



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **105198** (13) **C2**  
(51) МПК (2014.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2011 08588</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Адам Пол (GB/DE), Боргес Ерік (DE)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>11.12.2009</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>БЬОРІНГЕР ІНГЕЛЬХАЙМ ІНТЕРНАЦІОНАЛЬ ГМБХ, Binger Strasse 173, D-55216 Ingelheim am Rhein, Germany (DE)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.04.2014</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>08171554.2</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2007/070432 A, 21.06.2007 WO 2007/118214 A, 18.10.2007 EP 1505075 A, 09.02.2005 MIYAMOTO SHIN'ICHI ET AL: "Blockade of paracrine supply of insulin-like growth factors using neutralizing antibodies suppresses the liver metastasis of human colorectal cancers" CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 11, no. 9, 1 May 2005 (2005-05-01), pages 3494-3502, XP002414392 GOYA MASATO ET AL: "Growth inhibition of human prostate cancer cells in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice by a ligand- specific antibody to human insulin-like growth factors" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD.; US, vol. 64, no. 17, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 6252-6258, XP002982679
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>12.12.2008</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>EP</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>10.10.2011, Бюл.№ 19</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.04.2014, Бюл.№ 8</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ <b>PCT/EP2009/066894, 11.12.2009</b>	

**(54) АНТИТІЛО ПРОТИ ІНСУЛІНОПОДІБНИХ ФАКТОРІВ РОСТУ**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується молекули антитіла людини, яка зв'язується з інсуліноподібним фактором росту-1 (ІФР-1) та інсуліноподібним фактором росту-2 (ІФР-2) таким чином, що попереджується зв'язування ІФР-1 та ІФР-2 з рецептором ІФР-1, і придушується передача сигналу, опосередковувана рецептором ІФР-1; зв'язується з ІФР-1 та ІФР-2 миші або пацюка, та не зв'язується з інсуліном людини.

UA 105198 C2



Даний винахід відноситься до лікування гіперпроліферативних захворювань, зокрема, до лікування раку.

Передумови створення винаходу

Інсуліноподібний фактор росту-1 (ІФР-1; поліпептид із 70 амінокислот) та інсуліноподібний фактор росту-2 (ІФР-2; поліпептид із 67 амінокислот) є розчинними факторами масою 7,5 кДа, присутніми у сироватці, які потенційно можуть стимулювати ріст багатьох клітин ссавців (див. огляд Pollack та ін., 2004). При секреції у кров'яне русло інсуліноподібні фактори росту формують комплекси з білком, що зв'язує ІФР (БЗІФР), які захищають їх від протеолітичного руйнування у сироватці за шляхом до тканин-мішеней і попереджають від асоціації з рецепторами ІФР. Також відомо, що фактори ІФР секретуються аутокринним і паракринним способом самими тканинами-мішенями. Відомо, що це відбувається при нормальному розвитку плода, у ході якого фактори ІФР відіграють ключову роль у рості тканин, костей і органів. Те ж спостерігають у багатьох тканинах пухлин, у яких припускають паракринну передачу сигналу між пухлинними клітинами й клітинами строми або аутокринне вироблення ІФР самими пухлинними клітинами (див. огляд LeRoith D., 2003).

Фактори ІФР-1 та ІФР-2 можуть зв'язуватися з рецептором ІФР-1 (ІФР-1Р), який експресується багатьма здоровими тканинами, що представляє функціональний гетеротетрамер масою 460 кДа, що складається з димеризованих альфа- і бета-субодиниць, з подібною спорідненістю (Rubin та ін., 1995). ІФР-2 також може зв'язуватися з рецептором ІФР-2, який приблизно запобігає ІФР-2 від зв'язування й передачі сигналу через ІФР-1Р. У зв'язку з цим показано, що ІФР-2Р є пухлинним супресорним білком. Структурно ІФР-1Р близький до рецептора інсуліну, який існує у двох формах, ІР-А та ІР-Б, які відрізняються по-різному сплайсованою екзонною делецією з 12 амінокислот у позаклітинному домені ІР-А. ІР-Б представляє переважну ізоформу ІР, яка експресується у більшості здорових тканин дорослих, у яких він діє, опосередковуючи вплив інсуліну на метаболізм. З іншої сторони відомо, що ІР-А у високому ступені експресується у тканинах плода, що розвиваються, але не у здорових тканинах дорослих. У попередніх дослідженнях також було показано, що ІР-А, але не ІР-Б, у високому ступені експресується при деяких формах раку. Делеція екзона в ІР-А не впливає на зв'язування інсуліну, але викликає невелику конформаційну зміну, що дозволяє зв'язувати ІФР-2 з підвищеною спорідненістю у порівнянні з ІР-Б (Frasca та ін., 1999; Pandini та ін., 2002). Таким чином, через експресію у ракових тканинах і підвищену схильність до зв'язування ІФР-2, ІР-А може бути важливий в якості ІФР-1Р при опосередковуванні мітогенних ефектів ІФР-2 при раку.

Зв'язування факторів ІФР з ІФР-1Р приводить у дію складний внутрішньоклітинний сигнальний каскад, що викликає активування білків, які стимулюють проліферацію й виживання (огляд Pollack та ін., 2004).

На відміну від EGFR і Her2neu рецепторів, немає відомостей про ампліфікацію рецепторів ІФР-1Р або ІР-А при раку, свідчаючи про те, що активація рецепторів контролюється наявністю активованого ліганду. Є величезна кількість наукових, епідеміологічних і клінічних публікацій, які стосуються ролі факторів ІФР у розвитку, прогресуванні й метастазуванні багатьох різних типів раку (огляд Jerome та ін., 2003; і Pollack та ін., 2004).

Наприклад, при раку кишечника експресію ІРНК ІФР-2 і білок оцінюють у клінічних зразках пухлин кишечника у порівнянні з прилягаючою здоровою тканиною (Freier та ін., 1999; Li та ін., 2004). Також є позитивна кореляція підвищених рівнів ІФР у сироватці з індексом проліферації клітин у пацієнтів із неоплазією кишечника (Zhao та ін., 2005). Крім того, підвищені рівні циркуляції ІФР-2 корелюють з підвищеним ризиком розвитку раку кишечника й аденом (Renehan та ін., 2000a) а б); Hassan та ін., 2000). Втрата батьківського імпринтингу (PI) гена ІФР-2, епігенетичної зміни, що приводить до підвищеної експресії ІФР-2, є наслідуваною молекулярною ознакою, яка була раніше виявлена у пацієнтів із пухлинами кишечника й з іншими типами пухлин.

Показано, що втрата імпринтингу ІФР-2 асоційована з п'ятикратним підвищенням ризику неоплазії кишечника (Cui та ін., 2003; Cruz-Correa та ін., 2004) і аденом (Woodson та ін., 2004). Показано, що антитіла, які націлюються на альфа-субодиницю рецептора ІФР-1Р, що блокують зв'язування ІФР та інтерналізацію рецептора, перешкоджають росту ліній клітин, похідних від ксенотрансплантатів раку товстої кишки, наприклад, COLO 205 (Burtrum та ін., 2003).

Підвищені рівні факторів ІФР асоційовані з поганим прогнозом аденокарциноми легенів людини (Takamati та ін., 1996), і фактори ІФР експресуються й секретуються багатьма лініями клітин, похідними від дрібноклітинного раку легенів (ДРЛ) і недрібноклітинного раку легенів (НДРЛ) (Quinn та ін., 1996). Трансгенна надекспресія ІФР-2 індукує пухлини легенів на моделі гризунів (Mooghead та ін., 2003). У дослідженнях печінково-клітинного раку (ПКР) на клінічних зразках, отриманих від людей, і на тваринних моделях ПКР показано, що у них експресуються

підвищені рівні iPHK IФР і білка у порівнянні з відповідними здоровими тканинами й це корелює з посиленням ростом пухлини (Wang та ін., 2003; Ng та ін., 1998). Також було показано, що IФР-2 є серологічним маркером ПКР з підвищеними рівнями у сироватці пацієнтів із ПКР у порівнянні з контролями (Tsai та ін., 2005).

Ріст багатьох щільних пухлин у дітей, наприклад, саркоми Юінга й рабдоміосаркоми, очевидно, у високому ступені залежить від метаболічного шляху передачі сигналу IФР (Scotlandi та ін., 1996). Втрата імпринтингу (ПІ) гена IФР-2 залучена в якості основної генетичної події у розвитку ембріональної рабдоміосаркоми (Fukuzawa та ін., 1999). Приблизно аутокринна передача сигналу IФР також істотно впливає на ріст саркоми Юінга у тих випадках, коли химерний фактор транскрипції першого типу EWS-FLI1 експресується через хромосомну транслокацію, приводячи до підвищеної експресії генів-мішеней, включаючи IФР ліганди й IФР-1Р, і зниженої експресії IФРВР-3. Показано, що антитіла й низькомолекулярні сполуки, які націлюються на IФР-1Р, знижують ріст клітинних ліній, що відбуваються від ксенотрансплантатних щільних пухлин дітей (Kolb та ін., 2008; Manara та ін., 2007).

За допомогою антитіл, специфічних у відношенні ліганду IФР, показано, що ріст клітин раку простати людини у кості дорослої людини, імплантованих мишам лінії SCID, може бути подавлений (Goya та ін., 2004). Крім того, було показано, що антитіла до ліганду IФР можуть блокувати паракринне вироблення IФР і придушують метастазування у печінці клітин раку кишечника людини у системі ксенотрансплантата миші (Miyamoto та ін., 2005).

Також є вагомий доказ, який підтверджує, що система передачі сигналу IФР знижує чутливість раку до хіміотерапевтичних агентів і до радіації. Одним із ранніх підтверджень цього положення є обставина, що ембріони IФР-1Р нокаутних мишей відторгають трансформацію вірусами, онкогенами й надекспресією рецепторів фактора росту (Sell та ін., 1993; Sell та ін., 1994), і що надекспресія IФР-1Р захищає клітини від апоптозу, викликаного опроміненням УФ і гамма-радіацією (Kulik та ін., 1997). Крім того, використовуючи лінії клітин пухлини печінки, які секретують великі кількості IФР-2, встановлено, що нейтралізація IФР-2 істотно підвищує відповідь на хіміотерапевтичні агенти, наприклад, цисплатин і етопозид *in vitro*, особливо у низьких цитостатичних дозах, підтверджуючи, що IФР-2 може знизити чутливість до хіміотерапевтичних агентів (Lund та ін., 2004). Відповідно до цих даних було показано, що антитіла, які націлюються на IФР-1Р, підвищують чутливість ксенотрансплантатів пухлини до придушення росту хіміотерапевтичними лікарськими засобами й радіацією (Goetsch та ін., 2005).

Повідомлялося про ряд антитіл, які проявляють перехресне зв'язування з IФР-1 та IФР-2 людини. Встановлено, що антитіло sm1.2 формується проти IФР-1 людини та проявляє 40 % перехресну реакційну здатність до IФР-2 людини, а також придушує проліферацію лінії клітин фібробластів миші BALB/c3T3, які стимулюються під дією 20 нг/мл IФР-1 людини (Russell та ін., 1984). У дослідженні, що відповідає функціональній карті епітопа IФР-1, шляхом створення моноклональних антитіл до цілого білка IФР-1 і до частин цього білка, був ідентифікований ряд антитіл, які перехресно реагують з IФР-2 (Manes та ін., 1997). Відсоток перехресної реакційної здатності з IФР-2 варіює від 0 до 800 % і було ідентифіковано декілька антитіл з рівною реакційною здатністю у відношенні IФР-1 та IФР-2. KM1486 є моноклональним антитілом пацюка, що перехресно реагує з IФР-1 та IФР-2 людини, і було показано, що KM1486 може інгібувати ріст клітин раку простати людини у костях дорослих людей, імплантованих у мишей без ожиріння/з важким комбінованим імунodefіцитом (Goya та ін., 2004). Крім того, було показано, що антитіло KM1486 придушує метастазування у печінці при раку кишечника людини (Miyamoto та ін., 2005). Антитіло KM1486 також описане у WO 03/093317, JP 2003-310275, WO 2005/018671, WO 2005/028515 і WO 2005/027970.

Для лікування захворювання людини антитіло з повною послідовністю людини досить бажано для мінімізації ризику вироблення реакції проти антитіла людини й нейтралізації антитіл, які можуть швидко елімінувати введені антитіла в організмі й тим самим знизити терапевтичний ефект. Тому, встановивши ролі передачі сигналу, що залежить від IФР-1 та IФР-2, у розвитку й прогресуванні раку, стає бажаним одержання антитіл, що є повною мірою антитілами людини. У WO 2007/070432 описують антитіла, що повністю є антитілами людини, які спільно нейтралізують мітогенні ефекти обох лігандів.

Завдання, розв'язуване у даному винаході, полягало в одержанні інших анти-IФР антитіл людини з високою спорідненістю.

Інше завдання, розв'язуване у даному винаході, полягало в одержанні інших анти-IФР антитіл людини з високою спорідненістю до IФР-1.

Ще одне завдання, розв'язуване у даному винаході, полягало в одержанні анти-IФР антитіл людини з високою спорідненістю до IФР-1 і до IФР-2.

Інше завдання, розв'язуване у даному винаході, полягало в одержанні анти-ІФР антитіл людини з відповідною відносною спорідненістю до ІФР-1 і до ІФР-2.

Ще одне завдання, розв'язуване у даному винаході, полягало в одержанні анти-ІФР антитіл людини з підвищеною спорідненістю до ІФР-1, але не до ІФР-2.

5 Ще одне завдання, розв'язуване у даному винаході, полягало в одержанні анти-ІФР антитіл людини з високою нейтралізуючою здатністю у відношенні ІФР-1.

Ще одне завдання, розв'язуване у даному винаході, полягало в одержанні анти-ІФР антитіл людини з високою здатністю до нейтралізації ІФР-1 та ІФР-2.

10 Інше завдання, розв'язуване у даному винаході, полягало в одержанні анти-ІФР антитіл людини з високою розчинністю й стабільністю.

Інше завдання, розв'язуване у даному винаході, полягало в одержанні антитіл, які не впливають на зв'язування інсуліну з його рецептором.

Клінічна розробка терапевтичних агентів підтримується фармакодинамічними біомаркерами дії лікарського засобу. Клінічні дослідження антитіл, які націлюються на ІФР-1Р, показали, що підвищення сумарних рівнів ІФР-1 у сироватці може бути застосовним фармакокінетичним маркером таких агентів (Pollack та ін., 2007). Причиною підвищення сумарних рівнів ІФР-1 у сироватці приблизно є механізм зворотного зв'язку, що включає секрецію гіпофізарного гормону росту (ГР), що вивільняє з печінки та ІФР-1, і ІФР-сполучний білок (ІФРСБ). Справді, у людей було показано, що вільний або біологічно активний фактор ІФР-1, що становить тільки  
20 приблизно 1 % від рівнів сумарного ІФР-1, визначає відповідь за принципом зворотного зв'язку (Chen та ін., 2005).

У зв'язку з вищесказаним, ще одним завданням, розв'язуваним у даному винаході, була розробка лікування захворювань, причина розвитку й/або прогресування яких пов'язана з факторами ІФР, яке супроводжується біомаркером, що дозволяє проводити фармакологічний  
25 моніторинг ефективності терапії.

В експериментах за даним винаходом може бути показано, що рівні сумарного сироваткового фактора ІФР-1 підвищені при застосуванні анти-ІФР антитіл за даним винаходом. Таким чином, рівні сумарного ІФР-1 є корисним фармакодинамічним маркером ефективності терапії анти-ІФР антитілом. Тому досить переважно, якщо антитіла за даним винаходом мають  
30 перехресну реакційну здатність з факторами ІФР від відповідних видів тварин, наприклад, мишей або пацюків, таким чином, що фармакодинамічний ефект може бути протестований вже у доклінічному дослідженні.

Поняття "рівні загального ІФР-1" відносяться до об'єднаної кількості ІФР-1 у плазмі сироватки, включаючи кількість фактора ІФР-1, зв'язаного з сполучними білками сироватки, плюс вільний (незв'язаний) фактор ІФР-1.  
35

Таким чином, інший об'єкт даного винаходу відноситься до способу визначення ефективності лікування хворого раком молекулами антитіла, які зв'язуються з ІФР-1 та ІФР-2. У такому способі на першій стадії рівень загального ІФР-1 вимірюють у біологічному зразку пацієнта, наприклад, сироватці або плазмі. Потім вводять молекулу антитіла й після періоду, достатнього для прояву терапевтичного ефекту антитіла, знову визначають рівень загального ІФР-1. Підвищення рівня загального ІФР-1 у порівнянні з рівнем загального ІФР-1, вимірюваним на першій стадії, показує, якою мірою пацієнт відповідає на зазначені молекули анти-ІФР антитіла. Цей спосіб переважно використовують для моніторингу терапії, в якій вводять антитіла за даним винаходом.  
40

45 Короткий опис фігур

Фіг. 1 А-Ж показують титрування методом ELISA зв'язування антитіл IgG1, позначених 60814, 60819 і 60833, з фактором ІФР-1 людини (фіг. 1А), фактором ІФР-1 миші (фіг. 1Б), фактором ІФР-1 пацюка (фіг. 1В), фактором ІФР-2 людини (фіг. 1Г), фактором ІФР-2 миші (фіг. 1Д), фактором ІФР-2 пацюка (фіг. 1Е) і з інсуліном людини (фіг. 1Ж).

50 Фіг. 2 показує типові результати титрування антитіла 60833, що нейтралізує фосфорилювання ІФР-1Р, індуковане ІФР-1 (20 нг/мл)(фіг.2А) та ІФР-2 (100 нг/мл) (фіг. 2Б), за допомогою методу ELISA на основі клітин.

Фіг. 3А показує типові результати титрування антитіла 60833, що нейтралізує фосфорилювання ІР-А, індуковане ІФР-2 (100 нг/мл). Фіг. 3Б показує типові результати титрування антитіла 60833, що нейтралізує фосфорилювання ІФР-1Р, індуковане сироваткою людини (20 %). Обидва дослідження проводять, використовуючи метод ELISA на основі клітин.  
55

Фіг. 4А-2Г показує вплив антитіл 60814 і 60819 на простимульовану ІФР-1 (фіг. 4А і 4Б) та ІФР-2 (фіг. 4Б і 4Г) проліферацію клітин MCF-7 (фіг. 4А і 4Б) і COLO 205 (фіг. 4Б і 4Г).

60 Фіг. 5 показує вплив антитіл 60819 і 60833 на проліферацію лінії клітин TC-71, похідних від саркоми Юінга, у 10 % культуральному середовищі.

Фіг. 6 показує вплив антитіла 60819 на загальні рівні ІФР-1 миші у сироватці через 24 год. після однократного введення доз 25, 12,5, 6,25, 3,13 мг/кг. Перед лікуванням антитілом рівні сумарного сироваткового фактора ІФР-1 становлять 0 мг/кг.

5 Фіг. 7 показує вплив антитіла 60819 на рівні сумарного сироваткового фактора ІФР-1 у пацюка через 24 год. після однократного введення доз 30, 100, 200 мг/кг шляхом 10-хвилинної внутрішньовенної інфузії. Перед лікуванням антитілом рівень сумарного сироваткового фактора ІФР-1 становить 0 мг/кг.

Фіг. 8 показує вплив антитіла 60819 і рапаміцину, окремо або у комбінації, на проліферацію клітин лінії SK-ES-1, похідній від саркоми Юінга, у культуральному середовищі з 10 % ФСТ.

10 Фіг. 9 показує вплив антитіла 60819 і рапаміцину, окремо або у комбінації, на фосфорилювання ферменту АКТ і рівні ферменту РТЕН.

Фіг. 10 показує вплив антитіла 60819 і ерлотинібу/ тарцева, окремо або у комбінації, на проліферацію клітин лінії A-549, похідній від недрібноклітинного раку легенів (НДРЛ), у культуральному середовищі з 10 % ФСТ.

15 Фіг. 11 показує тривимірну структуру ІФР-1 людини, в якій амінокислоти, що зв'язуються антитілом 60833, виділені темно-сірим кольором. Унизу показана лінійна амінокислотна послідовність фактора ІФР-1 людини, в якій амінокислоти, взаємодіючі з антитілом 60833, підкреслені.

20 Фіг. 12 показує послідовності амінокислот і ДНК варіабельних ланцюгів антитіл 60814 (А), 60819 (Б) і 60833 (В); області CDR виділені жирним шрифтом.

Короткий опис винаходу

В іншому варіанті здійснення даний винахід відноситься до виділеної молекули антитіла людини, яка

- 25 а) зв'язується з ІФР-1 та ІФР-2 таким чином, що  
і) попереджується зв'язування ІФР-1 та ІФР-2 з рецептором ІФР-1, і  
ii) придушується передача сигналу, опосередкована рецептором ІФР-1,  
б) зв'язується з ІФР-1 та ІФР-2 миші або пацюка,  
в) не зв'язується з інсуліном людини;

причому зазначену молекулу антитіла вибирають з групи, що включає

- 30 і) молекулу антитіла, яка містить області CDR важкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) і SEQ ID NO:3 (CDR3), і області CDR легкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) і SEQ ID NO:6 (CDR3);

- 35 ii) молекулу антитіла, яка містить області CDR важкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:11 (CDR1), SEQ ID NO:12 (CDR2) і SEQ ID NO:13 (CDR3), і області CDR легкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:14 (CDR1), SEQ ID NO:15 (CDR2) і SEQ ID NO:16 (CDR3);

- 40 iii) молекулу антитіла, яка містить області CDR важкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:21 (CDR1), SEQ ID NO:22 (CDR2) і SEQ ID NO:23 (CDR3), і області CDR легкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:24 (CDR1), SEQ ID NO:25 (CDR2) і SEQ ID NO:26 (CDR3).

В іншому варіанті здійснення даний винахід відноситься до молекули анти-ІФР антитіла, причому молекула зазначеного антитіла містить області CDR важкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2) і SEQ ID NO:3 (CDR3), і області CDR легкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:4 (CDR1), SEQ ID NO:5 (CDR2) і SEQ ID NO:6 (CDR3).

45 В іншому варіанті здійснення даний винахід відноситься до молекули анти-ІФР антитіла, причому молекула зазначеного антитіла містить області CDR важкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:11 (CDR1), SEQ ID NO:12 (CDR2) і SEQ ID NO:13 (CDR3), і області CDR легкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:14 (CDR1), SEQ ID NO:15 (CDR2) і SEQ ID NO:16 (CDR3).

50 В іншому варіанті здійснення даний винахід відноситься до молекули анти-ІФР антитіла, причому молекула зазначеного антитіла містить області CDR важкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:21 (CDR1), SEQ ID NO:22 (CDR2) і SEQ ID NO:23 (CDR3), і області CDR легкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:24 (CDR1), SEQ ID NO:25 (CDR2) і SEQ ID NO:26 (CDR3).

В іншому варіанті здійснення даний винахід відноситься до молекул анти-ІФР антитіла, що містить важкий й легкий ланцюги або області CDR з амінокислотними послідовностями, зазначеними на фіг. 12 А-В.

60 В іншому варіанті здійснення даний винахід відноситься до молекули анти-ІФР антитіла,

причому молекула зазначеного антитіла зв'язується з нелінійним епітопом в ІФР-1, що включає амінокислотні послідовності LCGAELVDALQFVCGDR (SEQ ID NO:41) і CCFRSCDLRRLEM (SEQ ID NO:42) фактора ІФР-1 людини (SEQ ID NO:43). У кращому варіанті здійснення даного винаходу зазначена молекула антитіла здійснює контакт щонайменше з 8 амінокислотами в амінокислотній послідовності LCGAELVDALQFVCGDR (SEQ ID NO:41) і щонайменше з 10 амінокислотами в амінокислотній послідовності CCFRSCDLRRLEM (SEQ ID NO:42) фактора ІФР-1 людини (SEQ ID NO:43). В іншому кращому варіанті здійснення даного винаходу такі молекули анти-ІФР антитіла здійснюють контакт із Leu (5), Cys (6), Glu (9), Leu (10), Asp (12), Ala (13), Phe (16), Val (17), Arg (21), Cys (47), Cys (48), Phe (49), Ser (51), Cys (52), Asp (53), Leu (54), Arg (55), Leu (57) і Glu (58) фактора ІФР-1 людини (SEQ ID NO:43), що впливає з результатів рентгеноструктурної кристалографії. Відповідний спосіб описаний у даному винаході у прикладі 9. Переважно молекула зазначеного антитіла містить області CDR важкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:21 (CDR1), SEQ ID NO:22 (CDR2) і SEQ ID NO:23 (CDR3) і області CDR легкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:24 (CDR1), SEQ ID NO:25 (CDR2) і SEQ ID NO:26 (CDR3).

Зв'язування антитіла визначають у вигляді взаємодії через нековалентні зв'язки, які втримують антиген (або білок або його фрагмент, близький за структурою) із сайтом об'єднання з антитілом, тобто з областю імуноглобуліну, що поєднується з детермінантом відповідного антигену (або структурно близького білка).

Спорідненість (тобто взаємодія між одним сайтом зв'язування антигену й одним епітопом) виражається константою асоціації (association constant)  $K_A = k_{\text{ass}}/k_{\text{diss}}$  або константою дисоціації (dissociation constant)  $K_D = k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}}$ .

В одному з об'єктів даного винаходу за пунктом а) антитіло зв'язується з кожним білком ІФР зі спорідненістю, обумовленою методом поверхневого плазмонного резонансу, з величиною  $K_D$ , що варіює від 0,02 нМ до 20 нМ, наприклад, від 0,2 нМ до 2 нМ, наприклад, зі спорідненістю 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 або 1,0 нМ. Ґрунтуючись на цій властивості, досягають нейтралізації функціональної передачі сигналу ІФР.

В одному з об'єктів даного винаходу за пунктом б) антитіло не зв'язується з інсуліном людини у концентраціях, які щонайменше у 100 разів вище, ніж мінімальна концентрація, необхідна для зв'язування з ІФР-1 або ІФР-2 людини.

В іншому об'єкті даного винаходу властивість молекули анти-ІФР антитіла за пунктом в) відрізняється тим, що спорідненість молекули анти-ІФР антитіла до ІФР-1 та ІФР-2, відповідно, становить щонайменше 100-кратну й навіть більше ніж 1000-кратну величину у порівнянні з її спорідненістю з інсуліном. Однак проте у дуже високих дозах, наприклад, більше 100 мг/кг, не можна повністю виключати слабкого зв'язування, але молекула анти-ІФР антитіла не зв'язується з інсуліном у терапевтичних дозах.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу молекули антитіла за даним винаходом не впливають на мітогенні властивості інсуліну людини, які опосередковуються його зв'язуванням з рецептором інсуліну. (Загалом, мітогенну властивість визначають у вигляді властивий сполучі якості, що сприяє клітині ділитися, індуюючи мітоз, наприклад, у випадку інсуліну це його здатність індукувати ріст клітин).

В іншому варіанті здійснення даного винаходу крім здатності придушувати опосередковану ІФР передачу сигналу через рецептор ІФР-1, антитіло за даним винаходом також має здатність придушувати передачу сигналу через ІФР-2 через рецептор інсуліну ІР-А.

Антитіла за даним винаходом мають знеацька високу нейтралізуючу здатність у відношенні ІФР-1 та ІФР-2. Крім того, вони мають знеацька підвищену активність та єднальну спорідненість у відношенні ІФР-1, але не у відношенні ІФР-2. Вони мають високу розчинність і стабільність, у них відсутні небажані мотиви для глікозилювання або гідролізу у варіабельному домені й вони мають тривалий період напіврозпаду при циркуляції в організмі.

Докладний опис винаходу

У наступному описі молекула антитіла, яка зв'язується з ІФР-1 та ІФР-2 людини, називається "молекулою анти-ІФР антитіла".

