулы с антителом или его фрагментом может быть использован подходящий линкер. Способы связывания антитела или его фрагмента с карго-молекулой, такой как терапевтический или детектируемый агент, хорошо известны специалистам в данной области техники.

В одном неограничивающем примере карго-молекулой 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-5 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, может быть использовано 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, СПЕКТ 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 радиоиндикатор, 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 которой 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 акустически активный и газонаполненный микропузырь. Ультразвук является распространенной технологией для скрининга и раннего выявления заболеваний человека. Это дешевле MRI или скинтиграфии и безопаснее, чем технологии молекулярной визуализации, такие как радионуклидная визуализация, так как не связано с радиацией.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу транспортировки представляющей 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 проходит гематоэнцефалический барьер. Молекула может быть любой желаемой молекулой, в том числе карго-молекулой, 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), подкожное (sc) и внутримышечное (im) введение. В этом способе антитело или его фрагмент согласно данному изобретению "переносит" 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 своей специфичностью; например, не в рамках каких-либо ограничений, композиция может содержать антитела или их фрагменты, специфические 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 находиться в форме суспензии, в форме порошка (например, но ограничиваясь лиофилизированной или инкапсулированной), в форме капсул или таблеток. Например, не в рамках каких-либо ограничений, когда композиция находится в форме суспензии, носитель может содержать воду, физиологический раствор, подходящий буфер или добавки для улучшения растворимости и/или стабильности; реконструкция для получения суспензии осуществляется 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/объема; 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 карго-молекулы, доставляемой через ГЭБ субъекта, в котором карго-молекула связана с одним или более выделенным или очищенным антителом или его фрагментом, как описано в настоящем документе, причем способ включает стадии:

- a) сбора спинномозговой жидкости (СМЖ) у субъекта; и
- b) использования целевых методов протеомики для определения количества карго-молекулы, связанного с одним или более антителом или его фрагментом, в спинномозговой жидкости.

Карго-молекула может представлять собой любую желаемую молекулу, в том числе карго-

молекулы, 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 b), 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 карго-молекулой, может быть введено субъекту до сбора спинномозговой жидкости. Может потребоваться подходящая задержка между введением и доставкой антитела или его фрагмента, связанного с карго-молекулой, через ГЭБ. Задержка может составлять по меньшей мере 30 мин после введения антитела или фрагмента, связанного с карго-молекулой; например, не в рамках каких-либо ограничений, задержка может составлять по меньшей мере 30 мин, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, или 5 ч. Целевые методы протеомики, используемые для определения количества одного или более антитела или его фрагмента, связанного с карго-молекулой, 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 меченых 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 карго-молекулу.

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: 14) был получен. Фрагмент состоит из N-концевого 30 аминокислотного сигнального пептида, полной альфа-субъединицы, сайта фуринового расщепления (RKRR, SEQ ID NO: 15; 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: 16) 5'-GCTCTAGATCAGAAGTTTTTCATATCCTGTTTGG-3' (обратный; SEQ ID NO: 17) и субклонировали в сайт Smal pUC19. Последовательность IGF1R⁹³³ затем субклонировали в pCDN4/Myc-His (Invitrogen), чтобы создать rIGF1R⁹³³-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 полиэтиленimina. Свежую среду (LC-SFM (бессывороточная среда с низким кальцием)), содержащую 1 мкг/мл доксициклина и 10 мкг/мл кумата, добавляли к клеткам через 5 ч после трансфекции, и супернатант, содержащий LV частицы, был собран после 48-72 ч, его концентрировали с помощью ультрацентрифугирования при 100000 g в течение 2 ч 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, 0,5-1,0×10⁵ 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 мин при 37°C. Свежеприготовленную суспензию LV добавляли к клеткам через 4 ч после посева. После 24 ч 500 мкл среды с добавлением декстрансульфата добавляли к клеткам. Для повышения уровня экспрессии клетки были вновь трансфицированы 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 (10×) 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 4,5-2,5 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_HH, 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 адьюванта Фройнда (Sigma, St. Louis, MO). Еще три инъекции 100 мкг IGF1R⁹³³-His антигена с неполным адьювантом Фройнда (Sigma) были выполнены на 22, 36 и 50 сутки. Окончательную инъекцию 100 мкг антигена без адьюванта проводили на 77 сутки. Преиммунизированная кровь отбиралась до первой инъекции на 1 сутки и служила в качестве отрицательного контроля. Пробы крови (10-15 мл) собирали на 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 1×10⁷ 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 (Nalgen, 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 антикозий 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 PBMC 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 PBMC, 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, специфических к варибельной области

```
MJ1: 5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCSMKGTGCAGCTGGTGGAKTCTGGG
GGA- 3' (SEQ ID NO:18)
MJ2: 5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTAAGCTGGAGGAGTCTGGG
GGA- 3' (SEQ ID NO:19)
MJ3: 5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGCTCAGGTACAGCTGGTGGAG
TCT- 3' (SEQ ID NO:20),
```

и двух антисмысловых CH₂-специфических праймеров

CH₂: 5'-CGCCATCAAGGTACCAGTTGA-3' (SEQ ID NO: 21)

CH₂b₃: 5'-GGGGTACCTGTCATCCACGGACCAGCTGA-3' (SEQ ID NO: 22).

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 CH₂b₃ праймеров, 5 мкл 10× реакционного буфера, 1 мкл 10 мМ дНТФ, 2,5 ед. Таq 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 с, 72°C в течение 30 с 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 :23) и MJ8 праймеров (5'-CATGTGTAGATTCTGGCCGGCCTGGCCTGAGGAGACGGTGACCTGG-3' SEQ ID NO: 24), 5 мкл 10× реакционного буфера, 1 мкл 10 мМ дНТФ, 2,5 ед. Таq 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 с, 57°C в течение 30 с 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 до 420 п.о., соответствующие V_HH фрагментам тяжелой цепи антитела, очищали с использованием набора для очистки ПЦР Qiagen-QIAquick (Qiagen), расщепляли рестриктазой SfiI (New England Biolabs) и снова очищали с использованием такого же набора.

80 мкг фагидного вектора pMED1 (Arbabi-Ghahroudi et al, 2009b) расщепляли с помощью SfiI в течение ночи при 50°C. Для того, чтобы свести к минимуму самолигирование, добавляли 20 ед. рестриктаз XhoI и PstI, чтобы отсечь вырезанные фрагменты, и реакцию расщепления инкубировали в течение еще 2 ч при 37°C. 60 мкг расщепленной фагидной ДНК лигировали с 6 мкг расщепленных (SfiI в течение 5 ч при 50°C) V_HH фрагментов (мольное соотношение 1:1) в течение 3 ч при комнатной температуре с использованием системы 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., 2009). Размер библиотеки был определен как 5×10⁷, как описано в Arbabi-Ghahroudi et al., 2009b. 20 клонов были секвенированы и содержали все уникальные последовательности V_HH. E.coli, содержащие библиотеку, культивировали в течение 2-3 ч при 37°C, 250 об/мин в присутствии 2% (мас./об.) глюкозы. Затем бактерии осаждали, снова суспендировали в 2хYT/Amp/Glu (2хYT среда(экстракт дрожжей+триптон) с 100 мкг/мл ампициллина и 2% (мас./об.) глюкозы) с 35% (об./об.) глицерина и хранили при -80°C в небольших аликвотах.

Пэннинг эксперименты, по существу, проводили, как описано у Arbabi et al., 1997. Два миллилитра библиотеки (2,0×10¹⁰ бактерий) размораживали на льду и выращивали в 2хYT/Amp/Glu в течение приблизительно 2 ч при 37°C (A₆₀₀=0,4-0,5). E.coli были впоследствии инфицированы 20× избытком M13K07 хелпер-фага (New England Biolabs) в течение 1 ч при 37°C. Затем культуру центрифугировали при 4°C и гранулы инфицированных бактерий повторно суспендировали в 200 мл 2хYT/Amp с 50 мкг/мл канамицина и инкубировали при 37°C и 250 об/мин. Частицы фага в супернатанте культуры инкубировали с 1/5 объема 20% ПЭГ(полиэтиленгликоль) 8000/2,5 М NaCl на льду в течение 1 ч и центрифугировали при 10000 об/мин 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 196-луночные планшеты Maxisorp™ покрывали 10 мкг рекомбинантного IGF1R⁹³³-His на лунку в 100 мкл PBS в течение ночи при температуре 4°C. Лунки промывали PBS и блокировали PBS с 1% (мас./об.) казеином в течение 2 ч при температуре 37°C. Приблизительно 10¹² фагов было добавлено в лунки после блокировки и инкубированы в течение 2 ч при 37°C. 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°C. 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, 5 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 исключени-

ем 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, дублирующий IGF1R-5, был идентифицирован для дальнейшего изучения; его последовательность показана ниже

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVATIDW
GDGGARYANSVKGRFTISRDNAGTMYLQMNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNL
DVARYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5)

Пример 4. Гуманизация IGF1R-5.

