



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106536555 B

(45)授权公告日 2019.10.18

(21)申请号 201480078382.8

(22)申请日 2014.12.04

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106536555 A

(43)申请公布日 2017.03.22

(30)优先权数据
61/948,831 2014.03.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.10.25

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2014/000862 2014.12.04

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/131258 EN 2015.09.11

(73)专利权人 加拿大国家研究委员会
地址 加拿大安大略

(72)发明人 D·斯坦尼米洛维克 K·凯默里奇
A·S·哈坎尼 T·苏利
M·阿巴比-格赫劳迪 B·马西
R·吉尔伯特

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038
代理人 罗菊华

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 49/00(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
C07K 17/00(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件

WO 2011044542 A1,2011.04.14,权利要求
1,15-16.

WO 2011150061 A1,2011.12.01,全文.
Ruben J. Boadol,et

al..Pharmacokinetics and Brain Uptake in
the Rhesus Monkey of a Fusion Protein of
Arylsulfatase A and a Monoclonal Antibody
Against the Human Insulin Receptor.
《Biotechnol Bioeng.》.2013,第110卷(第5期),
摘要,图1,5D,7以及表III.

Pardridge, W.M..Blood-brain barrier
delivery.《Drug Discovery Today》.2007,第12
卷(第1-2期),第59页左栏第1段,图2.

审查员 高赞

权利要求书2页 说明书36页
序列表15页 附图14页

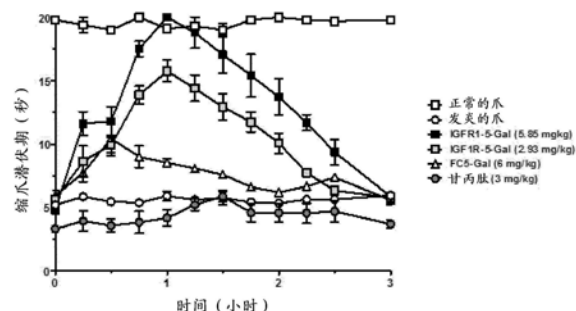
(54)发明名称

胰岛素样生长因子1受体特异性抗体及其用
途

(57)摘要

血脑屏障(BBB)阻止大于500道尔顿的分子
从血液转运至脑。受体介导的转胞吞(RMT)促进
与形成BBB的脑内皮细胞上的受体结合的特定分
子转运穿过BBB。鉴定了通过RMT迁移穿过BBB的
胰岛素样生长因子1受体(IGF 1R)结合性抗体或
其片段。所述抗体或片段被用于递送货物分子穿
过BBB,其中所述货物分子可以是治疗剂或可检
测试剂。所述抗体是骆驼V_HH,通过用933个氨基
酸的IGF 1R多肽免疫美洲驼来制备。还产生了骆

驼V_HH的人源化形式。



1. 一种分离的或纯化的单结构域抗体或其抗原结合片段,其包含
GRTIDNYA (SEQ ID NO:1) 的互补决定区 (CDR) 1序列;
IDWGDGGX (SEQ ID NO:2) 的CDR2序列,其中X为A或T;和
AMARQSRVNLDVARYDY (SEQ ID NO:3) 的CDR3序列,
其中所述单结构域抗体或其抗原结合片段特异性结合胰岛素样生长因子1受体 (IGF1R)。
2. 权利要求1的分离的或纯化的单结构域抗体或其抗原结合片段,其包含序列
X₁VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSRLRLSCAASGRTIDNYAMAWX₅RQAPGX₆X₇EX₈VX₉TIDWGDGGX₁₀RYANSVK
GRFTISRDNX₁₁KX₁₂TX₁₃YLQMNX₁₄LX₁₅X₁₆EDTAVYX₁₇CAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTX₁₈VTVSS (SEQ ID
NO:4), 其中X₁为E或Q;X₂为K或Q;X₃为V或E;X₄为A或P;X₅为V或S;X₆为D或G;X₇为L或R;X₈为F或
W;X₉为A或S;X₁₀为A或T;X₁₁为A或S;X₁₂为G或N;X₁₃为M或L;X₁₄为N或R;X₁₅为E或R;X₁₆为P或A;
X₁₇为S或Y;并且X₁₈为Q或L。
3. 权利要求1的分离的或纯化的抗体或其片段,其包含选自以下序列的序列:
QVKLEESGGGLVQAGGSRLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVATIDWGDGGARYANSVKGRFTISR
DNAKGTMYLQMNNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5);
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVSTIDWGDGGTRYANSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:6);
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVATIDWGDGGTRYANSVKGRFTISR
DNSKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:7);
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKGLEFVATIDWGDGGTRYANSVKGRFTISR
DNSKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:8);
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVATIDWGDGGTRYANSVKGRFTISR
DNSKGTMYLQMNSLRAEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:9);和
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVSTIDWGDGGTRYANSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:10)。
4. 权利要求1的分离的或纯化的单结构域抗体或其抗原结合片段,其中所述单结构域
抗体是骆驼来源的。
5. 权利要求1的分离的或纯化的单结构域抗体或其抗原结合片段,其中所述单结构域
抗体或其抗原结合片段呈多价展示形式。
6. 权利要求5的分离的或纯化的单结构域抗体或其抗原结合片段,其中所述单结构域
抗体或其抗原结合片段连接于Fc片段。
7. 权利要求1的分离的或纯化的单结构域抗体或其抗原结合片段,其中将所述单结构
域抗体或其抗原结合片段固定在表面上。
8. 权利要求1的分离的或纯化的单结构域抗体或其抗原结合片段,其中将所述单结构
域抗体或其抗原结合片段连接于货物分子。
9. 权利要求8的分离的或纯化的单结构域抗体或其抗原结合片段,其中所述货物分子
具有在1kD至200kDa的范围内的分子量。
10. 权利要求8的分离的或纯化的单结构域抗体或其抗原结合片段,其中所述货物分子
是可检测试剂、治疗剂、药物、肽、生长因子、细胞因子、受体陷阱、化学化合物、酶、抗体或其

片段、基于DNA的分子、病毒载体、或细胞毒性剂；一种或多种装载有可检测试剂、治疗剂、药物、肽、酶、抗体或其片段、基于DNA的分子、病毒载体或细胞毒性剂的脂质体或纳米载体；或一种或多种纳米颗粒、纳米线、纳米管或量子点。

11. 权利要求8的分离的或纯化的单结构域抗体或其抗原结合片段，其中所述货物分子是碳水化合物部分。

12. 一种组合物，其包含一种或不止一种权利要求1的分离的或纯化的单结构域抗体或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

胰岛素样生长因子1受体特异性抗体及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及胰岛素样生长因子1受体特异性抗体、其片段及其用途。更具体地,本发明涉及迁移穿过血脑屏障的胰岛素样生长因子1受体特异性抗体及其片段,以及其用途。

[0002] 发明背景

[0003] 神经变性疾病,诸如阿尔茨海默症和帕金森病,是压在我们老龄化社会上的不断增大的负担,因为目前对于这些致残性疾病,没有有效的治疗方法。在脑中起源的这些及其它疾病的治疗以及早期诊断仍然是个挑战,因为大多数合适的治疗分子和诊断剂无法穿透紧密和高度限制性的血脑屏障(BBB)(Abbott,2013年)。BBB构成由内衬血管和通过紧密连接相互连接的脑内皮细胞(BEC)形成的物理屏障(Abbott,2013)。BEC之间形成的紧密连接是BBB的完整性所必需的,并且阻止大于500道尔顿(Da)的分子的细胞旁转运。因为脑内皮细胞表现出非常低的胞饮速率(Abbott,2013),因此较大分子的跨细胞转运限于高特异性受体介导的转胞吞(RMT)途径以及被动的基于电荷的吸附介导的转胞吞作用(Abbott,2013;Pardridge,2002)。另外,外排泵诸如P-糖蛋白或多药抗性蛋白-1(MDR-1)的高密度有助于从脑中除去不想要的物质(Abbott,2013)。

[0004] 虽然所有这些特征保护大脑免受病原体和毒素侵害,但它们同样阻止了大多数治疗剂的进入。事实上,少于5%的小分子治疗剂和实际上没有较大的治疗剂可以以药理学相关浓度(即,足以接合中枢神经系统(CNS)靶和引起药理学/治疗性反应)穿过BBB,除非它们被专门地“摆渡”,即,偶联于转运蛋白分子。由于缺乏有效的“载体”来将分子运输穿过BBB,因此许多针对神经变性疾病的药物已被“搁置”或从进一步的开发中删除,因为它们不能以足够的量被递送至大脑。

[0005] 已开发了不同的将较大分子递送至脑的方法。例如,可打破血脑屏障的完整性,导致渗漏性BBB,这进而允许较大的分子无限制地细胞旁进入大脑。可通过各种方法成功地松开或破坏紧密连接。例如,注射诱导渗透压休克物质(例如,甘露醇,高渗溶液)至血流中引起细胞收缩并导致紧密连接的破坏,从而严重损害BBB(Guillaume,2010)。紧密连接的其它调节剂包括烷基甘油、缓激肽和其几种类似物,以及调节参与维持紧密连接的蛋白的表达的病毒(Erdlenbruch等,2003;Preston等,2008;Gan等,2013)。BBB的更局部化破坏可能通过应用超声来实现(Nhan等,2013)。然而,破坏BBB的时间足以改变脑稳态和允许有害的化学物质、毒素和病原体进入脑;这可导致严重的副作用,例如,癫痫发作和脑肿胀、感染和可能地永久神经病理学变化。如对于本领域技术人员来说将是显而易见的,对于影响多个脑区域的慢性和弥漫性脑疾病,利用这些技术的重复治疗是不现实的。大多数此类治疗是昂贵的,必须住院,并且一些方法需要麻醉。

[0006] 绕过BBB的另一种方法是将治疗分子直接注射入脑脊髓液(CSF)、实质空间或脑的其它部分。几个递送方法已被开发,包括:通过输注或对流增强扩散(CED)泵的硬膜内、大脑内(实质内)以及心室内递送。然而,任何类型的至脑的直接注射或脑内植入是侵入性且昂贵的程序,因为其需要住院、麻醉和通常手术。此外,治疗剂,尤其是大的生物制剂在脑实质内的差扩散速率使治疗剂的穿透仅限于围绕注射/植入的部位的小区域。注射物、导管和植

入物的正确放置仍然具有挑战性,对于实现药物至大脑的目标区域的扩散是至关重要的。另外,导管和植入物提供了用于感染的部位和/或针对外来物质的免疫应答。

[0007] 在另一个增加穿过BBB的递送的努力中,CNS药物已被修饰来增加其脑摄取。此类修饰可包括其表面电荷的变化、分子大小的减小,以及对药物的亲脂性的改变。然而,增加脑渗透的任何修饰也可能改变药物的总体药理学,包括其期望的活性和/或特异性。另外,亲脂性分子更容易通过P-糖蛋白外排泵从脑输出。

[0008] 最后,穿过BBB的内源转运机制已被利用。允许大分子转运穿过BBB的生理机制可分为高特异性受体介导的转胞吞(RMT)和非特异性的基于电荷的吸附介导的胞吞途径。当特异性配体对其受体结合时,或当阳离子配体或药物与脑内皮细胞表面(腔侧)上的阴离子官能团之间发生静电相互作用时,分别触发了胞吞作用。随后,新形成的核内体被转胞吞穿过细胞至近腔侧,以释放其货物。

[0009] 因为吸附介导的转胞吞是非特异性的电荷介导的相互作用,因此其在所有血管床和器官中发生,限制了药物用于脑递送的可用性。因此,利用RMT途径仍然是唯一的生理性、非侵入性的且高度受体特异性的脑递送方法。

[0010] 目前已知道仅少数受体经历在BBB处的RMT和“摆渡”穿过其天然配体:充分研究的转铁蛋白受体(TfR)、胰岛素受体(IR)、低密度脂蛋白受体相关蛋白1和2(LRP-1和-2)、白喉毒素受体和TMEM30A。已开发了结合这些受体的肽、天然配体和抗体或抗体片段(Pardridge等,1991;Yu等,2011;Muruganandam等,2001;Abulrob等,2005;Demeule,2008;Sumbria等,2013),用作利用内源RMT途径的药物-至-脑转运蛋白。然而,迄今为止只有一种肽(Angiopep ANG1005,靶向LRP-1)已在I期临床研究中已经进行了分析,而其它候选物正处于实验室环境的研究中。RMT途径似乎是药物转运至大脑的最有前途的途径,但目前的方法有局限性,包括:靶受体在BBB中的非选择性表达、载体与受体的天然配体之间的竞争、受体的无效转胞吞以及胞吞的载体的溶酶体降解(Xiao和Gun,2013)。

[0011] 高容量和高选择性BBB载体的缺乏延迟了用于在脑中起源的疾病(包括脑肿瘤和神经变性疾病)的新的治疗剂和诊断剂的开发。很明显存在对将小的和大的治疗性和诊断性分子以药理学上有效剂量递送入脑而不破坏BBB的生理学和稳态的非侵入性方法的需要。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明涉及胰岛素样生长因子1受体(IGF1R)特异性抗体及其用途。更具体地,本发明涉及迁移穿过血脑屏障的胰岛素样生长因子1受体特异性抗体及其片段,以及其用途。

[0014] 本发明提供了特异性结合胰岛素样生长因子1受体(IGF1R)表位的分离的或纯化的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段迁移穿过血脑屏障,并且其中所述表位被SEQ ID NO:5的抗体特异性结合。所述IGF1R表位可在IGF1R的细胞外结构域中,并可包含序列FENFLHNSIFVPR(SEQ ID NO:11)或其片段。

[0015] 本发明还提供了分离的或纯化的抗体或其片段,其包含

[0016] GRTIDNYA(SEQ ID NO:1)的互补决定区(CDR)1序列;

[0017] IDWGDGGX(SEQ ID NO:2)的CDR2序列,其中X为A或T;和

[0018] AMARQSRVNLDVARYDY(SEQ ID NO:3)的CDR3序列,

[0019] 其中所述抗体或其片段特异性结合胰岛素样生长因子1受体(IGF1R)。在一个实施

方案中,所述分离的或纯化的抗体或其片段包含IDWGDGGA的CDR2序列。

[0020] 例如,并且不希望以任何方式受到限制,所述特异于IGF1R的分离的或纯化的抗体或其片段可以是:

[0021] X₁VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWX₅RQAPGKX₆X₇EX₈VX₉TIDWGDGGX₁₀RYA NSVKGRFTISRDNX₁₁KX₁₂TX₁₃YLMNX₁₄LX₁₅X₁₆EDTAVYX₁₇CAMARQSRVNLDVARYDYWGQGT₁₈VTVSS (SEQ ID NO:4),其中X₁为E或Q;X₂为K或Q;X₃为V或E;X₄为A或P;X₅为V或S;X₆为D或G;X₇为L或R;X₈为F或W;X₉为A或S;X₁₀为A或T;X₁₁为A或S;X₁₂为G或N;X₁₃为M或L;X₁₄为N或R;X₁₅为E或R;X₁₆为P或A;X₁₇为S或Y;以及X₁₈为Q或L,

[0022] 或与其基本上相同的序列。在更具体的非限制性实例中,所述分离的或纯化的抗体可包含选自以下序列的序列:

[0023] QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVATIDWGDGGARYANSVKGRFTISRDNAGTMYLQMNLPEDETAVYSCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTQ₁₈VTVSS (SEQ ID NO:5),在本文中称为IGF1R-5;

[0024] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVSTIDWGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGT₁₈LVTVSS (SEQ ID NO:6),在本文中称为IGF1R-5_H1;

[0025] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVATIDWGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGT₁₈LVTVSS (SEQ ID NO:7),在本文中称为IGF1R-5_H2;

[0026] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKGLEFVATIDWGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGT₁₈LVTVSS (SEQ ID NO:8),在本文中称为IGF1R-5_H3;

[0027] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVATIDWGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGT₁₈LVTVSS (SEQ ID NO:9),在本文中称为IGF1R-5_H5;和

[0028] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVSTIDWGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGT₁₈LVTVSS (SEQ ID NO:10),在本文中称为IGF1R-5_H6,

[0029] 或与其基本上相同的序列。

[0030] 如上所述的分离的或纯化的抗体或其片段可以是单结构域抗体(sdAb);所述sdAb可以是骆驼来源的。所述抗体或其片段可结合于包含序列FENFLHNSIFVPR (SEQ ID NO:11)的表位。

[0031] 可以以多价展示形式呈现本发明的分离的或纯化的抗体或其片段。在多价展示形式中,所述抗体或其片段可连接于Fc片段;所述Fc片段可以是小鼠Fc2b或人Fc1。例如,并且不希望以任何方式限制,多价展示形式的分离的或纯化的抗体或其片段可包含SEQ ID NO:42(在本文中称为IGF1R-5-mFc共有序列)或43(在本文中称为mFc-IGF1R-5共有序列)、SEQ ID NO:12(在本文中称为IGF1R-5-mFc)或13(在本文中称为mFc-IGF1R-5)的序列。

[0032] 任何形式的如本文所述的分离的或纯化的抗体或其片段可迁移穿过血脑屏障。

[0033] 本发明还提供了编码如本文中所述的分离的或纯化的抗体或其片段的核酸分子。

还提供了包含如前所述的核酸分子的载体。

[0034] 可将如本文所述的分离的或纯化的抗体或其片段固定在表面上。

[0035] 本发明还提供了连接于货物分子的如本文所述的分离的或纯化的抗体或其片段；所述货物分子可具有在约1kD至约200kDa的范围内的分子量。连接于抗体或其片段的货物分子可以是可检测试剂、治疗剂、药物、肽、生长因子、细胞因子、受体陷阱 (receptor trap)、化学化合物、碳水化合物部分、酶、抗体或其片段、基于DNA的分子、病毒载体、或细胞毒性剂；一种或多种装载有可检测试剂、治疗剂、药物、肽、酶和抗体或其片段、基于DNA的分子、病毒载体或细胞毒性剂的脂质体或纳米载体；或一种或多种纳米颗粒、纳米线、纳米管或量子点。

[0036] 另外，本发明提供了包含一种或不止一种如本文所述的分离的或纯化的抗体或其片段和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的组合物。

[0037] 还提供了检测IGF1R的体外方法，该方法包括

[0038] a) 将组织样品与一种或不止一种连接于可检测试剂的如本文所述的分离的或纯化的抗体或其片段接触；和

[0039] b) 检测组织样品中结合于IGF1R的抗体或其片段所连接的可检测试剂。

[0040] 在上述方法中，样品可以是血清样品、血管组织样品、肿瘤组织样本、或来自人或动物受试者的脑组织样品。在如所述的方法中，检测的步骤(步骤b))可使用光学成像、免疫组织化学、分子诊断成像、酶联免疫吸附 (ELISA)、成像质谱法或其它合适的方法来进行。

[0041] 还提供了检测受试者中的IGF1R表达的体内方法，所述方法包括：

[0042] a) 向受试者施用一种或不止一种连接于可检测试剂的如本文所述的分离的或纯化的抗体或其片段；和

[0043] b) 检测结合于IGF1R的抗体或其片段所连接的可检测试剂。

[0044] 在上述方法中，检测步骤(步骤b))可使用PET (正电子发射断层摄影术)、SPECT (单光子发射计算机断层扫描)、荧光成像或任何其它合适的方法来进行。

[0045] 本文提供了将目标分子转运穿过血脑屏障 (BBB) 的方法，所述方法包括：

[0046] a) 向受试者施用一种或不止一种连接于目标分子的如本文所述的分离的或纯化的抗体或其片段，所述分离的或纯化的抗体或其片段迁移穿过血脑屏障，

[0047] 其中所述一种或不止一种抗体或其片段将目标分子摆渡穿过BBB。在如前描述的方法中，所述目标分子可具有在约1kD至约200kDa的范围内的分子量；所述目标分子可以是可检测试剂、治疗剂、药物、肽、生长因子、细胞因子、受体陷阱、化学化合物、碳水化合物部分、酶、抗体或其片段、基于DNA的分子、病毒载体或细胞毒性剂；一种或多种装载有可检测试剂、治疗剂、药物、肽、酶、抗体或其片段、基于DNA的分子、病毒载体或细胞毒性剂的脂质体；或一种或更多种纳米颗粒、纳米线、纳米管或量子点。在所描述的方法中，施用可以是静脉内 (iv)、皮下 (sc) 或肌内 (im) 施用。