Поняття "молекула анти-ІФР антитіла" охоплює анти-ІФР антитіла людини, фрагменти анти-ІФР антитіл, молекули типу анти-ІФР антитіл і кон'югати з якими-небудь зазначеними вище молекулами антитіл. До антитіл у рамках даного винаходу відносяться, але ними не обмежуються, моноклональні, химерні моноклональні й дво- або поліспецифічні антитіла. Поняття "антитіло" включає повні імуноглобуліни, вироблювані лімфоцитами, і, наприклад, присутні у сироватці, моноклональні антитіла, секретовані лініями гібридомних клітин, поліпептиди, вироблювані шляхом рекомбінантної експресії у клітинах-хазяїнах, які мають єднальну специфічність імуноглобулінів або моноклональних антитіл, і молекули, похідні від

таких імуноглобулінів, моноклональні антитіла або поліпептиди, що піддаються додатковому процесуванню, за умови, що вони зберігають єднальну специфічність.

Зокрема, поняття "молекула антитіла" переважно включає імуноглобуліни, які є повністю імуноглобулінами людини, що включають два важких ланцюги й два легких ланцюга.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу молекула антитіла є фрагментом анти-ІФР антитіла, що містить область зв'язування антигену. Для одержання фрагментів антитіла, наприклад, фрагментів Fab, може проводитися розщеплення звичайними методами, наприклад, використовуючи папаїн або пепсин. Приклади розщеплення папаїном описані у WO 94/29348 і US 4342566. При розщепленні антитіл папаїном звичайно одержують два ідентичних фрагменти, що зв'язують антиген, так званих фрагмента Fab, кожний з єдиним сайтом зв'язування антигену, і залишковий фрагмент Fc. Після обробки пепсином одержують фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, що має два сайти об'єднання з антигеном і зберігає здатність перехресного зв'язування антигену. Фрагменти антитіла також можуть бути отримані методами молекулярної біології, у ході яких одержують відповідні фрагменти ДНК, що кодують.

Фрагменти Fab також містять константні домени легкого ланцюга й перший константний домен (CH<sub>1</sub>) важкого ланцюга. Фрагменти Fab' відрізняються від фрагментів Fab тим, що вони містять додаткові залишки з карбокси-кінця домену CH<sub>1</sub> важкого ланцюга, включаючи один або декілька цистеїнів із шарнірної області антитіла. Позначення "Fab'-SH" у контексті даного винаходу відноситься до фрагмента Fab', у якому залишок (залишки) цистеїну у константних доменах несуть вільну тіолову групу. Фрагменти антитіла F(ab')<sub>2</sub> споконвічно одержують у вигляді пари фрагментів Fab', що містять між ними шарнірні цистеїни.

Фрагменти антигенсполучних антитіл або антитіло-подібні молекули, у тому числі одноланцюгові антитіла й лінійні антитіла, описані Zarata та ін., 1995, можуть містити в одному поліпептиді варіабельну область (області) окремо або у комбінації з цілими сполуками або їх частинами: з константним доменом легкого ланцюга, CH<sub>1</sub>, з шарнірною областю, з доменами CH<sub>2</sub> і CH<sub>3</sub>, наприклад, з так званими низькомолекулярними імунофармацевтичними агентами ("SMIP – Small Modular Immunopharmaceutical"), які є антитіло-подібними молекулами, що містять одноланцюговий поліпептидний ланцюг як єднальний домен Fv, що зв'язується з одноланцюговим шарніром і ефекторними доменами без константного домену CH<sub>1</sub> (WO 02/056910). Низькомолекулярні імунофармацевтичні агенти можуть бути отримані як мономери або димери, але не димери димерних структур традиційних антитіл. До даного винаходу також відносяться фрагменти зв'язування антитіл, що включають яку-небудь комбінацію варіабельної області (областей) з областю константного домену легкого ланцюга, VH<sub>1</sub>, CH<sub>1</sub>, з шарнірною областю, CH<sub>2</sub> і CH<sub>3</sub> доменами.

Фрагменти антитіла або антитіло подібні молекули можуть містити всі або тільки частину константної області такої довжини, що дозволяє їм проявляти специфічне зв'язування з релевантною частиною антигену ІФР-1/ІФР-2. Вибір типу або довжини константної області залежить, якщо немає потреби в ефекторних функціях типу фіксації комплексу або антитіло залежної клітинної токсичності, переважно від необхідних фармакологічних властивостей білка антитіла. Звичайно молекула антитіла представляє тетрамер, що складається з двох пар легкого ланцюга/важкого ланцюга, але також може бути димером, тобто представляти пару легкого ланцюга/важкого ланцюга, наприклад, фрагмент Fab або Fv, або вона може бути мономерним одноланцюговим антитілом (scFv).

Анти-ІФР антитіло подібні молекули також можуть бути однодоменими антитілами (наприклад, так званими "нанотілами"), що несуть сайт зв'язування антигену в одному Іg-подібному домені (описаному, наприклад, у WO 03/050531 і у публікації Revets та ін., 2005). Іншими прикладами антитіло подібних молекул є антитіла суперсімейства імуноглобулінів (immunoglobulin super family antibodies – IgSF; Srinivasan і Roeske, 2005), або CDR-вмісні або CDR-пересаджені молекули, або "доменні антитіла (Domain Antibody – dAb)". Доменні антитіла є функціонально єднальними одиницями антитіл, що відповідають варіабельним областям або важких ланцюгів (VH), або легких ланцюгів (VL) антитіл людини. Молекулярна маса домених антитіл приблизно становить 13 кДа або менше 1/10 розміру цілого антитіла. Створено серію великих і високо функціональних бібліотек VH і VL dAb, які повністю належать людині. Доменні антитіла також застосовні для "подвійного націлювання", тобто вони зв'язуються, крім ІФР-1/ІФР-2, також з іншою мішенню в одній молекулі. Бібліотеки dAb, методи добору й скринінгу, формати dAb для подвійного націлювання й для забезпечення продовженого періоду напіврозпаду у сироватці описані, наприклад, в US 6696245, WO 04/058821, WO 04/003019 і WO 03/002609.

У цілому фрагменти антитіл і антитіло подібні молекули успішно експресуються у бактеріях, дріжджах і клітинних системах ссавців.



У кращому варіанті здійснення даного винаходу молекула антитіла за даним винаходом, відповідно до зазначеного вище у пункті i), має варіабельний важкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8 і варіабельний легкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10 (ця послідовність може включати з С-кінця додатковий Gln. Таке положення амінокислоти може розглядатися або в якості С-кінця варіабельної області, за нумерацією Kabat, або, в іншому варіанті, і відповідно до послідовностей у переліку послідовностей, воно може представляти першу амінокислоту константної області легкого ланцюга, див. SEQ ID NO:34).

Краще антитіло з варіабельним важким ланцюгом, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8, і варіабельним легким ланцюгом, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10, містить константну область важкого ланцюга IgG1. Переважно таке антитіло є антитілом, позначуваним 60814, яке містить константну область важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:32, і константну область легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34. Повні амінокислотні послідовності антитіла, позначеного 60814, представлені у послідовності SEQ ID NO:35 (важкого ланцюга) і у послідовності SEQ ID NO:36 (легкого ланцюга).

В іншому кращому варіанті здійснення даного винаходу молекула антитіла за даним винаходом, зазначена вище у пункті ii), містить варіабельний важкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18, і варіабельний легкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20 (ця послідовність може включати з С-кінця додатковий Gln. Таке положення амінокислоти може розглядатися або в якості С-кінця варіабельної області, за нумерацією Kabat, або, в іншому варіанті, і відповідно до послідовностей у переліку послідовностей, воно може представляти першу амінокислоту константної області легкого ланцюга, див. SEQ ID NO:34).

Краще антитіло з варіабельним важким ланцюгом, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18, і з варіабельним легким ланцюгом, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20, містить константну область важкого ланцюга IgG1. Переважно таке антитіло містить константну область легкого ланцюга IgL. Переважно таке антитіло є антитілом, позначеним 60819, яке містить константну область важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:32, і константну область легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34. Повні амінокислотні послідовності антитіла, позначеного 60819, представлені у послідовності SEQ ID NO:37 (важкого ланцюга) і у послідовності SEQ ID NO:38 (легкого ланцюга).

В іншому кращому варіанті здійснення даного винаходу молекула антитіла за даним винаходом, зазначений вище у пункті iii), містить варіабельний важкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:28, і варіабельний легкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:30 (ця послідовність може включати з С-кінця додатковий Gln. Таке положення амінокислоти може розглядатися або в якості С-кінця варіабельної області, за нумерацією Kabat, або, в іншому варіанті, і відповідно до послідовностей у переліку послідовностей, воно може представляти першу амінокислоту константної області легкого ланцюга, див. SEQ ID NO:34).

Краще антитіло з варіабельним важким ланцюгом, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:28, і з варіабельним легким ланцюгом, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:30, містить константну область важкого ланцюга IgG1. Переважно таке антитіло містить константну область легкого ланцюга IgL. Переважно таке антитіло є антитілом, позначеним 60833, яке містить константну область важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:32, і константну область легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34. Повні амінокислотні послідовності антитіла, позначеного 60833, представлені у послідовності SEQ ID NO:39 (важкого ланцюга) і у послідовності SEQ ID NO:40 (легкого ланцюга).

Переxресна реакційна здатність антитіл за даним винаходом з ІФР-1 миші й пацюка дозволяє перевірити їх ендокринні прояви, наприклад, вплив на метаболічний шлях гормону росту, у цих видів.

Переxресна реакційна здатність з факторами ІФР пацюка особливо краща, оскільки пацюк є чудовою моделлю, яку переважно використовують при розробці лікарських засобів для вивчення токсикологічних проявів.

Спостережуваний фармакодинамічний вплив антитіл на рівні сумарного ІФР-1, ймовірно через видалення вільного ІФР-1, що приводить до регуляції за типом зворотного зв'язку за метаболічним шляхом гормону росту, що приводить до підвищеної секреції ІФР-1 у печінці, є корисним фармакодинамічним маркером. Наявність такого маркера у тварин, що дозволяє

визначити взаємозв'язок дози/відповіді на ранньому етапі розробки лікарського засобу, полегшує проведення першої фази клінічних досліджень, в яких крім фармакокінетичного аналізу піддають моніторингу фармакодинамічну відповідь на сумарні рівні ІФР-1 у пацієнтів.

Молекула анти-ІФР антитіла за даним винаходом також може бути варіантом антитіла, представленого амінокислотними послідовностями у переліку послідовностей.

Таким чином, даний винахід також відноситься до антитіл, які є варіантами таких поліпептидів, яким властиві ознаки, зазначені вище у пунктах від а) до в). Використовуючи звичайні методи, фахівець у даній галузі може одержати, досліджувати й використовувати функціональні варіанти антитіл 60814, 60819 і 60833. Прикладами є варіанти антитіл, у яких змінене щонайменше одне положення у CDR і/або каркасній ділянці, варіанти антитіл з одиничними амінокислотними заміщеннями в області каркасної ділянки, де є відхилення від послідовності зародкової лінії, антитіла зі заміщеннями консервативних амінокислот, антитіла, які кодуються молекулами ДНК, які гібридизуються у жорстких умовах з молекулами ДНК, що перебувають у переліку послідовностей, які кодують варіабельні ланцюги антитіл 60814, 60819 або 60833, функціонально еквівалентних оптимізованим за кодонами варіантам антитіл 60814, 60819 і 60833.

Варіант також може бути отриманий, використовуючи антитіло за даним винаходом як стартова точка для оптимізації й модифікування одного або декількох амінокислотних залишків, переважно амінокислотних залишків в одній або декількох областях CDR, і шляхом скринінгу одержуваної колекції варіантів антитіл із поліпшеними властивостями. Найбільше краща модифікація одного або декількох амінокислотних залишків в області CDR3 варіабельного легкого ланцюга, області CDR3 варіабельного важкого ланцюга, області CDR1 варіабельного легкого й/або CDR2 варіабельного важкого ланцюга. Модифікація може бути виконана методами, відомими у даній галузі, наприклад, так званим методом TRIM, описаним у WO 2007/042309.

Маючи відомості за окремими амінокислотами, можна зробити раціональні заміщення для одержання варіантів антитіл, які зберігають загальну молекулярну структуру антитіл 60814, 60819 або 60833. Амінокислотні заміщення, тобто "консервативні заміщення", можуть бути зроблені, наприклад, на основі подібності у полярності, заряді, розчинності, гідрофобності, гідрофільності й/або амфіпатичної природі відповідної амінокислоти. Фахівцям відомі звичайно практиковані амінокислотні заміщення, наприклад, описані у WO 2007/042309, і методи одержання модифікованих у такий спосіб антитіл. За допомогою генетичного коду й методів синтезу й рекомбінації ДНК можуть бути отримані звичайним способом молекули ДНК, що кодують варіанти антитіл із одним або декількома консервативними амінокислотними заміщеннями, і легко отримані відповідні антитіла.

Кращі варіанти антитіл мають ідентичність послідовності у варіабельних областях щонайменше на 60 %, більше переважно щонайменше на 70 % або 80 %, ще більше переважно щонайменше на 90 % і найбільше переважно щонайменше на 95 %. Кращі антитіла також мають подібність послідовностей у варіабельних областях щонайменше на 80 %, більше переважно на 90 % і найбільше переважно на 95 %.

(Поняття "ідентичності послідовностей" стосовно до двох поліпептидних послідовностей означає відсоток ідентичних амінокислот у цих двох послідовностях. Поняття "подібності послідовностей" означає відсоток ідентичних амінокислот або консервативних амінокислотних заміщень.)

В іншому варіанті здійснення даного винаходу молекула анти-ІФР антитіла за даним винаходом означає антитіло зі "спорідненістю, що сформувалася".

Анти-ІФР антитілом зі "спорідненістю, що сформувалася" є анти-ІФР антитіло, похідне від вихідного анти-ІФР антитіла, наприклад, антитіла 60814, 60819 або 60833, що має один або декілька інших варіантів в одній або декількох областях CDR або в якому одна або декілька повних областей CDR заміщені, що приводить до поліпшення спорідненості з антигенами у порівнянні з відповідним вихідним антитілом. Один із методів одержання таких мутантних антитіл включає фаговий дисплей (Hawkins та ін., 1992; Lowman та ін., 1991). Коротенько, декілька сайтів у гіперваріабельній області (наприклад, 6-7 сайтів) мутовані для одержання всіх можливих амінокислотних заміщень у кожному сайті. Отримані таким способом антитіла відбиваються у моновалентній формі на частках нитчастих фагів як гібриди з продуктом гена III фага M13, упакованих у кожній частці. Мутантні фаги, отримані методом фагового дисплея, потім піддають скринінгу для виявлення біологічної активності (наприклад, сполучної спорідненості) відповідно до описаного у даному винаході.

Антитіла зі спорідненістю, що сформувалася, також можуть бути отримані методами, описаними, наприклад, Marks та ін., 1992 (спорідненість, що сформувалася, шляхом

перетасування доменів варіабельного важкого ланцюга (VH) і варіабельного легкого ланцюга (VL)), або Barbas та ін., 1994; Shier та ін., 1995; Yelton та ін., 1995; Jackson та ін., 1995; і Hawkins та ін., 1992 (випадковий мутагенез залишків в області CDR і/або у каркасній ділянці). Кращі антитіла зі спорідненістю, що сформувалася, можуть мати дуже високу спорідненість, наприклад, виражену у пікомолях, для антигену-мішені.

Даний винахід також відноситься до молекул ДНК, які кодують молекулу анти-ІФР антитіла за даним винаходом. Такі послідовності включають, але ними не обмежуються, ті молекули ДНК, що кодують антитіла 60814, 60819 і 60833, які зазначені у переліку послідовностей: SEQ ID NO:7 і SEQ ID NO:9, відповідно, кодуючі варіабельні важкий й легкий ланцюги, відповідно, антитіла 60814; SEQ ID NO:17 і SEQ ID NO:19, кодуючі варіабельні важкий й легкий ланцюги, відповідно, антитіла 60819; SEQ ID NO:27 і SEQ ID NO:29, кодуючі варіабельні важкий й легкий ланцюги, відповідно, антитіла 60833.

Послідовності SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:19 і 29, кодуючі варіабельні легкі ланцюги, можуть з 3'-кінця містити додатковий кодон, що відповідає Gln.

Таким чином, даний винахід також відноситься до молекул нуклеїнової кислоти, які гібридизуються з молекулами ДНК, представленими нижче у переліку послідовностей, у дуже жорстких умовах зв'язування й промивання, наприклад, описаних у WO 2007/042309, де такі молекули нуклеїнових кислот кодують антитіло або його функціональний фрагмент, які мають властивості, рівні або переважають властивості антитіл 60814, 60819 або 60833. Кращими молекулами (відносно іРНК) є ті, які мають щонайменше на 70 % або 80 % (переважно щонайменше на 85 %, більше переважно щонайменше на 90 % і найбільше переважно щонайменше на 95 %) гомологію або ідентичність послідовностей з однією з молекул ДНК, описаних у даному винаході.

Варіанти ДНК ще одного класу, що перебувають у рамках охоплення даного винаходу, можуть бути визначені за поліпептидами, які вони кодують. Такі молекули ДНК мають відхилення у структурі послідовності від тих ДНК, які представлені у переліку послідовностей (послідовності SEQ ID NO:7, 17 і 27, або 9, 19, 29, відповідно), але вони кодують через виродженість генетичний код антитіла з ідентичними амінокислотними послідовностями антитіл 60814, 60819 або 60833, відповідно. За допомогою прикладу, беручи до уваги експресію антитіл 60814, 60819 або 60833 в еукаріотичних клітинах, останні дев'ять нуклеотидів, які, відповідно, кодують останні три амінокислоти варіабельних легких ланцюгів, можуть бути сконструйовані так, щоб відповідати застосуванню кодів в еукаріотичних клітинах. Якщо потрібно експресувати антитіла в *E. coli*, ці послідовності можуть бути змінені, щоб відповідати застосуванню кодонів в *E. coli*.

Варіанти молекул ДНК за даним винаходом можуть бути сконструйовані декількома різними способами, відповідно до опису у WO 2007/042309.

Для одержання молекул рекомбінантних анти-ІФР антитіл за даним винаходом молекули ДНК (кДНК і/або геномної ДНК), які кодують легкий ланцюг повної довжини (у випадку антитіла 60814 послідовність включає SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:33) і важкий ланцюг (у випадку антитіла 60814 послідовність включає SEQ ID NO:7 і SEQ ID NO:31) або їх фрагменти, інsertовані у вектори експресії таким чином, що послідовності оперативно пов'язані з послідовностями контролю транскрипції й/або трансляції. У випадку антитіла 60819 послідовностями є SEQ ID NO:19 і SEQ ID NO:33, і SEQ ID NO:17 і SEQ ID NO:31, відповідно, у випадку антитіла 60833 послідовностями є SEQ ID NO:29 і SEQ ID NO:33, і SEQ ID NO:27 і SEQ ID NO:31, відповідно.

Для одержання антитіл за даним винаходом фахівець може вибрати систему з великої кількості різноманітних систем, відомих у даній галузі, наприклад, наведених в огляді Kipriyanow і Le Gall, 2004.

Інший об'єкт даного винаходу відноситься до вектора експресії, що містить молекулу ДНК, що включає нуклеотидну послідовність, яка кодує варіабельний важкий ланцюг і/або варіабельний легкий ланцюг молекули антитіла відповідно до описаного вище. Переважно такий вектор експресії містить молекулу ДНК, що включає нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:7 і/або SEQ ID NO:9, або що включає нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:17 і/або SEQ ID NO:19, або що включає нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:27 і/або SEQ ID NO:29. Переважно такий вектор експресії додатково містить молекулу ДНК, що кодує константний важкий ланцюг і/або константний легкий ланцюг, відповідно, пов'язану з молекулою ДНК, яка кодує варіабельний важкий ланцюг і/або варіабельний легкий ланцюг, відповідно.

Вектори експресії включають плазмиди, ретровіруси, косміди, похідні від EBV епісоми тощо. Вектор експресії й послідовності контролю експресії вибрані таким чином, щоб вони були сумісні з клітиною-хазяїном. Ген легкого ланцюга антитіла й ген важкого ланцюга антитіла можуть бути інsertовані у різні вектори. У деяких варіантах здійснення даного винаходу обидві послідовності

ДНК інсертовані у той самий вектор. Застосовні ті вектори, які кодують функціонально сумісну послідовність імуноглобуліну, що повністю є послідовністю людини, СН (константну послідовність важкого ланцюга) або CL (константну послідовність легкого ланцюга) послідовності імуноглобуліну, з відповідними сайтами рестрикції, сконструйованими таким чином, що яка-небудь послідовність VH (варіабельна послідовність важкого ланцюга) або VL (варіабельна послідовність легкого ланцюга) може бути легко інсертована й експресована, відповідно до описаного вище. У випадку антитіл із варіабельними областями антитіл 60814, 60819 і 60833, константним ланцюгом звичайно є ланцюг каппа або лямбда для легкого ланцюга антитіла, а для важкого ланцюга антитіла нею може бути, але ними перелік не обмежується, який-небудь ізотип IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) або інші імуноглобуліни, включаючи алельні варіанти.

Рекомбінантний вектор експресії також може кодувати сигнальний пептид, що полегшує секрецію ланцюга антитіла з клітини-хазяїна. ДНК, що кодує ланцюг антитіла, можна клонувати у векторі таким чином, що сигнальний пептид зв'язаний у рамці з амінокінцем ДНК ланцюга зрілого антитіла. Сигнальний пептид може бути сигнальним пептидом імуноглобуліну або гетерологічним пептидом від білка, що не є імуноглобуліном. В іншому варіанті послідовність ДНК, що кодує ланцюг антитіла, вже може містити послідовність сигнального пептиду.

Крім послідовностей ДНК ланцюгів антитіл вектори рекомбінантної експресії несуть регуляторні послідовності, що включають промотори, енхансери, сигнали термінації й поліаденілювання та інші елементи контролю експресії, які контролюють експресію ланцюгів антитіл у клітині-хазяїні. Прикладами промоторних послідовностей (які ілюструють експресію у клітинах ссавців) є промотори й/або енхансери, похідні від CMV (наприклад, промотор/енхансер CMV, вірусу мавп 40 (SV40)), аденовірусів (наприклад, великий пізній промотор аденовірусу (adenovirus major late promoter-AdMLP)), поліом і сильних промоторів ссавців, наприклад, промоторів нативного імуноглобуліну й актину. Прикладами сигналів поліаденілювання є BGH поліА, SV40 пізня й рання послідовності поліА; в іншому варіанті можуть застосовуватися області 3'UTR генів імуноглобулінів тощо.

Вектори рекомбінантної експресії також можуть нести послідовності, які регулюють реплікацію вектора у клітинах-хазяїнах (наприклад, початок реплікації), і селективні маркерні гени. Молекули нуклеїнової кислоти, які кодують важкий ланцюг або його антигенсполучну частину й/або легкий ланцюг або його антигенсполучну частину анти-ІФР антитіла, і вектори, що включають такі молекули ДНК, можуть бути інтродуковані у клітини-хазяїни, наприклад, бактеріальні клітини або у клітини вищих еукаріот, наприклад, клітини ссавців, методами трансфекції, відомими у даній галузі, включаючи опосередковану ліпосомами трансфекцію, опосередковану полікатіонами трансфекцію, злиття протопластів, мікроін'єкції, осадження фосфатом кальцію, електропорацію або перенос вірусними векторами.

Переважаю молекули ДНК, які кодують важкий ланцюг і легкий ланцюг, містяться у двох векторах, які спільно трансфекують у клітини-хазяїни, переважно, у клітини ссавця.

Інший об'єкт даного винаходу відноситься до клітин-хазяїнів, що несуть один або декілька векторів експресії, відповідно до описаного раніше, переважно до клітин ссавців.

Лінії клітин ссавців, доступні як хазяїни для експресії, відомі у даній галузі й включають поряд із іншими клітини яєчника китайського хом'ячка (клітини Chinese hamster ovary-CHO), клітини NSO, клітини SP2/0, клітини HeLa, клітини нирки новонародженого хом'яка (baby hamster kidney-BHK), клітини нирки мавпи (лінія COS), клітини карциноми людини (наприклад, клітини Hep G2 і A-549), клітини 3T3 або похідні/потомство якої-небудь з перерахованих ліній клітин. Можуть застосовуватися клітини інших ссавців, включаючи, але ними не обмежуючись, лінії клітин людини, миші, пацюка, мавпи й гризунів, або інші еукаріотичні клітини, включаючи, але ними не обмежуючись, клітини дріжджів, комах і рослин, або прокаріотичні клітини, наприклад, бактерії. Молекули анти-ІФР антитіл за даним винаходом одержують шляхом культивування клітин-хазяїнів протягом часу, достатнього для здійснення експресії молекули антитіла у клітинах-хазяїнах.

Крім зазначеного вище, інший об'єкт даного винаходу відноситься до описаного способу одержання молекули антитіла, що включає трансфекцію клітин-хазяїнів ссавців одним або декількома описаними векторами, культивування клітин-хазяїнів, виділення й очищення антитіла. В іншому варіанті здійснення даний винахід відноситься до способу одержання антитіла, описаного вище, що включає одержання клітин-хазяїнів ссавця, що включають один або декілька описаних векторів, і культивування клітин-хазяїнів. В іншому варіанті здійснення даного винаходу спосіб додатково включає виділення й очищення антитіла.

Молекули антитіл переважно виділяють з культурального середовища у вигляді секретованого поліпептиду або вони можуть бути виділені з лізатів клітин-хазяїнів, якщо,

наприклад, експресуються без секреторного сигналу. Необхідно очистити молекули антитіла, використовуючи стандартні методи очищення білка, використовувати для рекомбінантних білків і білків клітин-хазяїнів таким чином, щоб одержати істотно гомогенні препарати антитіла. Приміром, використовувати у даній галузі методи очищення, застосовні для одержання молекул анти-ІФР антитіла за даним винаходом, включають як перша стадія видалення клітин і/або часток залишків клітин із культурального середовища або лізату. Потім антитіло очищають від контамінантних розчинних білків, поліпептидів і нуклеїнових кислот, наприклад, шляхом фракціонування за імунологічною спорідненістю або на іонообмінних колонках, осадженням спиртом, ВЕРХ зі зворотною фазою, хроматографією на сефадексі, хроматографією на кремнію або на катіонообмінній смолі. Як остання стадія одержання препарату молекули анти-ІФР антитіла можуть бути висушені, наприклад, ліофілізовані, відповідно до описаного нижче, для застосування у терапії.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу молекули анти-ІФР антитіла за даним винаходом можуть бути очищені у ході послідовних відомих у даній галузі стадій очищення, що включають афінну хроматографію (рекомбінантний білок А), інактивацію вірусу при низькій величині рН, фільтрацію через пористий фільтр, катіонообмінну хроматографію, аніонообмінну хроматографію, нанофільтрацію й 30 кДа ультра/діафільтрацію (Shukla та ін., 2007).

Ще один об'єкт за даним винаходом відноситься до молекули антитіла, описаної вище, для застосування у медицині.

Інший об'єкт за даним винаходом відноситься до фармацевтичної композиції, що містить як діючий інгредієнт молекули анти-ІФР антитіла, переважно, повного антитіла за даним винаходом.