Для того чтобы избежать потенциальной иммуногенности IGF1R-5, 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-5 V_HH, были идентифицированы с помощью поиска BLAST в Protein Data Bank (PDB). 3D структура IGF1R-5 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-5 V_HH была затем построена путем введения мутации основной структуры матрицы последовательности IGF1R-5; это включало 35 мутации в различных позициях. Модель IGF1R-5 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 каркаса 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-5 V_HH, соответствовали человеческой VH-3 подгруппе. Несколько человеческих зародышевых каркасных VH-3 последовательностей, которые наиболее близки к IGF1R-5 V_HH, также были сохранены в дополнение к человеческой VH-3 консенсусной последовательности. В IGF1R-5 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-5 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-5 V_HH (IGF1R-5 H1, H2, H3, H5, H6), 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-5, определенные в примере 3, и гуманизированные варианты, сконструированные в примере 4 (совместно именуемые здесь "V_HH конструкторы"), субклонировали в экспрессирующие плазмиды для экспрессии белка и очистки.

Очищали р фагмидный вектор, содержащий ДНК IGF1R-5 клона, с использованием набора Miniprep (Qiagen). IGF1R-связывающий V_HH IGF1R-5 был амплифицирован путем ПЦР из фагмидного вектора pMED1 с добавлением N-концевого сайта расщепления BbsI и сайта расщепления BamHI на C-конце, с использованием праймеров

5'-TATGAAGACACCAGGCCAGGTAAGCTGGAGGAGTCT-3' (прямой; SEQ ID NO: 25)

5'-TTGTTCCGATCCTGAGGAGACGGTGACCTG-3' (обратный; SEQ ID NO: 26).

ПЦР-фрагмент и экспрессионный вектор pSJF2H расщепляли рестриктазами BbsI и BamHI (NEB) в соответствии с инструкциями изготовителя. Расщепленный IGF1R-5 V_HH фрагмент лигировали с расщепленным экспрессионным вектором pSJF2H с использованием способов, аналогичных тем, которые описаны у Argabi-Ghahroudi et al. (2009b). Продукты лигирования были затем трансформированы в электро-

компетентные 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 рSJF2H аналогично тому, как описано выше, и затем трансформированы в TG1 E.coli; клоны были отобраны, как описано выше.

Экспрессия белка.

Все конструкты IGF1R-5 V_{НН} 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 об/мин в течение ночи при температуре 37°C. Бактерии гранулировали центрифугированием при 6000 об/мин 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 ч. Затем добавляли 45 мл холодного TES (1/8 объема от общего объема) и немедленно встряхивали в течение 1 мин и в течение 15 с каждые 10 мин после этого в течение 1 ч для извлечения белка из периплазмы. Полученный супернатант, содержащий V_{НН}, фильтровали через 0,22 мкм мембрану и диализовали 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 NiTrap Chelating HP (GE Healthcare), как описано ранее (Arbabi-Ghahroudi 2009b). Элюированные белковые фракции анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттинга, прежде чем диализовали против PBS, как описано ранее (Arbabi-Ghahroudi 2009b). Очищенные белковые фракции объединяли и диализовали против PBS+3 мМ ЭДТА и определяли концентрацию белка.

Пример 6. Биофизическая характеристика анти-IGF1R V_{НН} IGF1R-5.

Анти-IGF1R V_{НН} IGF1R-5 конструкты, экспрессированные и очищенные в примере 5, были охарактеризованы с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC), анализа температуры плавления и поверхностного плазмонного резонанса. Картирование эпитопа IGF1R-5 V_{НН} также было проведено.

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 антитела были мономерными, основываясь на элюирующем объеме по сравнению со стандартами (фиг. 3А).

Температура плавления.

Термическую стабильность IGF1R-5 V_{НН} конструктов оценивали с использованием измерения температуры плавления (T_м) 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 с, ширина полосы 1 нм, шаг данных 1 нм и время интегрирования 1 с. Для измерения температуры плавления или T_м (Greenfield, 2006a; 2006b) спектры CD были записаны в температурном диапазоне от 30 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. Доля фолдинга (ff) была получена по формуле, описанной в (Greenfield, 2006a; 2006b);

$$ff = \frac{[\Theta]_T - [\Theta]_U}{[\Theta]_F - [\Theta]_U} \quad \text{формула 1}$$

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_м) получали в средней точке кривой развертывания (доля 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_м) V_{НН} были определены на основе данных эллиптичности, предполагающих два состояния системы, что находится в соответствии с наблюдаемыми кривыми денатурации, соответствующими резкому переходу к денатурации (фиг. 2D). Значения T_м были взяты в средней точке сигмоидальных кривых денатурации доли фолдинга (ff) в зависимости от температуры. Результаты показаны на фиг. 3B. Температуры плавления гуманизированных V_{НН} были улучшены (повышены) по сравнению с IGF1R-5 V_{НН}, что предполагает улучшенные биофизические свойства.

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR).

Связывание мономерных IGF1R-5 V_{НН} конструктов с иммобилизованным рекомбинантным чело-

вещеским IGF1R (пример 1) определяли с помощью SPR с использованием BIACORE 3000 (GE Healthcare). Около 3000 резонансных единиц (RU) рекомбинантного человеческого IGF1R (R & D Systems) иммобилизовали на сенсорном чипе CM5. Иммобилизацию проводили при концентрации 10 мкг/мл в 10 mM ацетате при pH 4,0 с использованием набора для связывания амина, поставляемого изготовителем. Оставшиеся сайты связывания блокировали с помощью 1 M этаноламина с pH 8,5. Блокированная этаноламином поверхность была использована в качестве референсной поверхности. Для исследований связывания анализы проводились при 25°C в 10 mM HEPES, pH 7,4, содержащем 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,005% поверхностно-активное вещество P20 (полиоксиэтиленсорбитан; GE Healthcare). Различные концентрации IGF1R-5 V_{HH} вводили через иммобилизованный человеческий IGF1R и референсные поверхности при скорости потока 20 мкл/мин. Поверхность регенерировали 10 mM глицином, pH 2,0, со временем контакта 24 с. Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения BIAevaluation 4.1 (GE Healthcare). Результаты на фиг. 3C показывают, что данные соотносятся с моделью 1:1, давая K_D, показанные в табл. 1. Это указывает на то, что IGF1R-5 и гуманизированные варианты являются высокоаффинными однодоменными антителами, связывающимися с внеклеточным доменом человеческого IGF1R.

Таблица 1
Аффинность IGF1R-5 V_{HH} конструкторов к человеческому (h) IGF1R, определенная посредством SPR

	поверхность h-IGF1R		
	K _D (нМ)	k _d (с ⁻¹)	k _a (M ⁻¹ с ⁻¹)
IGF1R-5	0,6	3,4 × 10 ⁻⁴	5,3 × 10 ⁵
IGF1R-5 H1	11,0	4,3 × 10 ⁻³	3,9 × 10 ⁵
IGF1R-5 H2	7,5	2,9 × 10 ⁻³	3,8 × 10 ⁵
IGF1R-5 H3	0,8	4,1 × 10 ⁻⁴	5,2 × 10 ⁵
IGF1R-5 H5	1,6	8,0 × 10 ⁻⁴	5,0 × 10 ⁵
IGF1R-5 H6	1,7	7,2 × 10 ⁻⁴	4,3 × 10 ⁵

Анализы SPR были в дальнейшем использованы для демонстрации того, что IGF1R-5 V_{HH} не связывается с тем же эпитопом на рецепторе, что и природный лиганд IGF-1 (фиг. 3D). Эксперимент планировали, проводили и анализировали, как описано выше. Связывание с поверхностью свежеемобилизованного человеческого IGF1R изучалось путем инъекции IGF1R-5 V_{HH} при концентрации 25×K_D с последующей совместной инъекцией IGF1R-5 и человеческого лиганда IGF-1 при концентрациях 25×K_D при скорости потока 20 мкл/мин и временем инъекции 5 мин. Поверхности регенерировали промывкой рабочим буфером. IGF1R-5 V_{HH} связывал рецептор с насыщением, достигающим 38RU на не восстановленной поверхности. Лиганд IGF1 был способен связываться с рецептором IGF1R в присутствии IGF1R-5 V_{HH} с ожидаемым ~70RU (в относительных единицах). Одновременное связывание IGF1R-5 V_{HH} и IGF1 с рецептором показывает, что они оба связываются с различными эпитопами. Анализы SPR IGF1 R-5 V_{HH} и инсулинового рецептора дали основание полагать, что IGF1R-5 V_{HH} не может связываться с инсулиновым рецептором (данные не показаны). Несмотря на различия в относительных единицах (RU) IGF1R-5 связывания с восстановленной в отличие от свежей, не восстановленной поверхности, аффинность связывания, определенная для обеих поверхностей, была схожей и могла быть воспроизведена в различных экспериментах (данные не показаны).

Картирование эпитопов.

Услуги картирования эпитопов предоставлены PEPSCAN (Lelystad, The Netherlands; pepscan.com). Полноразмерная последовательность IGF1R показана на фиг. 2. На основе результатов картирования эпитопов и трехмерной визуализации соответствующей структуры рецептора инсулина (опубликованной в Protein Data Bank учетный № 2DTG, не показана) было предположено, что эпитоп, с которым связывается IGF1R-5 V_{HH}, имеет последовательность FENFLHNSIFVPR (SEQ ID NO: 11).

Пример 7. Поглощение IGF1R-5 эндотелиальными клетками головного мозга.