[0048] 本发明还包括定量被递送穿过受试者的BBB的货物分子的量的方法，其中所述货物分子被接连于一种或不止一种如本文所述的分离的或纯化的抗体或其片段，所述方法包括：

[0049] a) 从受试者收集脑脊髓液 (CSF)；和

[0050] b) 使用靶向蛋白质组学方法来定量CSF中连接于一种或不止一种分离的或纯化的

抗体或片段的货物分子的量。

[0051] 货物分子可以是任何期望的分子,包括先前所述的货物分子;所述抗体或其片段迁移穿过BBB;并且该分子可“连接”于抗体或其片段,如先前所述。在上述方法中,使用本领域中已知的任何合适的方法从受试者收集CSF。用于步骤b)中的靶向蛋白质组学方法所需的CSF的量可为约1至10 μ l。用于定量所述一种或不止一种连接于货物分子的抗体或其片段的量的靶向蛋白质组学方法可以是本领域中已知的任何合适的方法。例如且不希望是限制性的,该靶向蛋白质组学方法可以是质谱法,诸如多反应监测-同种型标记的内标(MRM-ILIS)。

[0052] 诊断剂或药物穿过紧密且高度选择性的BBB的不佳递送牵累用于脑疾病(诸如,但不限于,脑肿瘤和神经变性疾病)的治疗的开发。将分子转运穿过BBB的载体的缺乏延迟了用于此类疾病的新的治疗剂和诊断剂的开发。如本文所述的,已产生了为使缀合于抗体的药物穿过BBB到达它们在脑中的靶标的递送提供有效转运平台的IGF1R结合性V_HH。目前描述的抗体利用了从形成BBB的脑内皮细胞的腔内至近腔侧的IGF1R的天然RMT途径。在抗体与IGF1R结合后,RMT被启动,抗体与缀合的分子(货物)一起被转胞吞通过细胞至近腔侧,在近腔侧中它们被释放至脑微环境中。这是通过RMT迁移穿过BBB的抗IGF1R结合结构域抗体的第一次鉴定和演示。IGF1R V_HH被证实结合IGF1R(图2B),内化至BBB细胞内(图4),并穿越至体外BBB模型的近腔侧(图5B)。体内的药物至脑的递送的研究也表明,IGF1R V_HH“运载”缀合的肽(甘丙肽;约3kDa)以及大的蛋白质融合物(约80kDa)穿过BBB(图7A和B;图9)。

[0053] 该结果还表明,抗IGF1R V_HH可与Fc(可结晶片段)片段融合表达,以使循环半衰期延长约75倍(相较于单独的V_HH的约20分钟,为约25小时)。该高分子量融合构建体(约80kDa)也被高效地转运穿过BBB。长的血浆半衰期显著增加了IGF1R V_HH-mFc(mFc=小鼠Fc)缀合物的CSF暴露(相较于单独的V_HH),并可用作BBB递送载体,以用于在CNS中利用靶标治疗慢性疾病。使用免疫荧光检测可容易地检测脑实质中的缀合物。结果表明,IGF1R V_HH载体可“摆渡”大分子(在大小上与抗体、酶、生长因子、肽、细胞因子、受体陷阱相似)穿过BBB。

[0054] 因此,抗体递送不仅可用于短期治疗(例如癫痫发作),而且还可用于中期(例如,癌症)和长期(例如阿尔茨海默病或帕金森病)治疗。

[0055] 鉴于以下描述,本发明的另外的方面和优势将是明显的。详细的描述和实例,虽然指示本发明的优选实施方案,仍仅通过举例说明的方式给出,因为根据本发明的教导,本发明的范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员将变得明显。

[0056] 附图简述

[0057] 本发明的这些和其它特征现将参照所附的附图,通过举例的方式来描述,其中:

[0058] 图1是胰岛素样生长因子1受体(IGF1R)的示意图。IGF1R发现于细胞表面上,并包含两个亚基: α 亚基和 β 亚基。 α 亚基(包含具有胰岛素样生长因子1结合位点的细胞外部分)通过二硫键连接于 β 亚基(包含小的细胞外结构域、跨膜区和细胞内部分)。IGF1受体可以形成二聚体。重组地产生包含 α 亚基和 β 亚基的细胞外部分的933个氨基酸长的片段,如灰色框内指示的,(M1-F933,SwissProt登录号P08069;参见图2),并将其用于美洲驼(llama)的免疫。

[0059] 图2显示IGF1R(SwissProt登录号P08069)的序列。用于免疫和淘选的933个氨基酸

长的蛋白质片段以粗体显示；完整的胞外域是2个氨基酸更长的。分离 α 和 β 亚基的弗林蛋白酶切割位点以斜体小写字母显示。信号肽以粗斜体字显示。IGF1R-5 V_HH可能结合的假定的表位加以下划线。

[0060] 图3A显示通过Superdex 75柱运行的IGF1R-结合性V_HH IGF1R-5的大小排阻层析。特征谱表明V_HH是单体的且非聚集的。图3B显示如通过IGF1R-5-V_HH及其人源化变体(标记的5H1、5H2、5H3、5H5、5H6)的圆二色性(CD)测定的解链温度(T_m)。将所述蛋白质加热至90℃以上,并在CD仪中进行测量以测定解链曲线(黑色或实心圆)和T_m。随后,将蛋白质冷却至室温,再次加热并通过CD分析(灰色曲线或方块)。这允许测定重折叠蛋白质的分数。图3C显示0.1-10nM IGF1R-5 V_HH及其人源化变体(标记的5H1、5H2、5H3、5H5、5H6)与人IGF1R片段(h-IGF1R)的重组细胞外部分的结合的表面等离子体共振(SPR)传感覆盖图。利用该特定方法和实验设置获得的数据良好拟合至1:1模型,给出在低纳摩尔(nM)范围(0.6-16.4nM)内的K_D值,如表2中详示的。图3D显示IGF1R-5 V_HH与人IGF1R片段的重组细胞外部分的结合以及IGF1的随后添加的SPR传感图,所述IGF1可同时结合所述受体。重复该实验2次,如图中显示的。

[0061] 图4显示了Cy-5.5标记的IGF1R-5 V_HH和对照V_HH的细胞摄取的成像结果。将Cy5.5-标记的IGF1R-5 V_HH(或FC5 V_HH作为阳性对照;Muruganandam等,2002;Haqqani等,2012)与SV40永生大鼠脑内皮细胞(svARBE)在4℃(顶图)或37℃(底图)一起温育以评估IGF1R-5是被动地(4℃)内化还是通过主动机制(37℃)诸如受体介导的胞吞内化。利用小麦胚凝集素和DAPI进行共染色以分别使细胞表面和细胞核可视化。顶图:当在4℃温育时,发现IGF1R-5和FC5 V_HH在细胞外部(箭头),结合于细胞膜(与小麦胚凝集素共定位)。底图:在37℃,FC5和IGF1R-5 V_HH均在细胞内部累积在小囊泡样结构(箭头)(可能是核内体)中,这表明通过主动运输机制的内化。

[0062] 图5A显示IGF1R-5 V_HH与鼠Fc片段的C末端融合物(IGF1R-5-mFc)的序列,而图5B显示N末端融合物序列(mFc-IGF1R-5-Ga1)。组装的融合蛋白的示意图示于图5C中。在图5A-C中,IGF1R-5 V_HH以黑体显示,鼠Fc(CH2和CH3)以灰色显示。

[0063] 图6A是概括利用体外BBB模型评估各种V_HH穿过BBB的能力的流程图。同时测试等摩尔量(5.6μM或1.25μM)的阳性(FC5)和阴性对照(A20.1,艰难梭菌(*Clostridium difficile*)毒素A-结合V_HH;和EG2,一种EGFR结合V_HH)V_HH和IGF1R-5的穿过大鼠体外BBB模型的能力。在大鼠星形胶质细胞条件培养基(在底室中)和标准培养基(在顶室中)存在的情况下,在插入物的膜上的单层中生长来自成年大鼠的SV40永生大鼠脑内皮细胞(svARBE)。在将等摩尔量的各种V_HH共添加至BBB模型的腔内侧后,在15、30和60分钟后从底室采集样品。随后通过质谱法(多反应监测-同种型标记的内标;MRM-ILIS)定量这些样品中的每一种V_HH的浓度。 P_{app} 值[Q_r/dt =接收腔室中的累积量相对于时间;A=细胞单层的面积;C₀=给药溶液的初始浓度]通常用于测定分子穿过BBB的能力。图6B显示4种共施用的V_HH的 P_{app} 值。IGF1R-5具有与FC5相似的 P_{app} 值,而阴性对照均具有非常低的 P_{app} 值,表明相较于对照V_HH的非常低的非特异性转运或细胞旁转运,促进了FC5和IGF1R-5 V_HH的转运。结果为在5-6个独立的实验中获得平均 P_{app} 值。图6C显示相较于A20.1 V_HH(白色条块)的人源化IGF1R-5单结构域抗体(H1、H2、H3、H5、H6)(黑色条块)的 P_{app} 值,将所述A20.1 V_HH在同一小孔中作为对照进行测试;平均FC5和A20.1值由灰色虚线标示。图6D显示相较于A20.1-小鼠Fc

(A20.1mFc) (深灰色) 的IGF1R-5与小鼠Fc的N末端和C末端融合物(浅灰色)的 P_{app} 值,将A20.1-小鼠Fc在同一小孔中作为对照进行测试,其具有非常低的 P_{app} 值。FC5-Fc(与Fc融合的FC5)、FC5(V_HH)、IGF1R-5(V_HH)和A20.1(V_HH)的平均 P_{app} 值由虚线标示以进行比较。

[0064] 图7显示IGF1R-5 V_HH-甘丙肽缀合物的化学合成的简图。首先将IGF1R-5缀合于磺基-SMCC交联剂(NHS基团)(1);随后将马来酰亚胺活化的IGF1R-5-磺基-SMCC缀合于甘丙肽的还原的半胱氨酸(2)。

[0065] 图8显示化学缀合的甘丙肽的IGF1R-5介导的脑递送。图8A是显示IGF1R-5将药理学有效剂量的缀合的镇痛肽甘丙肽(3.2kD)递送至脑中的能力(使用Hargreaves疼痛模型)的曲线图。在该模型中,通过将100 μ l完全弗氏佐剂(CFA)注射至左足底面,从而在数小时内引起局部炎症,来在雄性Wistar大鼠(4-6周龄)中诱导局部慢性疼痛。在单独地尾静脉注射BBB载体V_HH-药物缀合物或甘丙肽后,将大鼠放入设置在玻璃表面上的Plexiglas外壳内。通过倾斜镜将热刺激聚焦在发炎或对侧的爪上。刺激施加与缩爪(舔或轻弹爪)之间的等待时间被解释为镇痛作用(热痛觉过敏的抑制)的量度。单独的甘丙肽不能穿过BBB,如通过3mg/kg甘丙肽(灰色实心圆)的全身性(尾静脉)注射后镇痛效果的缺乏所证明的。IGF1R-5-甘丙肽缀合物(2.93mg/kg或5.85mg/kg)的全身性注射在3小时的时期中诱导剂量依赖性镇痛作用,比利用6mg/kg的FC5-甘丙肽缀合物观察到的作用更加明显。图8B将这些结果显示为相较于最大可能作用(MPE;对照爪)的药效学反应的曲线下面积(AUC)。2.93mg/kg IGF1R-5-甘丙肽诱导28%的MPE,而5.85mg/kg IGF1R-5-甘丙肽在3小时的时期中诱导55%的MPE,这表明在全身性注射后所述缀合物相较于单独的甘丙肽的显著的脑穿透(<5%的MPE)。图8C是显示在静脉内注射不同浓度后在Hargreaves疼痛模型中mFc-IGF1R-5-Gal抑制热痛觉过敏的能力的曲线图。图8D显示在iv注射IGF1R-5-mFc-Gal或mFc-IGF1R-5-Gal缀合物后Hargreaves模型中的热痛觉过敏的剂量依赖性反应(峰值反应时的逆转百分比)。

[0066] 图9显示在全身性(尾静脉)施用5mg/kg后,IGF1R-5-mFc和对照V_HH(A20.1小鼠Fc融合物(A20.1-mFc))的血浆和CSF药代动力学。将导管插入小脑延髓池用于连续CSF收集(1-48h)。使用“追踪”和定量特定蛋白质肽标志的MRM-ILIS法测定IGF1R-5-mFc和A20.1-mFc的血浆和CSF水平。利用MRM同时测定CSF中的白蛋白水平。所有具有低于1500的血浆/CSF比率的CSF样品作为潜在污染的血液被排除。IGF1R-5-mFc与A20.1-mFc的血浆半衰期相似(分别为23h和25h)。在所述融合蛋白全身性注射后24小时,IGF1R-5-mFc和A20.1-mFc的血浆/CSF比率分别为2%和0.04%。

[0067] 图10显示在5mg/kg剂量的尾静脉施用后48h,脑切片中的IGF1R-5-mFc的免疫检测。利用PBS对大鼠进行牺牲灌注,使用振动切片机获得脑切片(35 μ m)。使用抗小鼠Fc抗体免疫检测IGF1R-5-mFc。使用凝集素RCA1检测皮质切片中的血管(左上)。利用针对神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的抗体在同一切片中检测星形细胞(右上)。可在血管中和血管外(即在脑实质中,迁移穿过BBB)检测到IGF1R-5-mFc(左下),如通过箭头标示的。所有染色的复合显微照片示于右下,显示IGF1R-5-mFc从血管的腔内侧迁移穿过BBB进入脑实质。

[0068] 图11显示IGF1R-5不干扰胰岛素或IGF-1信号传导(通过胰岛素受体或IGF1R)。图11A是显示IGF1R-5和所测试的任何其它抗IGF1R V_HH(IGF1R-1,-3,-4或-6)在100nM的浓度下均不单独地诱导下游Akt磷酸化的代表性免疫印迹。100nM的IGF1R-5或任何其它抗IGF1R V_HH的存在都不抑制如由10 μ g/ml胰岛素诱导的Akt磷酸化。来自3个独立实验的免疫印迹条

带密度的定量示于凝胶图像下方的条形图(平均值 $\pm$ SD)中。图11B是显示100nM的IGF1R-5和所测试的任何其它抗IGF1R V_{H1} (IGF1R, -3, -4或-6)自身均不诱导Akt的磷酸化,并且均不抑制在用200ng/ml的IGF-1刺激后诱导的IGF-1诱导的Akt磷酸化(即信号传导)的代表性免疫印迹。来自3个独立实验的免疫印迹条带密度的定量示于凝胶图像下方的条形图(平均值 $\pm$ SD)中。图11C显示针对磷酸化IGF1R探测的免疫印迹。将细胞与单独的在其C末端上与鼠Fc融合(例如IGF1R-5-mFc)的100nM或500nM的IGF1R-5或任何其它抗IGF1R V_{H1} (IGF1R-1, -3或-4)一起温育或在各自IGF1R- V_{H1} -mFc融合蛋白存在的情况下利用200ng/ml IGF-1刺激。免疫印迹表明,融合构建体均不抑制IGF-1诱导的IGF1R的磷酸化,并且自身均不诱导受体磷酸化。

[0069] 发明详述

[0070] 本发明涉及胰岛素样生长因子1受体特异性抗体,其片段,以及其用途。更具体地,本发明涉及迁移穿过血脑屏障的胰岛素样生长因子1受体特异性抗体或其片段,以及其用途。

[0071] 本发明提供了特异性结合胰岛素样生长因子1受体(IGF1R)表位的分离或纯化的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段迁移穿过血脑屏障,并且其中所述表位被SEQ ID NO:5的抗体特异性结合。所述IGF1R表位可在IGF1R的细胞外结构域中,并可包含序列FENFLHNSIFVPR(SEQ ID NO:11),或其片段。

[0072] 本发明还提供了分离的或纯化的抗体或其片段,其包含

[0073] GRTIDNYA(SEQ ID NO:1)的互补决定区(CDR)1序列;

[0074] IDWGDGGX(SEQ ID NO:2)的CDR2序列,其中X为A或T;和

[0075] AMARQSRVNLDVARYDY(SEQ ID NO:3)的CDR3序列,

[0076] 其中所述抗体或其片段特异性地结合于胰岛素样生长因子1受体(IGF1R)。在一个实施方案中,所述分离的或纯化的抗体或其片段包含IDWGDGGA的CDR2序列。

[0077] 如本文中所用,术语“抗体”,在本领域中也称为“免疫球蛋白”(Ig),是指从成对的重和轻多肽链构建的蛋白质;存在各种Ig同种型,包括IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。当抗体正确折叠时,每条链折叠成通过更线性的肽序列连接的许多不同的球状结构域。例如,免疫球蛋白轻链折叠成可变(V_L)和恒定(C_L)结构域,而重链折叠成可变(V_H)和三个恒定(C_H 、 C_{H2} 、 C_{H3})结构域。重链和轻链可变结构域(V_H 和 V_L)的相互作用导致抗原结合区(Fv)的形成。每一个结构域具有本领域技术人员熟悉的良好建立的结构。

[0078] 轻链和重链可变区负责结合靶抗原并因此可显示出抗体之间的显著序列多样性。恒定区显示较少的序列多样性,并负责结合许多天然蛋白质以引发重要的生物化学事件。抗体的可变区含有分子的抗原结合决定簇,从而决定了抗体对其靶抗原的特异性。大多数序列可变性存在于6个高变区中,每可变重(V_H)和轻(V_L)链各3个;所述高变区组合以形成抗原结合部位,并促成抗原决定簇的结合和识别。抗体对其抗原的特异性和亲和力由高变区的结构以及它们的大小、形状以及它们呈现给抗原的表面的化学性来决定。存在用于鉴定高变区的各种方案,两个最常见的方案(Kabat的以及Chothia和Lesk. Kabat等(1991)的那些方案)基于 V_H 和 V_L 结构域的抗原结合区上的序列可变性确定“互补决定区”(CDR)。Chothia和Lesk(1987)基于 V_H 和 V_L 结构域中的结构环区域的位置确定“高变环”(H或L)。这些个体方案确定相邻或重叠的CDR和高变环区域,抗体领域的技术人员通常可互换地使用术语“CDR”

和“高变环”，并且在本文中也这样使用它们。在本文中根据最近的IMGT编号系统(Lefranc, M.-P.等,2003)提及CDR/环,所述系统被开发来便利地比较可变结构域。在该系统中,保守氨基酸(诸如Cys23、Trp41、Cys104、Phe/Trp118,和在位置89上的疏水性残基)总是具有相同的位置。另外,提供了框架区(FR1:位置1至26;FR2:39至55;FR3:66至104;和FR4:118至129)和CDR(CDR1:27至38,CDR2:56至65;和CDR3:105至117)的标准化划界。

[0079] 如本文中提及的“抗体片段”可包括本领域中已知的任何合适的抗原结合抗体片段。抗体片段可以是天然存在的抗体片段,或可通过天然存在的抗体的操作或通过使用重组方法来获得。例如,抗体片段可包括但不限于Fv、单链Fv(scFv;由利用肽接头连接的V_L和V_H组成的分子)、Fab、F(ab')₂、单结构域抗体(sdAb;由单个V_L或V_H组成的片段)以及任何这些的多价展示。抗体片段诸如刚刚描述的那些片段可能需要接头序列、二硫键,或其它类型的共价键来连接片段的不同部分;本领域的技术人员将熟悉不同类型的片段和各种方法的要求以及用于构建它们的各种方法。

[0080] 在非限定性实例中,抗体片段可以是来源于天然存在的来源的sdAb。骆驼来源的重链抗体(Hamers-Casterman等,1993)缺少轻链,从而它们的抗原结合部位由一个称为V_HH的结构域组成。还已在鲨鱼中观察到sdAb,其被称为V_{NAR}(Nuttall等,2003)。可基于人Ig重链和轻链序列工程化其它sdAb(Jespersen等,2004;To等,2005)。如本文中所用,术语“sdAb”包括通过噬菌体展示或其它技术直接从任何来源的V_H、V_HH、V_L或V_{NAR}库分离的那些sdAb、来源于前述sdAb的sdAb、重组产生的sdAb以及通过此类sdAb的进一步修饰(通过人源化、亲和成熟、稳定化、增溶作用、骆驼化(camelizeation)或抗体工程的其它方法)产生的那些sdAb。本发明还设想了保留sdAb的抗原结合功能和特异性的同源物、衍生物或片段。