Для застосування у терапії молекули анти-ІФР антитіла включені у фармацевтичні композиції для полегшення їх введення тваринам і людям. Типові складки молекул анти-ІФР антитіла можуть бути отримані шляхом перемішування молекул анти-ІФР антитіла з фізіологічно прийнятними носіями, ексципієнтами або стабілізаторами, у формі ліофілізованих або іншим способом висушених складів або водних розчинів або водних або неводних суспензій. Носії, ексципієнти, модифікатори або стабілізатори є нетоксичними у застосовуваних дозах і концентраціях. До них відносяться буферні системи, наприклад, фосфат, цитрат, ацетати та інші неорганічні або органічні кислоти та їх солі; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту й метіонін; консерванти, наприклад, октадецилдиметилбензил амоній хлорид; гексаметоній хлорид; бензалконій хлорид, бензетоній хлорид; фенол, бутіл або бензиловий спирт; алкілпарабени, наприклад, метил- або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексан; 3-пентанол; і m-крезол; білки, наприклад, сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, наприклад, полівінілпіролідон або поліетиленгліколь (ПЕГ); амінокислоти, наприклад, гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди, олігосахариди або полісахариди та інші вуглеводи, включаючи глюкозу, маннозу, сахарозу, трегалозу, декстрини або декстриани; хелатуючі агенти, наприклад, EDTA; багататоомні спирти, наприклад, маніт або сорбіт; формуючі солі протиіони, наприклад, натрій; комплекси з металами (наприклад, комплекси Zn-білок); і/або іонні або неіонні поверхнево-активні речовини, наприклад, продукт TWEEN™ (полісорбати), продукт PLURONICS™ або ефіри жирних кислот, ефіри жирних кислот або складні ефіри цукрів. У складі з антитілом також можуть бути органічні розчинники, наприклад, етанол або ізопропанол. Ексципієнти також можуть виконувати функцію модифікації вивільнення або модифікації адсорбції.

Молекули анти-ІФР антитіл також можуть бути висушені (ліофільно, розбризкуванням, розбризкуванням із заморожуванням, висушуванням у близьких до критичного або у надкритичних газах, висушуванням у вакуумі, висушуванням на повітрі), осаджені або кристалізовані або захоплені у мікрокапсули, які осаджують, наприклад, методом коацервації або полімеризації на границі фаз, використовуючи, наприклад, гідроксиметилцелюлозу або желатин і полі(метилметакрилат), відповідно, у колоїдних системах вивільнення лікарських засобів (наприклад, у ліпосомах, альбумінових мікросферах, мікроемульсіях, наночастках, нанокапсулах), у макроемульсіях або осаджених або іммобілізованих на носіях або на поверхнях, наприклад, методом pcmc (protein coated microcrystals - мікрокристалів із нанесенням білка). Такі методи описані Remington, 2005.

Безумовно, складки для введення in vivo обов'язково повинні бути стерильними; стерилізація може здійснюватися традиційними методами, наприклад, фільтрацією через стерильні фільтруючі мембрани.

Може бути корисним для підвищення концентрації анти-ІФР антитіла одержувати так званий рідкий склад високої концентрації (high concentration liquid formulation-HCLF); описані різні

способи одержання таких складів.

Молекули анти-ІФР антитіл також можуть міститися у препаратах стійкого вивільнення. До таких препаратів відносяться тверді, напіврідкі й рідкі матриці гідрофобних або гідрофільних полімерів і вони можуть бути у формі об'єктів певної форми, наприклад, плівок, паличок або мікрокапсул, і можуть застосовуватися за допомогою спеціального пристрою. До прикладів матриць стійкого вивільнення відносяться поліефіри, гідрогелі (наприклад, полі(2-гідроксіетилметакрилат або ацетобутират сахарози), або полівініловий спирт), полімолочні кислоти (US 3773919), співполімери L-глутамінової кислоти й  $\gamma$ -етил-L-глутамату, ацетат етиленвінілу, що не піддається руйнуванню, співполімер молочної кислоти-гліколевої кислоти, що руйнується, наприклад, продукт LUPRON DEPOT™ (ін'єкційні мікросфери, що складаються з співполімера молочної кислоти-гліколевої кислоти й лейпроліду ацетату) і полі-D-(-)- 3-гідроксимасляна кислота. Хоча полімери, наприклад, ацетат етиленвінілу й співполімер молочної кислоти-гліколевої кислоти, можуть вивільняти молекули протягом більше 100 діб, деякі гідрогелі вивільняють білки протягом більше коротких періодів. Якщо інкапсульовані антитіла зберігаються в організмі протягом довгого часу, вони можуть денатурувати або агрегувати у результаті впливу вологи при 37 °C, приводячи до втрати біологічної активності й можливих змін імуногенності. Раціональні стратегії можуть бути розроблені для стабілізації, залежно від задіяного механізму. Наприклад, якщо виявлений механізм агрегування полягає у формуванні внутрішньомолекулярних зв'язків S-S через тіо-дисульфідне чергування, стабілізація може бути досягнута шляхом модифікації сульфгідрильних залишків, ліофілізації (наприклад, описаної у WO 89/011297) з кислих розчинів, контролю вмісту вологи, використовуючи відповідні добавки, і розвитку специфічних полімерних матричних композицій.

Склади, які також можуть застосовуватися для молекули анти-ІФР антитіла за даним винаходом, описані в US 7060268 і US 6991790.

Молекули анти-ІФР антитіла також можуть бути включені в інші використовувані форми, наприклад, дисперсії, суспензії або ліпосоми, таблетки, капсули, порошки, спреї, черезшкірні й внутрішньошкірні пластирі або мазі разом із пристосуваннями для підвищення проникності, пластили, назальні, буккальні або легеневіклади, або можуть бути отримані шляхом імплантації клітин або - після генної терапії - окремих власних клітин.

Молекули анти-ІФР антитіла також можуть бути змінені за допомогою хімічної групи, наприклад, поліетилєнґліколя (ПЕГ), метильної або етильної групи, або вуглеводневої групи. Такі групи можуть бути застосовні для поліпшення біологічних властивостей антитіла, наприклад, для підвищення періоду напіврозпаду у сироватці або для підвищення зв'язування тканиною.

Кращим способом введення є парентеральний спосіб, інфузією або ін'єкцією (внутрішньовенною, внутрішньом'язовою, підшкірною, внутрішньочеревинною, внутрішньошкірною), але також можуть застосовуватися інші способи введення, наприклад, шляхом інгаляції, черезшкірне, внутрішньоназальне, буккальне, пероральне введення.

У кращому варіанті здійснення даного винаходу фармацевтична композиція за даним винаходом містить анти-ІФР-антитіло, наприклад, антитіло 60814, 60819 або 60833, у концентрації 10 мг/мл, і додатково включає 25 мМ Na цитрату рН 6, 115 мМ NaCl, 0,02 % Tween® (полісорбат 20).

В іншому варіанті здійснення даного винаходу фармацевтична композиція за даним винаходом є водним розчином, що містить анти-ІФР антитіло, наприклад, антитіло 60814, 60819 або 60833, у концентрації 10 мг/мл, і додатково включає 25 мМ гістидин HCl рН 6, 38,8 г/л маніту, 9,70 г/л сахарози й 0,02 % Tween® (полісорбат 20).

Для внутрішньовенної інфузії фармацевтична композиція за даним винаходом може бути розведена у фізіологічному розчині, наприклад, в 0,9 % натріє хлориді або у 5 % глюкозі.

Фармацевтична композиція може бути висушена ліофільно й відновлена водою для ін'єкцій перед застосуванням.

Для попередження або лікування захворювання відповідне дозування антитіла може залежати від типу захворювання, що піддається лікуванню, тяжкості й ходу протікання захворювання, застосування антитіла для потреб лікування або попередження, від попереднього лікування, від історії хвороби пацієнта й від відповіді на антитіло, а також від вибору лікаря. Антитіло може бути введено пацієнтові однократно або у вигляді серійних введень.

Залежно від типу й тяжкості захворювання приблизно від 1 мкг/кг до 20 мг/кг (наприклад, 0,1-15 мг/кг) антитіла становить первісну дозу, яку підбирають, для введення пацієнтові, або, наприклад, у результаті одного, або декількох окремих введень, або шляхом безперервної інфузії, наприклад, інфузією протягом 1 год. Типова схема лікування звичайно включає

введення антитіла від одного разу на тиждень до одного разу кожні три тижні у дозах, що варіюють приблизно від 0,1 мкг/кг до приблизно 20 мг/кг або більше, залежно від зазначених вище факторів. Наприклад, тижнева доза може становити 5, 10 або 15 мг/кг. Хід лікування легко контролювати звичайними методами й аналізами.

5 Поняття "терапевтично ефективна кількість" антитіла, що вводиться, означає мінімальну кількість, необхідну для попередження, полегшення або лікування захворювання або розладу.

Молекули анти-ІФР антитіла за даним винаходом й фармацевтичні композиції, що містять їх, застосовні для лікування гіперпроліферативних розладів.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу гіперпроліферативним розладом є рак.

10 Ракові захворювання класифікують за двома підходами: за типом тканини, з якої відбувається рак (гістологічний підхід), і за первинним осередком захворювання або за розташуванням в організмі, де рак уперше був сформований. До більшості основних місць розвитку раку відносяться шкіра, легені, груди, простата, товста кишка й пряма кишка, шийка матки й матки.

15 Молекули анти-ІФР антитіла за даним винаходом використовують у лікуванні різних ракових захворювань, включаючи, але ними не обмежуючись, наступні захворювання:

- рак, зв'язаний зі СНІД, наприклад, саркому Капоші,

- рак костей, наприклад, сімейство пухлин і остеосарком Юінга;

20 - рак мозку, наприклад, пухлина мозку дорослих, гліому стовбура мозку у дітей, астроцитому мозочка у дітей, церебральну астроцитому /злюкисну гліому у дітей, епендимому у дітей, медулобластому у дітей, розташовані над мозочковим наметом недиференційовані нейроектодермальні пухлини у дітей, гліому зорового шляху й гіпоталамуса у дітей та інші пухлини мозку у дітей;

- рак грудей;

25 - рак, пов'язаний з травною системою/шлунково-кишковим трактом, наприклад, рак анальної зони, рак позаланцюгових жовчних проток, шлунково-кишкову карциноїдну пухлину, шлунково-кишкову стромальну пухлину, холангіокарциному, рак товстої кишки, рак стравоходу, рак жовчного міхура, первинний рак печінки дорослих (гепатоклітинну карциному, гепатобластому), рак печінки у дітей, рак підшлункової залози, рак прямої кишки, рак тонкого кишечника й рак шлунка;

- рак, пов'язаний з ендокринною системою, наприклад, адренокортикальну карциному, шлунково-кишкову карциноїдну пухлину, карциному острівцевих клітин (ендокринної частини підшлункової залози), рак паращитовидної залози, феохромоцитому, пухлину гіпофіза й рак щитовидної залози;

35 - ракові захворювання, пов'язані з очима, наприклад, внутрішньочну меланому й ретинобластому;

- рак, пов'язаний з сечостатевою системою, наприклад, рак сечового міхура, рак нирок, рак пеніса, рак простати, перехідно-клітинний рак ниркової миски та сечоводу, рак насінників, рак уретри, пухлина Вільмса та інші пухлини нирок у дітей;

40 - рак, пов'язаний зі зародковими клітинами, наприклад, злюкисну екстракраніальну герміноклітинну пухлину у дітей, внегонадну герміноклітинну пухлину, герміноклітинну пухлину яєчника й рак насінників;

- рак жіночих статевих органів, наприклад, рак шийки матки, рак ендометрію, гестаційну трофобластичну пухлину, епітеліальний рак яєчника, пухлину зародкових клітин яєчника, передракову пухлину яєчника, саркому матки, рак піхви й рак зовнішніх жіночих статевих пухлин;

45 - рак, пов'язаний з головою й шиєю, наприклад, підглотковий рак, рак гортані, рак губ і ротової порожнини, метастазуючий плоскоклітинний рак шиї зі схованим початком, носоглотковий рак, ротоглотковий рак, рак придаткових пазух носа й носової порожнини, рак паращитовидної залози й рак слинних залоз;

50 - рак, пов'язаний з гематологією/кров'ю, наприклад, лейкози, наприклад, гострий лімфобластний лейкоз дорослих, гострий лімфобластний лейкоз у дітей, гострий мієлоїдний лейкоз дорослих, гострий мієлоїдний лейкоз у дітей, хронічний лімфоцитарний лейкоз, хронічний мієлогенний лейкоз і лейкоз ворсистих клітин; і лімфоми, наприклад, СНІД-зв'язану лімфому, шкірну Т-клітинну лімфому, лімфому Ходжкіна у дорослих, лімфому Ходжкіна у дітей, лімфому Ходжкіна у вагітних, грибоподібний мікоз, неходжкінську лімфому у дорослих, неходжкінську лімфому у дітей, неходжкінську лімфому у вагітних, первинну лімфому центральної нервової системи, синдром Сезарі, шкірну Т-клітинну лімфому і макроглобулінемію Вальденстрема та інші види раку, пов'язаного з гематологією/кров'ю, наприклад, хронічні мієлопроліферативні розлади, множинну мієлому/новоутворення плазматитів,

мієлодиспластичні синдроми й мієлодиспластичні/ мієлопроліферативні захворювання;

- рак, пов'язаний зі скелетно-м'язовою системою, наприклад, сімейство пухлин Юінга, остеосаркому, злоякісну фіброзну гістіоцитому костей, рабдіоміосаркому у дітей, саркому м'яких тканин у дорослих, саркому м'яких тканин у дітей і саркому матки; злоякісні гемангіоми й

5 ангіосаркому;

- рак, пов'язаний з нервовою системою, наприклад, пухлина мозку у дорослих, пухлина мозку у дітей, гліому стовбура мозку, астроцитому мозочка, церебральну астроцитому /злоякісну гліому у дітей, епендимому, медулобластому, розташовані над мозочковим наметом недиференційовані нейроектодермальні пухлини, гліому зорового шляху й гіпоталамуса та інші

10 пухлини мозку, наприклад, нейробластому, пухлину гіпофіза й первинну лімфому центральної нервової системи;

- рак, пов'язаний з респіраторною/торакальною системою, наприклад, недрібноклітинний рак легенів, дрібноклітинний рак легенів, злоякісну мезотеліому, тимому й карциному виличкової залози;

15 - рак, пов'язаний зі шкірою, наприклад, шкірну Т-клітинну систему, саркому Капоші, меланому, рак шкіри з клітин Меркеля й рак шкіри;

- пухлини з дрібних круглих синіх клітин.

Зокрема, молекули анти-ІФР антитіл за даним винаходом й фармацевтичні композиції, що містять їх, корисні для лікування ракових захворювань системи кровотворення, включаючи

20 лейкози, лімфоми й мієломи, ракових захворювань шлунково-кишкового тракту, включаючи рак стравоходу, шлунка, кишечника, підшлункової залози, печінки, жовчного міхура й жовчних проток; ракових захворювань жіночої статеві сфери, включаючи рак грудей, яєчника, матки й шийки матки; раку шкіри, голови й шиї, включаючи злоякісні меланоми; ракові захворювання у дітей типу пухлин Вільмса, нейробластоми й саркоми Юінга; ракові захворювання мозку,

25 наприклад, гліобластоми; саркоми, типу остеосарком, саркоми м'якої тканини, рабдіоміосаркоми, гемангіосаркоми; раку легенів, мезотеліоми й раку щитовидки.

У кращому варіанті здійснення даного винаходу молекули анти-ІФР антитіл за даним винаходом й фармацевтичні композиції, що містять їх, корисні для лікування недрібноклітинного раку легенів (НДРЛ), зокрема локально сформованого або метастазуючого НДРЛ (стадія

30 IIIB/IV). У цьому контексті молекули анти-ІФР антитіл за даним винаходом можуть сполучатися з хіміотерапією на основі платини, зокрема подвійною платиновою терапією паклітакселом/карбоплатином або гемцитабіном/цисплатином.

В іншому кращому варіанті здійснення даного винаходу молекули анти-ІФР антитіл за даним винаходом й фармацевтичні композиції, що містять їх, корисні для лікування гепатоклітинної карциноми, зокрема локально сформованої або гепатоклітинної карциноми (на стадії III/IV). У

35 цьому контексті молекули анти-ІФР антитіл за даним винаходом можуть сполучатися зі сорафенібом (Strumberg D., 2005).

В іншому варіанті здійснення даного винаходу молекули анти-ІФР антитіл за даним винаходом й фармацевтичні композиції, що містять їх, застосовні для гіперпроліферативних розладів, що не відносяться до ракових захворювань, наприклад, псоріазу й рестенозу після

40 ангіопластики, але ними перелік не обмежується. Крім того, ґрунтуючись на попередньому спостереженні (Reinberg, 2008), яке полягає у тому, що зниження дії ІФР-1 впливає на тривалість життя, антитіла за даним винаходом мають корисну властивість при лікуванні дорослих за вповільненням старіння й попередженням вікових захворювань.

45 Таким чином, інший варіант здійснення даного винаходу відноситься до застосування молекул антитіл, подібних описаним вище, для одержання лікарського засобу для лікування зазначених вище ракових захворювань.

В іншому варіанті здійснення даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, подібній описаній вище, для лікування зазначених вище ракових захворювань.

50 У ще одному з варіантів здійснення даний винахід відноситься до способу лікування пацієнта з раковим захворюванням, зазначеним вище, що включає введення зазначеному пацієнтові ефективної кількості фармацевтичної композиції, описаної у даному винаході.

Залежно від розладу, що піддається лікуванню, молекули анти-ІФР антитіла за даним винаходом можуть застосовуватися окремо або у комбінації з одним або декількома

55 додатковими терапевтичними агентами, зокрема, вибраними з агентів, що руйнують ДНК, або терапевтично діючих сполук, які інгібують ангіогенез, метаболічні шляхи сигнальної трансдукції або мітотичні контрольні точки у ракових клітинах.

Додатковий терапевтичний агент може водитися одночасно, при цьому необов'язково як компонент єдиного фармацевтичного препарату, або до або після введення молекули анти-ІФР

60 антитіла.



У деяких варіантах здійснення даного винаходу додатковий терапевтичний агент може бути одним або декількома інгібіторами, вибраними з групи інгібіторів EGFR, VEGFR, HER2-neu, AuroraA, AuroraB, PLK і PI3 кінази, FGFR, PDGFR, Raf, KSP або PDK1, але ними перелік не обмежується.

5 Іншими прикладами додаткових терапевтичних агентів є інгібітори CDK, Akt, src/ bcr- abl, cKit, cMet/HGF, c-Мус, Flt3, HSP90, антагоністи сигнального шляху hedgehog, інгібітори JAK/STAT, Mek, mTor, NFκappa, протеасома, Rho, інгібітор передачі сигналу wnt або інгібітор метаболічного шляху убівітинування.

10 Прикладами інгібіторів Aurora є, але ними перелік не обмежується, PHA-739358, AZD-1152, AT-9283, CYC-116, R-763, VX-667, MLN-8045, PF-3814735, SNS-314, VX-689, GSK-1070916, TTP-607, PHA-680626, MLN-8237 і ENMD-2076.

Прикладом інгібітора PLK є GSK-461364.

15 Прикладами інгібіторів raf є BAY-73-4506 (також інгібітор VEGFR), PLX- 4032, RAF-265 (також інгібітор VEGFR), сорафеніб (також інгібітор VEGFR), XL-281 і Nevavar (також інгібітор VEGFR).

Прикладами інгібіторів KSP є іспінесіб, ARRY-520, AZD-4877, CK-1122697, GSK- 246053A, GSK-923295, MK-0731, SB-743921, LY-2523355 і EMD-534085.

20 Прикладами інгібіторів src і/або bcr-abl є дасатиніб, AZD-0530, босутиніб, XL-228 (також інгібітор ІФР-1Р), нілотиніб (також PDGFR і cKit інгібітор), іматиніб (також інгібітор cKit), NS-187, KX2-391, AP-24534 (також інгібітор EGFR, FGFR, Tie2, Flt3), KM-80 і LS-104 (також інгібітор Flt3, Jak2).

Прикладом інгібітора PDK1 є AR-12.

Прикладом інгібітора Rho є BA-210.

25 Прикладами інгібіторів PI3 кінази є PX-866, PX-867, BEZ-235 (також інгібітор mTor), XL-147, XL-765 (також інгібітор mTor), BGT-226, CDC-0941, GSK-1059615.

Прикладами інгібіторів cMet або HGF є XL-184 (також інгібітор VEGFR, cKit, Flt3), PF-2341066, MK-2461, XL-880 (також інгібітор VEGFR), MGCD-265 (також інгібітор VEGFR, Ron, Tie2), SU-11274, PHA-665752, AMG-102, AV-299, ARQ-197, MetMAb, CGEN-241, BMS-777607, JNJ- 38877605, PF-4217903, SGX-126, CEP-17940, AMG-458, INCB-028060 і E-7050.

30 Прикладом інгібітора c-Мус є CX-3543.

Прикладами інгібіторів Flt3 є AC-220 (також інгібітор cKit і PDGFR), KW-2449, LS-104 (також інгібітор bcr-abl і Jak2), MC-2002, SB-1317, лестауртиніб (також інгібітор VEGFR, PDGFR, PKC), TG-101348 (також інгібітор JAK2), XL-999 (також інгібітор cKit, FGFR, PDGFR і VEGFR), сунітиніб (також інгібітор PDGFR, VEGFR і cKit) і тандутиніб (також інгібітор PDGFR і cKit).

35 Прикладами інгібіторів HSP90 є танеспіміцин, алвеспіміцин, IPI-504, STA-9090, MEDI-561, AUU-922, CNF-2024 і SNX-5422.

Прикладами інгібіторів JAK/STAT є CYT-997 (також взаємодіючий з тубуліном), TG-101348 (також інгібітор Flt3) і XL-019.

40 Прикладами інгібіторів Mek є ARRY-142886, AS-703026, PD-325901, AZD-8330, ARRY-704, RDEA-119 і XL-518.

Прикладами інгібіторів mTor є рапаміцин, темсиролімус, дефоролімус (який також діє як інгібітор VEGF), еверолімус (також інгібітор VEGF), XL-765 (також інгібітор PI3 кінази) і BEZ-235 (також інгібітор PI3).

Прикладами інгібіторів Akt є перифозин, GSK-690693, RX-0201 і трицирибін.

45 Прикладами інгібіторів cKit є маситиніб, OSI-930 (який також діє як інгібітор VEGFR), AC-220 (також інгібітор Flt3 і PDGFR), тандутиніб (також інгібітор Flt3 і PDGFR), акситиніб (також інгібітор VEGFR і PDGFR), сунітиніб (також інгібітор Flt3, PDGFR, VEGFR) і XL-820 (також діє як інгібітор VEGFR і PDGFR), іматиніб (також інгібітор bcr-abl), нілотиніб (також інгібітор bcr-abl і PDGFR).

50 Прикладами антагоністів сигнального шляху hedgehog є IPI-609, CUR-61414, GDC-0449, IPI-926 і XL-139.

Прикладами інгібіторів CDK є селіцикліб, AT-7519, P-276, ZK-CDK (також інгібуючий VEGFR2 і PDGFR), PD-332991, R-547, SNS-032, PHA-690509, PHA-848125 і SCH-727965.

55 Прикладами інгібіторів протеасом/інгібіторів метаболічного шляху NFκappaB є бортезоміб, карфілзоміб, NPI-0052, CEP-18770, MLN-2238, PR-047, PR-957, AVE-8680 і SPC-839.

Прикладом інгібітора метаболічного шляху убівітинування є HBX-41108.

60 До прикладів анти-ангіогенних агентів відносяться інгібітори FGFR, PDGFR і VEGF(R), і талідоміди, вибрані з наведених нижче агентів, якими однак перелік не обмежується, BIBF 1120 (продукт Vargatef®), бевацизумаб, мотезаніб, CDP-791, SU-14813, телатиніб, KRN-951, ZK-CDK (також інгібітор CDK), ABT-869, BMS-690514, RAF-265, IMC-KDR, IMC-18F1, IMiDs, талідомід,

CC-4047, леналідомід, ENMD-0995, IMC-D11, Ki-23057, бриваніб, сидираніб, 1B3, CP-868596, IMC-3G3, R-1530 (також інгібітор Flt3), сидираніб (також інгібітор cKit і Flt3), акситиніб (також інгібітор cKit), лестауртиніб (також інгібітор Flt3 і PKC), ваталаніб, тандутиніб (також інгібітор Flt3 і cKit), пазопаніб, PF-337210, афліберсепт, E-7080, CHIR-258, сорафеніб тозилат (також інгібітор Raf), вандетаніб, CP-547632, OSI-930, AEE-788 (також інгібітор EGFR і Her2), BAY-57-9352 (також інгібітор Raf), BAY-73-4506 (також інгібітор Raf), XL-880 (також інгібітор cMet), XL-647 (також інгібітор EGFR і EphB4), XL-820 (також інгібітор cKit), нілотиніб (також інгібітор cKit і bcr-abl), CYT-116, PTC-299, BMS-584622, CEP-11981, довітиніб, CY-2401401 і ENMD-2976.

Додатковий терапевтичний агент також може бути вибраний з інгібіторів EGFR і може бути низькомолекулярним інгібітором EGFR або анти-EGFR антитілом. Прикладами анти-EGFR антитіл є, але ними перелік не обмежується, цетуксимаб, панітумумаб, німотузумаб, залутумумаб; прикладами низькомолекулярних інгібіторів EGFR є гефітиніб, ерлотиніб і вандетаніб (також інгібітор VEGFR). Іншим прикладом модулятора EGFR є гібридний токсин EGF.

Іншими інгібіторами EGFR і/або Her2, застосовними для комбінації з молекулою анти-ІФР антитіла за даним винаходом, є BIBW 2992 (продукт Tovok®), лапатиніб, трастузумаб, пертузумаб, XL-647, нератиніб, BMS-599626 ARRY-334543, AV-412, mAB-806, BMS-690514, JNJ-26483327, AEE-788 (також інгібітор VEGFR), AZD-8931, ARRY-380 ARRY-333786, IMC-11F8, земаб, TAK-285, AZD-4769.

Іншими агентами, які переважно можуть комбінуватися при лікуванні молекулами анти-ІФР антитіла за даним винаходом, є тозитумумаб і ібритумумаб тіуксетан (два радіомічених анти-CD20 антитіла); офатумумаб, ритуксимаб, LY-2469298, окрелізумаб, TRU-015, PRO-131921, FBT-A05, велтузумаб, R-7159 (інгібітори CD20), алемтузумаб (анти-CD52 антитіло), денозумаб, (інгібітор ліганду фактора диференціації остеокластів), галіксимаб (антагоніст CD80), заноліумаб (антагоніст CD4), SGN40 (модулятор рецептора ліганду CD40), XmAb-5485, Chi Lob 7/4, лукатумумаб, CP-870893 (інгібітори CD40), CAT-8015, епратузумаб, Y 90-епратузумаб, інотузумаба озогаміцин (інгібітори CD22), луміліксимаб (інгібітор CD23), TRU-016 (інгібітори CD37), MDX-1342, SAR-3419, MT-103 (інгібітори CD19), або мапатумумаб, тигатузумаб, лексатумумаб, апомаб, AMG-951 і AMG-655 (модулятори рецептора TRAIL).