Для того чтобы определить, поглощаются ли IGF1R-5 клетками, клетки svARBEC инкубировали с Cy5-5-меченым IGF1R-5.

IGF1R-5 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. 1 M карбонатного/бикарбонатного буфера (759 mM бикарбоната, 258 mM карбоната) pH 9,3 добавляли в 4 мг V_{HH}, приготовленного в PBS (1,06 mM KH₂PO₄, 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 бипродукты реакции фильтровали с помощью обесоливающих колонок для центрифугирования Zeba, 7K MWCO (Pierce) и измеряли с помощью спектрофотометра Beckman DU530 (компании Beckman Coulter). Cy5.5-меченные IGF1R-5 или FC5 в качестве

положительного контроля (1 мг/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 механизма 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-5 был обнаружен вне клеток, совместно локализующийся с клеточной мембраной, окрашенный агглютинином зародышей пшеницы. В противоположность этому при инкубации при 37°C IGF1R-5 накапливался в везикулах внутри клеток, вероятно эндосомах, что предполагает, что поглощение антител клетками происходит путем механизма активного транспорта. 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 конструкторов IGF1R-5-Fc.

Конструкторы, содержащие IGF1R-5 V_HH, слитые с кристаллизуемым фрагментом мышиного антитела (Fc; mFc2b), получали, экспрессировали и выделяли. И C-концевой конструктор (IGF1R-5-mFc) и N-концевой IGF1R-5 мышиный Fc слитый конструктор (mFc-IGF1R-5) были получены, последовательности показаны на фиг. 5A-B, схематическое изображение молекул показано на фиг. 5C. Слитые белки (~80кДа) также содержали N-концевой сигнальный пептид (MEFGLSWVFLVAILKGVQC; SEQ ID NO: 40), который не показан в последовательности на фиг. 5A-B, так как он расщепляется после секреции.

IGF1R-5 кДНК клонировали в экспрессионный вектор млекопитающих рТТ5 (Durocher, 2002), содержащий мышиный фрагмент Fc2b. Полиплексы полученного вектора были предварительно получены смешиванием 25 мл раствора плазмидной ДНК, содержащего 187,5 мкг рТТ5-IR5mFc2b, 56,25 мкг рТТ-АКТdd (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 (полиэтиленмин), содержащего 1,125 мг PEIpro™ (PolyPlus Transfection), оба в F17 среде. Смесь инкубировали в течение 10 мин 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 24 ч после трансфекции в культуру добавляли 12,5 мл 40% (мас./об.) 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 Econo-Pac (BioRad), калиброванную в PBS. Обессоленные антитела затем стерильно фильтровали при пропускании через Millex GP (Millipore) фильтр (0,22 мкм) и аликвотировали.

Пример 9. Фармакокинетика IGF1 R-5-mFc в СМЖ и плазме.

Анализ *in vivo* проводили, чтобы определить, способен ли IGF1R-5-mFc (пример 8) проходить в мозг и, в частности, в спинномозговую жидкость (СМЖ), а также для количественного определения присутствия в СМЖ и сыворотке.

Способ, использованный для многократного отбора образцов СМЖ мостомозжечковой цистерны, был разработан в NRC (Национальный научно-исследовательский совет) путем модификации ранее описанных способов (Huang *et al.*, 1995; Kornhuber *et al.*, 1986; Yaksh and Rudy, 1976). 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 NRC и находились в соответствии с руководствами Канадского совета по уходу за животными.

Самцов крыс линии Wistar 8-10-недельного возраста (диапазон веса 230-250 г) анестезировали смесью кетамин/ксилазин (45/12 мг/кг, *i.p.*) и фиксировали в стереотаксическом инструменте (любое другое устройство, твердо удерживающее голову животного, может быть использовано). Разрез, начинающийся на линии, соединяющей уши, и простирающийся около 3 см в каудальном направлении, делали по средней линии; фасцию ретрагировали из черепа, обнажая поверхностный слой мышц шеи, которые затем были разделены срединным разрезом, начинающимся с затылочного гребня и простирающимся каудально около 2 см. Отделение поверхностной мускулатуры обнажало расположенный внутри слой мышц, который легко отделялся вдоль средней линии тупым рассечением. Скребок использовали, чтобы отделить мышцы от места их прикрепления на затылочной кости примерно на 0,5 см по обе стороны от средней линии; осторожное ретрагирование мышц шеи обнажало атланта-затылочную мембрану; голову крысы затем наклоняли приблизительно под углом 45°. Небольшое отверстие делали с помощью иглы одноразового использования 27G; когда разрез выполнен правильно, чистая СМЖ немедленно изливается через щель; полиэтиленовые трубки (PE-20) затем вставляли на 0,5 см в щель. Канюлю фиксировали в

атланта-затылочной мембране с помощью гистоакрилового клея или клея Vetbond, что позволяло собирать образцы в течение длительного периода времени (более одной недели), а также способствовало профилактике инфекций или попадания других загрязняющих веществ в СМЖ; канюлю затем тщательно промывали искусственной СМЖ. Коллекторная часть канюли прочно прикреплялась к затылочной кости зубным цементом. После того как канюля была установлена, свободную часть (4-5 см) пропускали через кожу 20G иглой, мышцы и кожу затем закрывали, открытый участок уменьшали до нужной длины, а кончик слегка нагревали, чтобы предотвратить обратный ток спинномозговой жидкости. Наконец, животное помещали в комнату восстановления по меньшей мере на одну неделю, чтобы мостомозжечковая цистерна затянута. Этот способ не предполагает бурение черепа, как описано в других способах, позволяя избежать повреждения мозговых оболочек и прилегающей к ним нервной ткани.

Через неделю после полостной канюляции 5 мг/кг IGF1R-5mFc или контрольного слияния A20.1mFc вводили в хвостовую вену. Крыс анестезировали 3% изофлураном; первые 10 мкл СМЖ, накопленные в канюле, отбрасывали. 10 мкл спинномозговой жидкости собирали через 0,5, 1, 2, 24 и 48 ч после инъекции. Образцы крови (50 мкл) брали из хвостовой вены с использованием полимерных гелевых трубок (Becton, Dickinson Company Franklin Lakes, NJ USA) в те же моменты времени; образцы центрифугировали (15 мин при 1600 д; при комнатной температуре). Образцы хранили при -80°C до проведения анализа. В конце эксперимента крыс умерщвляли обезглавливанием под обезболиванием.

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 $V_{H}H$, как ожидается, будут значительно меньше в спинномозговой жидкости (менее 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. 9 и в табл. 2. На чертеже показан "типичный" фармакокинетический профиль Fc-содержащей молекулы в сыворотке. Уровни в СМЖ IGF1R-5FC увеличивались со временем, достигая максимума через 24 ч после инъекции, когда они достигали 2% от уровня в сыворотке. В то время как уровни в сыворотке/распад аналогичны для контрольных слитых молекул A20.1FC, их уровни в СМЖ минимальны, достигая 0,04% от уровня в сыворотке через 24 ч. В табл. 2 приведены фармакокинетические параметры IGF1R5-FC и контрольного A20.1-FC в СМЖ и в сыворотке после системного внутривенного введения эквивалентных доз (5 мг/кг $V_{H}H$ - Fc слияний). Период полувыведения из сыворотки IGF1R5-FC и контрольного A20.1-FC составлял 23 и 25 ч соответственно.

Отрицательный контроль A20.1FC (75кДа) демонстрирует соотношение в сыворотке/СМЖ через 24 ч, аналогичное тем, которые описаны в литературе для молекул подобного размера. Типичное (поясничное) соотношение в сыворотке/СМЖ альбумина (60кДа) в равновесном состоянии составляет 0,1%, тогда как соотношение в сыворотке/СМЖ для IgG составляет 0,07 (Shen et al., 2004; Lin, 2008). Соотношение IGF1 R5-Fc в сыворотке/СМЖ на 24 ч в 50 раз выше, чем для A20.1mFc.

Соотношение AUC в СМЖ/сыворотке для каждой молекулы свидетельствует о "воздействии" конструктора на ЦНС в течение периода 48 ч. IGF1R-5-Fc показывает 33-кратное повышение воздействия на центральную нервную систему по сравнению с A20.1FC. Эти результаты указывают на то, что IGF1R-5FC имеет облегченный доступ в СМЖ по сравнению с контрольной $V_{H}H$ -Fc слитой молекулой; это может произойти путем специфической "секреции" сосудистым сплетением, или путем "вымывания" (диффузии через эпидимальный слой желудочковой системы мозга или через объемный поток межклеточной жидкости) из паренхимы головного мозга после пересечения ГЭБ, или обоими путями (Abbott 2004; DeLange, 2002; Groothuis, 2007).

Также было показано, что дополнительные конструкторы ~110 и ~180кДа переносились через ГЭБ с помощью IGF1R5 или гуманизированной версии (данные не показаны).