[0081] sdAb具有针对抗体分子的期望的性质,诸如高耐热性、高耐洗涤剂性、相对高的对蛋白酶的抗性(Dumoulin等,2002)和高生产产率(Arbabi-Ghahroudi等,1997);还可从免疫文库分离(Li等,2009)或通过体外亲和力成熟(Davies&Riechmann,1996)对它们进行工程化以具有非常高的亲和力。增加稳定性的进一步修饰,诸如非典型二硫键的引入(Hussack等,2011;Kim等,2012)也可被引入至sdAb。

[0082] 本领域技术人员非常熟悉单结构域抗体的结构(见,例如,蛋白质数据库中的3DWT、2P42)。sdAb包括保留了免疫球蛋白折叠的单个免疫球蛋白结构域;最显著的是,只有3个CDR/高变环形成抗原结合部位。然而,并且如本领域中技术人员应理解的,可能并非全部CDR是结合抗原所需的。例如,并且不希望是限制性的,1、2或3个CDR可促成本发明的sdAb对抗原的结合和识别。可变结构域或sdAb的CDR在本文中被称作CDR1、CDR2和CDR3,并且如由Lefranc,M.-P.等(2003)所定义的进行编号。

[0083] 本发明的抗体或其片段特异于胰岛素样生长因子1受体(IGF1R)(一种在细胞表面上发现的受体)。所述IGF1R包括通过二硫键连接于β亚基的α亚基,所述α亚基包含具有胰岛素样生长因子1结合部位的细胞外部分,所述β亚基包含小的细胞外结构域、跨膜区和细胞内部分。IGF1受体组装成同型二聚体或可与胰岛素受体形成异二聚体。IGF1R的序列可以是,但不限于,在图2中所示的序列(SwissProt登录号P08069;SEQ ID NO:14),或与其基本上相同的序列。

[0084] 如本文所述的抗体或其片段不应当干扰通过胰岛素受体(IR)或IGF1R的信号传导。具体地,如本文所述的抗体或其片段不应当抑制由胰岛素诱导的AKT磷酸化,它们自身也

不应当诱导IR的磷酸化或抑制胰岛素诱导的信号传导；另外，如本文所述的抗体或其片段不应当抑制IGF1R的IGF-1诱导的磷酸化。此外，它们不应当结合胰岛素受体。

[0085] 如前所述，所述抗体或其片段可以是sdAb。所述sdAb可以是骆驼来源或来源于骆驼V_HH，因此其可基于骆驼框架区；或者，可将上述CDR可移植至V_{NAR}、V_HH、V_H或V_L框架区上。在另一种替代方案中，可将上述高变环移植至任何来源（例如，小鼠）的其它类型的抗体片段（Fv、scFv、Fab）的框架区或可将CDR移植至其上的具有相似大小和性质的蛋白质（例如，见Nicaise等，2004）。

[0086] 本发明还包括使用本领域中已知的任何合适的方法（例如但不限于CDR移植和镶面（veneering））“人源化”的抗体片段。抗体或抗体片段的人源化包括将序列中的氨基酸用其对应物（如在人共有序列中发现的）替代，而不丧失抗原结合能力或特异性；该方法降低了抗体或其片段当被引入人受试者时的免疫原性。在CDR移植的过程中，可将一个或不止一个本文中定义的CDR融合至或移植至人可变区（V_H或V_L）、其它人抗体（IgA、IgD、IgE、IgG和IgM）、抗体片段的框架区（Fv、scFv、Fab）或可将CDR移植至其上的具有相似大小和性质的蛋白（Nicaise等，2004）。在这种情况下，所述一个或不止一个高变环的构象可能得以保持，并且sdAb对其靶（即，IGF1R）的亲和力和特异性可能受到最小影响。CDR移植在本领域中已知的，并描述于至少以下专利中：美国专利No. 6180370、美国专利No. 5693761、美国专利No. 6054297、美国专利No. 5859205和欧洲专利No. 626390。镶面（在本领域也被称为“可变区表面重修”）包括使抗体或片段的暴露于溶剂的位置人源化；因此，对于CDR构象可能重要的包埋的非人源化残基得以保存，同时针对暴露于溶剂的区域的免疫反应的可能性被最小化。镶面是在本领域中已知的，并且描述于至少以下专利中：美国专利No. 5869619、美国专利No. 5766886、美国专利No. 5821123和欧洲专利No. 519596。本领域技术人员还充分熟悉制备此类人源化抗体片段和人源化氨基酸位置的方法。

[0087] 例如，并且不希望以任何方式限制，特异于IGF1R的分离的或纯化的抗体或其片段可以是

[0088] X₁VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWX₅RQAPGKX₆X₇EX₈VX₉TIDWGDGGX₁₀RYANSVKGRFTISRDNX₁₁KX₁₂TX₁₃YLMNX₁₄LX₁₅X₁₆EDTAVYX₁₇CAMARQSRVNLDVARYDYWGQGT₁₈VTVSS (SEQ ID NO:4)，其中X₁为E或Q；X₂为K或Q；X₃为V或E；X₄为A或P；X₅为V或S；X₆为D或G；X₇为L或R；X₈为F或W；X₉为A或S；X₁₀为A或T；X₁₁为A或S；X₁₂为G或N；X₁₃为M或L；X₁₄为N或R；X₁₅为E或R；X₁₆为P或A；X₁₇为S或Y；以及X₁₈为Q或L，

[0089] 或与其基本上相同的序列。或者，所述分离的或纯化的抗体可包含选自以下序列的序列：

[0090] QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDFEVATIDWGDGGARYANSVKGRFTISRDNAGTMYLQMNLPEDETAVYSCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5)，在本文被称为IGF1R-5；

[0091] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVSTIDWGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGT₁₈TLTVSS (SEQ ID NO:6)，在本文被称为IGF1R-5_H1；

[0092] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVATIDWGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGT₁₈TLTVSS (SEQ ID NO:7)，在本文

中被称为IGF1R-5_H2;

[0093] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKGLEFVATIDWGDGGTRYANSVKGRF TISRDN SKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNL DVARYDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:8), 在本文中被称为IGF1R-5_H3;

[0094] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVATIDWGDGGTRYANSVKGRF TISRDN SKGTMYLQMNSLRAEDTAVYSCAMARQSRVNL DVARYDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:9), 在本文中被称为IGF1R-5_H5;和

[0095] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVSTIDWGDGGTRYANSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNL DVARYDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:10), 在本文中被称为IGF1R-5_H6,

[0096] 或与其基本上相同的序列。

[0097] 基本上相同的序列可以包含一个或多个保守氨基酸突变。在本领域中已知的是, 针对参照序列的一个或多个保守氨基酸突变可产生相较于参照序列在生理学、化学、物理-化学或功能性质上没有实质变化的突变肽;在这种情况下, 参照和突变序列将被认为是“基本相同的”多肽。保守氨基酸取代在本文中被定义为氨基酸残基对另一个具有相似化学性质(例如大小、电荷或极性)的氨基酸的取代。可对sdAb的框架区进行这些保守氨基酸突变, 同时维持上文所列的CDR序列和抗体或片段的CDR的总体结构;从而抗体的特异性和结合得以保持。

[0098] 在非限制性实例中, 保守突变可以是氨基酸取代。这样的保守氨基酸取代可用碱性、中性、疏水性或酸性氨基酸取代同一组的另一种氨基酸。术语“碱性氨基酸”意指具有大于7的侧链pK值的亲水性氨基酸, 其在生理pH下通常带正电荷。碱性氨基酸包括组氨酸(His或H)、精氨酸(Arg或R)和赖氨酸(Lys或K)。术语“中性氨基酸”(也称为“极性氨基酸”)意指具有在生理pH下不带电荷, 但具有至少一个其中由两个原子共享的电子对被所述原子之一更紧密地持有的键的侧链的亲水性氨基酸。极性氨基酸包括丝氨酸(Ser或S)、苏氨酸(Thr或T)、半胱氨酸(Cys或C)、酪氨酸(Tyr或Y)、天冬酰胺(Asn或N)和谷氨酰胺(Gln或Q)。术语“疏水性氨基酸”(也称为“非极性氨基酸”)意指包括根据Eisenberg (1984)的标准化的一致性疏水性标度表现出大于零的疏水性的氨基酸。疏水性氨基酸包括脯氨酸(Pro或P)、异亮氨酸(Ile或I)、苯丙氨酸(Phe或F)、缬氨酸(Val或V)、亮氨酸(Leu或L)、色氨酸(Trp或W)、甲硫氨酸(Met或M)、丙氨酸(Ala或A)和甘氨酸(Gly或G)。“酸性氨基酸”是指具有小于7的侧链pK值的亲水性氨基酸, 其在生理pH下通常带负电荷。酸性氨基酸包括谷氨酸(Glu或E)和天冬氨酸(Asp或D)。

[0099] 序列同一性用于评估两个序列的相似性;其通过计算当就残基位置之间的最大对应性对齐两个序列时, 为相同的残基的百分比来测定。任何已知的方法可用于计算序列同一性;例如, 计算机软件可用于计算序列同一性。不希望是限制性的, 序列同一性可通过软件诸如由Swiss Institute of Bioinformatics维护的NCBI BLAST2服务(和如在ca.expasy.org/tools/blast/找到的)、BLAST-P、Blast-N或FASTA-N, 或本领域中已知的任何其它适当的软件来计算。

[0100] 本发明的基本上相同的序列可以是至少90%相同的;在另一个实例中, 基本相同的序列可以是在氨基酸水平上与本文所述的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%、99%或100%或其之间的任何百分比的同一性。重要的是,基本相同的序列保留了参照序列的活性和特异性。在非限制性实施方案中,序列同一性的差异可因保守氨基酸突变而导致。在非限制性实例中,本发明可涉及包含与本文所述的抗体的序列具有至少95%、98%或99%同一性的序列的抗体或其片段。

[0101] 本发明的抗体或其片段还可以包含辅助重组抗体或其片段的表达、检测或纯化的额外序列。可使用本领域技术人员已知的任何这样的序列或标签。例如,并且不希望是限制性的,所述抗体或其片段可包含靶向或信号序列(例如但不限于ompA)、检测/纯化标签(例如但不限于c-Myc、His₅或His₆)或其组合。在另一个实例中,所述额外序列可以是生物素识别位点,例如由Cronan等在W0 95/04069或Voges等在W0/2004/076670中描述的生物素识别位点。如本领域技术人员还已知的,可将接头序列与额外序列或标签结合使用,或者可用作检测/纯化标签。

[0102] 本发明的抗体或其片段还可呈多价展示形式,在本文中也称为多价呈现。多聚化可通过本领域已知的任何合适的方法来实现。例如,并且不希望以任何方式进行限制,可以使用自组装分子诸如在Zhang等人(2004a;2004b)和W02003/046560中描述的那些自组装分子来实现多聚化,其中通过表达包含本发明抗体或其片段与AB₅毒素家族的B亚基的五聚化结构域的融合蛋白来产生pentabody (Merritt&Hol,1995)。多聚体也可以使用Zhu等人描述的多聚化结构域形成(2010);还可使用由Zhu等(2010)描述的多聚化结构域来形成多聚体;该形式,在本文中被称作“combody”形式,是本发明的抗体或片段与产生多聚体分子的卷曲螺旋肽的融合物。本发明还包括其它形式的多价展示。例如,并且不希望是限制性的,所述抗体或其片段可以作为二聚体、三聚体或任何其它合适的寡聚体存在。这可以通过本领域已知的方法,例如直接连接联结(Nielson等,2000)、c-jun/Fos相互作用(de Kruif & Logtenberg,1996)、“旋钮入孔(Knob into holes)”相互作用(Ridgway等,1996)来实现。

[0103] 本领域已知的用于多聚化的另一种方法是使用Fc结构域(例如但不限于人Fc结构域)二聚化抗体或其片段。Fc结构域可选自多个种类,包括但不限于IgG、IgM或各种亚类,包括但不限于IgG1、IgG2等。在该方法中,将Fc基因连同sdAb基因插入载体以产生sdAb-Fc融合蛋白(Bell等,2010;Iqbal等,2010);重组表达所述融合蛋白,随后进行纯化。例如,并且不希望以任何方式进行限制,多价展示形式可包括与Fc结构域连接的抗IGF1R-5 V_HH的嵌合形式,或具有两个或三个识别独特表位的抗IGF1R-5 V_HH的双或三特异性抗体融合物。此类抗体易于工程化和生产,可以大大延长sdAb的血清半衰期,并且可以是优良的肿瘤成像试剂(Bell等,2010)。

[0104] 刚刚描述的多聚复合物中的Fc结构域可以是本领域已知的任何合适的Fc片段。所述Fc片段可来自任何合适的来源;例如,Fc可具有小鼠或人来源。在具体的非限制性实例中,Fc可以是小鼠Fc2b片段或人Fc1片段(Bell等,2010;Iqbal等,2010)。在具体的非限制性实例中,刚刚描述的多聚化分离的或纯化的抗体或片段可包含SEQ ID NO:42、43、12或13的序列。

[0105] 上述多聚体的每个亚基可以包含相同或不同的本发明的抗体或其片段,其可以具有相同或不同的特异性。另外,根据需要,可使用接头将多聚化结构域连接于抗体或抗体片段;此类接头应当具有足够的长度和合适的组成以提供两个分子的柔性连接,但不应阻碍抗体的抗原结合性质。

[0106] 如本文所述的抗体或其片段可以迁移穿过血脑屏障。脑通过被称为血脑屏障(BBB)的特化内皮组织与身体的其余部分分离。BBB的内皮细胞通过紧密连接来连接,并高效地防止许多治疗性化合物进入脑。除了低水平的囊泡转运以外,BBB的一个特定特征是在BBB的近腔(脑)侧上存在酶促屏障和ATP-依赖性转运蛋白的高水平表达,所述转运蛋白包括P-糖蛋白(Gottesman等,1993;Watanabe,1995),其将各种分子从脑主动运输至血流中(Samuels,1993)。只有小的(<500道尔顿)和疏水性(Pardridge,1995)分子可以更容易地穿过BBB。因此,如上所述的抗体或其片段特异性结合表面受体、内化进入脑内皮细胞并通过逃避溶酶体降解而经历穿过BBB的转胞吞的能力在神经学领域中是有用的。

[0107] 本发明也包括编码如本文所述的分子的核酸序列。鉴于遗传密码的简并性,许多核苷酸序列将具有编码所述多肽的效果,这是本领域技术人员容易理解的。核酸序列可以经密码子优化以用于在各种微生物中表达。本发明还包括包含刚刚描述的核酸的载体。此外,本发明包括包含所述核酸和/或载体的细胞。

[0108] 本发明还包括使用各种方法学固定在表面上的分离的或纯化的抗体或其片段;例如,并且不希望是限制性的,可将抗体或片段通过His-标签偶联、生物素结合、共价结合、吸附等连接或偶联至表面。本发明的抗体或其片段的固定可用于捕获、纯化或分离蛋白质的各种应用。固体表面可以是任何合适的表面,例如但不限于微量滴定板的孔表面、表面等离子体共振(SPR)传感器芯片的通道、膜、珠粒(诸如基于磁性或基于琼脂糖的珠粒或其它层析树脂)、玻璃、塑料、不锈钢、薄膜或任何其它有用的表面,诸如纳米颗粒、纳米线和悬臂表面。

[0109] 本发明还包括连接于货物分子的如上所述的抗体或其片段。货物分子可以是任何合适的分子,其通过抗体或其片段被递送穿过BBB。货物分子可以具有在约1kD至约200kDa的范围内的分子量;例如,货物分子可以具有约1kDa、5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa、80kDa、85kDa、90kDa、95kDa、100kDa、105kDa、110kDa、115kDa、120kDa、125kDa、130kDa、135kDa、140kDa、145kDa、150kDa、155kDa、160kDa、165kDa、170kDa、175kDa、180kDa、185kDa、190kDa、195kDa或200kDa的分子量,或其之间的任何分子量,或由任何两个前述分子量限定的任何分子量范围。在具体的非限制性实例中,货物分子可具有1kDa(例如,但不限于小分子,例如Cy5.5)、1-10kDa(例如,但不限于肽诸如甘丙肽,3kDa)、约80kDa(例如,但不限于Fc片段、酶、蛋白质、抗体等)或约200kDa(例如,但不限于单克隆抗体)的分子量。

[0110] 例如,并且不希望以任何方式进行限制,货物分子可以是可检测试剂、治疗剂、药物、肽、酶、生长因子、细胞因子、受体陷阱、抗体或其片段(例如,IgG、scFv、Fab、V_HH、V_H、V_L等)、化学化合物、碳水化合物部分、基于DNA的分子(反义寡核苷酸、microRNA、siRNA、质粒)、细胞毒性剂、病毒载体(腺病毒、慢病毒、逆转录病毒载体)、一种或多种装载有任何前述类型的货物分子的脂质体或纳米载体,或一种或多种纳米颗粒、纳米线、纳米管或量子点。如上所述的货物分子可以是可检测试剂。例如,可将IGF1R特异性抗体或其片段连接于放射性同位素、顺磁性标记、荧光团、荧光剂、近红外(NIR;例如Cy5.5)荧光色素或染料、回声微泡、亲和标记、基于蛋白质的可检测分子、核苷酸、量子点、纳米颗粒、纳米线或纳米管或可通过成像方法检测的任何其它合适的试剂。可使用本领域已知的任何方法(重组技术、化学缀合等)将抗体或其片段连接于货物分子。

[0111] 还可通过本领域已知的任何合适的方法将如本文所述的货物分子连接(在本文中也称为“缀合”)于抗体或其片段。例如,并且不希望是限制性的,可通过共价键或离子相互作用将货物分子连接于肽。可通过化学交联反应或使用与任何肽表达系统(诸如基于细菌、酵母或哺乳动物细胞的系统)组合的重组DNA方法学通过融合来实现所述连接。当将货物分子缀合于抗体或其片段时,可以使用合适的接头。用于将抗体或其片段连接于货物分子诸如治疗剂或可检测试剂的方法对于本领域技术人员是公知的。

[0112] 在一个非限制性实例中,货物分子可以是可检测标记、放射性同位素、顺磁性标记诸如钆或氧化铁、荧光团、近红外(NIR)荧光色素或染料、回声微泡、亲和标记(例如生物素、抗生物素蛋白等)、酶或可通过诊断成像方法检测的任何其它合适的试剂。在具体的非限制性实例中,可将抗IGF1R-5或其片段连接于近红外荧光(NIRF)成像染料,例如并且不希望限于Cy5.5、Alexa680、Dylight680或Dylight800。

[0113] 因此,本发明还提供了检测IGF1R的体外方法,包括将组织样品与一种或不止一种连接于可检测试剂的本发明的分离或纯化的抗体或其片段接触。随后可使用本领域已知的检测和/或成像技术检测IGF1R-抗体复合物。刚刚描述的方法中的组织样品可以是任何合适的组织样品,例如但不限于血清样品、血管组织样品、肿瘤组织样品或脑组织样品;组织样品可来自人或动物受试者。在本领域技术人员已知的合适条件下进行接触步骤,以用于形成抗体或其片段与IGF1R之间的复合物。检测步骤可以通过本领域已知的任何合适的方法来完成,所述方法是例如,但不限于光学成像、免疫组织化学、分子诊断成像、ELISA、成像质谱法或其它合适的方法。例如,并且不希望以任何方式进行限制,连接于可检测试剂的分离的或纯化的抗体或其片段可用于免疫测定(IA),包括,但不限于酶IA(EIA)、ELISA、“快速抗原捕获”、“快速层析IA和“快速EIA”。(例如,见Planche等,2008;Sloan等,2008;Rüssmann等,2007;Musher等,2007;Turgeon等,2003;Fenner等,2008)。

[0114] 本发明还提供了检测受试者中的IGF1R表达的体内方法。该方法包括向受试者施用一种或不止一种与可检测试剂连接的如本文所述的分离的或纯化的抗体或其片段,随后检测结合于IGF1R的标记抗体或其片段。检测步骤可包括本领域已知的任何合适的方法,例如,但不限于PET、SPECT或荧光成像或任何其它合适的方法。刚刚描述的方法可用于检测血管或组织(例如,但不限于肿瘤组织)中的IGF1R的表达。