До інших хіміотерапевтичних агентів, які можуть застосовуватися у комбінації з молекулами анти-ІФР антитіла за даним винаходом, відносяться, але ними не обмежуються, гормони, аналоги гормонів і антигормональних агентів (наприклад, тамоксифен, тореміфен, ралоксифен, фулвестрант, мегестрол ацетат, флутамід, нілутамід, бікалутамід, ципротерон ацетат, фінастерид, бусерелін ацетат, флудрокортизон, флуоксиместерон, медроксипрогестерон, окстреотид, арзоксифен, пасиреотид, вапреотид), інгібітори ароматази (наприклад, анастрозол, летрозол, ліарозол, екземестан, атаместан, форместан), агоністи й антагоністи LHRH (наприклад, гoserелін ацетат, лейпролід, абарелікс, цетрорелікс, деслорелін, гістрелін, трипторелін), антиметаболіти (наприклад, антифолати, а саме метотрексат, пеметрексед, аналоги піримідину, наприклад, 5-фторурацил, капецитабін, децитабін, неларабін і гемцитабін, аналоги пурину й аденозину, наприклад, меркаптопурин тіогуанін, кладрибін і пентостатин, циторабін, флударабін); протипухлинні антибіотики (наприклад, антрацикліни, а саме доксорубіцин, даунорубіцин, епірубіцин і ідарубіцин, мітоміцин С, блеоміцин, дактиноміцин, плікаміцин, мітоксантрон, піксантрон, стрептозоцин); похідні платини (наприклад, цисплатин, оксиплатин, карбоплатин, лобоплатин, сатраплатин); алкілюючі агенти (наприклад, естрамустин, меклоретамін, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, дакарбазин, циклофосфамід, іфосфамід, гідроксисечовина, темозоломід, нітрозосечовини, наприклад, кармустин і ломустин, тіотепа); антимітотичні агенти (наприклад, алкалоїди барвінку, наприклад, вінбластин, віндезин, вінорелбін, вінфлунін і вінкрістин; і таксани, наприклад, паклітаксел, доцетаксел і склади з ними, ларотаксел; симотаксел і епотилони, наприклад, іксабепілон, патупілон, ZK-ЕРО); інгібітори топоізомерази (наприклад, епіподофілотоксини, наприклад, етопозид і етопофос, теніпозид, амсакрин, топотекан, іринотекан) і різні інші хіміотерапевтичні засоби, наприклад, аміфостин, анагрелід, інтерферон альфа, прокарбазин, мітотан і порфімер, бексаротен, целекоксиб.

В одному з об'єктів даного винаходу молекули анти-ІФР антитіла за даним винаходом використовують у комбінації з хіміотерапією на основі платини, наприклад, у комбінації з паклітакселом/карбоплатином або гемцитабіном/цисплатином, при подвійній платиновій терапії. В одному з варіантів здійснення даного винаходу така комбінована терапія може бути повторена декілька разів, наприклад, 6 циклів (кожні три тижні). Це лікування може супроводжуватися додатковим повторюваним лікуванням (наприклад, 6 циклів кожні три тижні) тільки одним анти-ІФР антитілом. Такий режим може застосовуватися, наприклад, при лікуванні

недрібноклітинного раку легенів (НДРЛ). В іншому об'єкті даного винаходу молекули анти-ІФР антитіла за даним винаходом використовують у комбінації з сорафенібом. В одному з варіантів здійснення даного винаходу молекула анти-ІФР антитіла може вводитися періодично з інтервалами в 1-3 тижні, наприклад, протягом 12 циклів, у комбінації з безперервним введенням сорафенібу. Такий режим, наприклад, може застосовуватися для лікування гепатоклітинної карциноми.

Молекули анти-ІФР антитіла за даним винаходом, наприклад, при застосуванні у низьких концентраціях, також можуть комбінуватися з агентами, які націлюються на ІФР-1Р. До таких агентів відносяться антитіла, які зв'язуються з ІФР-1Р (наприклад, CP-751871, AMG-479, IMC-A12, MK-0646, AVE-1642, R-1507, BIIБ-022, SCH-717454,  $\rho$ hu Mab ІФР-Р) і нові хімічні агенти, які націлюються на домен кінази ІФР 1-Р (наприклад, OSI-906 або BMS-554417, XL-228, BMS-754807).

Молекули анти-ІФР антитіла за даним винаходом також можуть застосовуватися у комбінації з іншими способами лікування, включаючи хірургію, радіотерапію, гормональну терапію, модифікатори біологічної відповіді, гіпертермію й кріотерапію, а також агенти для ослаблення якого-небудь побічного ефекту, наприклад, протиблювотні засоби й, у кращому варіанті здійснення даного винаходу, антидіабетичні засоби, наприклад, метформін.

Молекули анти-ІФР антитіла за даним винаходом також можуть застосовуватися для діагностики раку, якщо підвищені рівні ІФР-1 і/або ІФР-2 у сироватці корелюють з розвитком і прогресуванням захворювання, наприклад, для визначення підвищених рівнів ІФР-2 через імпринтинг (PI), епігенетичної зміни, що впливає на ген II інсуліноподібного фактора росту (ІФР2). У деяких варіантах здійснення даного винаходу використовуване для діагностики антитіло, наприклад, для виявлення ІФР-1 у зрізах тканини людини за допомогою імуногістохімічного фарбування, є химерним антитілом, похідним від антитіла людини. У такому антитілі константні області або їх частини заміщені на відповідні послідовності від антитіл інших видів, наприклад, миші. З використанням такого химерного антитіла як основне антитіло вторинне антитіло, наприклад, козяче антитіло, що специфічно реагує з частиною Fc миші, може специфічно розпізнавати послідовності миші химерного основного антитіла й не зв'язується з частинами Fc інших молекул імуноглобуліну людини, які містяться у зразку тканини людини. Таким чином, уникають небажаного фоновому фарбування.

Антитіла за даним винаходом завдяки блокуванню передачі сигналу, опосередкованому ІФР-1 та ІФР-2, також можуть застосовуватися як контроль маси тіла й формування жирової тканини. З цією метою антитіла за даним винаходом вводять окремо або у комбінації з іншими засобами від ожиріння.

Матеріали й методи

Відбір антитіл, що повністю належать людині, які зв'язуються з високою спорідненістю з ІФР-1

Відбір клонів специфічних фрагментів Fab з бібліотеки комбінаторних антитіл людини (HuCAL Gold) (Кнаррік та ін., 2000), які зв'язують ІФР-1 людини з низькою наномольною спорідненістю, проводять способом, сутність якого описана Rauchenberger та ін., 2003, у трьох циклах пенінгу. Для ідентифікації фрагментів Fab з поліпшеною спорідненістю до ІФР-1 людини декілька таких "батьківських" клонів Fab піддають процедурі "дозрівання спорідненості *in vitro*" способом, сутність якого описана Nagy та ін., 2002. Послідовності L-CDR3 (області CDR3 легкого ланцюга) і H-CDR2 (області CDR2 важкого ланцюга) кожного клону модифікують окремо шляхом заміщення вихідної послідовності приблизно  $10^8$  L-CDR3 і H-CDR2 касетами від HuCAL (Кнаррік та ін., 2000). Фаги одержують зі створених "бібліотек дозрівання" і кожен бібліотеку піддають методу пенінгу на ІФР-1 людини. Для відбору сполучних за найвищою спорідненістю з ІФР-1 людини, пенінги проводять в умовах нормального промивання й підвищеної твердості за методами, відомими у даній галузі, зі зменшенням антигену й з блокуванням і без блокування інсуліном людини. Отриманий після пенінгу матеріал після трьох циклів фагового пенінгу піддають субклонуванню у векторі експресії Fab і спорідненість кожного Fab у відношенні ІФР-1 людини визначають методом рівноважного титрування, заснованого на електрохемілюмінесценції, розробленим фірмою BioVeris (Witney, Оксфордшир, Великобританія), в основному за описом Haenel та ін., 2005. Клони Fab з найкращою спорідненістю до ІФР-1 секвнують, потім конвертують в IgG1 антитіло людини відповідно до опису Krebs та ін., 2001, з субнаномольною спорідненістю до ІФР-1 людини без якої-небудь зміни специфічності у порівнянні з вихідними антитілами.

Клонування й рекомбінантна експресія IgG1 антитіл

Варіабельні області важкого ланцюга (VH) і варіабельні області легкого ланцюга (VL) виключають з векторів експресії Fab шляхом розщеплення ферментами рестрикції й лігуванням

у сумісні сайти рестрикції плазмід на основі рсДНК3.1, що містять важкий ланцюг IgG1 людини і константних областей легкого ланцюга Ig $\lambda$  людини, відповідно. Одержують плазмідні препарати EndoFree (фірма Qiagen) і плазмідні важкого й легкого ланцюга спільно трансфекують у культуру клітин HEK293 freestyle (фірма Invitrogen) у концентрації кожної плазмиди 1 мг/л за протоколом виробника. Через 72 год. супернатант збирають і концентрацію IgG визначають методом ELISA. Антитіла очищають у колонці з модифікованим білком А (фірма GE Healthcare), елюють цитратним буфером і потім діалізують до концентрації 2,5 мг/мл у ФСБ. В іншому варіанті лінію клітин CHO, зі стабільно інтегрованими плазмідами, які експресують антитіла, одержують і використовують для одержання антитіл.

Аналіз методом поверхневого плазмонного резонансу для визначення констант спорідненості

а) Спосіб захоплення антитіл

Сенсорний чіп покривають приблизно 1000 KE контрольного антитіла у проточній кюветі 1 і приблизно 1000 KE специфічного антитіла кролика проти Fc-гамма людини у проточній кюветі 2, використовуючи з'єднуючі реагенти з набору сполук амінів. Мішень у кількості 1000 KE розташовують на поверхні препарату біосенсора Biacore 3000 при швидкості струму 5 мкл/хв. Використовують рухливий буфер HBS-EP. Вимірювання спорідненості проводять, використовуючи наступні параметри: потік 20 мкл/хв (рухливий буфер HCB); температура вимірювання 25 °C; Fc1, Fc2 напрямку потоку; Fc1, Fc2 детекція; захоплення анти-ІФР-huMAb: 3 хв розчину 1 мкг/мл; 5 хв ІФР-Ag-асоціація; 5 хв ІФР-Ag-дисоціація; регенерація: пульс 30 сек з 50 мМ HCl. Антигени ІФР розводять до 500, 250, 125, 62,5 і 31,3 нМ у рухливому буфері (HCB) і різні розведення антигену поодиночі пропускають поверх Fc1 і Fc2 у випадковому порядку. Рухливий буфер пропускають вхолосту тільки у проміжках. Криву рухливого буфера віднімають з кривої зв'язування щораз перед аналізом спорідненості. Оцінку даних проводять, використовуючи програмне забезпечення BIAevaluation (версія 4.1, фірма Biacore, Фрайбург, Німеччина). Кінетичні фази асоціації й дисоціації встановлюють окремо. Для роздільної установки величин  $k_{diss}$  використовують строки ініціації 200-300 сек на фазі дисоціації (діапазон стійкого зниження сигналу). Для роздільної установки величин  $k_{ass}$  використовують тимчасові рамки приблизно 100 сек (діапазон стійкого підвищення сигналу) і для підрахунку індивідуальних значень  $k_{diss}$  використовують з асоціативною моделлю Ленгмюра 1:1. Середні величини зі стандартним відхиленнями кінетичних даних підраховують разом із відповідними константами дисоціації ( $K_D$ ) і асоціації ( $K_A$ ).

б) Спосіб покриття ІФР

Визначення констант зв'язування антитіл ІФР з лігандами ІФР при нанесенні на сенсорний чіп лігандів ІФР в основному проводять за зазначенням вище описом, за винятком тієї обставини, що на сенсорний чіп наносять 35,1 пг/мм<sup>2</sup> і 38,5 пг/мм<sup>2</sup> ІФР-1 та ІФР-2, відповідно. Потім антитіла пропускають над чіпом у наступних концентраціях: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 нМ.

Вимірювання за допомогою імуносорбентного аналізу зв'язування з факторами ІФР людини, миші й пацюка й з інсуліном людини

Антитіла IgG1, що повністю є антитілами людини, які зв'язуються з високою спорідненістю з ІФР-1, також досліджують на здатність зв'язувати ІФР-1 людини у прямому імуносорбентному аналізі (ELISA). Аналіз проводять шляхом нанесення ІФР-1 людини (фірма R&D Systems, номер у каталозі 291-G1) в 96-ямкові планшети Maxisorb у концентрації 0,5 мкг/мл протягом ночі при 4 °C (100 мкл/ямку). Тільки один буфер для покриття використовують як контроль неспецифічного зв'язування. Потім ямки однократно промивають буфером для промивання (1 × TBS-T) і сайти зв'язування, що залишилися, блокують 200 мкл буфера, що блокує, протягом 1 год. при кімнатній температурі на круговій качалці з наступним циклом промивання. Серійні трикратні розведення кожного досліджуваного антитіла у буфері, що блокує, одержують безпосередньо у планшетах із покриттям. Типові застосовувані концентрації залишають 50, 16,6, 5,6, 1,8, 0,6, 0,2 і 0,07 нг/мл. Окремо рівень, що блокує, використовують як позитивний контроль. Потім планшети інкубують протягом 2 год. при кімнатній температурі при струшуванні. Після трьох циклів промивання по 100 мкл/ямку другого реагенту, а саме антитіла проти IgG людини, кон'югованого з пероксидазою хрину (HRPO-кон'югованого анти-IgG людини (фірма Jackson ImmunoResearch Inc.), розведеного у буфері, що блокує, додають в усі ямки. Через 2 год. інкубації при кімнатній температурі при струшуванні планшети тричі промивають і по 100 мкл/ямку субстратного розчину ТМВ (рівні кількості розчинів А і Б) вносять піпеткою в усі ямки. Планшети інкубують протягом 10-20 хв при кімнатній температурі при струшуванні й потім реакцію зупиняють додаванням 100 мкл/ямку 1 М фосфорної кислоти. Поглинання вимірюють при довжині хвилі 450 нм (контроль при 650 нм).

Зв'язування IgG1 антитіл, що зв'язуються з фактором ІФР-1, що є повністю фактором

людини, з ІФР-1 миші (фірма R&D Systems, номер у каталозі 791-MG), ІФР-1 пацюка (фірма IBT, номер у каталозі RU100), ІФР-2 людини (фірма GroPer, номер у каталозі FM001), ІФР-2 миші (фірма R&D Systems, номер у каталозі 792-MG), ІФР-2 пацюка (фірма IBT, номер у каталозі AAU100) та інсулін людини (фірма Roche) також досліджують, відповідно до описаного вище  
 5 для ІФР-1 людини (виключенням є застосовувана концентрація інсуліну для покриття, яка становить 3 мкг/мл).

Дослідження проліферації клітин *in vitro* для визначення ефективності нейтралізації

Клітини лінії MCF-7, отриманої від раку грудей (ATCC, HTB-22), і клітини лінії COLO 205, отриманої від раку товстої кишки (ATCC, CCL-222), висівають в 96-ямкові планшети при щільності клітин 1000 клітин/ямку у середовищі RPMI без сироватки. По 10 нг/мл або ІФР-1, або ІФР-2, додають при наявності або при відсутності гуманізованого антитіла контрольного ізо типу, що не зв'язується з ІФР-1 або ІФР-2, або антитіла 60814, 60819 і 60833 у концентрації 12, 37, 111, 333, 1000 і 3000 нг/мл. Клітини культивують протягом 5 діб, потім відносно число клітин визначають у кожній ямці, використовуючи метод люмінесцентного аналізу життєздатних клітин CellTiter-Glo (фірма Promega). Люмінесценцію (люмен (лм) = одиниця люмінесценції) записують, використовуючи програму XFluor GENios Pro 4.

Дослідження росту ліній клітин, похідних від саркоми Юінга

Клітини, похідні від саркоми Юінга, ліній TC-71 (ATCC, номер у колекції ACC516) і SK-ES-1 (ATCC, номер у колекції HTB86), висівають в 96-ямкові планшети з щільністю 1000 клітин/ямку у середовище DMEM, що містить 1×NEAA, 1×натрій піруват, 1×глутамакс і 10 % фетальної сироватки теляти (ФСТ) та інкубують протягом ночі при 37 °C і у вологій атмосфері з 5 % CO<sub>2</sub>. Наступного дня серійні розведення досліджуваного антитіла, гуманізованого ізо типового контрольного антитіла (гуманізованого антитіла IgG1, що націлюється на CD44-v6), яке не зв'язує ІФР-1 або ІФР-2, рапаміцину або комбінації рапаміцину й досліджуваного антитіла, додають до клітин. Типові використовувані концентрації дорівнюють 30, 10, 3,3, 1,1, 0,37 і 0,12 мкг/мл (або 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 нМ рапаміцин і досліджуваного антитіла для дослідження комбінацій) і кожне розведення вносять в ямки у трьох повторях. Потім клітини з антитілом інкубують протягом 120 год., після чого визначають відносну кількість клітин у кожній ямці, використовуючи метод люмінесцентного аналізу життєздатних клітин CellTiter-Glo (фірма Promega). Люмінесценцію (люмен (лм) = одиниця люмінесценції) записують, використовуючи програму XFluor GENios Pro 4, і для аналізу даних одержують середнє значення за трьома ямками і відповідні розрахунки, використовуючи програму аналізу сигмоїдальної кривої (програму Graph Pad Prism) з варіабельним кутом нахилу кривої.

Аналіз методом вестерн блоттингу рівнів фосфорилованих ферментів АКТ і PTEN

Клітини SK-ES-1 поміщають в 96-ямкові планшети у середовище, що містить 10 % фетальної сироватки теляти, і потім протягом ночі інкубування їх обробляють або 100 нМ ізо типовим контрольним антитілом (гуманізованим антитілом IgG1, що націлюється на CD44-v6), яке не зв'язує ІФР-1 або ІФР-2, або 100 нМ 60819, 100 нМ рапаміцин, або комбінацією 100 нМ 60819 і 100 нМ рапаміцин. Через 24 год. клітини лізують і лізат клітин заморожують після визначення концентрації білка в аналізі Bradford. Аналіз методом вестерн-блоттингу здійснюють нанесенням 30 мкг білкових лізатів на гель SDS PAGE (фірма BioRad) і гель піддають блоттингу на сендвіч гель блоттингу Citerian. Вестерн-блотти інкубують протягом ночі з антитілом кролика анти-бета актину (контроль), антитілом кролика анти-PTEN (фірма Cell Signaling, номер у каталозі 9559) або антитілом кролика анти-pAKT (фірма Cell Signaling, номер у каталозі 4060) у розведенні 1:5000 (анти-бета актин), 1:1000 (анти-PTEN) або 1:2000 (анти-фосфоАКТ) в 1 % порошковому молоці. Після промивання у TBS антитіло проти IgG кролика, кон'юговане з пероксидазою хрину (фірма Amersham), застосовують протягом 1 год. і потім додатково промивають у TBS і реакційну здатність антитіла фіксують за підвищеною хемолюмінесценцією (enhanced chemiluminescence-ECL) і захоплюють на плівці Hyperfilm (фірма Amersham).

Комбінація *in vitro* анти-ІФР антитіла з інгібітором EGFR у клітинах лінії, похідної від недрібноклітинного раку легенів (НДРЛ)

Клітини лінії A-549 (ATCC, номер у колекції CCL-185), похідні від НДРЛ, поміщають в 96-ямкові планшети у кількості 1000 клітин/ямку у середовище RPMI 1640, що містить 2 мМ L-глутамін і 10 % фетальної сироватки теляти та інкубують протягом ночі при 37 °C у вологій атмосфері з 5 % CO<sub>2</sub>. Наступного дня до клітин додають серійні розведення досліджуваного ІФР антитіла, ерлотинібу/тарцеви або комбінації досліджуваного ІФР антитіла й ерлотинібу. Типові концентрації досліджуваного ІФР антитіла становлять 30000, 10000, 3333, 1111, 370,123, 41, 14 нг/мл, і типові використовувані концентрації ерлотинібу становлять 20000, 6667, 2222, 741, 247, 82, 27, 9 нМ, причому кожне розведення вносять в ямки у трьох повторях. Потім клітини інкубують протягом 120 год., після чого визначають відносне число клітин у кожній ямці,

використовуючи метод люмінесцентного аналізу життєздатних клітин CellTiter-Glo (фірма Promega). Люмінесценцію (люмен (лм) = одиниця люмінесценції) записують, використовуючи програму XFluor GENios Pro 4, і для аналізу даних одержують середнє значення за трьома ямками і відповідні розрахунки, використовуючи програму аналізу сигмоїдальної кривої (програму Graph Pad Prism) з варіабельним кутом нахилу кривої.

Визначення впливу на сумарні рівні ІФР-1 у сироватці миші й пацюка

Окремі внутрішньовенні (болюсні) введення 25, 12,5, 6,25 і 3,13 мг/кг досліджуваного ІФР антитіла вводять самкам безтимусних голих мишей лінії NMRI у віці 6-8 тижнів (n=5). Окремі 10-хвилинні внутрішньовенні введення 30, 100, 200 мг/кг антитіла 60819 проводять самцям і самкам пацюків лінії Wistar Han у віці 6-8 тижнів (n=4 самця, 4 самки). Перед лікуванням антитілом і через 24 год. після введення беруть зразок крові, одержують сироватку й загальні рівні ІФР-1 миші або пацюка визначають, використовуючи імуноцитометричний аналіз сумарного ІФР-1 пацюка/миші ОСТЕІА. Аналіз проводять за інструкціями виробника, поглинання вимірюють при 450 нм і оцінюють, використовуючи програмне забезпечення SoftMax Pro. Використовують криву стандарту для визначення концентрації у сироватці сумарного ІФР-1 у нг/мл. Статистичний аналіз проводять, використовуючи програмне забезпечення GraphPad Prism.

Дослідження методом ELISA на основі клітин фосфорилювання ІФР-1Р

Лінії клітин фібробластів миші, які рекомбінантно експресують ІФР-1Р людини або ІР-А людини, підтримують у середовищі DMEM, збагаченому 10 % інактивованою нагріванням ФСТ, 1 мМ натрієм піруватом, 0,075 % натрію бікарбонату, мінімальним середовищем Голка зі замінними амінокислотами (MEM NEAA) і 0,3 мкг/мл пуроміцину при 37 °C і в атмосфері з 5 % CO<sub>2</sub> у вологому інкубаторі. Клітини роз'єднують трипсином/EDTA, ресуспендують у культуральному середовищі й розводять до 100000 клітин/мл. По 100 мкл (10000 клітин) висівають в ямки стерильного 96-ямкового планшета та інкубують протягом ночі у вологому інкубаторі при 37 °C і в атмосфері 5 % CO<sub>2</sub>. Потім клітини виснажують середовищем для аналізу (середовище DMEM, збагачене 0,5 % інактивованою нагріванням ФСТ, 1 мМ натрієм піруватом, 0,075 % натрію бікарбонату й MEM NEAA) у кількості 100 мкл/ямку та інкубують протягом ночі відповідно до описаного вище. Антитіла у діапазоні концентрацій досліджуваного антитіла, приготовлених у середовищі для аналізу, додають до клітин, всі зразки готують у трьох повторах, щоб визначити стандартне відхилення для кожної умови проведення аналізу. У цих експериментах також досліджують антитіло ІФР-1Р, αІR-3 (фірма Calbiochem, номер у каталозі GR11L). Потім додають ІФР-1 (кінцева концентрація 20 нг/мл), ІФР-2 (кінцева концентрація 100 нг/мл) або сироватку людини (кінцева концентрація 20 %) і планшети інкубують протягом 30 хв у вологій атмосфері у термостаті. Клітини фіксують заміщенням середовища для росту на 4 % формальдегід у ФСБ протягом 20 хв при кімнатній температурі. Після двох циклів промивання за допомогою 300 мкл/ямку буфера для промивання (ФСБ з 0,1 % Triton X-100) протягом 5 хв (з перемішуванням) клітини блокують за допомогою 100 мкл/ямку 1,2 мас. % перекису водню у буфері для промивання протягом 30 хв при кімнатній температурі. Клітини знову промивають за допомогою 300 мкл/ямку буфера для промивання й блокують за допомогою 100 мкл/ямку буфера, що блокує (5 % БСА у буфері для промивання) протягом 60 хв при кімнатній температурі з перемішуванням. Буфер, що блокує, видаляють і додають 50 мкл/ямку первинного антитіла проти фосфо-ІФР-І рецептора β (tyr1135/1136) / інсулінового рецептора β (tyr1150/1151) (фірма Cell Signaling, номер у каталозі 3024), розведене 1:1000 у буфері, що блокує. Планшети інкубують протягом ночі при 4 °C при струшуванні, потім тричі промивають відповідно до зазначеного вище й вносять по 50 мкл/ямку козячих імуноглобулінів проти IgG кролика, кон'югованих із пероксидазою хрину (фірма Dako, номер у каталозі P0448), розведеною 1:500 у буфері, що блокує. Після 60 хв інкубації при кімнатній температурі при струшуванні ямки промивають двічі буфером для промивання відповідно до зазначеного вище й один раз 300 мкл ФСБ. 100 мкл/ямку субстратного розчину TMB (фірма Bender MedSystems, No. BMS406.1000) вносять в ямки та інкубують протягом 10 хв при перемішуванні, після чого реакцію зупиняють додаванням 100 мкл/ямку 1 М фосфорної кислоти, і зчитують поглинання, використовуючи фотометр (оптична щільність при 450 нм, оптична щільність при 650 нм використовується як контроль). Величини IC<sub>50</sub> придушення ІФР-1Р або фосфорилювання ІР-А визначають графічним аналізом.

Спільна кристалізація Fab-ІФР-1 і визначення структури

Моноклональні антитіла одержують у буфері 100 мМ Na фосфату (pH 7) перед розщепленням папаїном. Папаїн (фірма Sigma Aldrich, номер у каталозі 3125) активують у буфері для розщеплення (фосфатному буфері, що містить 10 мМ цистеїн гідрохлорид, 4 мМ EDTA, pH 7,0) за інструкціями виробника. Антитіло IgG змішують з активованим папаїном

(співвідношення фермент:IgG=1:100) і реакційну суміш інкубують при 37 °С на круговій качалці протягом ночі. Розщеплення зупиняють додаванням йодацетаміду до кінцевої концентрації 30 мМ. Для відділення фрагмента Fab від фрагментів Fc, продуктів розщеплення Fc та інтактного моноклонального антитіла суміш після розщеплення вносять у колонку з сорбентом Protein A MabSelect, урівноважену фосфатним буфером. Колонку промивають п'ятьма об'ємами колонки ФСБ, і фрагмент Fab збирають в елюаті й з фракцій промивання. Фрагмент Fc та інтактне моноклональне антитіло елюють з колонки 100 мМ цитратним буфером (рН 3,0) і потім проводять ексклюзійну хроматографію фрагмента Fab, використовуючи колонку HiLoad Superdex 75. Через колонку пропускають зі швидкістю 0,5 мл/хв 20 мМ триетаноламін, 130 мМ NaCl, рН 8,0. Білкову концентрацію фрагментів Fab визначають за вимірюванням поглинання при довжині хвилі 280 нм. Якість фрагментів Fab досліджують методами вестерн-блоттингу й ELISA.

Комплекс Fab-ІФР-1 одержують додаванням 2-кратного мольного надлишку рекомбінантного ІФР-1 (фірма Groppe; Receptor Grade) для очищення Fab, який потім інкубують протягом ночі на круговій качалці при 4 °С. Концентрування комплексу (до 15 мг/мл) і видалення незв'язаного ІФР-1 проводять, використовуючи пристрій Amicon-Ultra. Кристалізацію комплексу Fab:ІФР-1 проводять, використовуючи різні методи, наприклад, висячої краплі, сидячої краплі й затравки. В одному з варіантів здійснення даного винаходу кристал осаджують шляхом контакту розчину з резервуаром, що знижує розчинність білків через наявність осаджувачів, тобто реагентів, які індують осадження. Скринінг різних умов приводить до виявлення відповідної буферної системи, керованої шляхом внесення осаджувача й добавок. Концентрація осадків переважно становить 5-50 мас. %. Величина рН буфера переважно становить приблизно від 3 до приблизно 6. Концентрація білка у розчині переважно така, що через надлишкове насичення випадає осад. Температура при кристалізації переважно становить від 4 °С до 25 °С.

Тривимірна структура комплексу Fab:ІФР-1, визначена атомними координатами, отримана на підставі рентгеноструктурного дифракційного аналізу кристалу й карти щільності електронів, що впливає з нього. Дозвіл дифракції кристалів менше 2Å. Кристали переважно мають просторову групу P3221 (число 154) і розміри елементарних комірок становлять приблизно  $a = 70\text{\AA}$ ,  $b=70\text{\AA}$ ,  $c=195\text{\AA}$  і  $\gamma = 120^\circ$ . Спосіб визначення тривимірної структури представляє молекулярне заміщення, що включає застосування структури, близькій молекулі або комплексу рецепторного ліганду. Діючи систему зв'язування й очищення проводять протягом декількох повторюваних етапів до підсумкових R-факторів ( $R$  і  $R_{\text{free}}$ ), рівних 21 і 23 % відповідно.