Таблица 2

Фармакокинетические параметры системно введенных IGF1R-5Fc и A20.1Fc в сыворотке и СМЖ мостомозжечковой цистерны у крыс

		IGF1R-5Fc	A20.1Fc
СМЖ	AUC (ч*нг/мл)	15750,5	774
Сыворотка	AUC (ч*нг/мл)	1369563	2247094
	Полувыведение (фаза распространения) (ч)	22,89	25,46
	Клиренс (мл/ч)	1,003	0,66
Соотношение в СМЖ/сыворотке (24 ч) (%)		1,988	0,04
AUC соотношение в СМЖ/сыворотке (%)		1,150038	0,034
Кратность увеличения (воздействие на СМЖ)			33,82

Пример 10. Транспорт IGF1R-5 через модель гематоэнцефалического барьера *in vitro*.

Для того чтобы оценить, проходит ли IGF1R-5 V_{HN} и конструкторы примера 8 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; Naqqani 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). Эквивалентные количества (5,6 мкм) положительных (FC5) или отрицательных контролей (A20.1, Clostridium difficile токсин А связывающий V_{HN} ; и EG2, EGFR связывающий V_{HN}), IGF1R-5 V_{HN} и С- и N-концевые mFc-IGF1R-5 конструкторы примера 8 тестировали на их способность проникать через эту крысиную модель ГЭБ *in vitro*.

После экспозиции эквивалентных 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 Naqqani 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. 5 А) и нанесены на график. Значение P_{app} обычно используется для определения способности молекулы к прохождению гематоэнцефалического барьера [Qr/dt - общая сумма в приемном отделении в зависимости от времени; А - площадь монослоя клеток; CO - начальная концентрация дозированного раствора], значения P_{app} являются мерой удельной проницаемости соединения через эндотелиальный монослой мозга.

Результаты показаны на фиг. 6B-D. Приведенные результаты являются средними значениями P_{app} , полученными из нескольких независимых экспериментов. Оба отрицательных контроля имеют очень низкое значение P_{app} , указывая на то, что неспецифический транспорт или парацеллюлярный перенос этих V_{HN} через модель ГЭБ минимальны. IGF1R-5 V_{HN} имеет высокое значение P_{app} , что указывает на высокую скорость переноса в *in vitro* модели ГЭБ. Значение P_{app} для IGF1R-5 V_{HN} (фиг. 6B) аналогично значению положительного контроля - ГЭБ-проницаемого V_{HN} FC5 (W002/057445). Гуманизированные IGF1R-5 V_{HN} варианты показали схожие или повышенные значения P_{app} по сравнению с IGF1R-5 дикого типа (фиг. 6C). Примечательно, что IGF1R-5 H2 демонстрировал значительное увеличение (35 %) значения P_{app} по сравнению с IGF1R-5 дикого типа (фиг. 6C). Два гуманизированных варианта IGF1R-5 H1 и IGF1R H2, которые показали улучшенное прохождение ГЭБ *in vitro* (значения P_{app}), также показали более высокие скорости диссоциации в исследованиях связывания рецептора с помощью SPR, проведенных здесь (фиг. 3C), предполагая, что увеличенные скорости диссоциации улучшают трансцитоз антител, связывающихся с IGF1R рецептором рецепторно-опосредованного трансцитоза ГЭБ. IGF1R-5, слитый с N- или С-концом мышинового Fc (80кДа), имел близкие значения P_{app} к значениям однодоменного антитела IGF1R-5 (15кДа), что показывает, что молекулы 80 кДа могут эффективно пересекать гематоэнцефалический барьер *in vitro* при слиянии с IGF1R. Следует отметить, что слияние с N-концом Fc обеспечило некоторое преимущество (улучшение на 15% P_{app}). Эти данные показывают, что IGF1R-5 может быть использован в качестве платформы для создания биспецифических антител, в частности, слитых с С-концом полного IgG с терапевтической функцией, которая требует переноса в мозг. Эти результаты

определяют, что IGF1R-5 подвергается облегченному трансцеллюлярному транспорту через эндотелиальные клетки мозга *in vitro* и схожие свойства могут быть достигнуты *in vivo*. Следует отметить, что конструкторы, содержащие IGF1R-5 или гуманизированные версии, связанные с карго-молекулой (MW ~110 или 180кДа) также переносятся через ГЭБ (данные не показаны).

Абсолютное определение количества $V_{\text{H}}\text{H}$ с использованием способа MRM - ILIS.

Эти способы описаны у Haqqani et al. (2012). Вкратце, для проведения SRM (мониторинга селективных реакций, также известного как мониторинг множественных реакций (MRM)) анализа $V_{\text{H}}\text{H}$ каждый $V_{\text{H}}\text{H}$ 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 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 $V_{\text{H}}\text{H}$ в клеточных средах или биологических жидкостях (сыворотке или спинномозговой жидкости (СМЖ)) включал в себя впрыскивание известного количества ILIS (инъекция инсулина лизпро) (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; Haqqani et al. 2012), которое является модифицированной версией программного обеспечения MatchRx. Для каждого $V_{\text{H}}\text{H}$ 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. $V_{\text{H}}\text{H}$ 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 менее 0,05 по сравнению с конечными значениями интенсивностей соответствующего чистого $V_{\text{H}}\text{H}$.

Образцы, содержащие смеси $V_{\text{H}}\text{H}$ (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 PepMaps 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 мин, 20-46% в течение 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 $V_{\text{H}}\text{H}$ -специфические пептиды, используемые для детектирования и количественного определения каждого $V_{\text{H}}\text{H}$ в мультиплексном анализе, приведены в табл. 3.

Пептиды, используемые при nanoLC-SRM детектировании FC5, FC5-ILIS, EG2, A20.1, IGF1R-5 и альбумина, (a) в различных описанных исследованиях анализа 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 $V_{\text{H}}\text{H}$. A20-1, как описано у Hussack et al., 2011 b; EG2, как описано у Iqbal et al., 2010.

Таблица 3

Белок	Сигнатуры	SEQ ID NO:	уникальный
IGF1R-5	EFVATIDWGDGGAR	27	да
	TIDNYAMAWSR	28	да
	LEESGGGLVQAGGSLR	29	
FC5	ITWGGDNTFYNSVSK	30	да
FC5-ILIS	ITWGGDNTFYNSVSK ^(b)	30	да
A20.1	TYYADSVK	31	да
	EFVAAGSSTGR	32	да
	TFSMDPMAWFR	33	да
	DEYAYWGGGTQVTVSSGQAGQGSEQK	34	да
EG2	DFSDYVMGWFR	35	да
	LEESGGGLVQAGDSLRL	36	да
	NMVYLQMNLSKPEDTAVYYCAVNSAGTYVSPR	37	да
Альбумин	APQVSTPTLVEAAR	38	да

Пример 11. Конъюгация IGF1R-5 с галанином.

Для того, чтобы определить, способен ли IGF1R-5 пересекать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) *in vivo* и "переносить" через ГЭБ молекулу, которая не может пересечь ГЭБ самостоятельно, нейропептид Галанин был химически конъюгирован с IGF1R-5 V_HN или с IGF1R-5, слитым с C- или N-концом мышиноного Fc, 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-5 V_HN и Fc-слитые конструкторы были конъюгированы с фрагментом крысиного Галанина (Gal) с модифицированным цистеамидом C-концом (Biomatic) (GWTLNSAGYLLGPHAIIDNHRFSDDKHGLT-цистеамид, SEQ ID NO: 39). Схема конъюгации показана на фиг. 7.

Вкратце, 5 мг IGF1R-5 V_HN (пример 5) 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) (7,5× избыточное мольное отношение). Затем смесь продували газообразным азотом и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре (RT) для реагирования эфирного NHS остатка сульфо-SMCC с аминогруппами V_HN. Впоследствии непрореагировавший сульфо-SMCC был удален из активированного малеимидом IGF1R-5 V_HN 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 (6,5× избыточное мольное отношение, как описано выше).

Отдельно и одновременно иаланин с модифицированным цистеамидом C-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 (дителиотриетол) для предотвращения образования дисульфидных мостиков во время очистки). Наконец, добавляли 100 мкл 0,5 М ЭДТА (конечная концентрация 5 мМ).

Очищенные активированные малеимидом IGF1R-5 V_HN и IGF1R-5-Fc конструкторы (2,6 мл) разбавляли до 5 мл 0,5X PBS, 2,5 мМ ЭДТА, а затем 5 или 1 мл Gal-суа соответственно был добавлен во время вортексирования. Образцы продували азотом, герметизировали и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. На следующий день непрореагировавший Gal-суа был удален с помощью колонок Amicon-15 10 и 30K (Millipore) соответственно. Образцы добавляли в колонку и центрифугировали при 4000 g в течение 7 мин 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 вставку 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-5-Gal и IGF1 R-5-Fc-Gal затем прогоняли в 16 или 10% SDS-PAGE невозстанавливаемом геле и окрашивали серебром, чтобы подтвердить изменения молекулярной массы после конъюгации. Реакцию титровали до достижения соотношения ~ от 1 до 2 молекул Галанина на V_HN или IGF1 R-Fc конструкторы.

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_HN пропускали через колонку Amicon-15-50K MWCO центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин; элюировали и собирали. Этот продукт элюирования, затем добавляли в колонку Amicon-15-10K MWCO и центрифугировали при 4000 g 7-10 мин, что приводило к уменьшению объема супернатанта с 15 до 7,5 мл. Объем супернатанта в колонке возвращали к 15 мл, добавляя PBS. Колонку центрифугировали снова, как описано выше. Супернатант собирали и уровни эндотоксина измеряли системой En-

doSafe-PTS с использованием картриджей с диапазоном чувствительности 10-0,1 EU/мл (единиц эндотоксина на мл) (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.