[0115] 上述方法中的体内检测步骤可以是定量方式的用于诊断目的的全身成像或在特定部位例如但不限于脑血管或脑肿瘤血管的局部成像,以评估疾病的进展或宿主对治疗方案的反应。如上所述的方法中的检测步骤可以是免疫组织化学或非侵入性(分子)诊断成像技术,包括但不限于:

[0116] • 光学成像;

[0117] • 正电子发射断层摄影术(PET),其中可检测试剂为同位素诸如 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{124}I 、 ^{76}Br 、 ^{82}Rb 和 ^{68}Ga , ^{18}F 是临床上使用最多的;

[0118] • 单光子发射计算机体层摄影(SPECT),其中可检测试剂为放射性示踪元素诸如 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{201}Tl 、 ^{133}Xe ,取决于具体应用;

[0119] • 磁共振成像(MRI),其中可检测试剂可以是例如,但不限于钆、氧化铁纳米颗粒和碳涂覆的铁-钴纳米颗粒,从而增加MRI对斑块检测的灵敏度。

[0120] • 超声造影(Contrast-Enhanced Ultrasonography)(CEUS)或超声,其中可检测

试剂是至少一种声学活性和充气微泡。超声是用于人疾病的筛选和早期检测的广泛的技术。其比MRI或闪烁扫描术便宜,且比分子成像模式诸如放射性核素成像安全,因为其不涉及辐照。

[0121] 本发明还提供了将目标分子转运穿过血脑屏障的方法。该方法包括向受试者施用连接于本文所述的抗体或其片段的分子;所述抗体或其片段迁移穿过血脑屏障。所述分子可以是任何期望的分子,包括如前所述的货物分子;可以使用任何合适的方法将该分子“连接”于抗体或其片段,所述方法包括,但不限于缀合或以融合蛋白形式表达。施用可以通过任何合适的方法进行,例如肠胃外施用,包括但不限于静脉内(iv)、皮下(sc)和肌内(im)施用。在该方法中,本发明的抗体或其片段将目标分子“摆渡”穿过BBB至其脑靶标。

[0122] 本发明还包括包含一种或不止一种如本文所述的分离的或纯化的抗体或其片段的组合物。所述组合物可包含如上所述的单一抗体或片段,或可以是抗体或片段的混合物。此外,在包含本发明的抗体或片段的混合物的组合物中,抗体可具有相同的特异性,或可在它们的特异性方面不同;例如,并且不希望以任何方式进行限制,所述组合物可包含特异于IGF1R(相同或不同的表位)的抗体或其片段。

[0123] 组合物还可包含药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体。所述稀释剂、赋形剂或载体可以是本领域已知的任何合适的稀释剂、赋形剂或载体,并且必须与组合物中的其它成分相容,与组合物的递送方法相容,并且对于组合物的接受者是无害的。所述组合物可以是任何合适的形式;例如,所述组合物可以以悬浮液形式、粉剂形式(例如,但不限于冻干的或胶囊化的)、胶囊或片剂形式提供。例如并且不希望是限制性的,当将组合物以悬浮液形式提供时,载体可包括水、盐水、合适的缓冲液或用于改善溶解性和/或稳定性的添加剂;在具有适当pH的缓冲液中进行产生悬浮液的重建以确保抗体或其片段的活力。干粉还可包含改善稳定性的添加剂和/或增加体积/容积的载体;例如,并且不希望是限制性的,干粉组合物可包含蔗糖或海藻糖。在具体的非限制性实例中,可配制组合物以将抗体或其片段递送至受试者的胃肠道。因此,所述组合物可包括包封、延时释放或用于递送抗体或其片段的其它合适技术。制备包含本发明化合物的合适组合物在本领域技术人员的能力范围内。

[0124] 本发明还包括定量被递送穿过受试者的BBB的货物分子的量的方法,其中将所述货物分子与一种或不止一种本文所述的分离的或纯化的抗体或其片段连接,所述方法包括:

[0125] a) 从受试者收集脑脊髓液(CSF);和

[0126] b) 使用靶向蛋白质组学方法定量CSF中连接于一种或不止一种抗体或其片段的货物分子的量。

[0127] 货物分子可以是任何期望的分子,包括如前所述的货物分子;所述分离的或纯化的抗体或其片段迁移穿过血脑屏障;并且可使用任何合适的方法将该分子“连接”于抗体或其片段,所述方法包括,但不限于如前所述的缀合或以融合蛋白形式表达。在上述方法中,使用本领域已知的任何合适的方法从受试者收集CSF。用于步骤b)中的靶向蛋白质组学方法所需的CSF的量可在约1至10 μ l之间;例如,所需CSF的量可以是约1.0 μ l、1.5 μ l、2.0 μ l、2.5 μ l、3.0 μ l、3.5 μ l、4.0 μ l、4.5 μ l、5.0 μ l、5.5 μ l、6.0 μ l、6.5 μ l、7.0 μ l、7.5 μ l、8.0 μ l、8.5 μ l、9.0 μ l、9.5 μ l或10 μ l,或其间的任何量,或由刚刚所述的量限定的任何范围。可在收集CSF之前向受试者施用连接于货物分子的抗体或片段。可能需要连接于货物分子的抗体或片段

的施用与递送穿过BBB之间的合适延迟。延迟可以是施用连接于货物分子的抗体或片段后至少30分钟；例如并且不希望以任何方式进行限制，延迟可以是至少30分钟、1小时、1.5小时、2小时、2.5小时、3小时、3.5小时、4小时、4.5小时或5小时。用于定量连接于货物分子的一种或不止一种抗体或其片段的量的靶向蛋白质组学方法可以是本领域已知的任何合适的方法。例如并且不希望是限制性的，靶向蛋白质组学方法可以是质谱法，例如但不限于使用同位素标记的内标的多反应监测 (MRM-ILIS；见例如Haqqani等, 2013)。MRM是有利的，因为其允许对生物样品中的未标记的靶向分析物（例如，如本文所述的抗体或其片段）进行快速、灵敏和特异性定量。测定的多重性能可允许定量抗体或其片段和货物分子两者。

[0128] 本发明将在以下实施例中进一步说明。然而，应当理解的是，这些实施例仅用于说明目的，不应以任何方式用于限制本发明的范围。

[0129] 实施例1: IGF1R重组片段的纯化

[0130] 制备IGF1R的细胞外结构域的933个氨基酸长的重组片段（图1中的灰色框所示；也见SEQ ID NO:14的氨基酸1-933）。该片段包含N-末端30个氨基酸的信号肽、完整的 α 亚基、弗林蛋白酶切割位点 (RKRR, SEQ ID NO:15；分离 α 和 β 亚基) 以及 β 亚基的大部分胞外部分（图1和图2）。

[0131] 克隆。使用以下引物通过PCR扩增目标IGF1R胞外域的序列：

[0132] 5'-CGGGATCCGCCACCATGAAGTCTGGCTCCGGAG-3'（正向；SEQ ID NO:16）

[0133] 5'-GCTCTAGATCAGAAGTTTTTCATATCTGTGTTTGG-3'（反向；SEQ ID NO:17）

[0134] 并亚克隆入Puc19的SmaI位点。随后将IGF1R⁹³³序列亚克隆入pCDN4/myc-His (Invitrogen) 以产生pIGF1R⁹³³-His，其允许表达如先前所述的His-标记的胞外域 (Samani等2004)。

[0135] 瞬时转染。如先前所述，在包装细胞系293SF-PacLV中产生表达IGF1R⁹³³-His的慢病毒颗粒 (Broussau等, 2008)。简言之，使用聚乙烯亚胺，利用载体转染细胞。在转染后5小时，向细胞中添加含有1 μ g/ml多西环素和10 μ g/ml cumate的新鲜培养基 (LC-SFM)，在48-72小时后收集含有LV颗粒的上清液，通过在20%蔗糖垫上以100,000xg在4℃下超速离心2小时进行浓缩 (Gaillet B等人, 2007)，将其重悬于补充有1%FBS的LC-SFM培养基中，并于-70℃贮存直至使用。

[0136] 稳定表达。通过使用先前描述的方案 (Gaillet B.等2010) 利用各自的慢病毒颗粒转导293SF-Cum2细胞系来产生稳定的细胞系293SF-cum2-CR5-IGF1R-His。简言之，将 $0.5-1.0 \times 10^5$ 293SF-Cum2细胞于24孔板中接种在200 μ l不含硫酸葡聚糖的LC-SFM培养基中。通过将200-500 μ L LV与8 μ g/mL的聚凝胺混合并在37℃下温育30分钟来制备LV悬浮液。接种后4小时，将新鲜制备的LV悬浮液添加至细胞中。24小时后，向细胞中加入500 μ L补充有硫酸葡聚糖的培养基。为了升高表达水平，在3-4天的细胞回收后，使用相同的方案将细胞再转导多达6次。最后，将细胞在6孔板和摇瓶中进行扩增。

[0137] 大规模蛋白生产和纯化。将鉴定为最高生产者的克隆在振荡器或旋转瓶中进行扩增。通过在新培养基中添加1 μ g/ml的cumate来开始蛋白质生产，随后在37℃下温育24小时，和在30℃下温育4-8天。通过离心除去细胞，并使用切向流过滤系统 (Pellicon ultrafiltration cassette, EMD Millipore) 过滤和浓缩 (10x) 上清液。

[0138] 按照制造商的说明书，使用HisPrep柱 (GE Healthcare) 纯化IGF1R⁹³³-His。简言

之,将浓缩的样品施加于用50mM磷酸钠、300mM NaCl、5mM咪唑pH7.5平衡和洗涤的His-prep FF (16/10) 柱 (GE Healthcare),并用50mM磷酸钠、300mM NaCl、500mM咪唑pH7.5进行洗脱。将利用0.1M柠檬酸钠pH4.5至pH2.5的梯度洗脱用于洗脱蛋白质并合并峰级分。使用50kDa截留膜或脱盐柱利用含有50mM磷酸钠、150mM NaCl和0.01% Tween-80, pH7.2的缓冲液,通过超滤进行缓冲液交换。通过SDS-PAGE验证两种蛋白质的纯度,并将它们-80℃下贮存直至使用(参见随后的实施例)。

[0139] 实施例2:美洲驼免疫和血清反应

[0140] 为了分离靶向IGF1R的细胞外结构域的V_HH,用实施例1中获得的重组IGF1R⁹³³-His片段免疫美洲驼。

[0141] 通过皮下、下背部注射IGF1R⁹³³-His重组抗原(实施例1)免疫一只雄性美洲驼(Lama glama)。在第1天,将在PBS中稀释至1ml的200μg抗原与1ml弗氏完全佐剂(Sigma, St.Louis, MO)一起注射。在第22、36和50天进行100μg IGF1R⁹³³-His抗原加上弗氏不完全佐剂(Sigma)的另外3次注射。在第77天进行不含佐剂的100μg抗原的最终注射。在第1天首次注射之前抽取免疫前血,并用作阴性对照。在第29、43、57和84天收集血液(10-15ml)。立即处理来自第84天的血液以分离外周血单核细胞(PBMC)。用磷酸盐缓冲盐水(PBS)以1:1稀释血液,并使用Lymphoprep管(Axis Shield)从血液纯化PBMC。计数细胞,并将其以约1x 10⁷个细胞的等份在-80℃下贮存,以备将来使用。

[0142] 在第57天通过ELISA分析免疫前和免疫后总血清对IGF1R⁹³³-His抗原的特异性反应。如前所述对来自第84天的美洲驼血清进行分级分离(Doyle等,2008)。通过ELISA分析所得级分A1(HCAb)、A2(HCAb)、G1(HCAb)和G2(cIgG)对IGF1R⁹³³-His抗原的特异性结合。简言之,将在PBS中稀释的5μg IGF1R⁹³³-His重组抗原在96孔Maxisorp板(Nalgene, Nunc)中温育过夜(100μl/孔, 18h, 4℃)以包被板。用牛血清白蛋白(BSA)封闭平板,用PBS-T(PBS+0.05% (v/v) Tween-20)进行洗涤,随后施用免疫前总血清、免疫后总血清(第57天)和分级分离的血清(第84天)的系列稀释物。在室温下温育1.5小时后,用PBS-T洗涤板,随后添加山羊抗美洲驼IgG(PBS中1:1000)并将板在37℃下温育1小时。在用PBS-T洗涤后,添加猪抗山羊IgG-HRP缀合物(PBS中1:3,000),将平板在37℃下温育1小时。在加入100μl/孔的TMB底物(KPL, Gaithersburg, MD)之前进行最后的PBS-T洗涤;将底物温育10分钟。用100μl/孔的1M H₃PO₄终止反应。在450nm读取吸光度。

[0143] 实施例3:IGF1R-结合性V_HH的文库构建和选择

[0144] 基于从实施例2中的PBMC分离的RNA构建超免疫的美洲驼V_HH文库。

[0145] 基本上如先前所述(Arbabi-Ghahroudi等,2009a,2009b; Tanha等,2003)进行文库构建和淘选。使用QIAamp RNA Blood Mini试剂盒(Qiagen)从免疫(实施例2)后84天收集的约10⁷个PBMC分离总RNA。将约5μg的总RNA用作使用First-Strand cDNA Synthesis试剂盒(GE Healthcare),利用寡聚dT引物的第一链cDNA合成的模板。利用以下3个可变区特异性正义引物:

[0146] MJ1:5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCSMKGTGCAGCTGGTGGAKTCTGGGGGA-3'(SEQ ID NO:18)

[0147] MJ2:5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGA-3'(SEQ ID NO:19)

[0148] MJ3:5'-GCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGCTCAGGTACAGCTGGTGGAGTCT-3'(SEQ ID NO:20),

[0149] 和2个反义CH₂-特异性引物:

[0150] CH₂:5'-CGCCATCAAGGTACCAGTTGA-3' (SEQ ID NO:21)

[0151] CH_{2b3}:5'-GGGGTACCTGTCATCCACGGACCAGCTGA-3' (SEQ ID NO:22)

[0152] 的等摩尔混合物扩增cDNA和两个反义CH₂-特异性引物。

[0153] 简言之,将PCR反应混合物设置在具有以下组分的50μl的总体积中:1-3μl cDNA、5pmol MJ1-3引物混合物、5pmol CH₂或CH_{2b3}引物、5μl 10x反应缓冲液、1μl 10mM dNTP、2.5个单位的Taq DNA聚合酶(Hoffmann-La Roche)。PCR方案由以下步骤组成:(i) 94℃的初始步骤,持续3分钟,(ii) 随后30个循环:94℃持续1分钟,55℃持续30秒,72℃持续30秒,和(iii) 最后的延伸步骤,在72℃持续7分钟。将扩增的PCR产物在2%琼脂糖凝胶上电泳,观察到两条主要条带:约850bp的条带(对应于常规IgG)和约600bp的第二条带(对应于骆驼重链抗体的V_HH-CH₂区)。使用QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen)切割和纯化较小的条带,并在第二PCR中使用1μl (30ng) DNA模板,各5pmol的MJ7引物(5'-CATGTGTAGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCC-3' SEQ ID NO:23)和MJ8引物(5'-CATGTGTAGATTCCTGGCCGGCCTGGCCTGAGGAGACGGTGACCTGG-3' SEQ ID NO:24),5μl的10x反应缓冲液,1μl的10mM dNTP,2.5个单位的Taq DNA聚合酶在50μl的总体积中对其进行再扩增。PCR方案由以下步骤组成:(i) 初始步骤,94℃持续3分钟,(ii) 随后30个循环:94℃持续30秒,57℃持续30秒和72℃持续1分钟,和(iii) 最后的延伸步骤,72℃持续7分钟。使用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen)纯化扩增的PCR产物,其范围在340bp与420bp之间并对应于重链抗体的V_HH片段,用Sfi I限制性内切酶(New England BioLabs)进行消化,并使用相同试剂盒进行再纯化。

[0154] 在50℃下用Sfi I消化80μg的pMED1噬菌粒载体(Arbabi-Ghahroudi等,2009b)过夜。为了使自身连接最小化,加入20个单位的Xho I和Pst I限制性内切酶以切割切下的片段,并将消化反应在37℃下再温育2小时。按照制造商的说明书,使用LigaFast快速DNA连接系统(Promega)将60μg消化的噬菌粒DNA与6μg消化的(Sfi I在50℃持续5小时)V_HH片段(摩尔比为1:1)在室温下连接3小时。使用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen)纯化连接的质粒,在100μl的终体积中洗脱,并如所述的(Arbabi-Ghahroudi等,2009b),使用每个转化反应5μl的经连接的DNA等分试样转化入电感受态TG1大肠杆菌(E.coli)(Stratagene)。如Arbabi-Ghahroudi等,2009b中所述,测定文库大小为 5×10^7 。对20个克隆进行测序,其含有所有独特的V_HH序列。在2% (w/v) 葡萄糖存在的情况下,将包含文库的大肠杆菌在37℃、250rpm生长2-3小时。随后将细菌沉淀,重悬于含有35% (v/v) 甘油的2xYT/Amp/Glu(具有100μg/ml氨苄青霉素和2% (w/v) 葡萄糖的2xYT培养基)中,并以小的等分试样于-80℃贮存。

[0155] 淘选实验基本上如(Arbabi等,1997)中所述进行。将2毫升的文库(2.0×10^{10} 个细菌)在冰上解冻,随后37℃下于2xYT/Amp/Glu中生长约2小时($A_{600}=0.4-0.5$)。随后在37℃下用20×过量的M13K07辅助噬菌体(New England Biolabs)感染大肠杆菌,持续1小时。随后将培养物在4℃下离心,将感染的细菌沉淀重新悬浮于200ml含有50μg/ml卡那霉素的2xYT/Amp中,并在37℃和250rpm下温育。将培养上清液中的噬菌体颗粒与1/5体积的20% PEG 8000/2.5M NaCl一起在冰上温育1h,并以10,000rpm离心15分钟。将噬菌体沉淀重悬于1.5ml无菌PBS中,滴定并用作用于淘选的输入噬菌体。对于第1轮淘选,将96孔MaxisorpTM平板在4℃下用每孔100μl PBS中的10μg重组IGF1R⁹³³-His包被过夜。用PBS漂洗孔,并用PBS加1% (w/v) 酪蛋白在37℃封闭2小时。将约 10^{12} 个噬菌体添加至封闭的孔并在37℃温育2小时。

在用PBS/0.1% (v/v) Tween 20进行10×洗涤后,用0.1M三乙胺洗脱结合的噬菌体,中和(50 μl 1M Tris-HCl, pH7.4),将其与指数生长的TG1大肠杆菌混合。对洗脱的噬菌体进行滴定,将感染的细菌用M13K07进行超感染并在37℃下生长过夜。将来自过夜培养物的纯化的噬菌体用作下一轮淘选的输入。继续进行另外三轮淘选。使用与上述相同的方案,除了用于包被平板的重组抗原的量分别在第二轮、第三轮和第四轮淘选中减少至7μg、5μg和5μg。

[0156] 对第4轮淘选后获得的个体TG1集落进行噬菌体ELISA筛选,基本上如其它地方所述(Doyle等,2008)地进行,除了使用5μg/ml IGF1R⁹³³-His重组抗原包被微量滴定板。将所有阳性克隆送去用于DNA测序。选择产生高噬菌体ELISA信号的独特克隆用于使用已知方法进行大规模表达和纯化(见实施例4)。鉴定出称为IGF1R-5的克隆用于进一步研究;其序列如下所示。

[0157] QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVATIDWGDGGARYANSVKGRFTISRDNAGKTMYLQMNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:5)

[0158] 实施例4: IGF1R-5的人源化

[0159] 为了避免美洲驼来源的IGF1R-5在用作治疗剂的BBB载体时的潜在免疫原性,通过V_HH中的“骆驼”残基的突变对骆驼来源的sdAb进行“人源化”。应当指出的是,为了人源化的目的,使用Kabat编号(Kabat等,1991)来鉴定CDR残基。