Визначення фармакокінетичних параметрів у пацієнтів

Пацієнтам лінії Wistar вводять п'ять болюсних внутрішньовенних уливень по 18, 52 і 248 мг/кг антитіла кожні 72 год. У різний час беруть зразки крові й визначають концентрацію антитіла людини у плазмі методом сендвіч-ELISA. У результаті розраховують фармакокінетичні параметри антитіла у першу добу дозування, а період напіврозпаду розраховують після останньої доби дозування (з  $t(n) = 1008$  год.).

Приклад 1. Відбір антитіл, що зв'язуються з ІФР-1 з високою спорідненістю

Для ідентифікації фрагментів Fab з поліпшеною спорідненістю з фактором ІФР-1 людини декілька "батьківських" клонів Fab, для яких встановлено, що вони зв'язують ІФР-1 зі спорідненістю, вимірюваною у наномолях, піддають процедурі "дозрівання спорідненості in vitro", при якій послідовності L-CDR3 і H-CDR2 кожного клону модифікують окремо шляхом заміщення вихідної послідовності бібліотекою нових послідовностей L-CDR3 і H-CDR2. Отримані у результаті "бібліотеки дозрівання" піддають методу пенінгу на ІФР-1 людини і клони з найкращою спорідненістю відбирають для конверсії в антитіла IgG1 і подальшого аналізу. Трьома антитілами, які мають найкращу спорідненість з фактором ІФР-1 людини, є антитіла 60814, 60819 і 60833, які мають спорідненість ( $K_D$ ) 180, 190 і 130 пМ, відповідно (див. табл. 1), визначену методом рівноважного титрування, заснованого на електрохемилюмінесценції.

Таблиця 1

Результати дослідження  
зв'язування ІФР-1

Антитіло	Спорідненість (пМ)
60814	180
60819	190
60833	130

Також досліджують зв'язування антитіл з ІФР-1 та ІФР-2 людини, миші й пацюка й з інсуліном людини в імуносорбентних дослідженнях. Установлено, що 60814, 60819 і 60833 показують порівнянне перехресно-діюче зв'язування з ІФР-1 миші й пацюка й з ІФР-2 людини, миші й пацюка, але не взаємодіє з інсуліном людини (при найвищій певній концентрації 50 нг/мл) (фіг. 1А-1Ж).

Константи спорідненості для зв'язування антитіл з факторами ІФР-1 та ІФР-2 людини, миші й пацюка, також визначають методом поверхневого плазмонного резонансу (Biacore). Цей спосіб включає захоплення антитіл поверхнею сенсора й струм антигенів ІФР над захопленими антитілами, у такий спосіб переборюючи який-небудь ефект авідитету, що може виникнути, якщо антигени ІФР наносять на сенсор і додають антитіла. Константи спорідненості, визначені цим методом для антитіла 60833, показані у табл. 2, в якій можна бачити, що вимірювані величини  $K_D$  для ІФР-1 людини та ІФР-2 людини становлять 0,07 нМ і 0,9 нМ, відповідно.

Таблиця 2

Константи спорідненості антитіла 60833 з ІФР-1 та ІФР-2 людини, миші й пацюка, визначені методом поверхневого плазмонного резонансу (метод захоплення антитіла)

Антиген	$K_{on} [M^{-1}s^{-1}]$	$K_{off} [s^{-1}]$	$K_D [нМ]$
ІФР-1 людини	$4,74 \times 10^6$	$3,01 \times 10^{-4}$	0,07
ІФР-1 миші	$1,00 \times 10^6$	$3,23 \times 10^{-4}$	0,33
ІФР-1 пацюка	$3,81 \times 10^6$	$2,53 \times 10^{-4}$	0,07
ІФР-2 людини	$3,97 \times 10^6$	$3,53 \times 10^{-3}$	0,913
ІФР-2 миші	$8,68 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-2}$	13,4
ІФР-2 пацюка	$2,56 \times 10^6$	$6,13 \times 10^{-3}$	2,41

#### Приклад 2. Придушення передачі сигналу через ІФР

Першою подією, що відбувається після зв'язування факторів ІФР з рецептором ІФР-1Р, є фосфорилювання ІФР-1Р. Дослідження методом ELISA на основі клітин проводять для вимірювання придушення фосфорилювання ІФР-1Р, індукованого ІФР, антитілом 60833. Визначають силу й ефективність (до 15 мкг/мл (100 нМ)) антитіла 60833 за нейтралізацією фосфорилювання ІФР-1Р, індукованого рекомбінантними біологічно активними ІФР-1 та ІФР-2. У табл. 3 і на фіг. 2 показано, що антитіло 60833 сильно й ефективно придушує передачу сигналу, індуковану ІФР-1 (фіг. 2А) та ІФР-2 (фіг. 2Б). У тому ж аналізі моноклональне антитіло  $\alpha$ IR3, націлене на ІФР-1Р, діє набагато слабкіше й менш ефективно відносно передачі сигналу, індукованого ІФР-1, і проявляє дуже слабкий вплив на передачу сигналу, індуковану ІФР-2.

Подібний метод ELISA застосовують для аналізу заснованого на клітинах фосфорилювання ІР-А, щоб показати, що антитіло 60833 також може інгібувати сигнальний шлях ІФР-2 через ІР-А. У табл. 4 і у прикладі 3А показано, що антитіло 60833 сильно й ефективно придушує фосфорилювання ІР-А, індуковане ІФР-2. Навпроти, моноклональне антитіло  $\alpha$ IR3, яке не може зв'язувати ІР-А, не проявляє придушуючої дії.

Рівень біологічної активності ІФР у зразках сироватки або плазми людини також може бути вимірюваний, використовуючи метод ELISA для аналізу заснованого на клітинах фосфорилювання ІФР-1Р. Цей метод застосовують для визначення сили й ефективності (до 15 мкг/мл (100 нМ)) антитіла 60833 за нейтралізацією біологічної активності ІФР сироватки людини. У табл. 3 і на фіг. 3Б показано, що антитіло 60833 сильно й ефективно інгібує біологічну активність ІФР у сироватці людини.



Таблиця 3

## Вплив антитіла 60833 на фосфорилювання ІФР-1Р

Стимул фосфорилювання ІФР-1Р	Інгібітор	IC <sub>50</sub> (мкг/мл)	Збереження фосфорилювання при концентрації інгібітора 15 мкг/мл (100 нМ) (%)
ІФР-1 (20 нг/мл)	60833	0,09	0
	$\alpha$ ІR3	1,16	35
	Контрольний IgG	>15	108
ІФР-2 (100 нг/мл)	60833	1,12	7
	$\alpha$ ІR3	>15	76
	Контрольний IgG	>15	108
Об'єднана сироватка людини від здорових донорів (20 %)	60833	0,25	5
	$\alpha$ ІR3	>15	120
	Контрольний IgG	>15	110

Таблиця 4

## Вплив антитіла 60833 на фосфорилювання ІР-А

Стимул фосфорилювання ІР-А	Інгібітор	IC <sub>50</sub> (мкг/мл)	Збереження фосфорилювання при концентрації інгібітора 15 мкг/мл (100 нМ) (%)
ІФР-2 (100 нг/мл)	60833	0,82	6
	$\alpha$ ІR3	>15	115
	Контрольний IgG	>15	109

## Приклад 3. Впливи на клітинну проліферацію, індуковану ІФР-1 та ІФР-2

- 5 Визначають вплив антитіл 60814, 60819 і 60833 на індуковану факторами ІФР-1 та ІФР-2 проліферацію клітин лінії MCF-7 (отриманої від раку грудей) і клітин лінії COLO 205 (отриманої від раку товстої кишки). Приклади впливу антитіл 60814 і 60819 показані на фіг. 4 А-Г. Всі три антитіла проявляють дозозалежне придушення проліферації клітин MCF-7 (фіг. 4А і 4Б) і COLO 205 (фіг. 4В і 4Г), індукованої ІФР-1 (фіг. 4А і 4В) та ІФР-2 (фіг. 4Б і 4Г). Концентрація кожного антитіла, необхідна для 50 % придушення проліферації кожної лінії клітин, індукованої ІФР-1 або ІФР-2, показана у табл. 5.

Таблиця 5

## Придушення проліферації ракових клітин ліній MCF-7 і COLO 205, індукованої ІФР-1 та ІФР-2

Лінія клітин	Стимуляція	IC <sub>50</sub> (нг/мл)		
		60814	60819	60833
MCF7	ІФР-1	24,1	54,0	38,6
MCF7	ІФР-2	78,2	40,8	81,2
COLO-205	ІФР-1	135,0	216,9	165,1
COLO 205	ІФР-2	576,1	100,8	632,3

## Приклад 4. Вплив на проліферацію ліній клітин, похідних від саркоми Юінга

- 15 Вплив антитіл 60819 і 60833 на проліферацію клітин лінії TC-71, похідних від саркоми Юінга й вирощених на середовищі, що містить 10 % ФСТ, показаний на фіг. 5. При порівнянні з контрольним ізотиповим гуманізованим IgG1 антитілом, що не зв'язує ІФР-1 або ІФР-2, обидва антитіла, 60819 і 60833, показують дозозалежне придушення проліферації клітин TC-71.

## Приклад 5. Вплив на рівні сумарного ІФР-1 миші й пацюка

- 20 Можна чекати, що нейтралізація діючого ІФР-1 за допомогою антитіла, націленого на ІФР,

приведе до ендокринного зворотного зв'язку за метаболічним шляхом гормону росту (ГР), що у свою чергу приведе до підвищених рівнів у сироватці сумарного ІФР-1. Антитіла 60814, 60819 і 60833 проявляють перехресну реакційну здатність у відношенні ІФР-1 миші й пацюка, що допускає який-небудь фармакокінетичний вплив на рівні сумарного ІФР-1, вимірювані у зразках.

З фіг. 6 і 7 слідує, що введення антитіла 60819 мишам (фіг. 6) і пацюкам (фіг. 7) приводить до дозозалежного підвищення рівнів сумарного ІФР-1 миші й пацюка через 24 год. після введення. Таким чином, ІФР-1 представляє корисний фармакокінетичний маркер дії таких антитіл, які можуть контролюватися протягом клінічного періоду у людей.

Приклад 6. Вплив комбінації антитіл, що впливають на ліганд ІФР, і рапаміцину на проліферацію лінії клітин, похідних від саркоми Юінга, і на внутрішньоклітинне проведення сигналу

Вплив антитіла 60819 та інгібітора mTOR рапаміцину, окремо або у комбінації, на проліферацію лінії клітин SK-ES-1, отриманих від саркоми Юінга, показаний на фіг. 8. Показане дозозалежне придушення проліферації окремо й антитілом 60819, і рапаміцином, причому обидва агента досягають приблизно 60 % придушення проліферації у концентрації 100 нМ. Комбінація рівнів доз обох агентів, антитіла 60819 і рапаміцину, проявляє адитивний ефект на придушення проліферації клітин, приблизно рівний 95 % придушенню при комбінуванні доз по 100 нМ.

Індукована фактором ІФР проліферація клітин опосередковується через ланцюг ланцюжка внутрішньоклітинних подій за фосфорилюванням білків. Одним із білків, фосфорилювання якого підвищується стимуляцією ІФР, є АКТ. Фіг. 9 показує вплив антитіла й рапаміцину, окремо або у комбінації, на фосфорилювання АКТ у клітинах SK-ES-1 через 24 год. після лікування з використанням доз 100 нМ. При порівнянні з проліферацією неопрацьованих клітин, що проявляють фосфорилювання АКТ, 100 нМ антитіла 60819 придушує фосфорилювання АКТ. Навпроти, обробка 100 нМ рапаміцину приводить до підвищених рівнів фосфорилюваного АКТ у порівнянні з контролем, що приблизно пов'язане з компенсаторним механізмом зворотного зв'язку після придушення mTOR. Однак якщо комбінують 100 нМ рапаміцину й 100 нМ антитіла 60819, фосфорилювання АКТ придушується. Це означає, що компенсаторний зворотний зв'язок, який приводить до фосфорилюваного АКТ при обробці рапаміцином, відбувається через підвищення лігандів ІФР, які придушуються антитілом 60819. Фіг. 9 також показує, що обидва агента, антитіло 60819 і рапаміцин, окремо або у комбінації, не впливають на сумарні рівні PTEN.

Приклад 7. Вплив комбінації антитіла, що націлюється на ліганд ІФР, та інгібітора EGFR на проліферацію клітин лінії, похідної від НДРЛ

Вплив антитіла 60819 та інгібітора EGFR ерлотинібу/тарцеви, окремо або у комбінації, на проліферацію лінії клітин A-549, отриманих від недрібноклітинного раку легенів (НДРЛ), показаний на фіг. 10. На цій моделі спостерігають тільки незначний вплив антитіла 60819, застосовуваного окремо, на проліферацію клітин, а тарцева проявляє дозозалежний вплив із придушенням проліферації клітин приблизно на 60 % при найвищій досліджуваній дозі (20 мкМ). Однак якщо антитіло 60819 і тарцеву комбінують, спостерігають більше сильне й ефективне придушення проліферації клітин, що вказує на синергетичний ефект.

Приклад 8. Фармакокінетичні властивості у пацієнтів лінії Wistar

Середні фармакокінетичні параметри антитіла 60833 у пацієнтів лінії Wistar у першу добу дозування 18, 52 і 248 мг/кг показані у табл. 6. Підсумковий період напіввиживання розраховують після останньої доби дозування (при  $t(n) = 1008$  год.), середній підсумковий період напіввиживання для всіх трьох рівнів дозування становить 221 год. (9,2 діб).

Таблиця 6

Середні фармакокінетичні параметри антитіла 60833 у пацієнтів лінії Wistar у першу добу дозування

	Доза антитіла 60833 (мг/кг)		
	18	52	248
C(max) [мг/мл]	0,531	1,70	5,56
AUC(0-72 год.) [мг×год./мл]	15,5	40,2	120
CL [(мл/добу)/кг]	22,9	28,7	37,3
V(ss) [мл/кг]	68,1	76,3	65,4
t <sub>1/2</sub> φ [год.]	210	197	255

$\phi$  = після останньої доби дозування при  $t(n) = 1008$  год.

Приклад 9. Спільна кристалізація й визначення структури Fab-ІФР-1 для ідентифікації сайтів зв'язування антитіла на ІФР-1

- 5 Для остаточного визначення залишків в ІФР-1 людини, які взаємодіють з антитілами до ІФР, спільно кристалізують Fab та ІФР-1 і визначають взаємодію з дозволом менше 2Å. Залишки у молекулі ІФР-1, які контактують з антитілом (Fab) 60833, показані у табл. 7. У цілому 19 залишків у молекулі ІФР-1 контактують з 15 залишками CDR в антитілі 60833. З цих 19 залишків в ІФР-1 17 залишків ідентичні залишкам в ІФР-2 людини, якщо вирівнювати амінокислотні послідовності ІФР-1 та ІФР-2 людини (перераховані у табл. 7). Фіг. 11 показує тривимірну
- 10 структуру ІФР-1, в якій амінокислоти, що зв'язуються з антитілом 60833, виділені кольором, а також у представленій лінійній амінокислотній послідовності ІФР-1 людини ці взаємодіючі амінокислоти підкреслені.

Таблиця 7

Амінокислотні залишки в ІФР-1 людини, що здійснюють контакти  
з амінокислотними залишками антитіла 60833 FAB

Амінокислотні залишки в ІФР-1 при контакті з антитілом 60833	Амінокислотні залишки контакту на антитілі 60833 (CDR)	Гомологічний залишок в ІФР-2
Leu (L) 5	Tyr (Y) 54; (HCDR 2)	Leu (L) 8
Cys (C) 6	Ser (S) 56; (HCDR 2)	Cys (C) 9
Glu (E) 9	Thr (T) 52; (HCDR 2) Ser (S) 53; (HCDR 2) Tyr (Y) 54; (HCDR 2) Gly (G) 55; (HCDR 2) Ser (S) 56; (HCDR 2)	Glu (E) 12
Leu (L) 10	Phe (F) 57; (HCDR 2)	Leu (L) 13
Asp (D) 12	Trp (W) 33; (HCDR 1)	Asp (D) 15
Ala (A) 13	Trp (W) 33; (HCDR 1)	-
Phe (F) 16	Trp (W) 33; (HCDR 1) Arg (R) 92; (LCDR 3) Tyr (Y) 98; (LCDR 3) Trp (W) 99; (LCDR 3) Tyr (Y) 101; (HCDR 3)	Phe (F) 19
Val (V) 17	Arg (R) 92; (LCDR 3) Tyr (Y) 98; (LCDR 3)	Val (V) 20
Arg (R) 21	Tyr (Y) 95; (LCDR 3)	Arg (R) 24
Cys (C) 47	Ser (S) 56; (HCDR 2) Phe (F) 57; (HCDR 2)	Cys (C) 46
Cys (C) 48	Ser (S) 56; (HCDR 2)	Cys (C) 47
Phe (F) 49	Tyr (Y) 54; (HCDR 2) Gly (G) 55; (HCDR 2) Ser (S) 56; (HCDR 2)	Phe (F) 48
Ser (S) 51	Gly (G) 55; (HCDR 2) Ser (S) 56; (HCDR 2) Thr (T) 58; (HCDR 2)	Ser (S) 50
Cys (C) 52	Ser (S) 56; (HCDR 2) Phe (F) 57; (HCDR 2) Thr (T) 58; (HCDR 2)	Cys (C) 51
Asp (D) 53	Phe (F) 57; (HCDR 2) Thr (T) 58; (HCDR 2)	Asp (D) 52
Leu (L) 54	Trp (W) 33; (HCDR 1) Phe (F) 57; (HCDR 2) Thr (T) 58; (HCDR 2) Tyr (Y) 98; (LCDR 3)	Leu (L) 53
Arg (R) 55	Lys (K) 65; (HCDR 2) Gly (G) 96; (LCDR 3) Tyr (Y) 98; (LCDR 3)	-
Leu (L) 57	Phe (F) 57; (HCDR 2)	Leu (L) 56

Таблиця 7

Амінокислотні залишки в ІФР-1 людини, що здійснюють контакти  
з амінокислотними залишками антитіла 60833 FAB

Амінокислотні залишки в ІФР-1 при контакті з антитілом 60833	Амінокислотні залишки контакту на антитілі 60833 (CDR)	Гомологічний залишок в ІФР-2
Glu (E) 58	Tyr (Y) 95; (LCDR 3) Gly (G) 96; (LCDR 3) Tyr (Y) 98; (LCDR 3)	Glu (E) 57
19 залишків у фактора ІФР-1 беруть участь у контактах з антитілом 60833	15 залишків в антитілі 60833 бере участь у контактах з фактором ІФР-1: HCDR 1:1 залишок HCDR 2:8 залишків HCDR 3:1 залишок LCDR 1: - LCDR 2: - LCDR 3:5 залишків	

Джерела інформації:

- Barbas та ін., Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91, 1994, сс. 3809-3813.
- Burtrum та ін., Cancer Res. 63, 2003, сс. 8912-8921.
- 5 Chen та ін., J. Clin. Endocrinol. 90, 2005, сс. 366-371.
- Cui та ін., Science 299, 2003, сс. 1753-1755.
- Cruz-Correa та ін., Gastroenterology 126, 2004, сс. 1190-1193.
- Dufner і Thomas, Exp. Cell Res. 253, 1999, сс. 100-109.
- Frasca та ін., Mol. Cell. Biol. 19, 1999, сс. 3278-3288.
- 10 Freier та ін., Gut, 44(5), 1999, сс. 704-708;
- Fukuzawa та ін., Int. J. Cancer 82, 1999, сс. 490-497.
- Goetsch та ін., Int. J. Cancer 113, 2005, сс. 316-328.
- Goya та ін., Cancer Res. 64, 2004, сс. 6252-6258.
- Haenel та ін., Anal. Biochem. 339, 2005, сс. 182-184.
- 15 Hassan та ін., Cancer Res. 60, 2000, сс. 1070-1076.
- Hawkins та ін., J. Mol. Biol. 226(3), 1992, сс. 889-896.
- Jackson та ін., J. Immunol. 154(7), 1995, сс. 3310-3319.
- Jerome та ін., End. Rel. Cancer 10, 2003, сс. 561-578.
- Kabat E.A. та ін. у кн.: "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 1991, 5-е вид., вид-во
- 20 Public Health Service, Національний інститут здоров'я, Bethesda, Меріленд.
- Kipriyanow і Le Gall, Molecular Biotechnology 26, 2004, сс. 39-60.
- Knappik та ін., J. Mol. Biol. 296, 2000, сс. 57-86.
- Kolb та ін. Pediatr. Blood Cancer 50, 2008, сс. 1190-1197.
- Krebs B. та ін., J. Immunol. Meth. 245, 2001, сс. 67-84.
- 25 Kulik та ін., Mol. Cell. Biol. 17, 1997, сс. 1595-606.
- LeRoith D, Experimental Diab. Res. 4, 2003, сс. 205-212.
- Li та ін., Tumour Biol. 25, 2004, сс. 62-68.
- Lowman та ін., Biochemistry 30(45), 1991, сс. 10832-10837.
- Lund та ін., Cancer Lett. 206, 2004, сс. 85-96.
- 30 Manara та ін., Clin. Cancer Res. 13, 2007, сс. 1322-1330.
- Manes та ін., Endocrinology 138, 1997, сс. 905-915.
- Marks та ін., Biotechnology 10, 1992, сс. 779-783.
- Miyamoto та ін., Clin. Cancer Res. 11, 2005, сс. 3494-3502.
- Moorhead та ін., Oncogene 22, 2003, 853-857.
- 35 Nagy та ін., Nature Med. 8(8), 2002, сс. 801-807.
- Ng та ін., J. Gastroenterol. Hepatol. 13, 1998, сс. 152-157.
- Pandini та ін., J. Biol. Chem. 277, 2002, сс. 39684-39695.
- Pollack та ін., Nature Rev. Can. 4, 2004, сс. 505-518.
- Pollack та ін., Американське суспільство клініцистів-онкологів (American Society for Clinical
- 40 Oncology-ASCO), щорічна конференція, 2007, реферат 3587.
- Quinn та ін., J. Biol. Chem. 271, 1996, сс. 11477-11483.

- Rauchenberger R. та ін., J. Biol. Chem. 278, 2003, cc. 38194-38205.
- Reinberg, U.S. News World Report, March 5, 2008.
- Remington, кн.: "The Science and Practice of Pharmacy", 2005, 21<sup>е</sup> вид., під ред. Hendrickson Randy, Advanced Concepts Institute, University of The Sciences in Philadelphia, 600 S. 43<sup>rd</sup> Street, Philadelphia, PA 19104, USA; 215- 895- 1184.
- 5 Renehan та ін., Br. J. Cancer 83, 2000a), cc. 1344-1350.
- Renehan та ін., J. Clin. Endocrinol. Metab. 85, 2000b), cc. 3402-3408.
- Revets та ін., Expert Opin Biol Ther. 5(1), 2005, cc. 111-124.
- Rubin та ін., Lab. Invest. 73, 1995, cc. 311-331.
- 10 Russell та ін., Proc. Natl. Acad. Sci USA 81, 1984, cc. 2389-2392.
- Scotlandi та ін., Cancer Res. 56, 1996, cc. 4570-4574.
- Sell та ін., Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, cc. 11217-11221.
- Sell та ін., Mol. Cell. Biol. 14, 1994, cc. 3604-3612.
- Shier та ін., Gene 169, 1995, cc. 147-155.
- 15 Shukla та ін., J. Chromatography B, 848(1), 2007, cc. 28-39.
- Srinivasan M. i Roeske RW., Curr Protein Pept Sci. 6(2), 2005, cc. 185-196.
- Strumberg D., Drugs Today (Barc), 41(12), 2005, cc. 773-784.
- Takanami та ін., J. Surg. Oncol. 61, 1996, cc. 205-208.
- Tsai та ін., Scand. J. Gastroenterol. 40, 2005, cc. 68-75.
- 20 Wang та ін., World J. Gastroenterol. 9, 2003, cc. 267-270.
- Woodson та ін., J. Natl. Cancer Inst. 96, 2004, cc. 407-410.
- Yao та ін., Clin. Cancer Res. 9, 2003a), cc. 2719-2726.
- Yao та ін., J. Clin. Invest. 111, 2003b), cc. 265-273.
- Yelton та ін., Immunol. 155, 1995, cc. 1994-2004.
- 25 Zapata та ін., Protein Eng. 8(10), 1995, cc. 1057-1062.
- Zhao та ін., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 14, 2005, cc. 1819-1822.
- WO 89/011297
- WO 94/29348
- WO 02/056910
- 30 WO 03/002609
- WO 03/050531
- WO 03/093317
- WO 04/003019
- WO 04/058821
- 35 WO 2005/018671
- WO 2005/027970
- WO 2005/028515
- WO 2007/042309
- WO 2007/070432
- 40 JP 2003-310275
- US 4342566
- US 3773919
- US 6696245
- US 6991790
- 45 US 7060268

Перелік послідовностей

<110> Бьорінгер Інгельхайм Інтернаціональ ГмбХ

<120> АНТИТІЛА ПРОТИ ІНСУЛІНОПОДІБНИХ ФАКТОРІВ РОСТУ

<130> 12-0295

<160> 43

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asn Tyr Trp Met His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Ile Ser Gly Trp Ser Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 3

Phe Gly Ile Asp Ala Tyr Thr Lys Val Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 4  
 <211> 11  
 <212> БЛЮК  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Gly Asp Asn Ile Pro Leu Lys Tyr Val Ser  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> БЛЮК  
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 6  
 <211> 11  
 <212> БЛЮК  
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Ser Ser Trp Asp Thr Leu Asp Ile Phe Asn Val  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 366  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(366)

<400> 7

cag gtg gaa ttg gtg gaa agc ggc ggc ggc ctg gtg caa ccg ggc ggc 48  
Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

agc ctg cgt ctg agc tgc gcg gcc tcc gga ttt acc ttt tct aat tat 96  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

tgg atg cat tgg gtg cgc caa gcc cct ggg aag ggt ctc gag tgg gtg 144  
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

agc ggt atc tct ggt tgg tct agc tgg acc tat tat gcg gat agc gtg 192  
Ser Gly Ile Ser Gly Trp Ser Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

aaa ggc cgt ttt acc att tca cgt gat aat tgc aaa aac acc ctg tat 240  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcg gaa gat acg gcc gtg tat tat tgc 288  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

gcg cgt ttt ggt att gat got tat act aag gtt tat ttt gat tat tgg 336  
Ala Arg Phe Gly Ile Asp Ala Tyr Thr Lys Val Tyr Phe Asp Tyr Trp  
100 105 110

ggc caa ggc acc ctg gtg acg gtt agc tca 366  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 8

<211> 122

<212> BIJOK

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr



```

                20                25                30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35                40                45

Ser Gly Ile Ser Gly Trp Ser Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50                55                60

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

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

Ala Arg Phe Gly Ile Asp Ala Tyr Thr Lys Val Tyr Phe Asp Tyr Trp
      100                105                110

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

```

```

<210> 9
<211> 327
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(327)

```

```

<400> 9
gat atc gaa ctg acc cag ccg cct tca gtg agc gtt gca cca ggt cag      48
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1                5                10                15

acc gcg cgt atc tcg tgt agc ggc gat aat att cct ctt aag tat gtt      96
Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Pro Leu Lys Tyr Val
      20                25                30