Fc-слитые конструкторы были получены в клетках млекопитающих в стерильных условиях. Уровни эндотоксина были измерены, как описано выше, в образцах, очищенных от клеток, и только образцы с EU менее 0,5 на 1 мг были использованы для исследований на животных.

Пример 12. Транспорт IGF1R-5-Gal с использованием модели Харгривса.

Для того, чтобы оценить, проходят ли IGF1R-5-Gal, mFc-IGF1R-5-Gal и IGF1R-5-mFc-Gal (пример 11) 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 Nagreaves 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 светотемновом 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 Winstar 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 теплового раздражителя на плантарной поверхности обеих задних лап (воспаленная и невоспаленная контрольная лапа), используя плантарное устройство Анальгезиометр для стимуляции лапы (ИТС 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 с 17 до 20 с в обеих задних лапах перед введением CFA. Если ответ не происходил в течение 20 с, 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 была использована в качестве контроля в сравнении с инъекцированной 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, проходят ли IGF1R-5-Gal, mFc-IGF1R-5-Gal и IGF1R-5-mFc-Gal гематоэнцефалический барьер и могут ли связываться с рецепторами-мишенями (GalR1 и 2) в паренхиме головного мозга, крысы получали одну инъекцию в хвостовую вену IGF1R-5-Галанина (2,93 или 5,85 мг/кг; эндотоксин EU ≤1/мг), или mFc-IGF1R-5-Gal (1,98 или 4,96 мг/кг; EU менее 0,5/мг), или IGF1R-5-mFc-Gal (2,0 или 5,0 мг/кг; EU менее 0,5/мг) или контрольных соединений через три дня после инъекции CFA. Задержку отдергивания лапы (PWL) тестировали для каждой задней лапы (воспаленных и невоспаленных) каждые 15 мин в течение 3 ч. 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-5. 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. 8A-D).

Результаты показывают, что внутривенное введение галанина не уменьшало боль по сравнению с PBS. В отличие от этого одна инъекция FC5-Gal, IGF1R5-Gal, mFc-IGF1R-5-Gal или IGF1R-5-mFc-Gal производила дозозависимое подавление тепловой гипералгезии, давая основание полагать, что IGF1 R-5 V_HN переносил Галанин через ГЭБ для создания фармакологического эффекта путем связывания с GalR1 и/или 2 в паренхиме головного мозга. Эффект IGF1R-5-Gal является дозозависимым и значительно более выраженным, чем эффект, индуцированный FC5-Gal, что дает основание полагать, что рецептор IGF1R имеет более высокую скорость ГЭБ транспорта, чем предполагаемый FC5 рецептор. Эти результаты показывают, что IGF1R-5 V_HN может "переносить" большие молекулы (3-80 кДа) через ГЭБ с использованием пути рецепторно-опосредованного транцитоза. Активный рецепторно-опосредованный транспорт необходим, так как известно, что ГЭБ предотвращает прохождение всех гидрофильных молекул больше 0,5 кДа.

Пример 13. Иммунодетектирование IGF1R-5-mFc.

Для того, чтобы убедиться, что высокие уровни IGF1R-5-mFc, обнаруженные в СМЖ после периферического введения, происходят, по меньшей мере, частично из внеклеточного пространства паренхимы, другими словами, что неповрежденный конструктор пересекает ГЭБ, было проведено иммунодетектирование IGF1R-5-mFc в мозгах крысы.

Вкратце, мозг животных из эксперимента примера 11 собирали сразу после перфузии животных PBS (т.е. 48 ч после введения 5 мг/кг в хвостовую вену IGF1R-5-mFc). Мозги 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 1× 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 1× PBS, инкубировали в течение ночи при 4°C. Секции промывали три раза в 1× PBS и инкубировали в кроличьем анти-GFAP (Cat# Z0334, Dako) 1:500 в 5% NGS/1× PBS в течение часа при комнатной температуре. Секции затем опять промывали три раза в 1× PBS и затем инкубировали в 1:300 козьем антимышином Alexa 647 (A21235, Invitrogen) или 1:500 козьем антикроличьем Alexa 647 (A21244, Invitrogen) в 1× PBS. Затем добавляли лектин для окрашивания сосудистой системы RCAI (Cat # FL-1081, Vector) 1:500 в 1× PBS на 10 мин. После промывки три раза 1× PBS секции покрывали покровным стеклом во флуоресцентной закрепляющей среде Dako (Cat # S3023, Dako) и к ним добавляли 2 мкг/мл Хехст (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 табл. 4.

Таблица 4

Объективы и каналы, использованные во флуоресцентной микроскопии

	Флуоресцентная молекула	Возбуждение (нм)	Эмиссия (нм)
RCAI-сосуды	ФИТЦ (флуоресцеин изотиоцианат)	495	518
Хехст 33342 - ядра	Хехст	350	461
IGF1R-5-m-Fc	Cy3	531	593
GFAP	Alexa 647	628	692

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-5-mFc накапливается в сосудах головного мозга, а также проходит через ГЭБ в окружающую мозговую паренхиму. Результаты подтверждают утверждение о том, что повышенные уровни IGF1R-5-mFc в СМЖ свидетельствуют о прохождении конструктора через ГЭБ. Это дополнительно существенно подтверждается наблюдением, что галанин, связанный с IGF1R-5, индуцировал фармакологический ответ (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-5 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. Влияние IGF1R-5 на "физиологическую" функцию IGF1R.

С точки зрения безопасности важно показать, что антитело согласно изобретению не мешает 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-5 V_HN или IGF1R-5-mFc не мешают физиологической передаче сигналов через IGF1R или инсулиновый рецептор (IR), индуцированной их природными лигандами.

Для того, чтобы определить, индуцирует ли IGF1R-5 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 рецепторстимулированной прямой киназы, протеинкиназы B, в SV-ARBEC клетках.

SV-ARBEC 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-5 V_HN или IGF1R-5-Fc слияния (100 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 мин, а затем дважды промыва-

ли в сбалансированном солевом растворе Хэнка. Затем клетки лизировали с использованием буфера 1× RIPA (буфер для радиоиммунопреципитации) (Cell Signaling Technology), дополненного 1% Тритоном-X 100 и ингибиторами протеаз (Sigma). Клетки подвергали 2×20 с импульсам в водяной бане ультразвуковым и лизаты очищали центрифугированием при 14,000 об/мин в течение 10 мин. Концентрацию белка определяли с помощью системы анализа белка DC (Bio-Rad Laboratories). Равные по мкм образцы белка разделяли в 4-20% градиентном SDS полиакриламидном геле при 125 В и переносили на PVDF (поливинилиден фторид) мембрану. Фосфопротеинкиназу В (Ser 473) определяли с помощью инкубации в течение ночи в разведении 1:1000 первичного антитела против данной мишени (технология клеточной передачи сигнала) с последующей инкубацией в течение часа со козым вторичным антителом против кроличьего IgG-HRP, с последующим взаимодействием с реагентом ECL Plus и визуализацией на автордиографической пленке. Значения денситометрии были определены с использованием программного обеспечения Un-Scan-LT (Silk Scientific Inc.).

Результаты показаны на фиг. 11. Вестерн-блоттинг фосфорилирования протеинкиназы В показал, что IGF1R-5 не ингибирует фосфорилирование протеинкиназы В, индуцированное 10 мкг/мл инсулина или 200 нг/мл IGF-1 при совместном применении с 100 нМ IGF1R-5, или IGF1R-5-mFc, или 500 нМ IGF1R-5-mFc. V_HH или Fc слияния также не индуцировали сами по себе передачу сигнала протеинкиназой В (фиг. 11A, 11B и 11C, с надписью "-5"). Результаты показывают, что даже в бивалентном отображении в формате Fc слияния IGF1R-5 не вызывает димеризацию рецептора и прямую передачу сигнала, и, следовательно, не нарушает функцию рецептора в присутствии природного лиганда. Эта особенность IGF1R-5 ("молчаливое связывание") имеет важное значение для его применения в качестве переносчика терапевтических средств через ГЭБ, так как она обеспечивает 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 Inherit Metab Dis.* 36(3):437-49.
- Abbott, N. J. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem. Int.* 2004, 45, 545-552.
- Abulrob A, Sprang H, Van Bergen en Henegouwen P, Stanimirovic D (2005) The blood-brain barrier transmigration single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J Neurochem.* 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., Hiram, T., Ding, W., MacKenzie, R., and Tanha, J. (2009a) *Protein Eng. Des. Sel.* 22, 59-66.
- Arbabi-Ghahroudi, M., MacKenzie, R., and Tanha, J. (2009b) *Methods Mol. Biol.* 525, 187-216.
- 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 Kruijff, J., and Logtenberg, T. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 7630-7634.
- De Lange, E. C; Danhof, M. Considerations in the use of cerebrospinal fluid pharmacokinetics to predict brain target concentrations in the clinical setting: implications of the barriers between blood and brain. *Clin. Pharmacokinet.* 2002, 41, 691-703.
- 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.
- Fluttert, M., Dalm, S., and Oitzl, M.S. (2000) *Lab Anim* 34, 372-378.
- Gaillet, B., Gilbert, R., Broussau, S., Pilote, 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).
- Groothuis D. R.; Vavra M. W.; Schlageter K. E.; Kang E. W.; Itskovich A. C.; Hertzler S.; Allen C. V.; Lipton H. L. Efflux of drugs and solutes from brain: the interactive roles of diffusional transcapillary transport, bulk flow and capillary transporters, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007, 27, 43-56.
- 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 brain-targeting 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, Lilje 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.
- 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.
- Russmann, H., Panthel, K., Bader, R.C., Schmitt, C., and Schaumann, R. (2007) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 115-119.
- Samani, A.A., Chevet, E., Fallavollita, L., Galipeau, J., and Brodt, P. (2004) *Cancer Research* 64, 3380-3385.
- Samuels B.L., *J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 54, 421-429 (1993).
- 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., Hirama, T., Khiew, N.H., To, R., Tong-Sevinc, H., Stone, E., Brisson, J.R., and MacKenzie, C.R. (2004b) *J. Mol. Biol.* 335, 49-56.
- Zhu et al., *Immunology and Cell Biology* (2010) 88:667-675.
- 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
 WO 95/04069
 WO/2004/076670
 WO2003/046560