[0160] 骆驼V_HH的3D结构建模。使用针对蛋白质数据库(PDB)的BLAST搜索鉴定类似于IGF1R-5 V_HH的模板结构。使用基于4KRP|B(PDB代码|链ID)(作为主模板)的同源性建模,利用来自4FHB|D的附加信息来近似IGF1R-5的3D结构。随后通过将主模板结构突变为IGF1R-5序列来构建IGF1R-5 V_HH结构;这包括在各个位置的35个突变。随后通过利用AMBER力场的能量最小化和约束的逐步释放(范围从首先被松开的CDR环至仅在最后阶段才被完全松开的框架区的主链重原子)来精制IGF1R-5 V_HH模型。随后通过蒙特卡罗最小化(MCM)构象取样来精制V_HH模型的CDR-H3环,其中对CDR-H3区域中的二面角进行取样,随后进行能量最小化。

[0161] 用于骆驼CDR的人重链框架的选择。通过针对人种系数据库(VBASE),针对其它序列数据库(Genbank和SwissProt)和针对人框架共有序列的标准序列同源性比较来选择人重链框架。进行BLAST搜索以在匹配CDR的长度的同时仅检索框架区(即,排除CDR)中具有最高同源性的序列匹配。针对对应于人VH-3亚组的IGF1R-5 V_HH鉴定最接近的人框架。除了人VH-3共有序列以外,还保留了几个与IGF1R-5 V_HH最相似的人种系VH-3框架序列。IGF1R-5 V_HH框架序列需要18个突变,以达到用于100%框架人源化的共有人VH-3序列。

[0162] 用于回复突变的框架残基的鉴定。表征IGF1R-5 V_HH模型及其完全人源化的对应物以估计人类性指数、抗原接触倾向指数,以描绘CDR、典型残基、罕见框架残基、潜在的糖基化位点、包埋的残基、Vernier区残基和与CDR的接近度。这些数据的分析提示了针对抗IGF1R V_HH的几种人源化变体的设计,每个变体在不同位置上的亲代骆驼残基具有不同数目的回复突变。针对IGF1R-5 V_HH(IGF1R-5H1、H2、H3、H5、H6)设计了5个人源化变体,其中变体含有多达10个回复突变。这些骆驼回复突变残基中的一些被埋在V_HH结构域核心内部,因此预期不会诱导免疫应答。

[0163] 实施例5:选定的V_HH构建体的表达和纯化

[0164] 将实施例3中鉴定的IGF1R-5和实施例4中构建的人源化形式(在本文中统称为

“V_HH构建体”)亚克隆入表达质粒中用于蛋白表达和纯化。

[0165] 使用MiniPrep试剂盒 (Qiagen) 纯化含有IGF1R-5克隆的DNA的噬菌粒载体。从pMED1噬菌粒载体PCR扩增IGF1R结合性V_HH IGF1R-5,使用以下引物添加N末端BbsI切割位点和C末端BamHI切割位点:

[0166] 5'-TATGAAGACACCAGGCCAGGTAAAGCTGGAGGAGTCT-3' (正向;SEQ ID NO:25)

[0167] 5'-TTGTTTCGGATCCTGAGGAGACGGTGACCTG-3' (反向;SEQ ID NO:26)

[0168] 按照制造商的说明书,用BbsI和BamHI限制性内切酶 (NEB) 消化PCR片段和pSJF2H表达载体。使用与在Arbabi-Ghahroudi等 (2009b) 中所述的那些方法相似的方法将消化的IGF1R-5 V_HH片段连接至消化的pSJF2H表达载体中;随后将连接产物转化至电感受态TG1大肠杆菌中。在LB琼脂板+100μg/ml氨苄青霉素上选择克隆,并通过DNA测序验证。

[0169] 使用与上述方法类似的方法合成人源化克隆并将其直接克隆入pSJF2H,随后转化至大肠杆菌TG1中;如上所述选择克隆。

[0170] 蛋白表达。将所有IGF1R-5 V_HH构建体在TG1大肠杆菌中表达。将LB/amp/glu培养基 (补充有100μg/ml氨苄青霉素和1%葡萄糖的LB培养基) 中的过夜培养物在1L LB/amp/glu中以1:100稀释进行传代培养。通过添加IPTG至终浓度为0.2mM来在0.8-0.9的OD₆₀₀下诱导蛋白表达。将培养物在37℃以220rpm生长过夜。通过以6000rpm离心12分钟来使细菌沉淀;将沉淀重悬于35ml冷TES缓冲液 (0.2M Tris-Cl pH8.0, 20%蔗糖, 0.5mM EDTA) 中。将悬浮液在冰上温育,并每10分钟涡旋一次,持续1小时。随后添加45ml冷TES (总体积的1/8体积) 并立即涡旋1分钟,此后每10分钟涡旋15秒,持续1小时,以从周质提取蛋白质。将所得的含有V_HH的上清液通过0.22μm膜过滤,并在固定化金属亲和层析 (IMAC) 缓冲液A (10mM HEPES pH 7.0, 500mM NaCl) 中透析过夜。如先前所述 (Arbabi-Ghahroudi 2009b) 使用HiTrap Chelating HP柱 (GE Healthcare) 纯化蛋白质。通过SDS-PAGE和免疫印迹分析洗脱的蛋白质级分,随后如先前所述 (Arbabi-Ghahroudi 2009b) 针对PBS进行透析。合并纯化的蛋白质级分,并针对PBS+3mM EDTA进行透析,测定蛋白质浓度。

[0171] 实施例6:抗IGF1R V_HH IGF1R-5的生物物理学表征

[0172] 使用大小排阻层析、表面等离子体共振分析和解链温度分析来表征在实施例5中表达和纯化的抗IGF1R V_HH IGF1R-5构建体。还进行了IFG1R-5 V_HH的表位作图。

[0173] 大小排阻色谱:将应用Superdex™ 75 (GE Healthcare) 的大小排阻层析用于消除任何可能的聚集体,随后进行表面等离子体共振 (SPR) 分析。所用的运行缓冲液是含有150mM NaCl、3mM EDTA和0.005%P20的10mM HEPES, pH7.4。通过测量280nm波长处的吸光度来测定用于SPR分析的级分的浓度。SEC分析表明,基于相较于标准品的洗脱体积,抗体是单体的 (图3A)。

[0174] 解链温度:通过CD光谱法,使用解链温度 (T_m) 测量来评价IGF1R-5 V_HH构建体的热稳定性。使用配备有Peltier热电型温度控制系统的Jasco J-815分光偏振计 (Jasco, Easton, MD, USA) 进行实验。使用路径长度为1mm的CD比色皿。在扫描速度为50nm/分钟,数字积分时间 (DIT) 为4秒,带宽为1nm,数据间距为1nm以及积分时间为1秒的条件下,在180-260nm的波长范围内记录光谱。为了测量解链温度或T_m (Greenfield, 2006a; 2006b), 在30℃至96℃的温度范围内记录CD光谱。从对应于缓冲液光谱的空白中减去所有CD光谱。用在100mM磷酸钠缓冲液, pH 7.4中的50μg/mL V_HH进行测量。对于所有变体,在210nm监测热诱

导的蛋白质变性。通过所描述的公式 (Greenfield, 2006a; 2006b) 获得折叠分数 (ff) :

$$[0175] \quad ff = ([\theta]_T - [\theta]_U) / ([\theta]_F - [\theta]_U) \quad \text{公式I}$$

[0176] 其中 $[\theta]_T$ 是在任何温度下的摩尔椭圆率, $[\theta]_F$ 是30℃下完全折叠的蛋白质的摩尔椭圆率, $[\theta]_U$ 是90℃下未折叠蛋白质的摩尔椭圆率。使用绘图软件GraphPad Prism (4.02版, Windows版), 通过非线性回归曲线拟合 (Boltzman S形方程) 获得为解折叠曲线 (折叠分数 (ff) 相对于温度) 的中点的解链温度 (T_m)。V_HH的解链温度 (T_m) 是基于椭圆率数据假设两态系统来测定的, 其与对应于急剧转变至变性的所观察到的变性曲线一致 (图2D)。 T_m 值取自折叠分数 (ff) 相对温度的S形变性曲线的中点。结果示于图3B中。相较于IGF1R-5 V_HH, 所有人源化V_HH的解链温度得到改善 (更高), 表明改善的生物物理性质。

[0177] 表面等离子体共振 (SPR): 使用BIAcore 3000 (GE Healthcare) 通过SPR测定单体IGF1R-5 V_HH构建体与固定化重组人IGF1R (实施例1) 的结合。将约3000个共振单位 (RU) 的重组人IGF1R (R&D Systems) 固定在传感器芯片CM5上。使用由制造商提供的胺偶联试剂盒, 在pH4.0的10mM乙酸盐中以10μg/ml的浓度进行固定化。用pH 8.5的1M乙醇胺封闭剩余的结合位点。将乙醇胺封闭的表面用作参照表面。对于结合研究, 在25℃于含有150mM NaCl、3mM EDTA和0.005%表面活性剂P20的10mM HEPES, pH7.4 (聚氧乙烯脱水山梨醇; GE Healthcare) 中进行分析。以20μl/分钟的流速将各种浓度的IGF1R-5 V_HH注射至固定化人IGF1R和参照表面上方。利用pH 2.0的10mM甘氨酸和24秒的接触时间再生表面。用BIAevaluation 4.1软件 (GE Healthcare) 分析数据。结果 (见图3C) 显示数据良好拟合至1:1模型, 得到表1中所示的 K_D 。这表明IGF1R-5和人造化变体是针对人IGF1R的细胞外结构域的高亲和性单结构域抗体结合剂。

[0178] 表1. 如通过表面等离子体共振测定的IGF1R-5 V_HH构建体对于人 (h) IGF1R的亲和力

[0179]

	h-IGF1R 表面		
	K _D (nM)	k _d (s ⁻¹)	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)
IGF1R-5	0.6	3.4 x 10 ⁻⁴	5.3 x 10 ⁵
IGF1R-5 H1	11.0	4.3 x 10 ⁻³	3.9 x 10 ⁵
IGF1R-5 H2	7.5	2.9 x 10 ⁻³	3.8 x 10 ⁵
IGF1R-5 H3	0.8	4.1 x 10 ⁻⁴	5.2 x 10 ⁵
IGF1R-5 H5	1.6	8.0 x 10 ⁻⁴	5.0 x 10 ⁵
IGF1R-5 H6	1.7	7.2 x 10 ⁻⁴	4.3 x 10 ⁵

[0180] 进一步使用SPR分析来证明IGF1R-5 V_HH不与受体上与天然配体IGF-1的表位相同的表位结合 (图3D)。如上所述设置、进行和分析实验。通过以20μl/分钟的流速, 5分钟的注射时间, 注射浓度为25x K_D 的IGF1R-5 V_HH, 随后共注射浓度均为25x K_D 的IGF1R-5和人造化配体来研究对新鲜固定的人IGF1R表面的结合。通过用运行缓冲液洗涤来再生表面。IGF1R-5 V_HH结合受体, 在非再生表面上达到约38RU的饱和度。在IGF1R-5 V_HH的存在下, IGF-1配体

能够以预期~70RU (相对单位) 结合IGF1R受体。IGF1R-5 V_HH和IGF-1两者同时结合受体表明两者结合不同的表位。IGF1R-5 V_HH和胰岛素受体的SPR分析表明IGF1R-5 V_HH不能结合胰岛素受体 (数据未显示)。尽管IGF1R-5结合再生表面相对新鲜的非再生表面的相对单位 (RU) 不同,但在两个表面上测定的结合亲和力是高度相似的,并且可在不同的实验中再现 (数据未显示)。

[0181] 表位作图:表位作图服务由Pepscan (Lelystad, The Netherlands; pepscan.com) 提供。IGF1R的全长序列如图2所示。基于表位作图结果和相关胰岛素受体结构的三维呈现 (如在蛋白质数据库登录号2DTG中公开的,未显示), IGF1R-5 V_HH所结合的表位被建议为FENFLHNSIFVPR (SEQ ID NO:11)。

[0182] 实施例7:IGF1R-5被脑内皮细胞内化

[0183] 为了确定IGF1R-5是否被内化至细胞中,将svARBE C细胞与Cy5-5标记的IGF1R-5一起温育。

[0184] 用NHS-Cy5.5标记IGF1R-5 V_HH。标记通过伯胺 (在蛋白质的N-末端和/或赖氨酸侧链上) 与NHS酯之间的稳定的胺键进行。通常,将pH9.3的10%v/v的1M碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液 (759mM碳酸氢盐, 258mM碳酸盐) 添加至在PBS (1.06mM KH₂PO₄, 154mM NaCl, 5.6mM Na₂HPO₄) pH7.4中制备的4mg V_HH, 调节终浓度为4mg/mL。以2X摩尔比的染料对蛋白质添加以10mg/mL溶解于DMSO中的NHS-Cy5.5。将混合物在室温下于1.5mL微量离心管中倒置数次,温育2小时。温育后,使用Zeba Spin脱盐柱, 7K MWC0 (Pierce) 过滤未结合的染料和反应双产物,并使用Beckman DU530分光光度计 (Beckman Coulter) 测量。将Cy5.5-标记的IGF1R-5或FC5作为阳性对照 (1mg/ml) 与SV40永生化大鼠脑内皮细胞 (svARBE C) 在4℃温育 (图4, 顶图), 从而只允许被动的非特异性转运机制发生,或在37℃温育 (图4, 底图), 以允许主动转运诸如受体介导的胞吞发生。用小麦胚凝集素和DAPI进行共染色以分别显现细胞表面和细胞核。在荧光显微镜下观察细胞并捕获图像。

[0185] 如果4℃下温育,发现IGF1R-5在细胞外与小麦胚凝集素染色的细胞膜共定位。相反地,当在37℃温育时,IGF1R-5累积在细胞内的囊泡 (可能是核内体) 中,这表明抗体通过主动转运机制内化至细胞中。对于FC5观察到类似的行为,其先前被显示经由笼形蛋白包被的小泡通过能量依赖的胞吞作用进入细胞 (Abulrob等2005)。

[0186] 实施例8:IGF1R-5-Fc构建体的产生

[0187] 制备包含与可结晶的鼠抗体片段 (Fc; mFc2b) 融合的IGF1R-5V_HH的构建体,表达并分离所述构建体。制备C末端构建体 (IGF1R-5-mFc) 和N末端IGF1R-5小鼠Fc融合构建体 (mFc-IGF1R-5),其序列示于图5A-B中,分子的示意图示于图5C中。融合蛋白 (~80kDa) 还包含在图5A-B的序列中未显示的N-末端信号肽 (MEFGLSWVFLVAILKGVQC; SEQ ID NO:40), 因为其在分泌后被切割。

[0188] 将IGF1R-5 cDNA克隆入含有小鼠Fc2b片段的哺乳动物表达载体pTT5 (Durocher 2002)。通过混合25ml质粒DNA溶液与25ml含有1.125mg的PEI proTM (PolyPlus Transfection) 的PEI溶液 (两者均在F17培养基中制备), 预形成所得载体的多聚复合物 (polyplex), 所述质粒DNA溶液含有187.5μg pTT5-IR5mFc2b, 56.25μg pTT-AKTdd (蛋白激酶B的活化突变体), 18.75μg pTTo-GFP (以监测转染效率) 和112.5μg鲑鱼睾丸DNA (Sigma-Aldrich)。将混合物温育10分钟,随后添加至细胞培养物中。用50ml多聚复合物转染稳定表

达截短的EBNA1蛋白(CHO-3E7)并在F17培养基(Invitrogen)中生长的CHO细胞的450ml培养物。转染后24小时,向培养物中加入12.5ml 40% (w/v) 胰蛋白胨N1(Organotechnie)溶液和1.25ml 200mM丙戊酸溶液。转染后8天收获培养物并通过离心澄清。将澄清的培养基通过0.22 μ m膜过滤,随后施加至填充有5ml蛋白质-A MabSelect SuRe树脂(GE Healthcare)的柱上。上样后,将柱子用5倍体积的磷酸缓冲盐水pH 7.1(PBS)洗涤,用100mM柠檬酸钠缓冲液pH 3.0洗脱抗体。合并含有洗脱的抗体的级分,并通过加载至在PBS中平衡的脱盐Econo-Pac柱(BioRad)上进行缓冲液交换。随后通过Millex GP(Millipore)过滤器单元(0.22 μ m)将脱盐抗体无菌过滤并进行等分。

[0189] 实施例9:IGF1R-5-mFc在CSF和血浆中的药代动力学

[0190] 进行体内测定以确定IGF1R-5-mFc(实施例8)是否能够进入脑,特别是进入脑脊髓液(CSF),以及定量其在CSF和血清中的存在。

[0191] 通过改进先前描述的方法(Huang等,1995;Kornhuber等,1986;Yaksh和Rudy,1976),在NRC开发了用于小脑延髓池CSF的多重取样的技术。动物被单独饲养在聚丙烯笼中,并允许自由获取食物和水。在24℃的温度和50 $\pm$ 5%的相对湿度下在12小时光/暗周期中进行实验。所有动物方法由NRC的动物护理委员会批准并符合加拿大动物保护委员会指导原则。

[0192] 用氯胺酮/甲苯噻嗪混合物(45/12mg/kg, i.p.)麻醉8-10周龄的雄性Wistar大鼠(体重范围,230-250g),并将其安置在立体定位仪(可使用牢固地保持动物的头部的任何其它装置)中。在中线处进行从连接耳朵的线开始并在尾部方向上延伸约3cm的切割:将筋膜从颅骨缩回,暴露颈部肌肉的表层,随后通过在枕骨嵴开始并向尾部延伸约2cm的中线切口分离其。表面肌肉组织的分离暴露了下面的肌肉层,其通过钝器解剖被容易地沿中线分开。使用刮擦工具从它们在枕骨上的原点将肌肉从中线两侧释放约0.5cm;颈部肌肉组织的轻微收缩暴露寰枕膜;随后将大鼠的头向下旋转至约45°角。使用27G一次性针头的尖端制造小孔;当切口正确地进行时,澄清的CSF应立即通过狭缝涌出;随后将聚乙烯管(PE-20)插入狭缝0.5cm。随后借助于氰丙烯酸丁酯胶或Vetbond胶将套管固定至寰枕膜上,从而允许样品长时间(超过1周)收集并且还防止感染或其它污染物进入CSF;随后套管用人工CSF彻底冲洗。使用牙科用水泥将套管的收集部分牢固地附接至枕骨。套管被固定后,自由部分(4-5cm)用20G针穿过皮肤,随后关闭肌肉和皮肤,将暴露部分切成所需的长度,并将尖端轻微加热以防止CSF的回流。最后,将动物放置在恢复室中至少一周,以允许关闭小脑延髓池。该技术不涉及通过颅骨的钻孔(如其它方法所描述的),避免损伤脑膜和相邻的神经组织。

[0193] 在脑池套管插入术后1周,将5mg/kg的IGF1R-5mFc或对照A20.1mFc融合物注射至尾静脉中。用3%异氟烷麻醉大鼠;丢弃在套管中累积的前10 μ l CSF。在注射后0.5小时、1小时、2小时、24小时和48小时收集10 μ l CSF。在相同的时间点使用聚合物凝胶管(Becton, Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ USA)从尾静脉(Fluttert等,2000)中取血样(50 μ l);将样品离心(以1600rcf进行15分钟;室温)。将样品于-80℃贮存直至分析。在实验结束时,在麻醉下通过断头处死大鼠。

[0194] 通过质谱和基于nanoLC-SRM的定量分析血清和CSF样品,如实施例7中所述。

[0195] CSF收集是一种精细的过程,在此期间CSF可容易被血液污染。由于预期V_{BH}的量在CSF中比在血液中少得多(<0.1%),即使轻微的血液污染也会严重损害个体CSF样品的值。

因此有必要为血液污染的CSF样品开发严格的排除标准。为了评估血液-CSF白蛋白比率,开发了用于定量血浆和CSF中的白蛋白水平的nanoLC-SRM方法。基于其独特的保留时间和m/z值 (Mo1 Pharm) 选择白蛋白肽APQVSTPTLVEAAR (SEQ ID NO:38),以在多重测定中具有对其它肽峰的最小干扰。使用如上所述的SRM定量CSF和血浆样品中的肽的强度。对于每只大鼠,如下计算白蛋白比率:

[0196] 白蛋白比率=每nL的分析的血浆的强度/每nL的分析的CSF的强度

[0197] 1500及以下的比率被认为是污染的血液。

[0198] 结果示于图9和表2中。该图显示了含Fc分子的“典型”血清药代动力学特征。IGF1R-5Fc的CSF水平随时间增加,在注射后24小时达到峰值,此时它们达到血清水平的2%。虽然对照A20.1Fc融合分子的血清水平/衰退是相似的,但其CSF水平是最低的,在24小时达到血清水平的0.04%。表2显示了在全身性静脉内施用等摩尔剂量 (5mg/kg V_HH—Fc融合物) 后,CSF和血清中IGF1R5-Fc和对照A20.1-Fc的药代动力学参数。IGF1R5-Fc和对照A20.1-Fc的血清半衰期分别为23小时和25小时。

[0199] 阴性对照A20.1Fc (75kD) 显示与文献中针对具有相似大小的分子所描述的相似的24小时时的血清/CSF比率。稳定状态下的白蛋白 (60kD) 的典型血清/CSF (腰部) 比率为0.1%,而IgG的血清/CSF比率为0.07 (Shen等,2004;Lin,2008)。24小时时的IGF1R5-Fc血清/CSF比率为A20.1mFc的50倍。

[0200] 每个分子的CSF/血清AUC比率指示在48小时期间构建体的CNS“暴露”。与A20.1Fc相比,IGF1R-5-Fc显示33倍更高的CNS暴露。结果表明,与对照V_HH-Fc融合分子相比,IGF1R-5Fc获得增加的至CSF的进入;这可通过脉络丛的特异性“分泌”或通过穿过BBB后从脑实质的“洗出”(通过内衬脑室系统的室管膜层的扩散或经由间质液的大量流动) 或通过这两者发生 (Abbott 2004;DeLange,2002;Groothuis,2007)。

[0201] 还已显示~110kDa和180kDa的另外的构建体通过IGF1R-5和人源化形式被摆渡穿过BBB (数据未显示)。

[0202] 表2.全身注射的IGF1R-5Fc和A20.1Fc在大鼠血清和小脑延髓池CSF中的药代动力学参数

[0203]

		IGF1R-5Fc	A20.1Fc
CSF	AUC (h*ng/ml)	15750.5	774
血清	AUC (h*ng/ml)	1369563	2247094
	半衰期(分布相) (h)	22.89	25.46
	清除率(ml/h)	1.003	0.66
CSF/血清比率(24h) (%)		1.988	0.04
CSF/血清 AUC 比率(%)		1.150038	0.034
倍数增加(CSF 暴露)			33.82

[0204] 实施例10:穿过体外血脑屏障模型的IGF1R-5的转运

[0205] 为了评估IGF1R-5 V_HH和实施例8的构建体是否迁移穿过血脑屏障,如下所述使用体外测定法。概括实验的流程图示于图6A。

[0206] 如所述的 (Garberg等,2005;Haqqani等,2012) 使用SV40永生成年大鼠脑内皮细胞 (Sv-ARBE) 产生体外血脑屏障 (BBB) 模型。将Sv-ARBE (80,000个细胞/膜) 于1ml生长培养基中接种在0.1mg/mL大鼠尾胶原蛋白I型包被的组织培养插入物 (孔径-1μm;表面积0.9cm²,Falcon) 上。插入组件的底室含有以1:1 (v/v) 比率补充有永生新生大鼠星形胶质细胞条件培养基的2ml生长培养基。

[0207] 测试等摩尔量 (5.6μM) 的阳性 (FC5) 或阴性对照 (A20.1,艰难梭菌毒素A结合性V_HH;和EG2,EGFR结合性V_HH)、IGF1R-5 V_HH以及实施例8的C-和N-末端mFc-IGF1R-5构建体的穿过该大鼠体外BBB模型的能力。

[0208] 在等摩尔量的sdAb暴露于BBB的腔内侧后,在15、30和60分钟后从近腔侧采集样品。随后通过如由Haqqani等 (2012) 所述的质谱法 (多重反应监测-同种型标记的内标;MRM-ILIS) (见下文中的方法描述) 定量每一个样品的sdAb含量。

[0209] 表观渗透系数的测定:可以直接绘出定量的值,或者可用给定的公式 (图5A) 测定P_{app} (表观渗透系数) 值并绘图。P_{app}值通常用于测定分子穿过BBB的能力。 $[Q_r/dt = \text{接受器区室中的累积量相对于时间}; A = \text{细胞单层的面积}; C_0 = \text{给药溶液的初始浓度}]$ 。P_{app}值是化合物穿过脑内皮单层的比渗透性的量度。

[0210] 结果示于图6B-D中。给出的结果是从多个独立实验获得的平均P_{app}值。两个阴性对照均具有非常低的P_{app}值,表明这些V_HH穿过BBB模型的非特异性转运或细胞旁转运是最少的。IGF1R-5具有高P_{app}值,表明穿过体外BBB模型的高转运速率。IGF1R-5 V_HH的P_{app} (图6B) 与阳性对照BBB可渗透的V_HH FC5 (WO 02/057445) 的P_{app}相似。人源化IGF1R-5变体显示出与野生型IGF1R-5相似或更高的P_{app}值 (图6C)。值得注意的是,相较于野生型IGF1R5,IGF1R-5 H2显示P_{app}值显著增加35% (图6C)。显示改善的体外BBB穿过 (P_{app}值) 的两种人源化变体IGF1R-5 H1和IGF1R H2还在此处进行的利用SPR的受体结合研究中显示更快的“解离速率”

(图3C),表明更快的“解离速率”是改善结合BBB受体介导的转胞吞受体IGF1R的抗体的转胞吞所期望的。融合于鼠Fc (80kD) 的N或C末端的IGF1R-5具有与单结构域抗体IGF1R-5 (15kD) 相似的 P_{app} 值,表明当与IGF1R融合时,80kD的分子可在体外有效地穿过BBB。值得注意的是,与Fc的N-末端融合提供了一些优势(15%的 P_{app} 的提高)。这些数据显示IGF1R-5可用作平台来工程化双特异性抗体,特别地以融合于需要被转运至脑中的具有治疗功能的完整IgG的C-末端。这些结果提供了强烈的指示:IGF1R-5在体外经历促进的穿过脑内皮细胞的跨细胞转运,并且可在体内具有相似的性质。值得注意的是,还已显示包含连接于货物分子(MW~110kDa或180kDa)的IGF1R-5或人源化形式的构建体也被摆渡穿过BBB(数据未显示)。

[0211] 使用MRM-ILIS方法对 V_{HH} 的绝对定量。方法全部如Haqqani等(2012)所述。简言之,为了开发用于 V_{HH} 的SRM(选择的反应监测,也称为多反应监测(MRM))测定,首先通过nanoLC-MS/MS,使用数据依赖性采集分析每一 V_{HH} ,以鉴定所有可离子化的肽。对于每一个肽,选择3至5个最强的碎片离子。初始SRM测定被开发来监测attomole量(约100-300amol)的消化物的这些片段。在低量下显示可重现的强度比率(即,相较于较高的量具有Pearson $r^2 \geq 0.95$)的片段被认为是稳定的,并且被选择用于最终的SRM测定。为了进一步优化测定,还包括每个肽的洗脱时间,小心不要选择具有接近的 m/z (质荷比)和洗脱时间的肽。

[0212] 细胞培养基或体液(血清或脑脊液(CSF))中的 V_{HH} 的典型多重SRM分析包括加标已知量的ILIS(0.1-10nM),随后将100-400ng CSF或培养的培养基蛋白(0.3-1 μ L)或约50-100ng血清蛋白(1-3纳升)注射入nanoLC-MS系统。在靶的指定洗脱时间,在离子陷阱中选择前体 m/z 的每种靶肽离子(和丢弃剩余的不相关离子),随后进行碰撞诱导解离(CID)断裂,并在离子陷阱中仅选择所需的碎片离子,以用于通过检测器监测。对于定量分析,将由LTQ(ThermoFisher)产生的原始文件转换为标准质谱数据格式mzXML,并且使用称为Q-MRM(Quantitative-MRM;见Haqqani等2012)的内部软件提取强度,所述软件为MatchRx软件的改进版本。对于每一个 V_{HH} ,对于其片段离子中的每一个产生提取离子色谱图,其由在整个洗脱时间内在0.25Da的片段 m/z 内的组合强度组成。为了获得每个片段的最终强度值,将在0.5分钟的预期保留时间内的所有强度相加。如果其肽的至少一种的片段显示预期的强度比率,即最终强度值显示出与其对应的纯 V_{HH} 的最终强度值相比较强的Pearson相关性 $r \geq 0.95$ 和 $p < 0.05$,则 V_{HH} 被定义为在样品中是可检测的。

[0213] 将含有 V_{HH} 的混合物(培养基、血清、CSF)的样品如前所述进行还原、烷基化和胰蛋白酶消化(Haqqani等,2012;Gergov等,2003)。利用乙酸(5%的终浓度)酸化消化物(胰蛋白酶肽)并在与LTQ XL ETD或LTQ Orbitrap ETD质谱仪(ThermoFisher,Waltham,MA)偶联的反相nanoAcquity UPLC(Waters,Milford,MA)上进行分析。将样品的所需等分试样注射并装载至300 μ m I.D. $\times$ 0.5mm 3 μ m PepMaps C18捕集器(ThermoFisher),随后使用在1分钟内0%至20%的乙腈(在0.1%甲酸中),16分钟内20%-46%和1分钟内46%-95%的梯度,400nL/min的流速将其洗脱至100 μ m的I.D. $\times$ 10cm 1.7 μ m BEH130C18nanoLC柱(Waters)。使用用于片段化肽离子的CID通过电喷雾电离(ESI)将洗脱的肽电离至质谱仪中用于MS/MS和SRM分析。使用氮作为碰撞气体,以35%的标准化碰撞能量和30ms的活化时间进行CID。使用 6×10^3 的自动增益控制(AGC)目标值和200ms的最大累积时间,通过仪器来调整进入线性离子陷阱的离子注入时间。

[0214] 在多重测定中用于检测和定量每种 V_{HH} 的 V_{HH} 特异性肽示于表3中。

[0215] 表3.FC5、FC5-ILIS、EG2、A20.1、IGF-1R-5和白蛋白的nanoLC-SRM检测中使用的肽。(a)在所述的各种研究中,以不同组合多重化测定以用于同一样品中的同时监测;(b)重标记的肽;(c)每种肽的SRM测定的检测和定量的限度范围为1.5-2.5ng/ml。1ng/mL对应于约60-70pM的V_HH。A20-1如Hussack等人,2011b中所述;EG2如Iqbal等人,2010中所述。

[0216]

蛋白质	特征	SEQ	独特
[0217]			
		ID	性
		NO:	
IGF1R-5	EFVATIDWGDGGAR	27	是
	TIDNYAMAWSR	28	是
	LEESGGGLVQAGGSLR	29	
FC5	ITWGGDNTFYNSVK	30	是
FC5-ILIS	ITWGGDNTFYNSVK ^(b)	30	是
A20.1	TTYADSVK	31	是
	EFVAAGSSTGR	32	是
	TFSMDPMAWFR	33	是
	DEYAYWGQGTQVTVSSGQAGQGSEQK	34	是
EG2	DFSDYVMGWFR	35	是
	LEESGGGLVQAGDSLR	36	是
	NMVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVNSAGT	37	是
	YVSPR		
白蛋白	APQVSTPTLVEAAR	38	是

[0218] 实施例11:IGF1R-5至甘丙肽的缀合

[0219] 为了确定IGF1R-5是否可以在体内穿过血脑屏障(BBB)并且将不能自身穿过BBB的分子“摆渡”穿过BBB,将神经肽甘丙肽化学缀合于与鼠Fc的C-或N-末端融合的IGF1R-5 V_HH或IGF1R-5,并全身性施用。甘丙肽是通过结合脑组织中表达的GalR1和GalR2来产生镇痛作用的神经活性肽。当在外周给予时,甘丙肽没有镇痛作用,因为其不能自己穿过BBB(Robertson等,2011)。

[0220] 将IGF1R-5 V_HH和Fc-融合构建体缀合于具有半胱氨酸(cysteamide)修饰的C末端(Biomatic)(GWTLSAGYLLGPHAIDNHRFSKDHGLT-半胱氨酸,SEQ ID NO:39)的大鼠甘丙肽(Gal1)片段。缀合方案示于图7中。

[0221] 简言之,将5mg在0.5X PBS、2.5mM EDTA中的[2mg/ml]的IGF1R-5 V_HH(实施例5)与436.4μl的2.5mg/ml磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(磺基-SMCC) (7.5x过量摩尔比)混合。随后用氮气冲洗混合物,并在室温(RT)下温育30分钟,以使得磺基-SMCC的NHS酯臂与V_HH上的胺反应。随后,使用10ml 7K Zeba柱(Pierce)从马来酰亚胺活化的IGF1R-5 V_HH中除去未反应的磺基-SMCC。在样品上样之前,将柱用5ml PBS洗涤3次,并以1000xg离心2分钟。在样品上样后,用200μl PBS加满柱子,并以1000×g离心2分钟。对于IGF1R-Fc构建体,如上所述,将5mg与~68μl磺基-SMCC (6.5x过量摩尔比)反应。

[0222] 单独地和同时地,通过将10mg冻干粉末溶解在10ml无内毒素的水中以制备1mg/ml原液来制备半胱氨酰胺修饰的C-TERM甘丙肽(Gal-cya)(甘丙肽-cya粉末具有少量DTT以防止在纯化期间形成二硫键)。最后,加入100μl的0.5M EDTA (5mM终浓度)。

[0223] 将纯化的马来酰亚胺活化的IGF1R-5 V_HH和IGF1R-Fc构建体(2.6ml)用0.5X PBS, 2.5mM EDTA稀释至5ml,随后在涡旋下分别加入5ml或1ml Gal-cya。将样品用氮气冲洗,密封并在4℃温育过夜。第二天,分别使用Amicon-15 10K和30K柱(Millipore)除去未反应的Gal-cya。将样品加入柱中并以4000×g离心7分钟,直到体积减少至5ml。将5ml 0.5X PBS, 2.5mM EDTA添加至柱的插入物中剩余的5ml样品中,并再次旋转,直至样品减少至4ml。随后将缀合的样品添加至如上所述制备的10ml 7K Zeba柱(Pierce)中,随后以1000×g离心2分钟。

[0224] 随后将缀合的IGF1R-5-Gal和IGF1R-Fc-Gal样品在16%或10%SDS-PAGE非还原凝胶上电泳并银染,以确认缀合后分子量大小的偏移。滴定反应物以获得每个V_HH或IGF1R-Fc构建体约1至2个甘丙肽分子。

[0225] 内毒素去除和内毒素水平的测定:使用Amicon Ultra分子量截留(MWCO)纤维素膜旋转柱(Millipore)除去内毒素。首先,通过以4000xg离心10分钟使15ml V_HH制备物通过Amicon-15-50K MWCO柱;收集洗脱液。随后将该洗脱液添加至Amicon-15-10K MWCO柱中,并以4000×g离心7-10分钟,导致上清液体积从15ml减少至7.5ml。通过添加PBS将柱中的上清液体积调节回15ml。如上所述再次旋转柱。收集上清液并使用EndoSafe-PTS系统,使用灵敏度范围为10-0.1EU/ml的套筒(Charles River Laboratories International)测量内毒素水平。将25μl的样品加载至套筒上的4个孔中的每一个中,必要时进行稀释。只有EU<1/1mg的样品才用于动物研究。

[0226] 在无菌条件下在哺乳动物细胞中产生Fc-融合构建体。如上所述在从细胞纯化的样品中测量内毒素水平,并且只将<0.5EU/1mg的样品用于动物研究。

[0227] 实施例12:使用Hargreaves模型的IGF1R-5-Gal的转运

[0228] 为了评价IGF1R-5-Gal、mFc-IGF1R-5-Gal和IGF1R-5-mFc-Gal(实施例11)是否迁移穿过血脑屏障,使用先前在国际专利公开No. W02011/127580中描述的体内测定。

[0229] 使用与由Hargreaves等(1988)所描述的类似的炎性痛觉过敏的大鼠模型。将动物以每个聚丙烯笼子三只的组(Hargreaves模型)进行饲养,并允许自由获得食物和水。在24℃的温度和50±5%的相对湿度下在12小时光/暗周期中进行实验。所有动物程序由NRC的动物护理委员会批准并符合加拿大动物保护委员会指导原则。

[0230] 在该模型中,在短暂异氟烷麻醉(3%)下,用低体积(100μl,用30号针头)的完全弗氏佐剂(CFA;热灭活的结核分枝杆菌(M. tuberculosis)(Sigma)悬浮在油:生理盐水1:1的

乳剂中)注入至6-8周龄(体重范围230-250g)的雄性Wistar大鼠的右后爪中。CFA诱导促炎物质的释放,其激活伤害感受器并产生慢性疼痛状态和痛觉过敏(增强的对有害的热敏感性)。使用用于爪刺激的足底测痛计设备(IITC Model#336TG Life Science, Inc.)通过在两个后爪(发炎的和非发炎对照爪)的足底表面中施加辐射刺激来测量缩爪潜伏期。动物通过舔或轻弹其爪来响应所用的时间被解释为阳性反应(缩爪潜伏期)。调节光强灯以在两个后爪中引发在17秒至20秒之间的基线缩爪潜伏期,然后施用CFA。如果在20秒内没有发生缩回反应,则光束被自动关闭以避免组织损伤,并且该爪被赋予最大得分。

[0231] CFA注射后2天并且在施用化合物之前2天,操作动物并在测痛仪设备中适应至少60分钟,目的是减轻压力并防止假阳性反应。在两只爪中测量基线以验证发展的疼痛(热痛觉过敏);非发炎的爪用作针对注射的爪的对照。从实验中排除对于“发炎的爪”具有超过6秒的缩爪潜伏期和对于“正常的爪”短于17秒的动物。

[0232] 为了确定IGF1R-5-Gal、mFc-IGF1R-5-Gal和IGF1R-5-mFc-Gal是否被递送穿过血脑屏障,并且可接合脑实质中的靶受体(GalR1和2),大鼠在CFA注射后3天接受IGF1R-5-甘丙肽(2.93mg/kg或5.85mg/kg;内毒素EU=<1/mg),或mFc-IGF1R-5-Gal Gal(1.98mg/kg或4.96mg/kg;<0.5EU/mg),或IGF1R-5-mFc-Gal(2.0mg/kg或5.0mg/kg;<0.5EU/mg)或对照化合物的一次尾静脉注射。对每个后爪(发炎的和未发炎的)每15分钟测试缩爪潜伏期(PWL),持续3小时。增加的缩爪潜伏期指示成功的镇痛诱导,其仅可通过IGF1R-5将甘丙肽成功递送至脑实质中而获得。甘丙肽只有当存在于脑实质中时才能引起镇痛,并且其自身不能穿过完整的BBB(Robertson等,2011)。

[0233] 结果被分析为缩爪潜伏期(PWL,秒)相对于时间(分钟或小时)的时间进程(图8A-D)。

[0234] 结果显示,与PBS相比,静脉内施用的甘丙肽不减轻疼痛。相反地,FC5-Gal、IGF1R5-Gal、mFc-IGF1R-5-Gal或IGF1R-5-mFc-Gal的单次注射均产生热痛觉过敏的剂量依赖性抑制,表明IGF1R-5 V_HH是负责“摆渡”甘丙肽穿过BBB以通过结合脑实质中的GalR1和/或2产生药理作用的实体。IGF1R-5-Gal效应是剂量依赖性的并且比由FC5-Gal诱导的效应明显更加显著,这表明IGF1R受体具有比假定的FC5受体更高的BBB转运速率。这些结果表明,IGF1R-5 V_HH可以使用受体介导的转胞吞途径将大分子(3kDa-80kDa)“摆渡”穿过BBB。主动的受体介导的转运是需要的,因为已知BBB阻止大于0.5kDa的所有亲水分子通过。

[0235] 实施例13:IGF1R-5-mFc的免疫检测

[0236] 为了确定在外周施用后在CSF中检测到的高水平的IGF1R-5mFc至少部分源自实质细胞外空间,换句话说,完整构建体已经穿过BBB,在大鼠脑中进行IGF1R-5-mFc的免疫检测。