```

tct tgg tac cag cag aaa ccc ggg cag gcg cca gtt ctt gtg att cat 144  
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile His  
 35 40 45

gat gat aat aag cgt ccc tca ggc atc ccg gaa cgc ttt agc gga tcc 192  
 Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

aac agc ggc aac acc gcg acc ctg acc att agc ggc act cag gcg gaa 240  
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu  
 65 70 75 80

gac gaa gcg gat tat tat tgc tct tct tgg gat act ctt gat att ttt 288  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Thr Leu Asp Ile Phe  
 85 90 95

aat gtg ttt ggc ggc ggc acg aag tta acc gtc cta ggt 327  
 Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105

<210> 10  
 <211> 109  
 <212> BIJOK  
 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Pro Leu Lys Tyr Val  
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile His  
 35 40 45

Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Thr Leu Asp Ile Phe  
85 90 95

Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105

<210> 11  
<211> 5  
<212> EIJOK  
<213> Homo sapiens

<400> 11

Asn Tyr Trp Met His  
1 5

<210> 12  
<211> 17  
<212> EIJOK  
<213> Homo sapiens

<400> 12

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

Gly

<210> 13  
<211> 13  
<212> EIJOK  
<213> Homo sapiens

<400> 13

Phe Gly Ile Asp Ala Tyr Thr Lys Val Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> БИЖОК

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Gly Asp Asn Ile Pro Leu Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> БИЖОК

<213> Homo sapiens

<400> 15

Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 16

<211> 11

<212> БИЖОК

<213> Homo sapiens

<400> 16

Gln Ser Tyr Asp Tyr Phe Pro Lys Phe Val Val

1 5 10

<210> 17

<211> 366

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(366)

<400> 17

cag gtg gaa ttg gtg gaa agc ggc ggc ggc ctg gtg caa ccg ggc ggc

48

```

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

agc ctg cgt ctg agc tgc gcg gcc tcc gga ttt acc ttt tct aat tat      96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
           20           25           30

tgg atg cat tgg gtg cgc caa gcc cct ggg aag ggt ctc gag tgg gtg      144
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35           40           45

agc ggt atc tct ggt tgg tct agc tgg acc tat tat gcg gat agc gtg      192
Ser Gly Ile Ser Gly Trp Ser Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
           50           55           60

aaa ggc cgt ttt acc att tca cgt gat aat tcg aaa aac acc ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
           65           70           75           80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcg gaa gat acg gcc gtg tat tat tgc      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95

gcg cgt ttt ggt att gat gct tat act aag gtt tat ttt gat tat tgg      336
Ala Arg Phe Gly Ile Asp Ala Tyr Thr Lys Val Tyr Phe Asp Tyr Trp
           100          105          110

ggc caa ggc acc ctg gtg acg gtt agc tca      366
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
           115          120

```

<210> 18  
 <211> 122  
 <212> EIJOK  
 <213> Homo sapiens

<400> 18

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
           20           25           30

```

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

Ser Gly Ile Ser Gly Trp Ser Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Gly Ile Asp Ala Tyr Thr Lys Val Tyr Phe Asp Tyr Trp  
100 105 110

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

<210> 19  
<211> 327  
<212> DHK  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(327)

<400> 19  
gat atc gaa ctg acc cag ccg cct tca gtg agc gtt gca cca ggt cag 48  
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
1 5 10 15

acc gcg cgt atc tcg tgt agc ggc gat aat att cct ctt aag tat gtt 96  
Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Pro Leu Lys Tyr Val  
20 25 30

tct tgg tac cag cag aaa ccc ggg cag gcg cca gtt ctt gtg att cat 144  
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile His

35	40	45	
gat gat aat aag cgt ccc tca ggc atc ccg gaa cgc ttt agc gga tcc			192
Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser			
50	55	60	
aac agc ggc aac acc gcg acc ctg acc att agc ggc act cag gcg gaa			240
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu			
65	70	75	80
gac gaa gcg gat tat tat tgc cag tct tat gat tat ttt cct aag ttt			288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Tyr Phe Pro Lys Phe			
85	90	95	
gtt gtg ttt ggc ggc ggc acg aag tta acc gtc cta ggt			327
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly			
100	105		
<210> 20			
<211> 109			
<212> БИЛОК			
<213> Homo sapiens			
<400> 20			
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln			
1	5	10	15
Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Pro Leu Lys Tyr Val			
20	25	30	
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile His			
35	40	45	
Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser			
50	55	60	
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu			
65	70	75	80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Tyr Phe Pro Lys Phe  
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105

<210> 21  
<211> 5  
<212> БЛЮК  
<213> Homo sapiens

<400> 21

Ser Tyr Trp Met Ser  
1 5

<210> 22  
<211> 17  
<212> БЛЮК  
<213> Homo sapiens

<400> 22

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

Gly

<210> 23  
<211> 8  
<212> БЛЮК  
<213> Homo sapiens

<400> 23

Asn Met Tyr Thr His Phe Asp Ser  
1 5

<210> 24



<211> 13

<212> БИЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 24

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Ser  
1 5 10

<210> 25

<211> 7

<212> БИЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 25

Asp Asn Ser Lys Arg Pro Ser  
1 5

<210> 26

<211> 11

<212> БИЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 26

Gln Ser Arg Asp Thr Tyr Gly Tyr Tyr Trp Val  
1 5 10

<210> 27

<211> 351

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(351)

<400> 27

cag gtg gaa ttg gtg gaa agc ggc ggc ggc ctg gtg caa ccg ggc ggc  
Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

48

agc ctg cgt ctg agc tgc gcg gcc tcc gga ttt acc ttt act tct tat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr  
                   20                                  25                                  30

tgg atg tct tgg gtg cgc caa gcc cct ggg aag ggt ctc gag ctt gtg 144  
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val  
                   35                                  40                                  45

agc tct atc act tct tat ggt agc ttt acc tat tat gcg gat agc gtg 192  
 Ser Ser Ile Thr Ser Tyr Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                                  55                                  60

aaa ggc cgt ttt acc att tca cgt gat aat tcg aaa aac acc ctg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
                   65                                  70                                  75                                  80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcg gaa gat acg gcc gtg tat tat tgc 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                                   85                                  90                                  95

ggc cgt aat atg tat act cat ttt gat tct tgg ggc caa ggc acc ctg 336  
 Ala Arg Asn Met Tyr Thr His Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
                                   100                                  105                                  110

gtg acg gtt agc tca 351  
 Val Thr Val Ser Ser  
                   115

<210> 28  
 <211> 117  
 <212> BIJOK  
 <213> Homo sapiens

<400> 28

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr  
                   20                                  25                                  30

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

35	40	45
Ser Ser Ile Thr Ser Tyr Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
		80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90
		95
Ala Arg Asn Met Tyr Thr His Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
	100	105
		110
Val Thr Val Ser Ser		
	115	

<210> 29  
 <211> 333  
 <212> DHK  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(333)

<400> 29	
gat atc gtg ctg acc cag ccg cct tca gtg agt ggc gca cca ggt cag	48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln	
1	5
	10
	15
cgT gtg acc atc tcg tgt agc ggc agc agc agc aac att ggt tct aat	96
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn	
	20
	25
	30
tct gtg tct tgg tac cag cag ttg ccc ggg acg gcg ccg aaa ctt ctg	144
Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu	
	35
	40
	45

att tat gat aat tct aag cgt ccc tca ggc gtg ccg gat cgt ttt agc 192  
 Ile Tyr Asp Asn Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

gga tcc aaa agc ggc acc agc gcg agc ctt gcg att acg ggc ctg caa 240  
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln  
 65 70 75 80

agc gaa gac gaa gcg gat tat tat tgc cag tct cgt gat act tat ggt 288  
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Arg Asp Thr Tyr Gly  
 85 90 95

tat tat tgg gtg ttt ggc ggc ggc acg aag tta acc gtc cta ggt 333  
 Tyr Tyr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 30

<211> 111

<212> BLJOK

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn  
 20 25 30

Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
 35 40 45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln  
 65 70 75 80

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

Tyr Tyr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 31  
 <211> 993  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(993)

<400> 31  
 gcc tcc acc aag ggt cca tgc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag 48  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 96  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tgc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc 144  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc 192  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc 240  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag 288  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc 336  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca 384

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	
115 120 125	
aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc	432
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	
130 135 140	
gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg	480
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	
145 150 155 160	
tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag	528
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
165 170 175	
gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg	576
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	
180 185 190	
cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac	624
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	
195 200 205	
aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg	672
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
210 215 220	
cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag	720
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu	
225 230 235 240	
ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat	768
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	
245 250 255	
ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac	816
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	
260 265 270	
aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc	864
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
275 280 285	
ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac	912
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	
290 295 300	

gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg 960  
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 993  
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 32

<211> 330

<212> BIJOK

<213> Homo sapiens

<400> 32

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
		160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
225	230	235
		240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300



Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 33  
<211> 318  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(318)

<400> 33  
cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct gag 48  
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
1 5 10 15  
  
gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt gac ttc 96  
Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
20 25 30  
  
tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gga gat agc agc ccc gtc 144  
Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Gly Asp Ser Ser Pro Val  
35 40 45  
  
aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac aag 192  
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
50 55 60  
  
tac gcg gcc agc agc tat ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag tcc 240  
Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
65 70 75 80  
  
cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg gag 288  
His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
85 90 95  
  
aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca tag 318  
Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100

105

<210> 34

<211> 105

<212> BIJOK

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Gly Asp Ser Ser Pro Val  
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
100 105

<210> 35

<211> 452

<212> BIJOK

<213> Homo sapiens

<400> 35

Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr	20	25	30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35	40	45
Ser Gly Ile Ser Gly Trp Ser Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ala Arg Phe Gly Ile Asp Ala Tyr Thr Lys Val Tyr Phe Asp Tyr Trp	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro	115	120	125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr	130	135	140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr	145	150	155
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro	165	170	175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr	180	185	190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
260 265 270

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

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

370

375

380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
435 440 445

Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 36

<211> 214

<212> B1MOK

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Pro Leu Lys Tyr Val  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile His  
35 40 45

Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Thr Leu Asp Ile Phe  
85 90 95

Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys  
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln  
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly  
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Gly Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly  
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala  
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser  
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val  
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
210

<210> 37

<211> 452

<212> EIMOK

<213> Homo sapiens

<400> 37

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Trp Ser Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Gly Ile Asp Ala Tyr Thr Lys Val Tyr Phe Asp Tyr Trp  
100 105 110

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180	185	190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
195	200	205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
210	215	220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
225	230	235
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
245	250	255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
290	295	300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
325	330	335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
340	345	350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val		
355	360	365



Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
435 440 445

Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 38

<211> 214

<212> EIMOK

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Pro Leu Lys Tyr Val  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile His  
35 40 45

Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Tyr Phe Pro Lys Phe  
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys  
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln  
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly  
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Gly Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly  
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala  
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser  
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val  
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
210

<210> 39

<211> 447

<212> BIROK

<213> Homo sapiens

<400> 39

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

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

Ser Ser Ile Thr Ser Tyr Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Met Tyr Thr His Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
130 135 140

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

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

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

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

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

```

355              360              365

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

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

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

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

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

<210> 40
<211> 216
<212> B1MOK
<213> Homo sapiens

<400> 40

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20              25              30

Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35              40              45