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Однодоменное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающееся с рецептором инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R), содержащее последовательность области, определяющей комплементарность (CDR) 1 GRTIDNYA (SEQ ID NO: 1);

последовательность CDR2 IDWGDGGX (SEQ ID NO:2), где X представляет собой A или T; и последовательность CDR3 AMARQSRVNLDVARYDY (SEQ ID NO: 3).

2. Антитело или его фрагмент по п.1, содержащее последовательность
 X₁VX₂L X₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWX₅RQAPGX₆X₇EX₈VX₉TID
 WGDGGX₁₀RYANSVKGRFTISRDNX₁₁KX₁₂TX₁₃YLMNX₁₄LX₁₅X₁₆EDTAVYX₁₇CAMAR
 QSRVNLDVARYDYWGQGTX₁₈VTVSS (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 S; X₆ представляет собой D или G; X₇ представляет собой L или R; X₈ представляет собой F или W; X₉ представляет собой A или S; X₁₀ представляет собой A или T; X₁₁ представляет собой A или S; X₁₂ представляет собой G или N; X₁₃ представляет собой M или L; X₁₄ представляет собой N или R; X₁₅ представляет собой E или R; X₁₆ представляет собой P или A; X₁₇ представляет собой S или Y; и X₁₈ представляет собой Q или L, или последовательность, идентичную указанной на 90%.

3. Антитело или его фрагмент по п.1 или 2, содержащее последовательность, выбранную из группы, состоящей из

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDRFVATID
 WGDGGARYANSVKGRFTISRDNAGTMYLQMNLEPEDTAVYSCAMARQSR
 VNLDVARYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5),

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWRQAPGKLEWVSTID
 WGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRV
 NLDVARYDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:6),

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWRQAPGKLEWVATID
 WGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSR
 VNLDVARYDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:7),

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKLEFVATID
 WGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSR
 VNLDVARYDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:8),

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDRFVATID
 WGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYSCAMARQSR
 VNLDVARYDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:9) и

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDRFVSTID
 WGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRV
 NLDVARYDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:10)

или последовательности, на 90% идентичной любой из SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

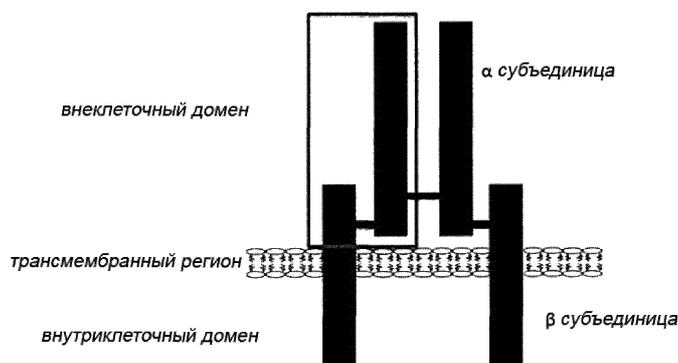
4. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-3, где антитело имеет верблюжье происхождение.

5. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-4, где антитело или его фрагмент связывается с эпитопом, содержащим последовательность FENFLHNSIFVPR (SEQ ID NO: 11)

6. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-5, где антитело или его фрагмент находятся в мультимерной форме.

7. Антитело или его фрагмент по п.6, где антитело или его фрагмент связано с Fc-фрагментом.

8. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его фрагмент по любому из пп.1-7.
9. Вектор для экспрессии антитела или его фрагмента по любому из пп.1-7, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.8.
10. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-7, где антитело или его фрагмент иммобилизовано на твердую поверхность.
11. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-7, где антитело или его фрагмент связано с карго-молекулой.
12. Антитело или его фрагмент по п.11, где карго-молекула имеет молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 200 кДа.
13. Антитело или его фрагмент по п.12, где карго-молекула представляет собой детектируемый агент, лекарственное средство, пептид, фактор роста, цитокин, ловушку рецептора, углеводный фрагмент, фермент, антитело или его фрагмент, молекулу на основе ДНК, вирусный вектор или цитотоксический агент; липосому или наноноситель, загруженные детектируемым агентом, лекарственным средством, пептидом, ферментом, антителом или его фрагментом, молекулой на основе ДНК, вирусным вектором или цитотоксическим агентом; или наночастицу, нанопровод, нанотрубку или квантовую точку.
14. Композиция для доставки терапевтических и диагностических молекул в фармакологически эффективных дозах в мозг субъекта, содержащая антитело или его фрагмент по любому из пп.10-13 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.
15. *In vitro* способ детектирования IGF1R, включающий:
- а) контактирование образца ткани с антителом или его фрагментом по любому из пп.1-7, связанным с детектируемым агентом; и
 - б) выявление формирования комплекса антитела или его фрагмента, связанного с детектируемым агентом, и IGF1R в образце ткани, причем формирование комплекса свидетельствует о наличии IGF1R в образце.
16. *In vivo* способ детектирования экспрессии IGF1R у субъекта, включающий:
- а) введение антитела или его фрагмента по любому из пп.1-7, связанного с детектируемым агентом, субъекту; и
 - б) выявление формирования комплекса антитела или его фрагмента, связанного с детектируемым агентом, и IGF1R, причем формирование комплекса свидетельствует о наличии экспрессии IGF1R у субъекта.
17. Способ переноса карго-молекулы через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), включающий введение антитела или его фрагмента по п.1, связанного с карго-молекулой, субъекту.
18. Способ по п.17, где карго-молекула имеет молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 200 кДа.
19. Способ по п.18, где карго-молекула представляет собой детектируемый агент, лекарственное средство, пептид, фактор роста, цитокин, ловушку рецептора, углеводный фрагмент, фермент, антитело или его фрагмент, молекулу на основе ДНК, вирусный вектор, или цитотоксический агент; липосому или наноноситель, загруженные детектируемым агентом, лекарственным средством, пептидом, ферментом, антителом или его фрагментом, молекулой на основе ДНК, вирусным вектором или цитотоксическим агентом; или наночастицу, нанопровод, нанотрубку или квантовую точку.
20. Способ определения количества карго-молекулы, переносимой через ГЭБ субъекта, где карго-молекула связана с антителом или его фрагментом по п.1, включающий:
- а) сбор спинномозговой жидкости (СМЖ) у субъекта; и
 - б) определение количества карго-молекулы, связанной с антителом или его фрагментом, в СМЖ.