[0237] 简言之,在用PBS进行动物灌注后立即(即在5mg/kg尾静脉注射IGF1R-5-mFc之后48小时)收获来自实施例11的动物的脑;冷冻脑并在冷冻切片机上切成12μm切片。将切片在RT下于100%甲醇中固定10分钟,在PBS中洗涤3次,并在含有0.3%的TritonX-100的1X PBS中的10%正常山羊血清(NGS)中温育1小时。在4℃下施加在1X PBS中的含有0.3% TritonX-100的5%NGS中的1:200的山羊抗-m-IgG Fc γ-cy3(Cat#115-165-071, Jackson Immuno Reasearch, lot#106360),进行过夜。将切片在1x PBS中洗涤3次,随后在室温下在5%NGS/1XPBS中的1:500的兔抗GFAP(Cat#Z0334, Dako)中温育1小时。将切片在1xPBS中再

洗涤三次,随后在1xPBS中的1:300的山羊抗小鼠Alexa 647 (A21235,Invitrogen) 或1:500的山羊抗兔Alexa 647 (A21244,Invitrogen) 中温育。随后加入1×PBS中的1:500的脉管系统染色凝集素RCAI (Cat#FL-1081,Vector),进行10分钟。在用1xPBS洗涤三次后,将切片在Dako荧光封固剂 (Cat#S3023,Dako) 中用盖玻片覆盖,并用2μg/mL Hoechst (Cat#H3570,Invitrogen) 加标以对细胞核进行染色。使用10X和60X物镜和如表4所示的信道利用Olympus 1X81荧光显微镜捕获图像。

[0238] 表4.用于荧光显微镜的物镜和信道

[0239]

	荧光分子	激发光(nm)	发射光(nm)
RCAI-脉管	FITC	495	518
Hoechst33342-细胞核	Hoechst	350	461
IGF1R-5-m-Fc	Cy3	531	593
GFAP	Alexa 647	628	692

[0240] 结果示于图10中。小鼠Fc的免疫检测显示在整个不同脑区域中的脑血管的强染色,以及血管周脑实质的染色,表明IGF1R-5Fc在脑血管中积累,并且还迁移穿过BBB进入周围的脑实质中。该结果支持如下结论:IGF1R-Fc的升高的CSF水平指示构建体迁移穿过BBB。这得到以下观察的进一步强烈支持:连接于IGF1R-5的甘丙肽诱导对实质GalR1和GalR2受体的药理学反应(镇痛)。总之,体外BBB迁移穿过结果、体内药物动力学(血清/CSF水平)和药效学(Hargreaves模型)结果表明IGF1R-5 V_hH通过由其与IGF1R表位的结合触发的主动的受体介导的转胞吞以比其它V_hH显著更高的速率迁移穿过完整的BBB,并且其可“摆渡”一系列(1-80kD)本来非渗透性的分子穿过血脑屏障。

[0241] 实施例14:IGF1R-5对IGF1R的“生理”功能的影响

[0242] 从安全角度来看,重要的是显示本发明的抗体当接合其受体用于通过受体介导的转胞吞递送药物时,不干扰受体的生理功能(即通过其天然配体IGF-1诱导信号传导)。鉴于此,重要的是证明IGF1R-5 V_hH或IGF1R-5-mFc不干扰IGF1R或相关胰岛素受体(IR)由其天然配体诱导的生理信号传导。

[0243] 为了确定IGF1R-5是否单独诱导通过IGF1R或IR的信号传导,或干扰如通过受体的天然配体IGF-1或胰岛素刺激的信号传导,在SV-ARBEC细胞中测定它们对受体本身的磷酸化或受体刺激的下游激酶Akt的影响。

[0244] 根据本领域已知的方法,将SV-ARBEC在补充有蛋白胨、D-葡萄糖、BME氨基酸、BME维生素、抗生素/抗霉菌溶液和胎牛血清的M199基础培养基中生长至汇合。在处理前18小时将细胞转换到无血清培养基中。在添加200ng/ml IGF-1、10μg/ml胰岛素或媒介物之前1小时向细胞中加入IGF1R-5 V_hH或IGF1R-5-Fc融合物(100nM或500nM)。将细胞与配体或媒介物一起温育20分钟,随后在Hank平衡盐溶液中洗涤两次。随后使用补充有1%Triton-x 100和蛋白酶抑制剂混合物(Sigma)的1x RIPA缓冲液(Cell Signaling Technology)裂解细

胞。在水浴超声器中给予细胞以 2×20 秒的爆发,通过以14,000rpm离心10分钟澄清裂解物。使用DC蛋白测定系统(BIO-RAD laboratories)测定蛋白质浓度。将等 μg 的蛋白质样品在125V下在4-20%梯度的SDS聚丙烯酰胺凝胶上分离并转移到PVDF膜。通过在针对该靶标的一抗(Cell Signaling Technology)的1:1000稀释液中过夜温育,随后与山羊抗兔IgG-HRP二抗温育1小时来检测磷酸-Akt (Ser 473),随后与ECL Plus试剂反应,并将其显现在放射自显影胶片上。使用Un-Scan-It软件(Silk Scientific Inc.)测定密度测定值。

[0245] 结果示于图11中。Akt磷酸化的免疫印迹分析显示当与100nM的IGF1R-5或IGF1R-5-mFc或500nM IGF1R-5-mFc共同施用,IGF1R-5不抑制通过 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 的胰岛素或通过 $200\text{ng}/\text{ml}$ 的IGF-1诱导的Akt磷酸化。 V_{H} 或Fc融合物本身均不诱导Akt信号传导(图11A、11B和11C,标记为“-5”)。结果证明,即使在呈Fc融合形式的二价展示中,IGF1R-5也不触发受体二聚化和下游信号传导,因此在天然配体存在的情况下不干扰受体功能。IGF1R-5的这个特征(“安静的结合剂”)对于其作为用于治疗剂的BBB载体的应用是重要的,因为其赋予有利的安全性特征。

[0246] 本文所述的实施方案和实施例是举例说明性的,并不意味着限制所要求保护的本发明的范围。前述实施方案的变化,包括替代、修改和等同物,由发明人意图包括在权利要求中。此外,所讨论的特征的组合对于本发明的解决方案可能不是必需的。

[0247] 参考文献

[0248] 本文和整个申请中提及的所有专利、专利申请和出版物通过引用并入本文。

[0249] Abbott NJ (2013) Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inherit Metab Dis*. 36 (3):437-49.

[0250] Abbott, N.J. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology, *Neurochem. Int.* 2004, 45, 545-552.

[0251] Abulrob A, Sprong H, Van Bergen en Henegouwen P, Stanimirovic D (2005) The blood-brain barrier transmigration single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J Neurochem*. 95 (4):1201-14.

[0252] Arbabi-Ghahroudi, M. Desmyter A, Wyns L, Hamers R., and Muyldermans S (1997) Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies, *FEBS Lett* 414, 521-526

[0253] Arbabi-Ghahroudi M., To R., Gaudette N., Hirama T., Ding W., MacKenzie R., and Tanha J. (2009a) *Protein Eng. Des. Sel.* 22, 59-66.

[0254] Arbabi-Ghahroudi M., MacKenzie R., and Tanha J. (2009b) *Methods Mol. Biol.* 525, 187-216.

[0255] Bell A., Wang Z.J., Arbabi-Ghahroudi M., Chang T.A., Durocher Y., Trojahn U., Baardsnes J., Jaramillo M.L., Li S., Baral T.N., O'Connor-McCourt M., Mackenzie R., and Zhang J. (2010) *Cancer Lett.* 289, 81-90.

[0256] Broussau S., Jabbour N., Lachapelle G., Durocher Y., Tom R., Transfiguracion J., Gilbert R. and Massie B. (2008) *Mol Ther* 16, 500-507.

[0257] Chothia C., and Lesk A.M. (1987) *J. Mol. Biol.* 196, 901-917.

- [0258] Davies J.,and L.Riechmann,Affinity improvement of single antibody VH domains:residues in all three hypervariable regions affect antigen binding.Immunotechnology 2(1996) 169-179
- [0259] De Kruif,J.,and Logtenberg,T. (1996) J.Biol.Chem.271,7630-7634.
- [0260] De Lange,E.C.;Danhof,M.Considerations in the use of cerebrospinal fluid pharmacokinetics to predict brain target concentrations in the clinical setting:implications of the barriers between blood and brain, Clin.Pharmacokinet.2002,41,691-703.
- [0261] Demeule M.;Currie J.C.;Bertrand Y.;Che C.;Nguyen T.;Regina A.; Gabathuler R.;Castaigne J.P.;Beliveau R.Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2,J.Neurochem.2008,106,1534-1544.
- [0262] Dumoulin,M.,Conrath,K.,Van Meirhaighe,A.,Meersman,F.,Heremans,K., Frenken,L.G.,Muyldermans,S.,Wyns,L.,and Matagne,A. (2002) Protein Sci 11,500-515.
- [0263] Durocher,Y.,S.Perret,等(2002). "High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1cells." Nucleic Acids Res 30(2):E9.
- [0264] Doyle,P.J.,Arbabi-Ghahroudi,M.,Gaudette,N.,Furzer,G.,Savard,M.E., Gleddie,S.,McLean,M.D.,MacKenzie,C.R.,and Hall,J.C. (2008) Mol.Immunol.45,3703-3713.
- [0265] Eisenberg,D.,Schwarz,E.,Komaromy,M.,and Wall,R. (1984) J.Mol.Biol.179, 125-142
- [0266] Erdlenbruch B,Alipour M,Fricker G,Miller DS,Kugler W,Eibl H,Lakomek M (2003) Alkylglycerol opening of the blood-brain barrier to small and large fluorescence markers in normal and C6glioma-bearing rats and isolated rat brain capillaries.Br J Pharmacol.140(7):1201-10.
- [0267] Fenner,L.,Widmer,A.F.,Goy,G.,Rudin,S.,and Frei,R. (2008) J.Clin.Microbiol.46,328-330.
- [0268] Fluttert,M.,Dalm,S.,and Oitzl,M.S. (2000) Lab Anim 34,372-378.
- [0269] Gaillet,B.,Gilbert,R.,Broussau,S.,Pilotte,A.,Malenfant,F.,Mullick,A., Garnier,A.,and Massie,B. (2010) Biotechnol Bioeng 106,203-215.
- [0270] Gan Y,Jing Z,Stetler RA,Cao G(2013) Gene delivery with viral vectors for cerebrovascular diseases.Front Biosci (Elite Ed) .5:188-203.Review.
- [0271] Garberg,P.;Ball,M.;Borg,N.;Cecchelli,R.;Fenart,L.;Hurst,R.D.; Lindmark,T.;Mabondzo,A.;Nilsson,J.E.;Raub,T.J.;Stanimirovic,D.;Terasaki,T.; Oberg,J.O.;Osterberg,T.In vitro models for the blood-brain barrier,Toxicol.In Vitro 2005,19,299-334.
- [0272] Gergov,M.;Ojanpera,I.;Vuori,E.Simultaneous screening for238 drugs in

blood by liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003, 795, 41-53.

[0273] Gaillet B, Gilbert R, Amziani R, Guilbault C, Gadoury C, Caron AW, Mullick A, Garnier A, Massie B (2007) High-level recombinant protein production in CHO cells using an adenoviral vector and the cumate gene-switch. *Biotechnol Prog.* Jan-23 (1):200-9

[0274] Gottesman等, *Ann. Rev. Biochem.*, 62, 385-427 (1993)

[0275] Groothuis D.R.; Vavra M.W.; Schlageter K.E.; Kang E.W.; Itskovich A.C.; Hertzler S.; Allen C.V.; Lipton H.L. Efflux of drugs and solutes from brain: the interactive roles of diffusional transcapillary transport, bulk flow and capillary transporters, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007, 27, 43-56.

[0276] Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., and Hamers, R. (1993) *Nature* 363, 446-448.

[0277] Haqqani AS, Caram-Salas N, Ding W, Brunette E, Delaney CE, Baumann E, Boileau E, Stanimirovic D (2012) Multiplexed evaluation of serum and CSF pharmacokinetics of brain-targeting single-domain antibodies using a NanoLC-SRM-ILIS method. *Mol Pharm.* 2013 May 6; 10 (5):1542-56.

[0278] Hargreaves KM, Troullos ES, Dionne RA, Schmidt EA, Schafer SC, Joris JL (1988) Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications. *Clin Pharmacol Ther.* 44 (6):613-21.

[0279] Huang YL, **Säljö** A, Suneson A, Hansson HA (1995) A new approach for multiple sampling of cisternal cerebrospinal fluid in rodents with minimal trauma and inflammation. *J Neurosci Methods.* 63 (1-2):13-22.

[0280] Hussack G., Hirama T., Ding W., MacKenzie R., and Tanha J. (2011) *PLoS ONE* 6, e28218.

[0281] Hussack G, Arbabi-Ghahroudi M, van Faassen H, Songer JG, Ng KK, MacKenzie R, Tanha J (2011b) Neutralization of *Clostridium difficile* toxin A with single-domain antibodies targeting the cell receptor binding domain. *J Biol Chem.* 286 (11):8961-76.

[0282] Iqbal U., Trojahn U., Albaghdadi H., Zhang J., O'Connor M., Stanimirovic D., Tomanek B., Sutherland G., and Abulrob A. (2010) *Br. J. Pharmacol.* 160, 1016-1028.

[0283] Jespers, L., Schon, O., Famm, K., and Winter, G. (2004) *Nat. Biotechnol.* 22, 1161-1165.

[0284] Kabat EA, Wu TT. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol.* 1991; 147:1709-19.

[0285] Kim, D.Y., Kandalaft, H., Ding, W., Ryan, S., van Fassen, H., Hirama, T., Foote,

- S.J.,MacKenzie,R.,and Tanha,J.(2012)PEDS advance access August 30,2012,1-9.
- [0286] Kornhuber ME,Kornhuber J,Cimniak U(1986)A method for repeated CSF sampling in the freely moving rat.J Neurosci Methods.17(1):63-8.
- [0287] Lefranc,M.-P.等,(2003)Dev.Comp.Immunol.,27,55-77.
- [0288] Li S,Zheng W,Kuolee R,Hirama T,Henry M,Makvandi-Nejad S,Fjallman T,Chen W,Zhang J.Pentabody-mediated antigen delivery induces antigen-specific mucosal immune response.Mol Immunol 2009;46:1718-26.
- [0289] Lin,J.H.CSF as a surrogate for assessing CNS exposure:an industrial perspective,Curr.Drug Metab 2008,9,46-59.
- [0290] Merritt,E.A.,and Hol,W.G.(1995)Curr.Opin.Struct.Biol.5,165-171.
- [0291] Muruganandam A,Tanha J,Narang S,Stanimirovic D(2001)Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium.FASEB J.2002 Feb;16(2):240-2.
- [0292] Musher,D.M.,Manhas,A.,Jain,P.,Nuila,F.,Waqar,A.,Logan,N.,Marino,B.,Graviss,E.A.(2007)J.Clin.Microbiol.45,2737-2739.
- [0293] Nhan T,Burgess A,Cho EE,Stefanovic B,Lilge L,Hynynen K.(2013)Drug delivery to the brain by focused ultrasound induced blood-brain barrier disruption:Quantitative evaluation of enhanced permeability of cerebral vasculature using two-photon microscopy.J Control Release.172(1):274-280.
- [0294] Nicaise M,Valeio-Lepiniec M,Minard P,Desmadril M.(2004)Affinity transfer by CDR grafting on a nonimmunoglobulin scaffold.Protein Sci.13(7):1882-1891.
- [0295] Nielsen,U.B.,Adams,G.P.,Weiner,L.M.,and Marks,J.D.(2000)Cancer Res.60,6434-6440.
- [0296] Nuttall,S.D.,Krishnan,U.V.,Doughty,L.,Pearson,K.,Ryan,M.T.,Hoogenraad,N.J.,Hattarki,M.,Carmichael,J.A.,Irving,R.A.,and Hudson,P.J.(2003)Eur.J.Biochem.270,3543-3554.
- [0297] Pardridge,W.M.;Buciak,J.L.;Friden,P.M.Selective transport of an anti-transferrin receptor antibody through the blood-brain barrier in vivo,J.Pharmacol.Exp.Ther.1991,259,66-70.
- [0298] Pardridge,W.M.,Adv.Drug Delivery Reviews,15,5-36(1995)
- [0299] Pardridge,W.M.Drug and gene delivery to the brain:the vascular route,Neuron.2002,36,555-558.
- [0300] Planche,T.,Aghaizu,A.,Holliman,R.,Riley,P.,Poloniecki,J.,Breathnach,A.,and Krishna,S.(2008)Lancet Infect.Dis.8,777-784.
- [0301] Preston E,Slinn J,Vinokourov I,Stanimirovic D.(2008)Graded reversible opening of the rat blood-brain barrier by intracarotid infusion of sodium caprate.J Neurosci Methods.168(2):443-9.
- [0302] Ridgway,J.B.,Presta,L.G.,and Carter,P.(1996)Protein Eng.9,617-621.

- [0303] Robertson CR, Flynn SP, White HS, Bulaj G (2011) Anticonvulsant neuropeptides as drug leads for neurological diseases. *Nat Prod Rep.* 28(4):741-62.
- [0304] Rüssmann, H., Panthel, K., Bader, R.C., Schmitt, C., and Schaumann, R. (2007) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 115-119.
- [0305] Samani, A.A., Chevet, E., Fallavollita, L., Galipeau, J., and Brodt, P. (2004) *Cancer Research* 64, 3380-3385.
- [0306] Samuels B.L., *J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 54, 421-429 (1993)
- [0307] Shen, D.D.; Artru, A.A.; Adkison, K.K. Principles and applicability of CSF sampling for the assessment of CNS drug delivery and pharmacodynamics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004, 56, 1825-1857.
- [0308] Sloan, L.M., Duresko, B.J., Gustafson, D.R., and Rosenblatt, J.E. (2008) *J. Clin. Microbiol.* 46, 1996-2001.
- [0309] Sumbria RK, Zhou QH, Hui EK, Lu JZ, Boado RJ, Pardridge WM. (2013) Pharmacokinetics and brain uptake of an IgG-TNF decoy receptor fusion protein following intravenous, intraperitoneal, and subcutaneous administration in mice. *Mol Pharm.* 10(4):1425-31.
- [0310] Tanha, J., Muruganandam, A., and Stanimirovic, D. (2003) *Methods Mol. Med.* 89, 435-449.
- [0311] To, R., Hirama, T., Arbabi-Ghahroudi, M., MacKenzie, R., Wang, P., Xu, P., Ni, F., and Tanha, J. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 41395-41403.
- [0312] Turgeon, D.K., Novicki, T.J., Quick, J., Carlson, L., Miller, P., Ulness, B., Cent, A., Ashley, R., Larson, A., Coyle, M., Limaye, A.P., Cookson, B.T., and Fritsche, T.R. (2003) *J. Clin. Microbiol.* 41, 667-670.
- [0313] Watanabe, T., *Acta Oncol.*, 34, 235-241 (1995)
- [0314] Xiao G, Gan LS. (2013) Receptor-mediated endocytosis and brain delivery of therapeutic biologics. *Int J Cell Biol.* doi:10.1155/2013/703545. Epub 2013 Jun 11. Yaksh TL, Rudy TA (1976) Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav.* 17(6):1031-6.
- [0315] Yu, Y.J.; Zhang, Y.; Kenrick, M.; Hoyte, K.; Luk, W.; Lu, Y.; Atwal, J.; Elliott, J.M.; Prabhu, S.; Watts, R.J.; Dennis, M.S. Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target, *Sci. Transl. Med.* 2011, 3, 84ra44.
- [0316] Zhang, J., Li, Q., Nguyen, T.-D., Tremblay, T.-L., Stone, E., To, R., Kelly, J., and MacKenzie, C.R. (2004a) *J. Mol. Biol.* 341, 161-169.
- [0317] Zhang, J., Tanha, J., Hirama, T., Khiew, N.H., To, R., Tong-Sevinc, H., Stone, E., Brisson, J.R., and MacKenzie, C.R. (2004b) *J. Mol. Biol.* 335, 49-56.
- [0318] Zhu等, *Immunology and Cell Biology* (2010) 88:667-675.
- [0319] 欧洲专利 No. 519596