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

```

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln  
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln  
100 105 110

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

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr  
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Cys Asp Ser Ser Pro Val Lys  
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr  
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His  
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys  
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
210 215

<210> 41

<211> 17

<212> EIJOK

<213> Homo sapiens

<400> 41

Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp  
1 5 10 15

Arg

<210> 42

<211> 13

<212> БИЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 42

Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met  
1 5 10

<210> 43

<211> 70

<212> БИЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 43

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe  
1 5 10 15

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly  
20 25 30

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys  
35 40 45

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu  
50 55 60

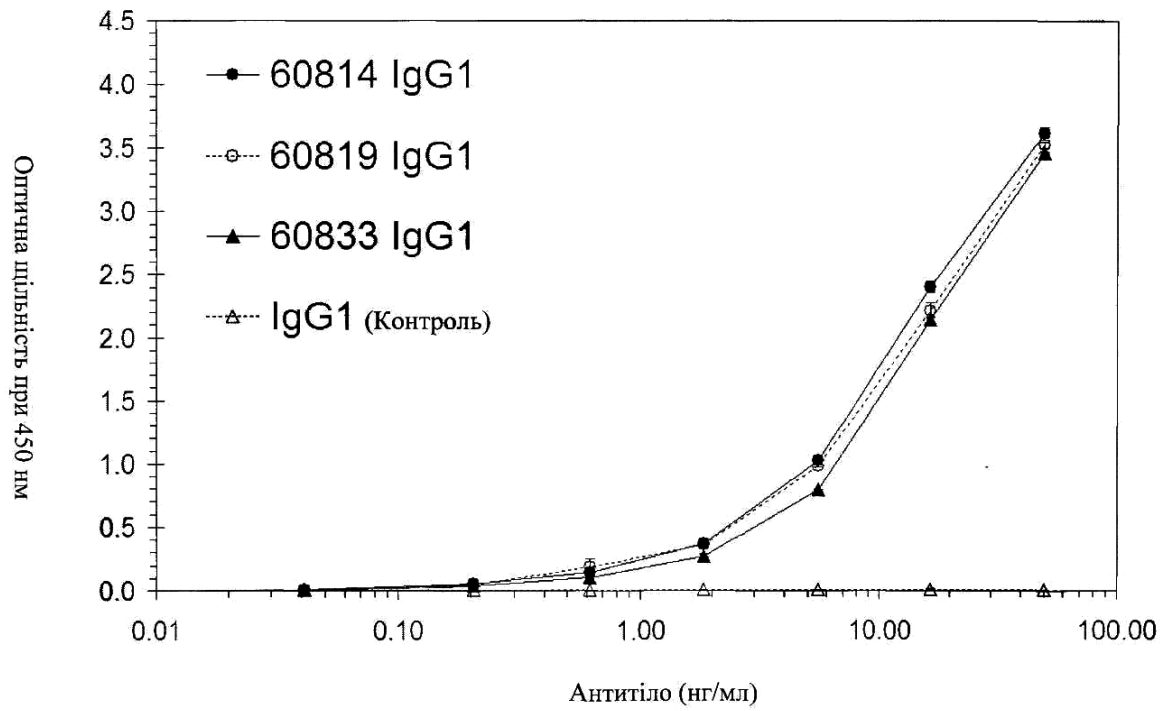
Lys Pro Ala Lys Ser Ala  
65 70

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

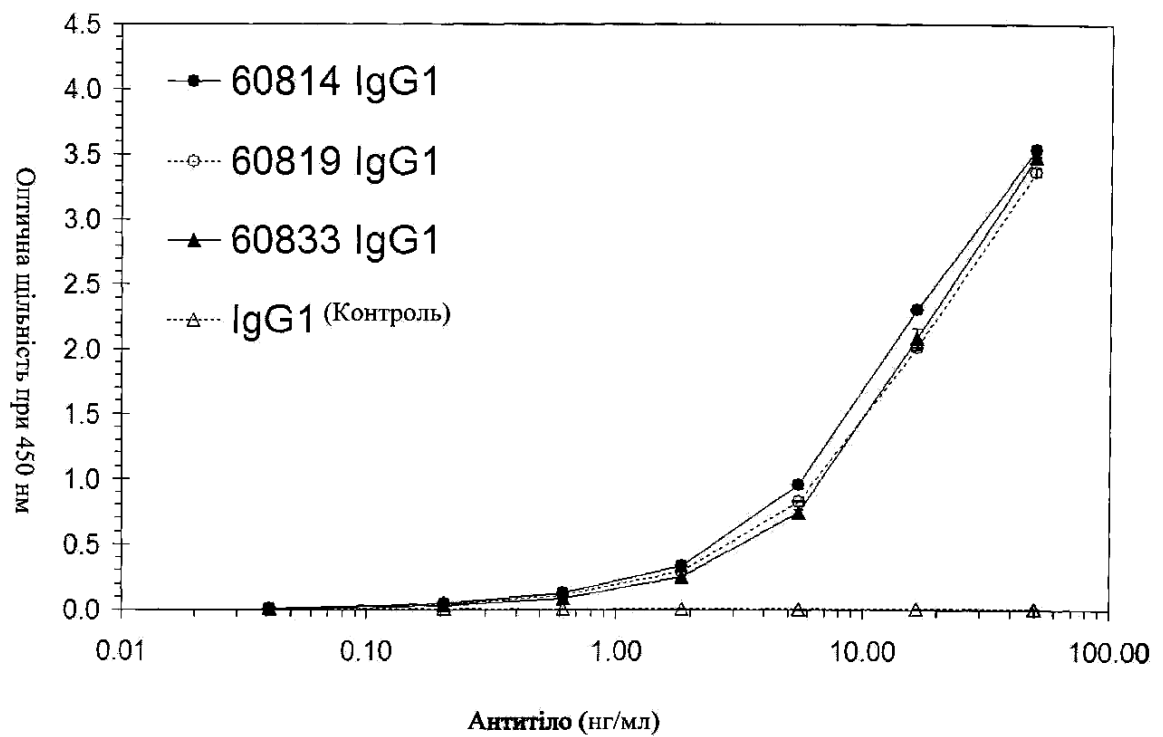
1. Виділена молекула антитіла людини, яка
  - а) зв'язується з інсуліноподібним фактором росту-1 (ІФР-1) та інсуліноподібним фактором росту-2 (ІФР-2) таким чином, що
    - i) попереджується зв'язування ІФР-1 та ІФР-2 з рецептором ІФР-1, і
    - ii) придушується передача сигналу, опосередковувана рецептором ІФР-1,
  - б) зв'язується з ІФР-1 та ІФР-2 миші або пацюка,
  - в) не зв'язується з інсуліном людини;
 причому зазначена молекула антитіла являє собою молекулу антитіла, яка містить області CDR важкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:21 (CDR1), SEQ ID NO:22 (CDR2) і SEQ ID NO:23 (CDR3), і області CDR легкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:24 (CDR1), SEQ ID NO:25 (CDR2) і SEQ ID NO:26 (CDR3).
2. Молекула анти-ІФР антитіла, де зазначена молекула антитіла містить області CDR важкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:21 (CDR1), SEQ ID NO:22 (CDR2) і SEQ ID NO:23 (CDR3), і області CDR легкого ланцюга, що включають амінокислотні послідовності SEQ ID NO:24 (CDR1), SEQ ID NO:25 (CDR2) і SEQ ID NO:26 (CDR3).
3. Молекула антитіла за п. 1 або 2, яка містить варіабельний важкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:28.
4. Молекула антитіла за п. 1 або 2, яка містить варіабельний легкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:30.
5. Молекула антитіла за будь-яким з пп. 1-4, що включає константну область важкого ланцюга, вибрану з групи, що включає константні області IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA і IgE.
6. Молекула антитіла за п. 5, в якій зазначена константна область важкого ланцюга представлена константною областю IgG1, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:32.
7. Молекула антитіла за будь-яким з пп. 1-4, в якій константна область легкого ланцюга являє собою Igλ.
8. Молекула антитіла за п. 7, в якій константна область легкого ланцюга включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34.
9. Молекула антитіла за п. 3 або п. 4, яка містить
  - а) важкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:39, і
  - б) легкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:40.
10. Молекула антитіла за будь-яким з пп. 1-4, що є Fab, F(ab')<sub>2</sub> або одноланцюговим фрагментом Fv.
11. Молекула ДНК, яка кодує варіабельний важкий ланцюг або варіабельний легкий ланцюг молекули антитіла за будь-яким з пп. 1-10.
12. Молекула ДНК за п. 11, яка містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:27, що кодує варіабельний важкий ланцюг антитіла, як визначено в п. 3.
13. Молекула ДНК за п. 11, яка містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:29, що кодує варіабельний легкий ланцюг антитіла, як визначено в п. 4.
14. Вектор експресії, який містить молекулу ДНК, що включає нуклеотидну послідовність, яка кодує варіабельний важкий ланцюг і/або варіабельний легкий ланцюг молекули антитіла за будь-яким з пп. 1-10.
15. Вектор експресії за п. 14, який містить молекулу ДНК, що включає нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:27 і/або SEQ ID NO:29.
16. Вектор експресії за п. 14 або п. 15, що включає, додатково, молекулу ДНК, яка кодує константний важкий ланцюг і/або константний легкий ланцюг, відповідно, зв'язану з молекулою ДНК, яка кодує варіабельний важкий ланцюг і/або варіабельний легкий ланцюг, відповідно.
17. Клітина-хазяїн, яка несе один або декілька векторів експресії за пп. 14, 15 або 16.
18. Клітина-хазяїн за п. 17, що є клітиною ссавця.
19. Спосіб одержання антитіла за будь-яким з пп. 1-10, що включає трансфектування клітини-хазяїна ссавця одним або декількома векторами за пп. 14-16, культивування клітини-хазяїна, виділення й очищення антитіла.
20. Спосіб одержання антитіла за будь-яким з пп. 1-10, що включає одержання клітини-хазяїна ссавця, що містить один або декілька векторів за пп. 14-16, і культивування клітини-хазяїна.
21. Спосіб за п. 20, що додатково включає виділення й очищення антитіла.
22. Молекула антитіла за будь-яким з пп. 1-10 для застосування у медицині.



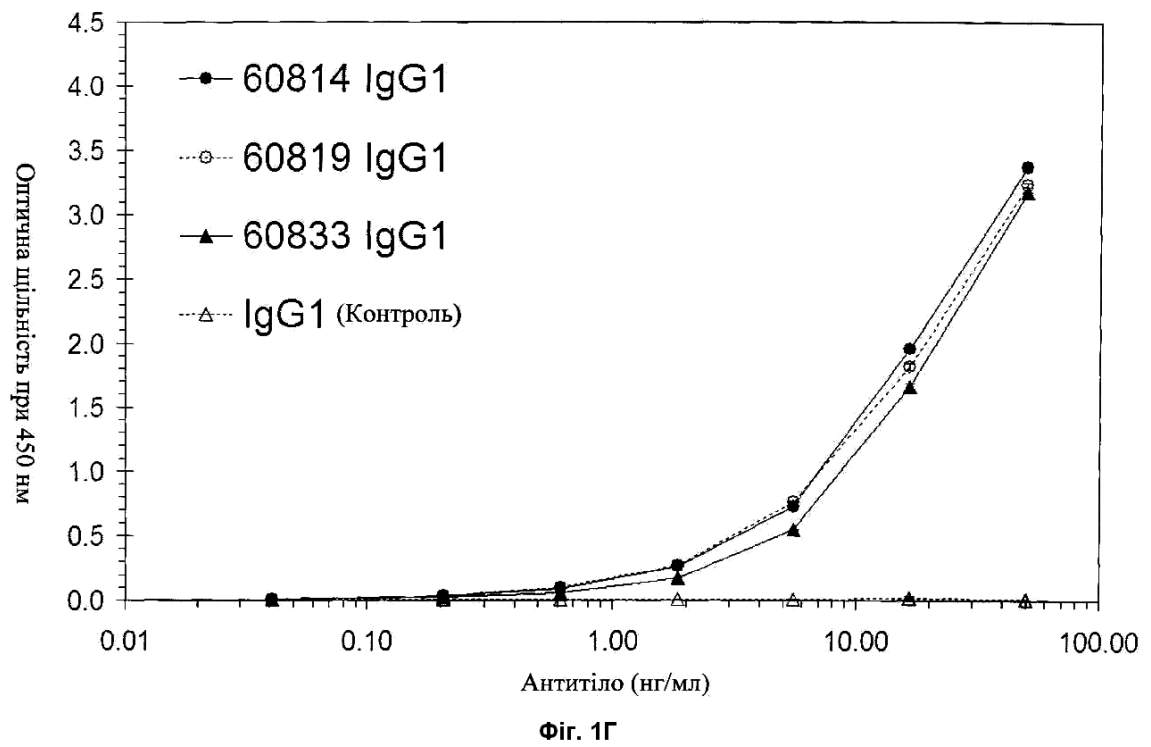
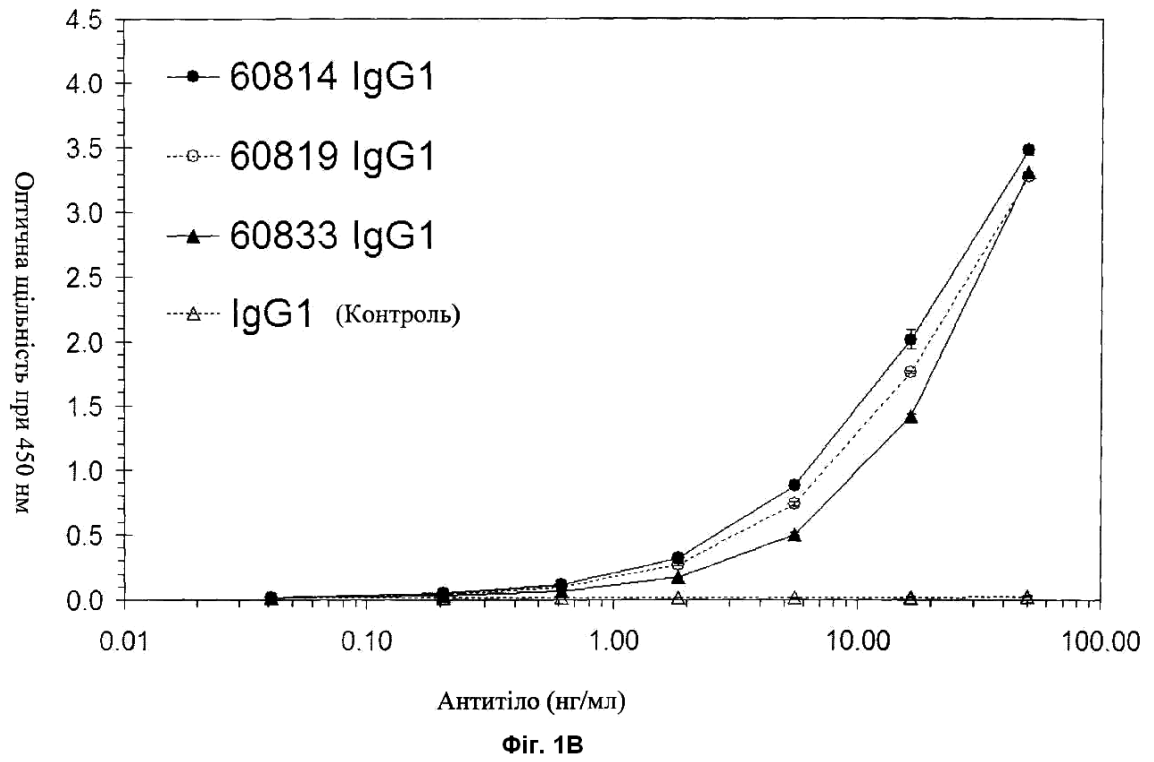
23. Молекула антитіла за будь-яким з пп. 1-10 для застосування для лікування онкологічного захворювання, вибраного зі злоякісних захворювань системи кровотворення, що включає лейкози, лімфоми й мієломи; з раку шлунково-кишкового тракту, включаючи рак стравоходу, шлунка, товстої й прямої кишки, підшлункової залози, печінки, жовчного міхура й жовчних проток, зокрема гепатоклітинну карциному; з раку нирок, простати й сечового міхура; з гінекологічних злоякісних захворювань, включаючи рак грудей, яєчника, шийки матки й ендометрія; зі злоякісних захворювань шкіри, голови й шиї, включаючи злоякісні меланоми; з дитячих злоякісних захворювань, наприклад пухлини Вільмса, нейробластоми й саркоми Юінга; зі злоякісних захворювань головного мозку, наприклад гліобластоми; із сарком, наприклад остеосаркоми, саркоми м'яких тканин, рабдоміосаркоми, гемангіосаркоми; з раку легень, зокрема недрібноклітинного раку легень; з мезотеліоми й раку щитовидки.
24. Молекула антитіла за п. 23, де лікарський засіб використовують у комбінації з хіміотерапією на основі платини, зокрема, з подвійною терапією паклітакселом/карбоплатином або гемцитабіном/цисплатином, сорафенібом або сполукою, вибраною з групи інгібіторів EGFR, VEGF, HER2-neu, AuroraB, Plkl, PI3 кінази або mTor.
25. Молекула антитіла за п. 24, де інгібітор mTor являє собою рапаміцин, темсиролімус, дефороліміс або еверолімус.
26. Фармацевтична композиція, що включає молекулу антитіла за будь-яким з пп. 1-10, і фармацевтично прийнятний носій.
27. Фармацевтична композиція за п. 26, що додатково включає один або декілька терапевтичних агентів, вибраних із
- а) агентів, що руйнують ДНК,
  - б) сполук терапевтичної дії, що придушують метаболічні шляхи сигнальної трансдукції або мітотичні контрольні точки у ракових клітинах,
  - в) антидіабетичних агентів.
28. Фармацевтична композиція за п. 27, в якій зазначена одна або декілька сполук із підпункту б) вибрана з групи інгібіторів EGFR, VEGF, HER2-neu, AuroraB, Plkl, PI3 кінази або mTor.