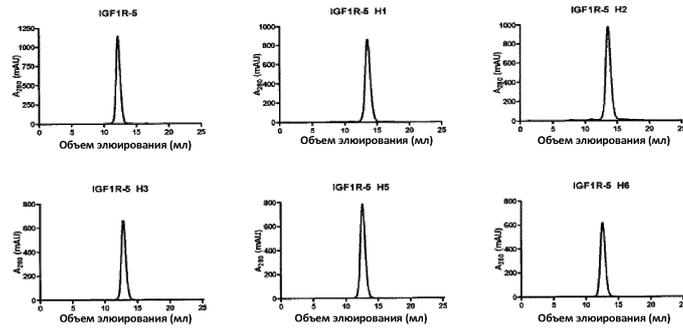


Фиг. 1

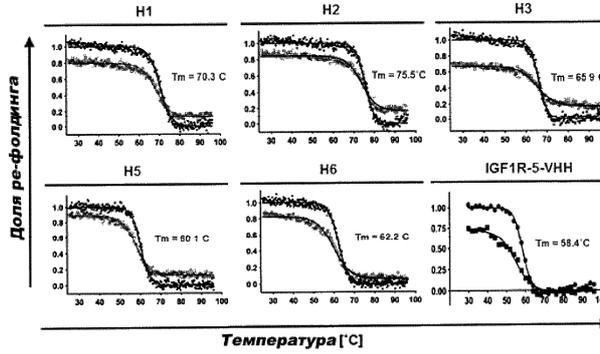
```

MKSGSGGGSP TSLWGLLFLS AALSLMPTSG EICGPGIDIR NDXQQLKRLE NCTVIEGYLE 60
ILLISKAEDY RSYRFPKLTV ITEYLLFRV AGLBSLGLDF PHLVIRGWK LFYNYALVIF 120
EMTNLKDIGL YNLRNITRGA IRIEKADLC YLSTVDWLSI LDAVSNNEIV GHKPPKCCGD 180
LCPGTMEKP MCEKTTINME YNRCWTNTR CQKCPSTCG KRACENNEC CBSECLGSCS 240
APDNDAACVA CRHYTYAGVC VPACFPNTYR FEGWCVDRD FCANILSAES SDESGFVIHD 300
GECMQCPCSP FIRNGSQSMY CIPCEGCPK VCEBEKTKT IDSVTSQML QGCTIFKGNL 360
LNIHRGNHI ASELENFMGL IEVVTGYVKI RSHALVLSL FLKNLRLILG REQLEGNYSF 420
VLDNQNLQY LWDWDRMLT IKAGMYFAP NPCLCVSEIY RMEEVGTGK RQSKGDIR 480
NNGERASCE5 DVLHPTSTT SKNRIITMH RYRPPDYRLD ISFTVYKEA PFKNVTEYDG 540
QDAGCSNSWN MVDVLPFNK DVEPGILLG LRPWTQYAVY VKAVTLTHVE NDHIRGAKSE 600
ILYIRTNASV PSYPLDLSA SNSSQLIVK MNPPSLFNGM LSYIVRMQR QPQDGLYRH 660
NYCSKDKIPI RKYADGTIDI EEVTENPKTE VCGGKGPCC ACPKTEAEKQ AEKEEAETK 720
VFNFLHNSI FVPRPPrkr DVMQVANTM SSRSNVTA A DTYNIDPEE LETEYPPFES 780
RVDNKRTEVI SNLRPFTLYR IDIHSNHEA EKLGCASMF VFARTMPAG ADDIPGFVTM 840
EPRPENSIFL KMPEPENPG LILMYEIKYG SQVEDQRECV SRQRYKYGG AKLNRNLNPGN 900
YTRIQATSL SGNPSWTPV FFFYQAKTYG ENFIHLIAL PVAVLLIVGG LVIMLYVFHR 960
KRNSRLGNG VLYASVNPY FSAADVVPD EWEVAREKIT MSRELGGQSP GMVYEGVAKG 1020
VVKDEPETRV AIKTVNEAAS MRERIEPLNE ASWMEFENCH HVVRLGQVVS QGQPTLVIME 1080
LMTGDLKSY LRSLRPEMEN NPVLAPPSLS KMIQAGEIA DGMAYLNANK FVHRDLAARN 1140
CMVAEDFTVK IGDFTGTRDI YETDYRKGG KGLLPRWMS PESLKDGVFT TYSDVMSFGV 1200
VLWEIATLAE QPYQGLSNEQ VLRVYMEGGL LDKPDNCPDM LPELMRMCWQ YNPKMRPSFL 1260
EIISSIKEEM EPGFREVSFY YSEENKLEPE EELDLEPEN ESVPLDPSAS SSSLPLDRH 1320
SGHKAENGPG PGLVLRASF DERQYAHMN GGRKNERALP LPQSSTC 1367
    
```

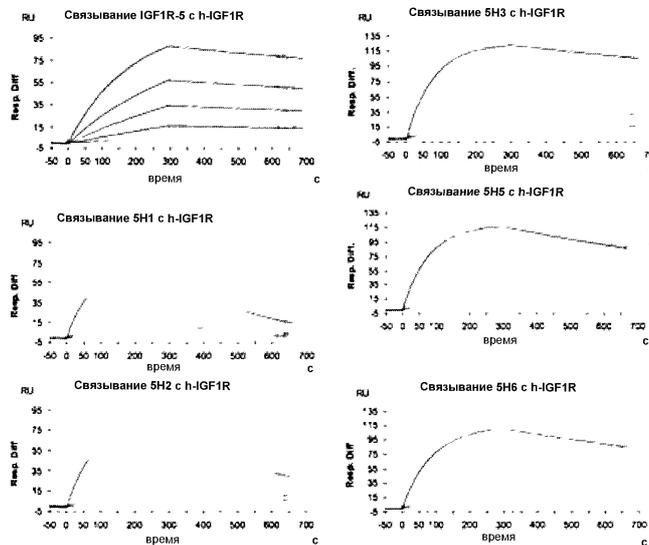
Фиг. 2



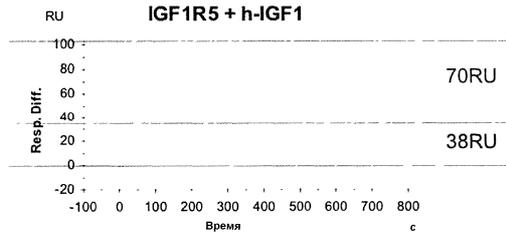
Фиг. 3А



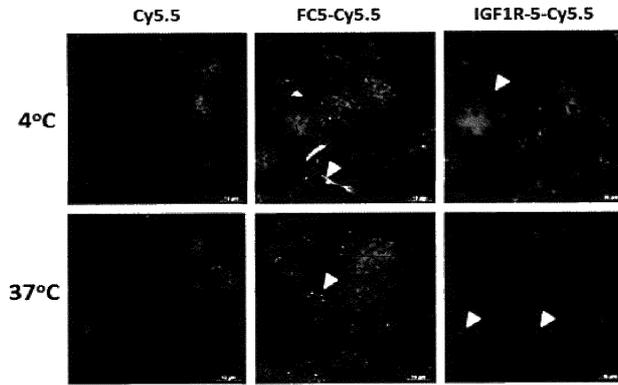
Фиг. 3В



Фиг. 3С



Фиг. 3D



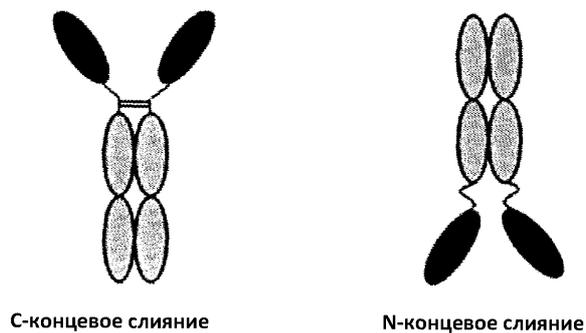
Фиг. 4

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRITIDNYAMAWSRQAPGKDREFVATIDWGDGGARYANS
 VKGRFTISRDNAGTMYLQMNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNLVARYDYWGQGTQVTVSS
 MTVDKKLEPSGPISTINPCPPCKECHKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISLTPKVTCVVVDVSE
 DDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPS
 IERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLD
 SDGSYFIYKLNMKTSKWEKTDSEFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK

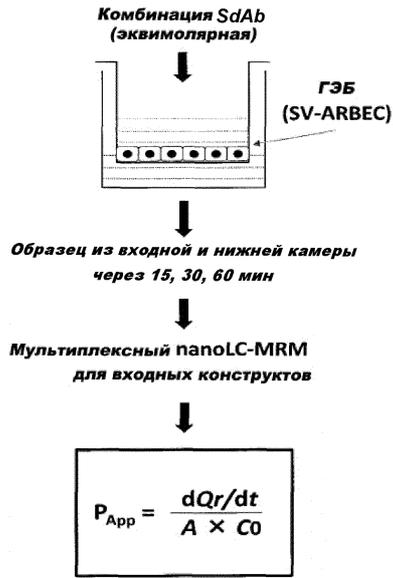
Фиг. 5A

EPSGPISTINPCPPCKECHKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVQI
 SWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKI
 KGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSY
 FIYKLNMKTSKWEKTDSEFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGGGGGGGQVKLEESGGGLVQ
 AGGSLRLSCAASGRITIDNYAMAWSRQAPGKDREFVATIDWGDGGARYANSVKGRFTISRDN
 A KGTMYLQMNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNLVARYDYWGQGTQVTVSS

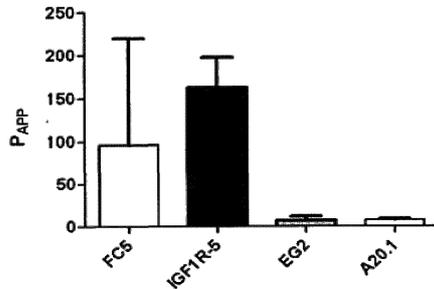
Фиг. 5B



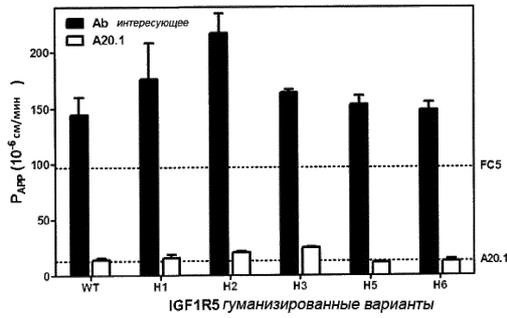
Фиг. 5C



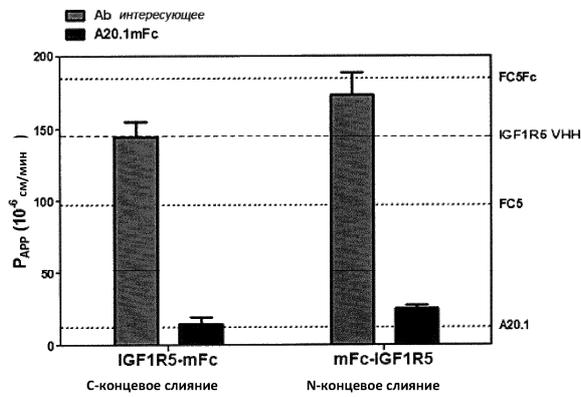
Фиг. 6А



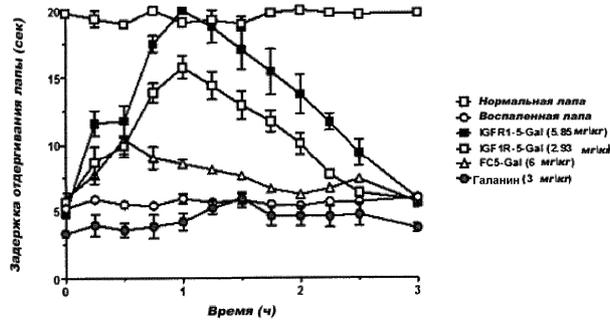
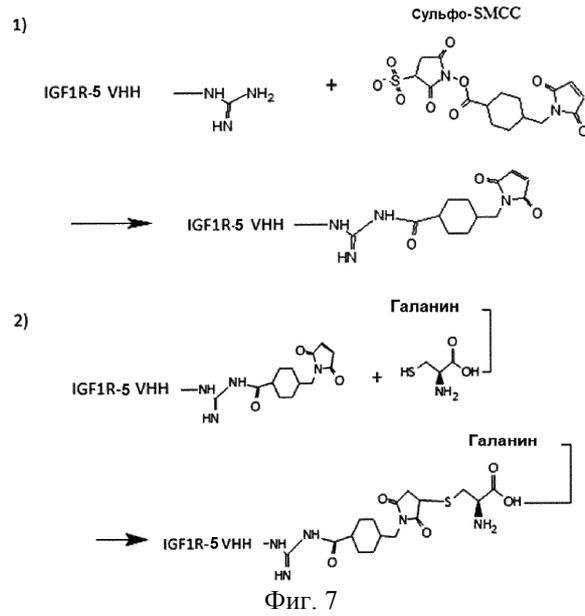
Фиг. 6В



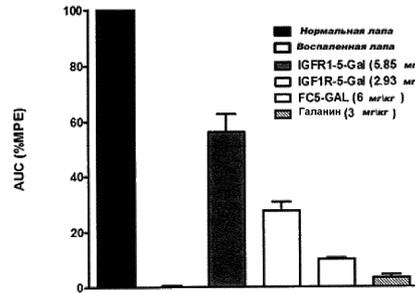
Фиг. 6С



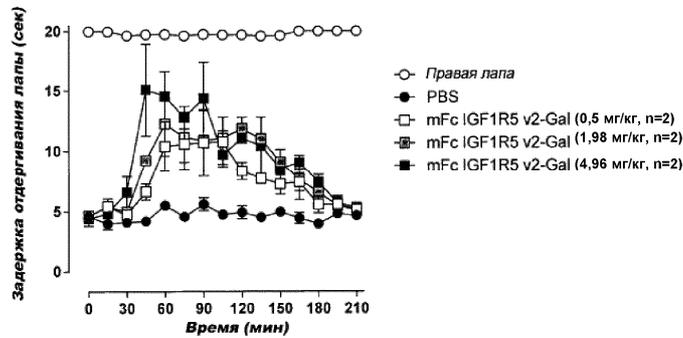
Фиг. 6D



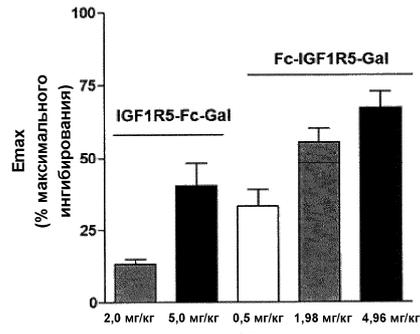
Фиг. 8А



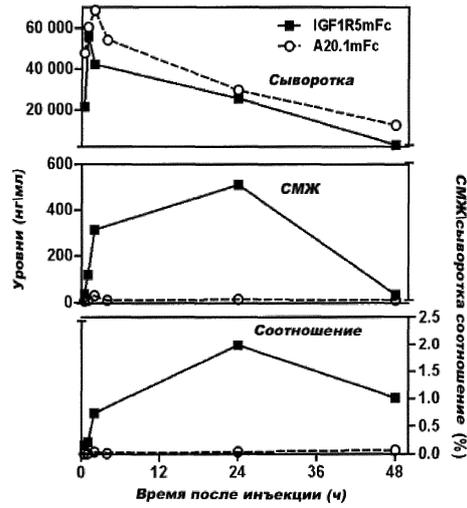
Фиг. 8В



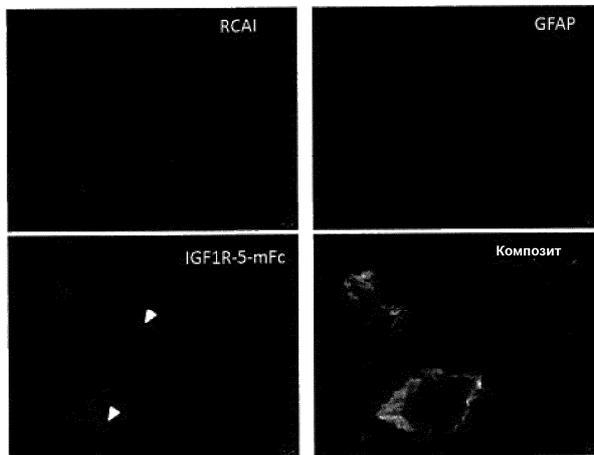
Фиг. 8С



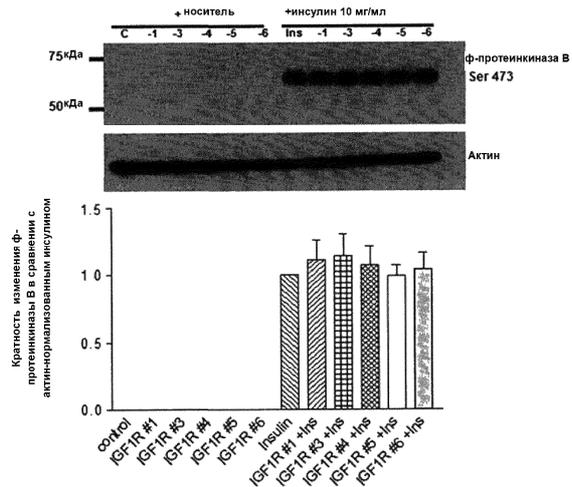
Фиг. 8D



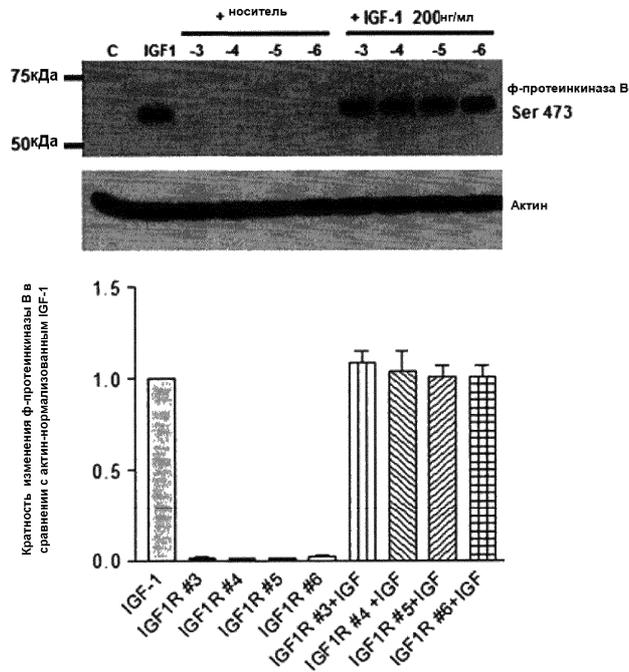
Фиг. 9А



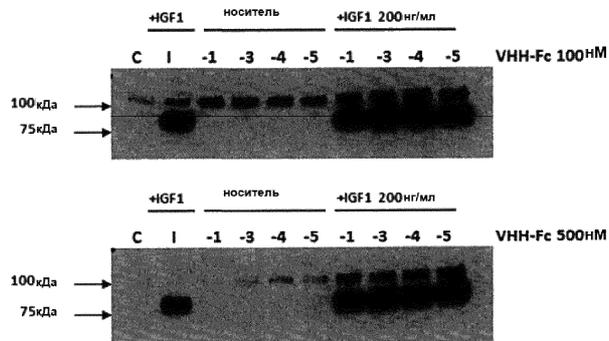
Фиг. 10



Фиг. 11А



Фиг. 11В



Фиг. 11С