29. Фармацевтична композиція за будь-яким з пп. 26-28 для застосування для лікування онкологічного захворювання, вибраного зі злоякісних захворювань системи кровотворення, що включає лейкози, лімфоми й мієломи; з раку шлунково-кишкового тракту, включаючи рак стравоходу, шлунка, товстої й прямої кишки, підшлункової залози, печінки, жовчного міхура й жовчних проток, зокрема гепатоклітинну карциному; з раку нирок, простати й сечового міхура; з гінекологічних злоякісних захворювань, включаючи рак грудей, яєчника, шийки матки й ендометрія; зі злоякісних захворювань шкіри, голови й шиї, включаючи злоякісні меланоми; зі злоякісних захворювань дітей, наприклад пухлини Вільмса, нейробластоми й саркоми Юінга; зі злоякісних захворювань головного мозку, наприклад гліобластоми; із сарком, наприклад остеосаркоми, саркоми м'яких тканин, рабдоміосаркоми, гемангіосаркоми; з раку легень, зокрема недрібноклітинного раку легень; з мезотеліоми й раку щитовидки.
30. Фармацевтична композиція за п. 29, яка додатково використовується у комбінації з хіміотерапією на основі платини, зокрема з подвійною платиновою терапією паклітакселом/карбоплатином або гемцитабіном/цисплатином, з сорафенібом, або зі сполукою, вибраною з групи інгібіторів EGFR, VEGF, HER2-neu, AuroraB, Plkl, PI3 кінази або mTor.
31. Спосіб придушення зв'язування IGF-1 та IGF-2 з рецептором IGF-1 *in vitro* у клітинах ссавця, що включає введення у зазначені клітини молекули антитіла за будь-яким з пп. 1-10, відповідно до чого придушується передача сигналу, опосередкована рецептором IGF-1, проліферація й анти-апоптоз, опосередковані IGF-1 та IGF-2.
32. Спосіб придушення зв'язування IGF-2 з рецептором інсуліну IGF-A *in vitro* у клітинах ссавців, що включає введення у зазначені клітини молекули антитіла за будь-яким з пп. 1-10, при цьому придушується передача сигналу, опосередкована рецептором інсуліну IGF-A, і таким чином придушується проліферація й анти-апоптоз, опосередковані IGF-2.
33. Спосіб моніторингу ефективності лікування хворого на рак молекулою антитіла, що зв'язується з IGF-1 та IGF-2, де зазначена молекула антитіла являє собою молекулу антитіла за будь-яким з пп. 1-10, де зазначений спосіб включає
- (а) вимірювання у біологічному зразку зазначеного пацієнта рівня сумарного фактора IGF-1,
  - (б) введення зазначеному пацієнтові зазначеної молекули анти-IGF антитіла,
  - (в) вимірювання у біологічному зразку зазначеного пацієнта рівня сумарного фактора IGF-1, причому величина підвищення рівня сумарного фактора IGF-1, у порівнянні з рівнем сумарного фактора IGF-1, вимірюваного на стадії (а), показує, до якого ступеня пацієнт відповідає на лікування зазначеною молекулою анти-IGF антитіла.

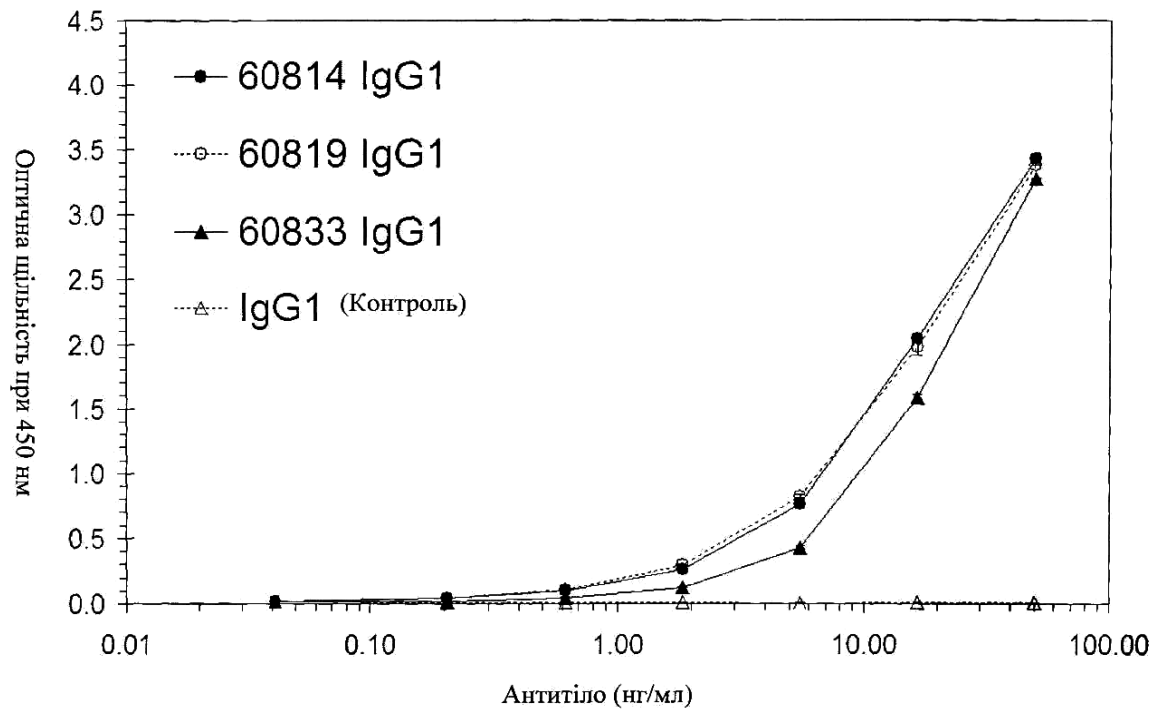


Фіг. 1А

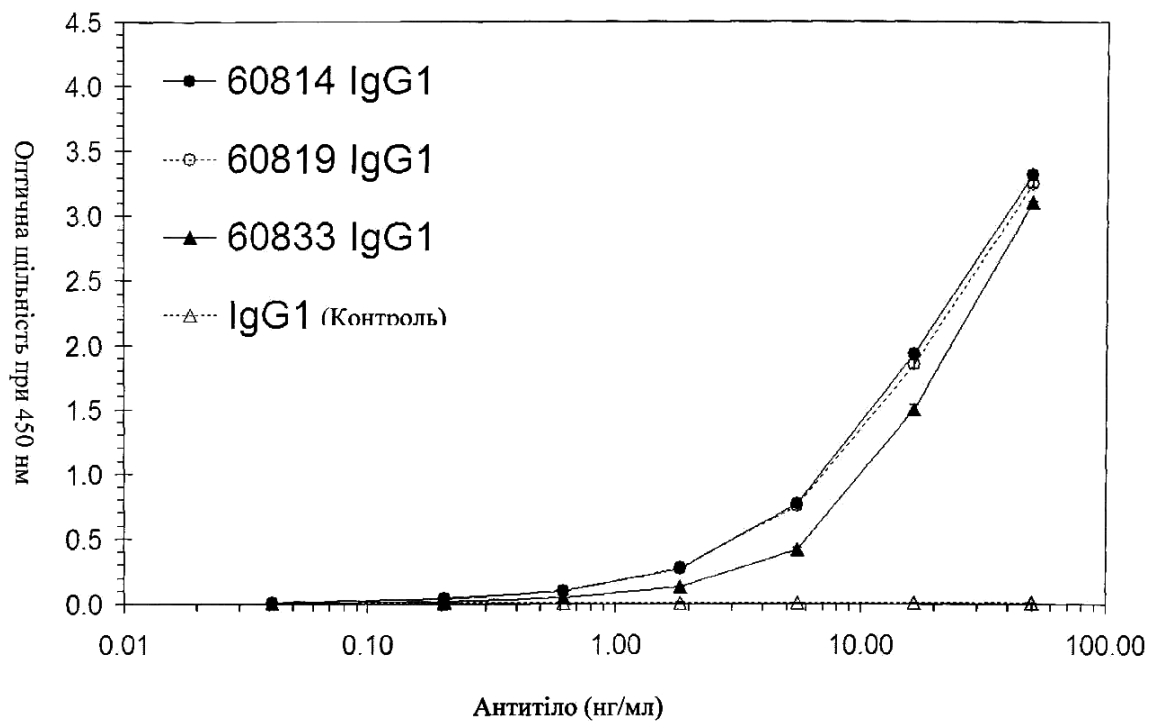


Фіг. 1Б

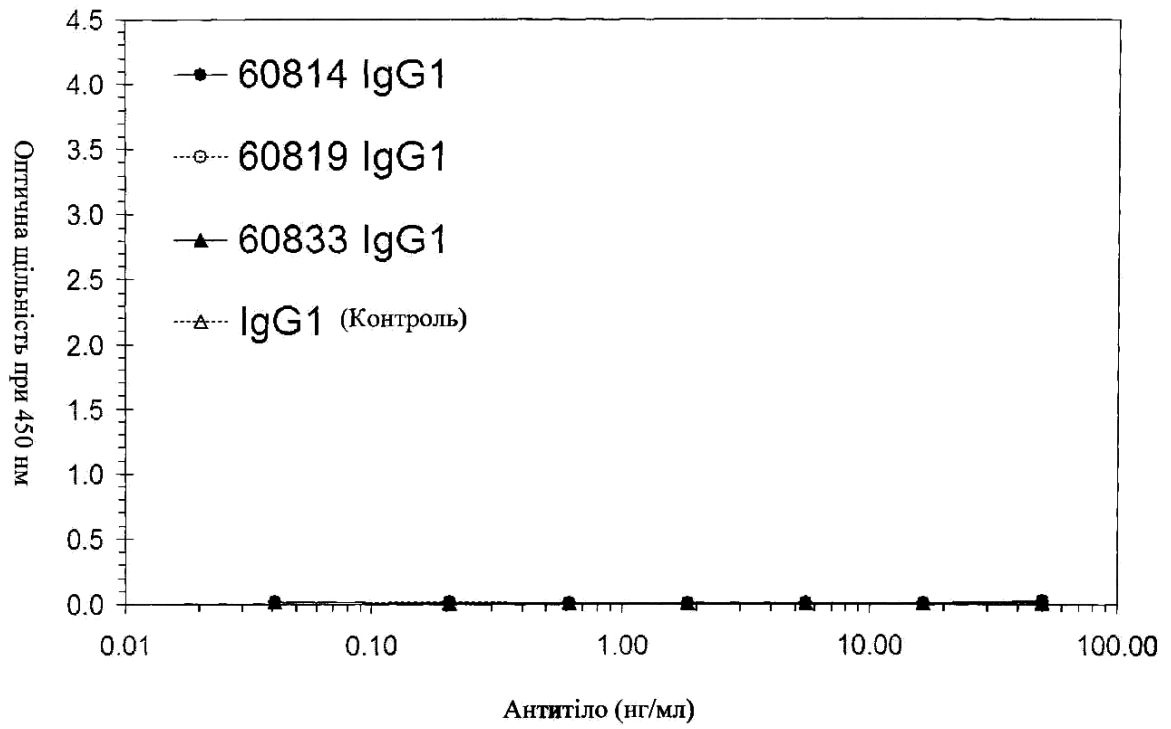




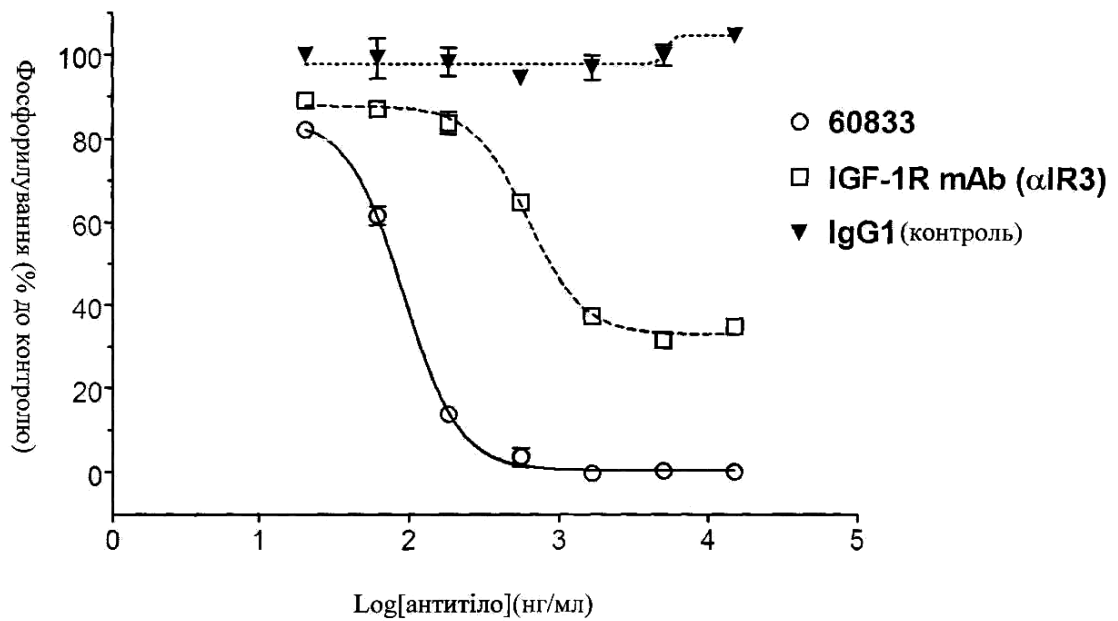
Фіг. 1Д



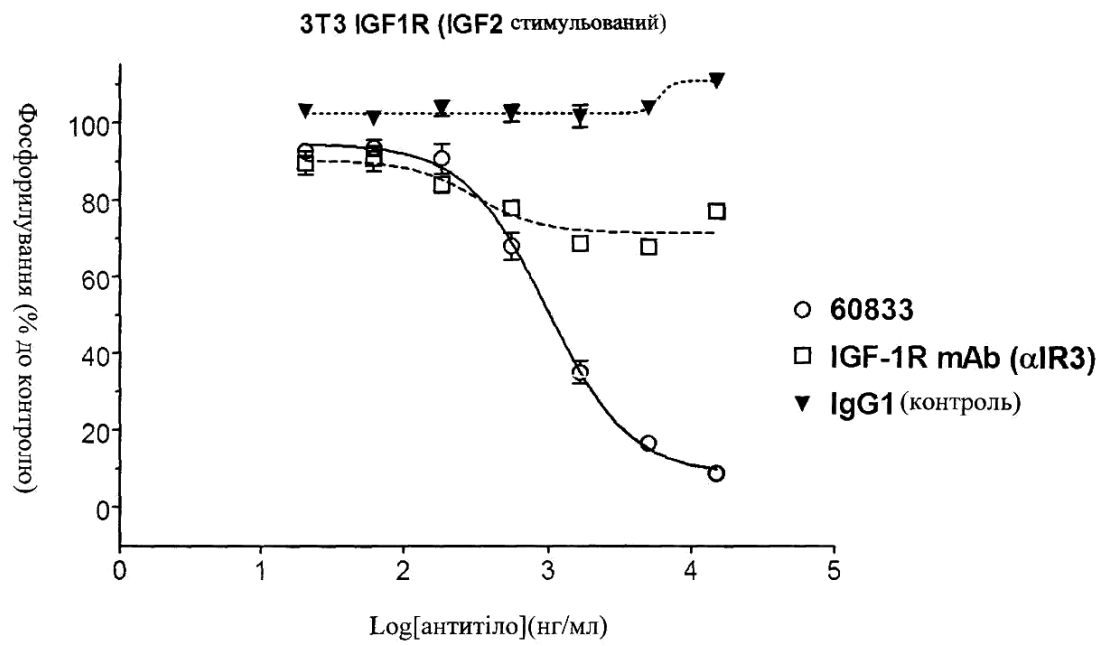
Фіг. 1Е



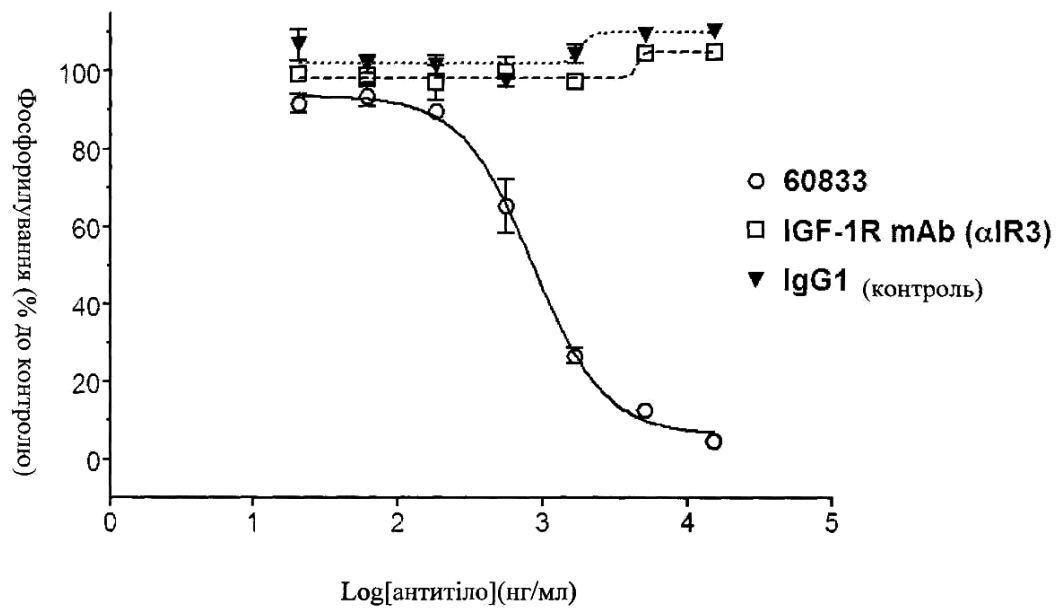
Фіг. 1Ж



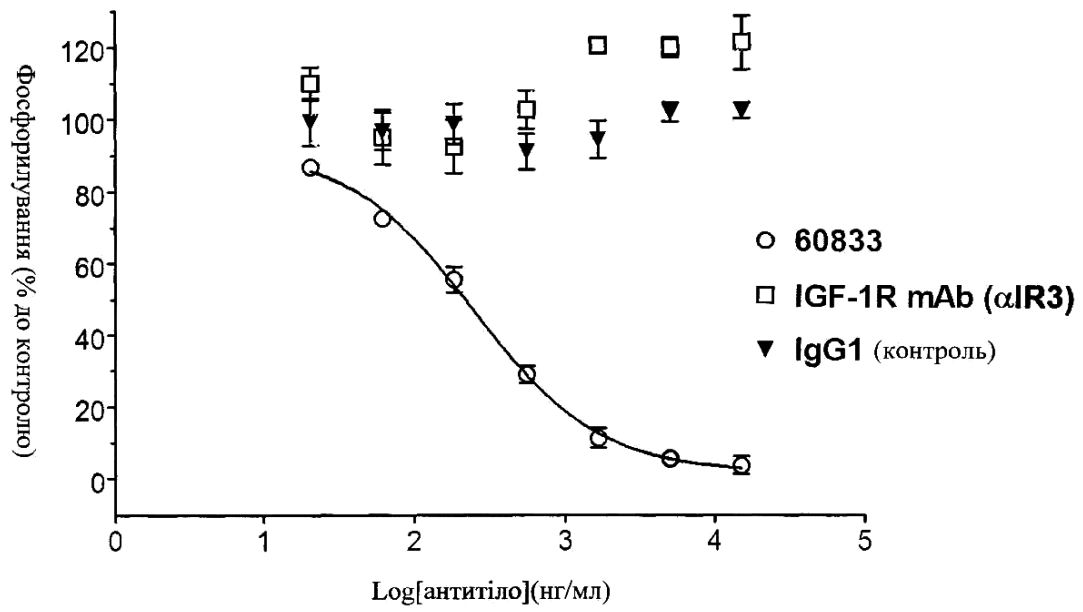
Фіг. 2А



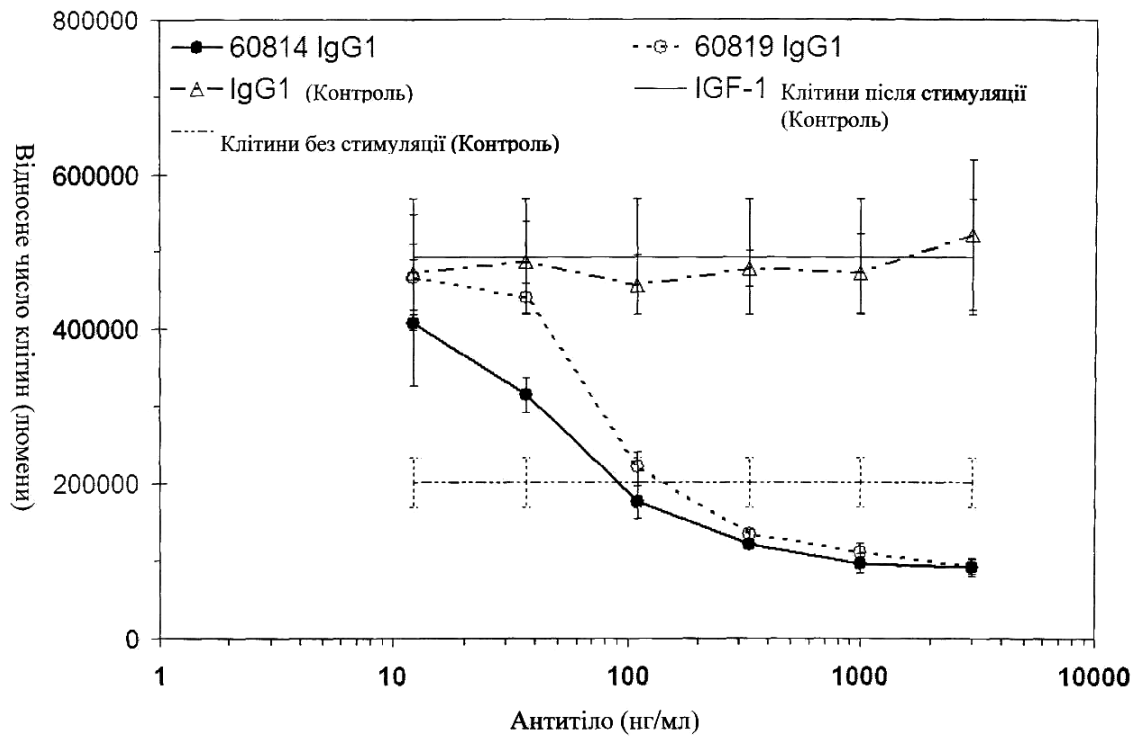
Фіг. 2Б



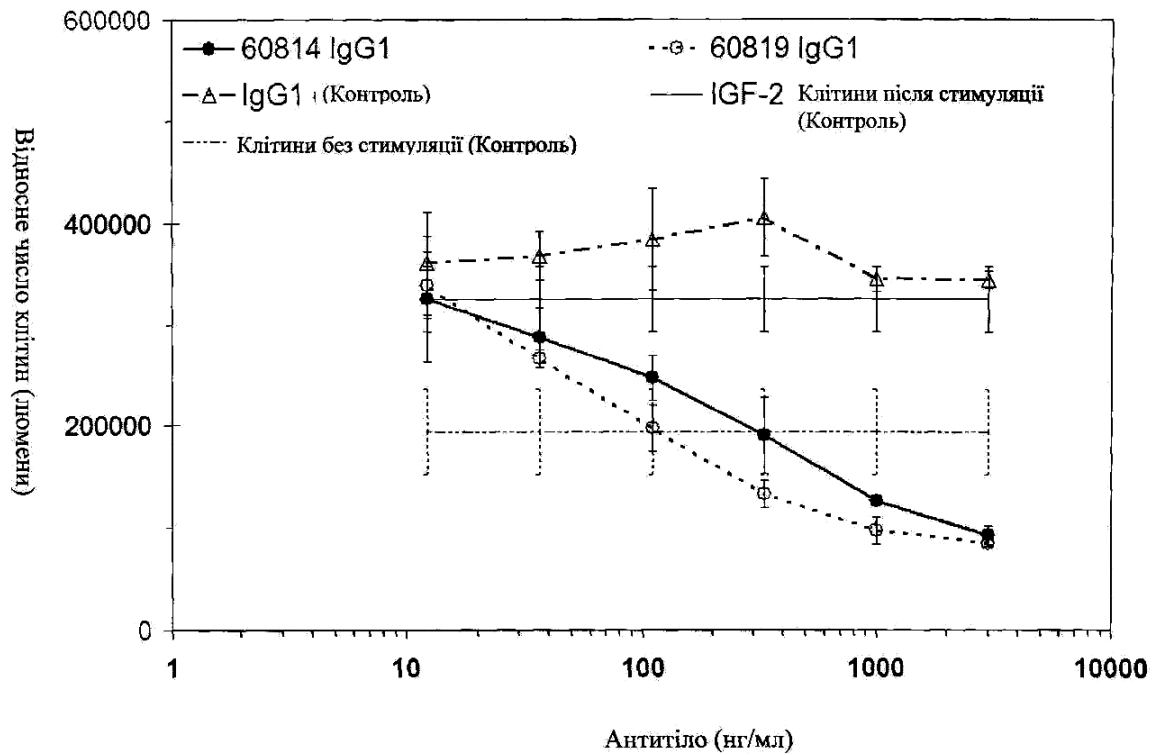
Фіг. 3А



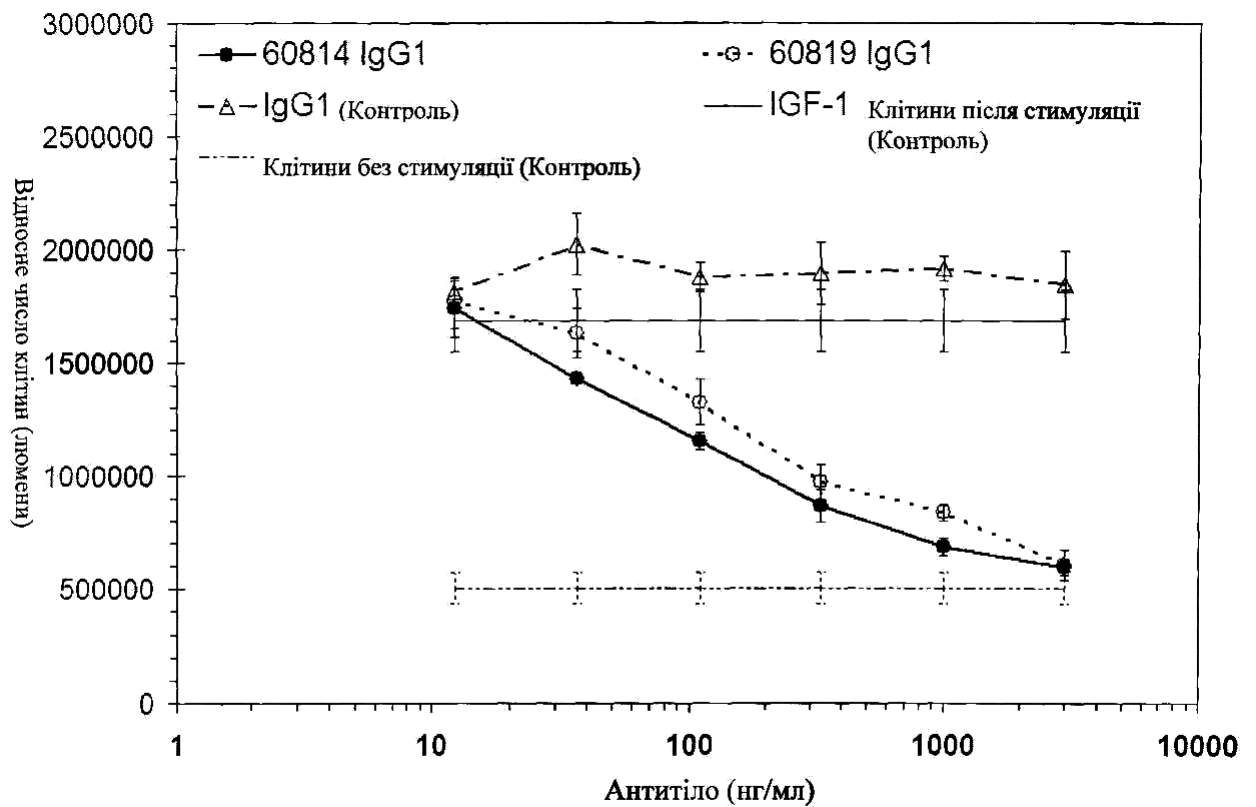
Фіг. 3Б



Фіг. 4А

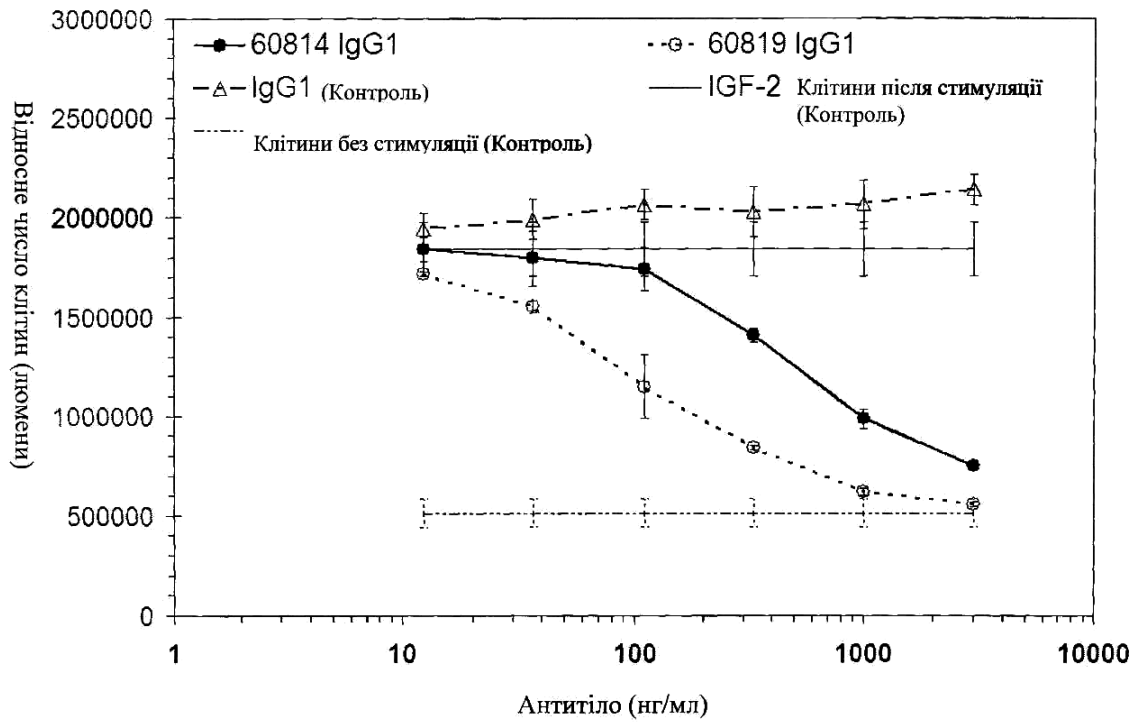


Фіг. 4Б

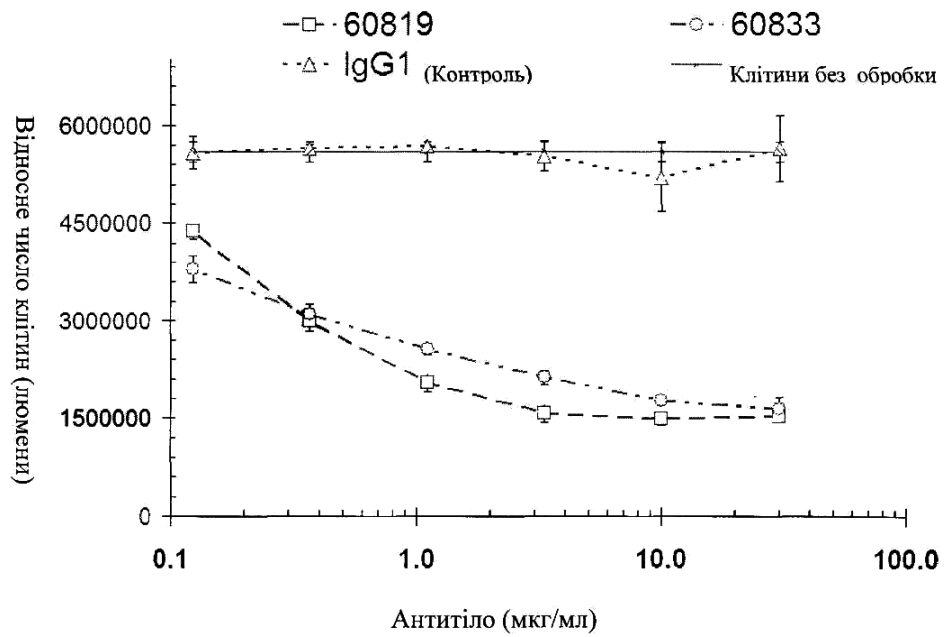


Фіг. 4В

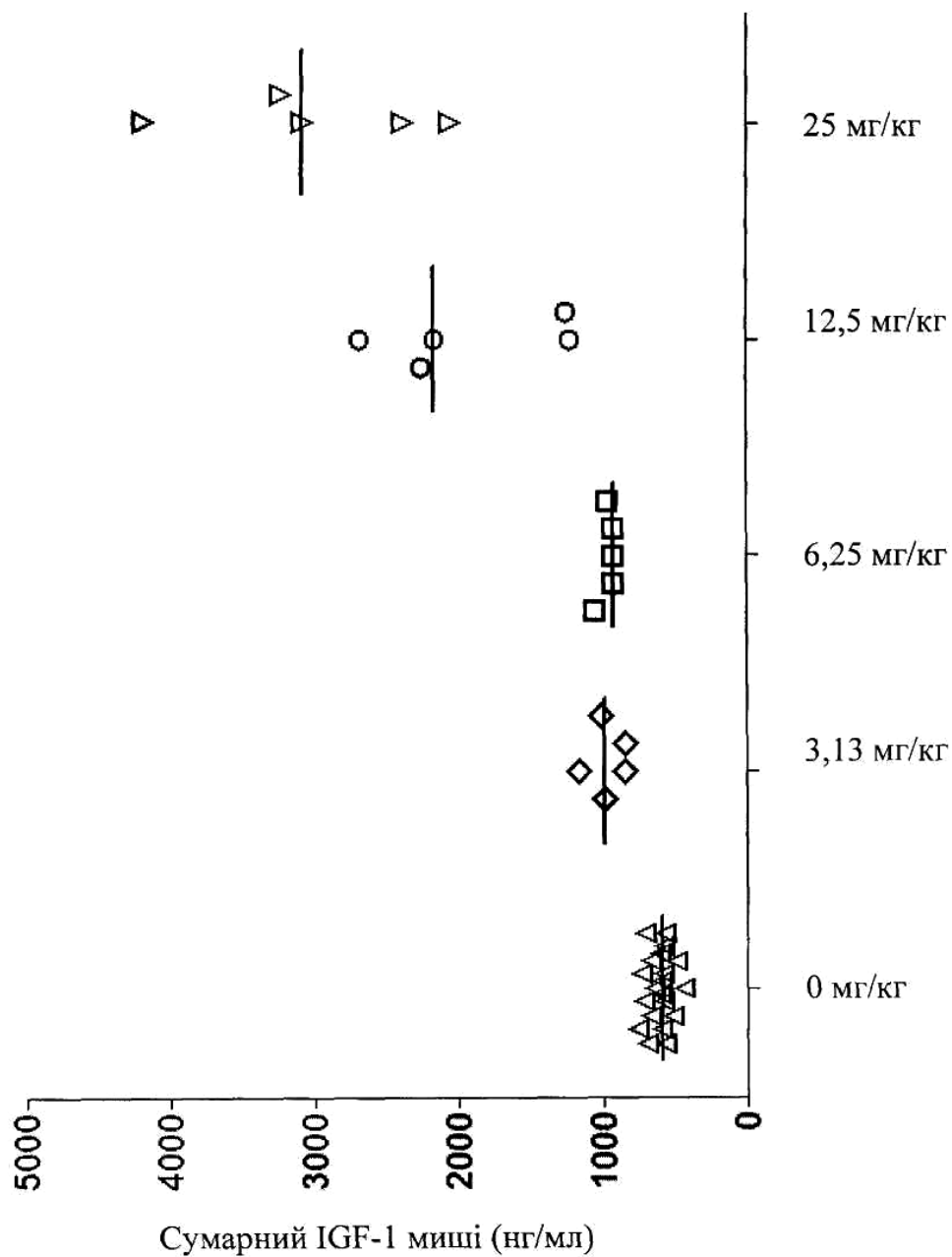




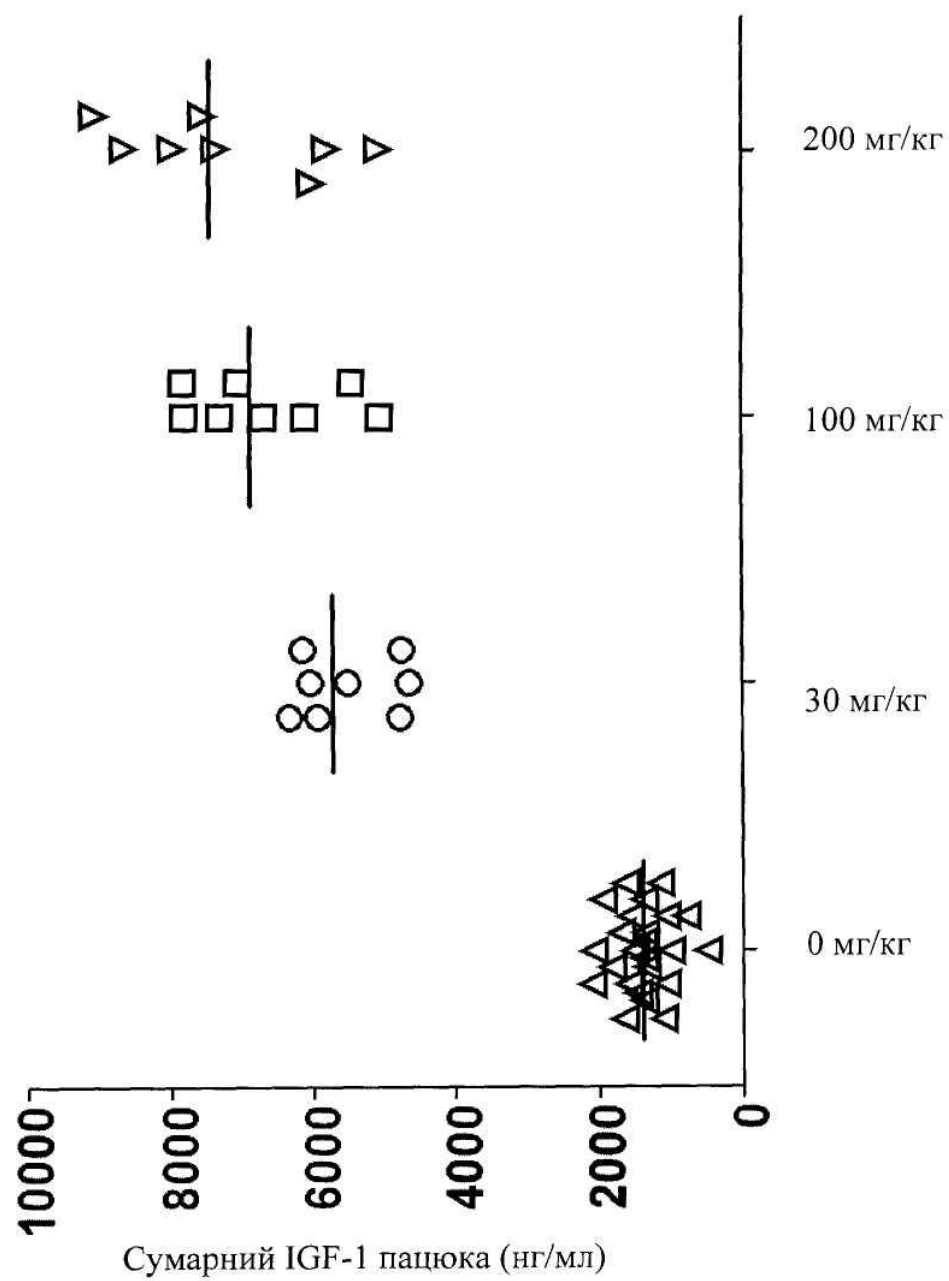
Фіг. 4Г



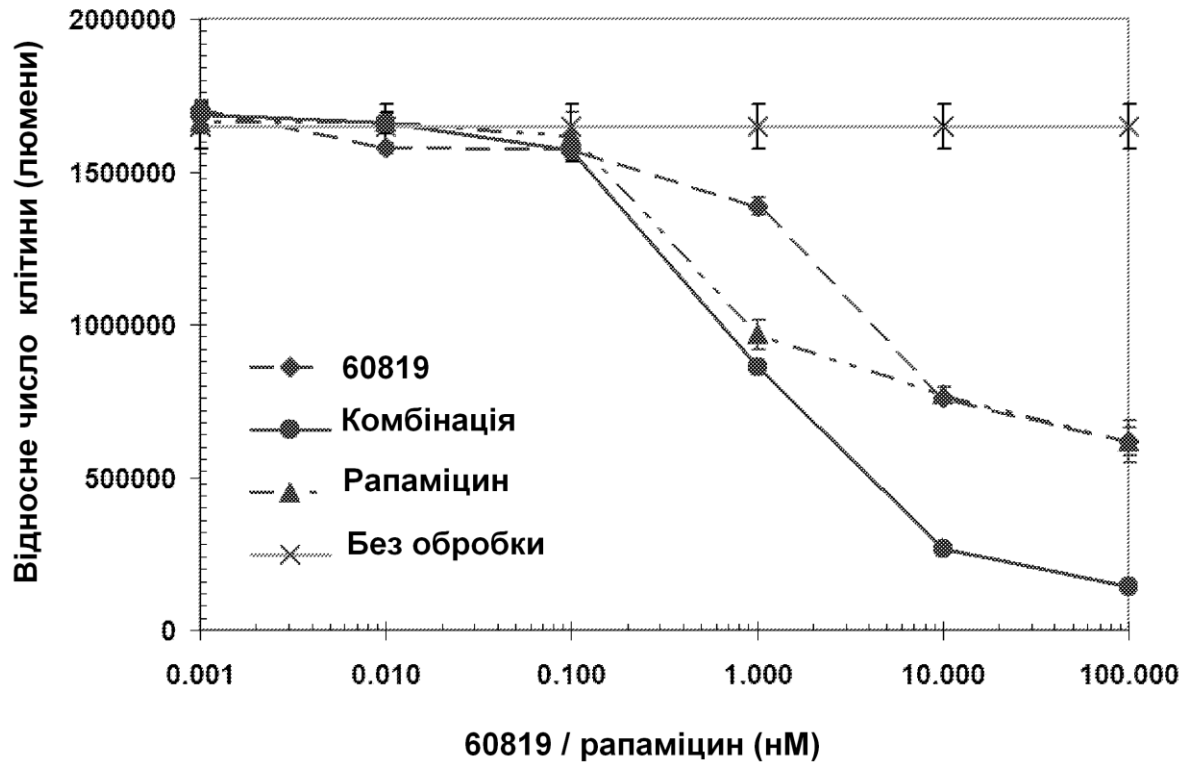
Фіг. 5



Фіг. 6

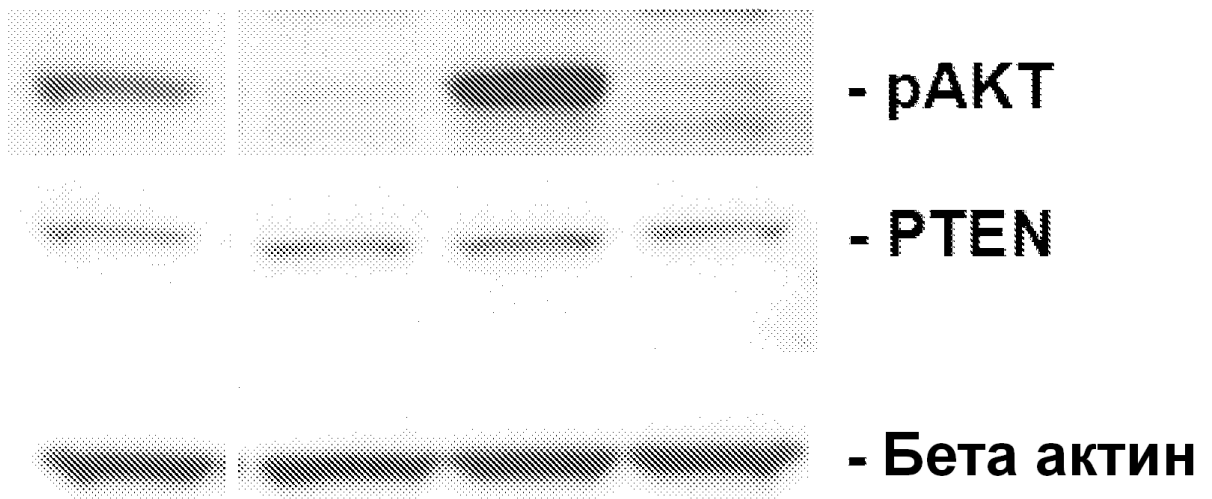


Фіг. 7

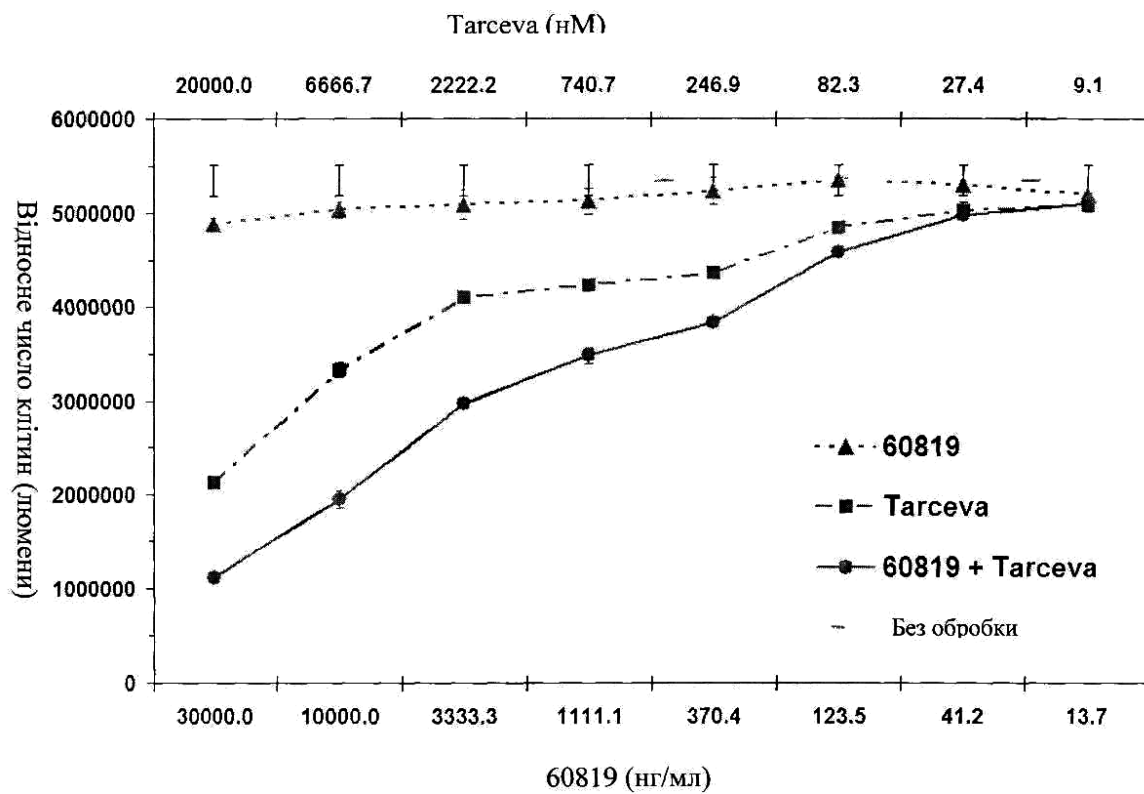


Фіг. 8

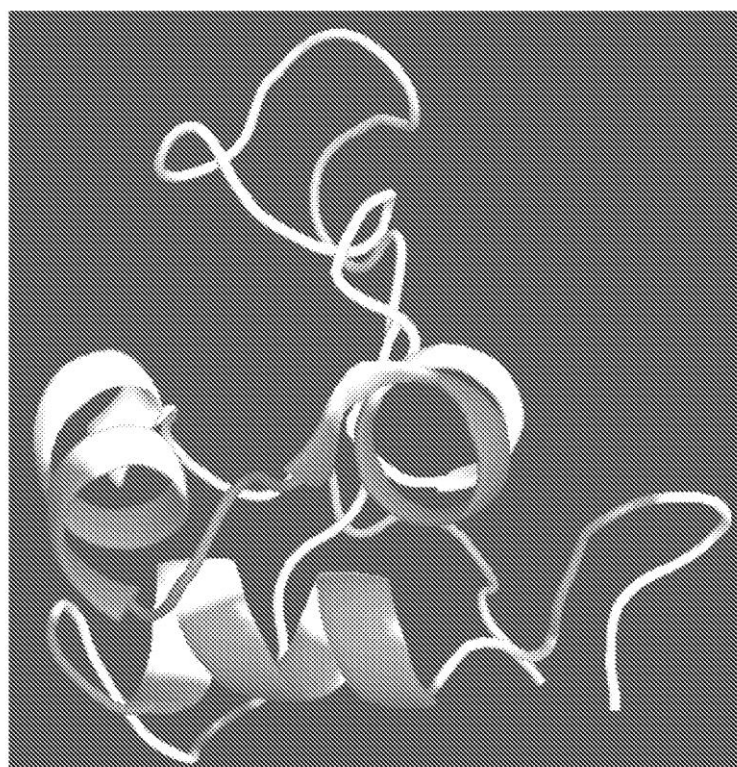
Контроль      60819 (100 нМ)      Рапаміцин (100 нМ)      Комбінація



Фіг. 9



Фиг. 10



GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQ  
 TGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA

Фиг. 11

60814

Амінокислотна послідовність VH3

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**NYWMH**WVRQAPGKGLEWVS**GISGWSSWTTYADSVKGR**FT  
 ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**FGIDAYTKVYFDY**WGQGLTVTVSS

Послідовність ДНК VH3

CAGGTGGAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATT  
 TACCTTTTCTAATTATTGGATGCATTGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATCTCTGGTT  
 GGTCTAGCTGGACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTACCATTTCACGTGATAATTGAAAAACACCCTGTAT  
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTTTTGGTATTGATGCTTATACTAAGGT  
 TTATTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

60814

Амінокислотна послідовність Vλ3

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCS**SGDNIPLKYV**SWYQQKPGQAPVLIH**DDNKRPS**GIPERFSGSNSGN  
 TATLTISGTQAEDEADYYC**SSWDTLDIFNV**FGGGTKLTVLG (Q)

Послідовність ДНК Vλ3

GATATCGAACTGACCCAGCCGCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTGACACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATAATAT  
 TCCTCTTAAGTATGTTTCTTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTCATGATGATAATAAGCGTC  
 CCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAA  
 GACGAAGCGGATTATTATTGCTCTTCTTGGGATACTCTTGATATTTTAAATGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCCT  
 CTAGGT

**Fig. 12A**

60819

Амінокислотна послідовність VH3

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**NYWMH**WVRQAPGKGLEWVS**GISGWSSWTTYADSVKGR**FT  
 ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**FGIDAYTKVYFDY**WGQGLTVTVSS

Послідовність ДНК VH3

CAGGTGGAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATT  
 TACCTTTTCTAATTATTGGATGCATTGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATCTCTGGTT  
 GGTCTAGCTGGACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTACCATTTCACGTGATAATTGAAAAACACCCTGTAT  
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTTTTGGTATTGATGCTTATACTAAGGT  
 TTATTTTGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

60819

Амінокислотна послідовність Vλ3

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCS**SGDNIPLKYV**SWYQQKPGQAPVLIH**DDNKRPS**GIPERFSGSNSGNTATLTIS  
 GTQAEDEADYYC**QSYDYFPK**FVVFGGGTKLTVLG (Q)

Послідовність ДНК Vλ3

GATATCGAACTGACCCAGCCGCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTGACACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGCGATAATAT  
 TCCTCTTAAGTATGTTTCTTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTCATGATGATAATAAGCGTC  
 CCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCCTGACCATTAGCGGCACTCAGGCGGAA  
 GACGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTATGATTATTTTCTAAGTTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCCT  
 CTAGGT

**Fig. 12B**

60833

Амінокислотна послідовність VH3

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYWMSWVRQAPGKGLELVSSITSYGSFTYYADSVKGRFTISRD  
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNMYTHFDSWGQGLVTVSS

Послідовність ДНК VH3

CAGGTGGAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTCCGGATT  
TACCTTTTACTTCTTATTGGATGTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGCTTGTGAGCTCTATCACTTCTT  
ATGGTAGCTTTACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTGAAAAACACCCGTGAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTAATATGTATACTCATTTTGATTCTTG  
GGCCAAGGCACCCCTGGTGACGGTTAGCTCA

60833

Амінокислотна послідовність Vλ3

DIVLTQPPSVSGAPGQQRVTISCSGSSSNIGSNVSVWYQQLPGTAPKLLIYDNSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI  
TGLQSEDEADYYCQSRDTYGYWVFGGGTKLTVLG (Q)

Послідовність ДНК Vλ3

GATATCGTGCTGACCCAGCCGCTTCAGTGAGTGGCGCACCCAGGTCAGCGTGTGACCATCTCGTGTAGCGGCAGCAGCAG  
CAACATTGGTTCTAATTCTGTGTCTTGGTACCAGCAGTTGCCCGGGACGGCGCCGAACTTCTGATTATGATAATTCTA  
AGCGTCCCTCAGGCGTGCCGGATCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCGCGAGCCTTGCGATTACGGGCCTGCAA  
AGCGAAGACGAAGCGATTATTATTGCCAGTCTCGTGATACTTATGGTTATTATTGGGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTT  
AACCGTCCTAGGT

**Fig. 12B**

---

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601