- [0320] 欧洲专利No.626390
- [0321] 美国专利No.5693761
- [0322] 美国专利No.5766886
- [0323] 美国专利No.5821123
- [0324] 美国专利No.5859205
- [0325] 美国专利No.5869619
- [0326] 美国专利No.6054297
- [0327] 美国专利No.6180370
- [0328] WO 02/057445
- [0329] WO 2011/127580
- [0330] WO 95/04069
- [0331] WO/2004/076670
- [0332] WO2003/046560

序列表

<110> National Research Council of Canada
 Stanimirovic, Danica
 Kemmerich, Kristin
 Sulea, Traian
 Arbabi-Ghahroudi, Mehdi
 Haqqani, Arsalan
 Gilbert, Renald
 Massie, Bernard

<120> 胰岛素样生长因子1受体特异性抗体及其用途
 <130> 12600-98
 <150> 61/948,831
 <151> 2014-03-06
 <160> 42
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> IGF1R-5 CDR1
 <400> 1
 Gly Arg Thr Ile Asp Asn Tyr Ala
 1 5

<210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> IGF1R-5 CDR2
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa是Ala或Thr
 <400> 2
 Ile Asp Trp Gly Asp Gly Gly Xaa
 1 5

<210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> IGF1R-5 CDR3
 <400> 3
 Ala Met Ala Arg Gln Ser Arg Val Asn Leu Asp Val Ala Arg Tyr Asp
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 4
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> IGF1R-5共有序列
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa是Glu或Gln
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa是Lys或Gln
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa是Val或Glu
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa是Ala或Pro
 <220>

[0002]

```

<221> MISC_FEATURE
<222> (37)..(37)
<223> Xaa是Val或Ser
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (44)..(44)
<223> Xaa是Asp或Gly
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45)..(45)
<223> Xaa是Leu或Arg
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (47)..(47)
<223> Xaa是Phe或Trp
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (49)..(49)
<223> Xaa是Ala或Ser
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (58)..(58)
<223> Xaa是Ala或Thr
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (75)..(75)
<223> Xaa是Ala或Ser
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (77)..(77)
<223> Xaa是Gly或Asn
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (79)..(79)
<223> Xaa是Met或Leu
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (85)..(85)
<223> Xaa是Asn或Arg
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (87)..(87)
<223> Xaa是Glu或Arg
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (88)..(88)
<223> Xaa是Pro或Ala
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (95)..(95)
<223> Xaa是Ser或Tyr
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (119)..(119)
<223> Xaa是Gln或Leu
<400> 4
Xaa Val Xaa Leu Xaa Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Xaa Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ile Asp Asn Tyr
20      25      30
Ala Met Ala Trp Xaa Arg Gln Ala Pro Gly Lys Xaa Xaa Glu Xaa Val
35      40      45
Xaa Thr Ile Asp Trp Gly Asp Gly Gly Xaa Arg Tyr Ala Asn Ser Val
50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa Lys Xaa Thr Xaa Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Xaa Leu Xaa Xaa Glu Asp Thr Ala Val Tyr Xaa Cys
85      90      95
Ala Met Ala Arg Gln Ser Arg Val Asn Leu Asp Val Ala Arg Tyr Asp
100     105     110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
115     120

<210> 5
<211> 124
<212> PRT

```

<213> 人工的
 <220>
 <223> IGF1R-5_VHH
 <400> 5
 Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ile Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ala Trp Ser Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Asp Trp Gly Asp Gly Gly Ala Arg Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Gly Thr Met Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Asn Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ser Cys
 85 90 95
 Ala Met Ala Arg Gln Ser Arg Val Asn Leu Asp Val Ala Arg Tyr Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> IGF1R-5_H1
 <400> 6
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ile Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Asp Trp Gly Asp Gly Gly Thr Arg Tyr Ala Asn 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 Met Ala Arg Gln Ser Arg Val Asn Leu Asp Val Ala Arg Tyr Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0003]

<210> 7
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> IGF1R-5_H2
 <400> 7
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ile Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Asp Trp Gly Asp Gly Gly Thr Arg Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Met 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 Met Ala Arg Gln Ser Arg Val Asn Leu Asp Val Ala Arg Tyr Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> IGF1R-5_H3
 <400> 8

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ile Asp Asn Tyr
20      25      30
Ala Met Ala Trp Ser Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
35      40      45
Ala Thr Ile Asp Trp Gly Asp Gly Gly Thr Arg Tyr Ala Asn Ser Val
50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Met 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 Met Ala Arg Gln Ser Arg Val Asn Leu Asp Val Ala Arg Tyr Asp
100     105     110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115     120

```

```

<210> 9
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> IGF1R-5_H5
<400> 9

```

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ile Asp Asn Tyr
20      25      30
Ala Met Ala Trp Ser Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val
35      40      45
Ala Thr Ile Asp Trp Gly Asp Gly Gly Thr Arg Tyr Ala Asn Ser Val
50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Gly Thr Met Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ser Cys
85      90      95
Ala Met Ala Arg Gln Ser Arg Val Asn Leu Asp Val Ala Arg Tyr Asp
100     105     110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115     120

```

[0004]

```

<210> 10
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> IGF1R-5_H6
<400> 10

```

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ile Asp Asn Tyr
20      25      30
Ala Met Ala Trp Ser Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val
35      40      45
Ser Thr Ile Asp Trp Gly Asp Gly Gly Thr Arg Tyr Ala Asn 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 Met Ala Arg Gln Ser Arg Val Asn Leu Asp Val Ala Arg Tyr Asp
100     105     110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115     120

```

```

<210> 11
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> IGF1R-5表位
<400> 11

```

```

Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg
1      5      10

```

```

<210> 12

```

<211> 370
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> IGF1R-5-mFc融合体
 <400> 12
 Gln Val Lys Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ile Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ala Trp Ser Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Asp Trp Gly Asp Gly Gly Ala Arg Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Gly Thr Met Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Asn Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ser Cys
 85 90 95
 Ala Met Ala Arg Gln Ser Arg Val Asn Leu Asp Val Ala Arg Tyr Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Met Thr Val Asp
 115 120 125
 Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro
 130 135 140
 Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly
 145 150 155 160
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
 165 170 175
 Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
 180 185 190
 Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His
 195 200 205
 Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg
 210 215 220
 Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys
 225 230 235 240
 Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 245 250 255
 [0005] Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
 260 265 270
 Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu
 275 280 285
 Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp
 290 295 300
 Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val
 305 310 315 320
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys
 325 330 335
 Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His
 340 345 350
 Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro
 355 360 365
 Gly Lys
 370

 <210> 13
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> mFc-IGF1R-5融合体
 <400> 13
 Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys
 1 5 10 15
 Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val
 20 25 30
 Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr
 35 40 45
 Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp
 50 55 60
 Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln
 65 70 75 80
 Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser
 85 90 95
 Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
 100 105 110

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile
 115 120 125
 Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu Pro
 130 135 140
 Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu
 145 150 155 160
 Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn
 165 170 175
 Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser
 180 185 190
 Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys
 195 200 205
 Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu
 210 215 220
 Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly
 245 250 255
 Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 260 265 270
 Gly Arg Thr Ile Asp Asn Tyr Ala Met Ala Trp Ser Arg Gln Ala Pro
 275 280 285
 Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val Ala Thr Ile Asp Trp Gly Asp Gly Gly
 290 295 300
 Ala Arg Tyr Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 305 310 315 320
 Asn Ala Lys Gly Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Glu Pro Glu
 325 330 335
 Asp Thr Ala Val Tyr Ser Cys Ala Met Ala Arg Gln Ser Arg Val Asn
 340 345 350
 Leu Asp Val Ala Arg Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 355 360 365
 Val Ser Ser
 370

<210> 14
 <211> 1367
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 人IGFIR
 <400> 14

[0006]

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
 1 5 10 15
 Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
 20 25 30
 Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
 35 40 45
 Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
 50 55 60
 Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
 65 70 75 80
 Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
 85 90 95
 Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
 100 105 110
 Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
 115 120 125
 Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
 130 135 140
 Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
 145 150 155 160
 Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
 165 170 175
 Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
 180 185 190
 Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
 195 200 205
 Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
 210 215 220
 Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
 225 230 235 240
 Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
 245 250 255
 Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
 260 265 270

[0007]

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
 275 280 285
 Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
 290 295 300
 Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
 305 310 315 320
 Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
 325 330 335
 Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
 340 345 350
 Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
 355 360 365
 Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
 370 375 380
 Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
 385 390 395 400
 Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
 405 410 415
 Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
 420 425 430
 Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
 435 440 445
 Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
 450 455 460
 Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
 465 470 475 480
 Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
 485 490 495
 Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
 500 505 510
 Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
 515 520 525
 Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
 530 535 540
 Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
 545 550 555 560
 Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
 565 570 575
 Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
 580 585 590
 His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
 595 600 605
 Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
 610 615 620
 Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
 625 630 635 640
 Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
 645 650 655
 Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
 660 665 670
 Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
 675 680 685
 Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
 690 695 700
 Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
 705 710 715 720
 Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
 725 730 735
 Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
 740 745 750
 Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
 755 760 765
 Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
 770 775 780
 Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
 785 790 795 800
 Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
 805 810 815
 Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
 820 825 830
 Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
 835 840 845
 Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
 850 855 860
 Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
 865 870 875 880

[0008]

```

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
      885      890      895
Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
      900      905      910
Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
      915      920      925
Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala Val
      930      935      940
Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His Arg
      945      950      955      960
Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser Val
      965      970      975
Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp
      980      985      990
Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser Arg Glu Leu Gly Gln Gly
      995      1000      1005
Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val Lys
      1010      1015      1020
Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Val Asn Glu Ala
      1025      1030      1035
Ala Ser Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val
      1040      1045      1050
Met Lys Glu Phe Asn Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val
      1055      1060      1065
Val Ser Gln Gly Gln Pro Thr Leu Val Ile Met Glu Leu Met Thr
      1070      1075      1080
Arg Gly Asp Leu Lys Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Met
      1085      1090      1095
Glu Asn Asn Pro Val Leu Ala Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met Ile
      1100      1105      1110
Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala
      1115      1120      1125
Asn Lys Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Val
      1130      1135      1140
Ala Glu Asp Phe Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Thr Arg
      1145      1150      1155
Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly Lys Gly Leu
      1160      1165      1170
Leu Pro Val Arg Trp Met Ser Pro Glu Ser Leu Lys Asp Gly Val
      1175      1180      1185
Phe Thr Thr Tyr Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp
      1190      1195      1200
Glu Ile Ala Thr Leu Ala Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Leu Ser Asn
      1205      1210      1215
Glu Gln Val Leu Arg Phe Val Met Glu Gly Gly Leu Leu Asp Lys
      1220      1225      1230
Pro Asp Asn Cys Pro Asp Met Leu Phe Glu Leu Met Arg Met Cys
      1235      1240      1245
Trp Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro Ser Phe Leu Glu Ile Ile
      1250      1255      1260
Ser Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Pro Gly Phe Arg Glu Val Ser
      1265      1270      1275
Phe Tyr Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Leu Pro Glu Pro Glu Glu Leu
      1280      1285      1290
Asp Leu Glu Pro Glu Asn Met Glu Ser Val Pro Leu Asp Pro Ser
      1295      1300      1305
Ala Ser Ser Ser Ser Leu Pro Leu Pro Asp Arg His Ser Gly His
      1310      1315      1320
Lys Ala Glu Asn Gly Pro Gly Pro Gly Val Leu Val Leu Arg Ala
      1325      1330      1335
Ser Phe Asp Glu Arg Gln Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg
      1340      1345      1350
Lys Asn Glu Arg Ala Leu Pro Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys
      1355      1360      1365

```

```

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 弗林蛋白酶切割位点
<400> 15
Arg Lys Arg Arg
1

```

```

<210> 16

```

[0009]	<211>	33		
	<212>	DNA		
	<213>	人工的		
	<220>			
	<223>	正向引物		
	<400>	16		
		cgggatccgc caccatgaag tctggctccg gag	33	
	<210>	17		
	<211>	34		
	<212>	DNA		
	<213>	人工的		
	<220>			
	<223>	反向引物		
	<400>	17		
		gctctagatc agaagttttc atatcctgtt ttgg	34	
	<210>	18		
	<211>	45		
	<212>	DNA		
	<213>	人工的		
	<220>			
	<223>	MJ1引物		
	<400>	18		
		gccagccgg ccatggccsm kgtgcagctg gtggaktctg gggga	45	
	<210>	19		
	<211>	45		
	<212>	DNA		
	<213>	人工的		
	<220>			
	<223>	MJ2引物		
	<400>	19		
		gccagccgg ccatggccca ggtaaagctg gaggagtctg gggga	45	
	<210>	20		
	<211>	45		
	<212>	DNA		
	<213>	人工的		
	<220>			
	<223>	MJ3引物		
	<400>	20		
		gccagccgg ccatggccca ggctcaggta cagctggtgg agtct	45	
	<210>	21		
	<211>	21		
	<212>	DNA		
	<213>	人工的		
	<220>			
	<223>	CH2引物		
	<400>	21		
		cgccatcaag gtaccagttg a	21	
	<210>	22		
	<211>	29		
	<212>	DNA		
	<213>	人工的		
	<220>			
	<223>	CH2b3引物		
	<400>	22		
		gggtacctg tcattccacgg accagctga	29	
	<210>	23		
	<211>	34		
	<212>	DNA		
	<213>	人工的		
	<220>			
	<223>	MJ7引物		
	<400>	23		
		catgtgtaga ctgcggccc agccggccat ggcc	34	
	<210>	24		
	<211>	47		
	<212>	DNA		
	<213>	人工的		
	<220>			

[0010]

<223> MJ8引物
 <400> 24
 catgtgtaga ttcttgccg gcctggcctg aggagacggt gacctgg 47

<210> 25
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 正向引物
 <400> 25
 tatgaagaca ccaggcccag gtaaagctgg aggagtct 38

<210> 26
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 反向引物
 <400> 26
 ttgttcggat cctgaggaga cggtagacctg 30

<210> 27
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> IGF1R-5肽
 <400> 27
 Glu Phe Val Ala Thr Ile Asp Trp Gly Asp Gly Gly Ala Arg
 1 5 10

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> IGF1R-5肽
 <400> 28
 Thr Ile Asp Asn Tyr Ala Met Ala Trp Ser Arg
 1 5 10

<210> 29
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> IGF1R-5肽
 <400> 29
 Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg
 1 5 10 15

<210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> FC5和FC5_ILIS肽
 <400> 30
 Ile Thr Trp Gly Gly Asp Asn Thr Phe Tyr Ser Asn Ser Val Lys
 1 5 10 15

<210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> A20.1肽
 <400> 31
 Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5

<210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工的

[0011]

<220>
 <223> A20.1肽
 <400> 32
 Glu Phe Val Ala Ala Gly Ser Ser Thr Gly Arg
 1 5 10

 <210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> A20.1肽
 <400> 33
 Thr Phe Ser Met Asp Pro Met Ala Trp Phe Arg
 1 5 10

 <210> 34
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> A20.1肽
 <400> 34
 Asp Glu Tyr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Ala Gly Gln Gly Ser Glu Gln Lys
 20 25

 <210> 35
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> EG2肽
 <400> 35
 Asp Phe Ser Asp Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg
 1 5 10

 <210> 36
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> EG2肽
 <400> 36
 Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp Ser Leu Arg
 1 5 10 15

 <210> 37
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> EG2肽
 <400> 37
 Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
 1 5 10 15
 Val Tyr Tyr Cys Ala Val Asn Ser Ala Gly Thr Tyr Val Ser Pro Arg
 20 25 30

 <210> 38
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 白蛋白肽
 <400> 38
 Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala Ala Arg
 1 5 10

 <210> 39
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 甘丙肽-半胱氨酰胺

<400> 39
 Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Pro His Ala Ile
 1 5 10 15
 Asp Asn His Arg Ser Phe Ser Asp Lys His Gly Leu Thr
 20 25

<210> 40
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 信号肽
 <400> 40

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

<210> 41
 <211> 370
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> IGF1R-5-mFc共有序列融合体
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa是Glu或Gln
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa是Lys或Gln
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa是Val或Glu
 <220>

[0012]

<221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa是Ala或Pro
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (37)..(37)
 <223> Xaa是Val或Ser
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (44)..(44)
 <223> Xaa是Asp或Gly
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa是Leu或Arg
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (47)..(47)
 <223> Xaa是Phe或Trp
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (49)..(49)
 <223> Xaa是Ala或Ser
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (58)..(58)
 <223> Xaa是Ala或Thr
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (75)..(75)
 <223> Xaa是Ala或Ser
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (77)..(77)
 <223> Xaa是Gly或Asn
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (79)..(79)
 <223> Xaa是Met或Leu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (85).. (85)
 <223> Xaa是Asn或Arg
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (87).. (87)
 <223> Xaa是Glu或Arg
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (88).. (88)
 <223> Xaa是Pro或Ala
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (95).. (95)
 <223> Xaa是Ser或Tyr
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (119).. (119)
 <223> Xaa是Gln或Leu
 <400> 41
 Xaa Val Xaa Leu Xaa Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Xaa Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ile Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ala Trp Xaa Arg Gln Ala Pro Gly Lys Xaa Xaa Glu Xaa Val
 35 40 45
 Xaa Thr Ile Asp Trp Gly Asp Gly Gly Xaa Arg Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa Lys Xaa Thr Xaa Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Xaa Leu Xaa Xaa Glu Asp Thr Ala Val Tyr Xaa Cys
 85 90 95
 Ala Met Ala Arg Gln Ser Arg Val Asn Leu Asp Val Ala Arg Tyr Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser Met Thr Val Asp
 115 120 125
 Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro
 130 135 140
 Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly
 145 150 155 160
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
 165 170 175
 Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
 180 185 190
 Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His
 195 200 205
 Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg
 210 215 220
 Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys
 225 230 235 240
 Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 245 250 255
 Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
 260 265 270
 Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu
 275 280 285
 Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp
 290 295 300
 Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val
 305 310 315 320
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys
 325 330 335
 Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His
 340 345 350
 Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro
 355 360 365
 Gly Lys
 370
 <210> 42
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> mFc-IGF1R-5共有序列融合体

[0014]

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (248).. (248)
<223> Xaa是Glu或Gln
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (250).. (250)
<223> Xaa是Lys或Gln
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (252).. (252)
<223> Xaa是Val或Glu
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (261).. (261)
<223> Xaa是Ala或Pro
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (284).. (284)
<223> Xaa是Val或Ser
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (291).. (291)
<223> Xaa是Asp或Gly
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (292).. (292)
<223> Xaa是Leu或Arg
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (294).. (294)
<223> Xaa是Phe或Trp
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (296).. (296)
<223> Xaa是Ala或Ser
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (305).. (305)
<223> Xaa是Ala或Thr
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (322).. (322)
<223> Xaa是Ala或Ser
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (324).. (324)
<223> Xaa是Ala或Ser
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (326).. (326)
<223> Xaa是Gly或Asn
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (332).. (332)
<223> Xaa是Met或Leu
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (332).. (332)
<223> Xaa是Asn或Arg
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (334).. (334)
<223> Xaa是Glu或Arg
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (335).. (335)
<223> Xaa是Pro或Ala
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (342).. (342)
<223> Xaa是Ser或Tyr
<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (366).. (366)
<223> Xaa是Gln或Leu

[0015]

```

<400> 42
Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys
1      5      10      15
Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val
20     25     30
Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr
35     40     45
Pro Lys Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp
50     55     60
Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln
65     70     75     80
Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser
85     90     95
Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
100    105    110
Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile
115    120    125
Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu Pro
130    135    140
Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu
145    150    155    160
Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn
165    170    175
Gly His Thr Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser
180    185    190
Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys
195    200    205
Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu
210    215    220
Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Gly Gly
225    230    235    240
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Xaa Val Xaa Leu Xaa Glu Ser Gly Gly
245    250    255
Gly Leu Val Gln Xaa Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
260    265    270
Gly Arg Thr Ile Asp Asn Tyr Ala Met Ala Trp Xaa Arg Gln Ala Pro
275    280    285
Gly Lys Xaa Xaa Glu Xaa Val Xaa Thr Ile Asp Trp Gly Asp Gly Gly
290    295    300
Xaa Arg Tyr Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
305    310    315    320
Asn Xaa Lys Xaa Thr Xaa Tyr Leu Gln Met Asn Xaa Leu Xaa Xaa Glu
325    330    335
Asp Thr Ala Val Tyr Xaa Cys Ala Met Ala Arg Gln Ser Arg Val Asn
340    345    350
Leu Asp Val Ala Arg Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr
355    360    365
Val Ser Ser
370

```

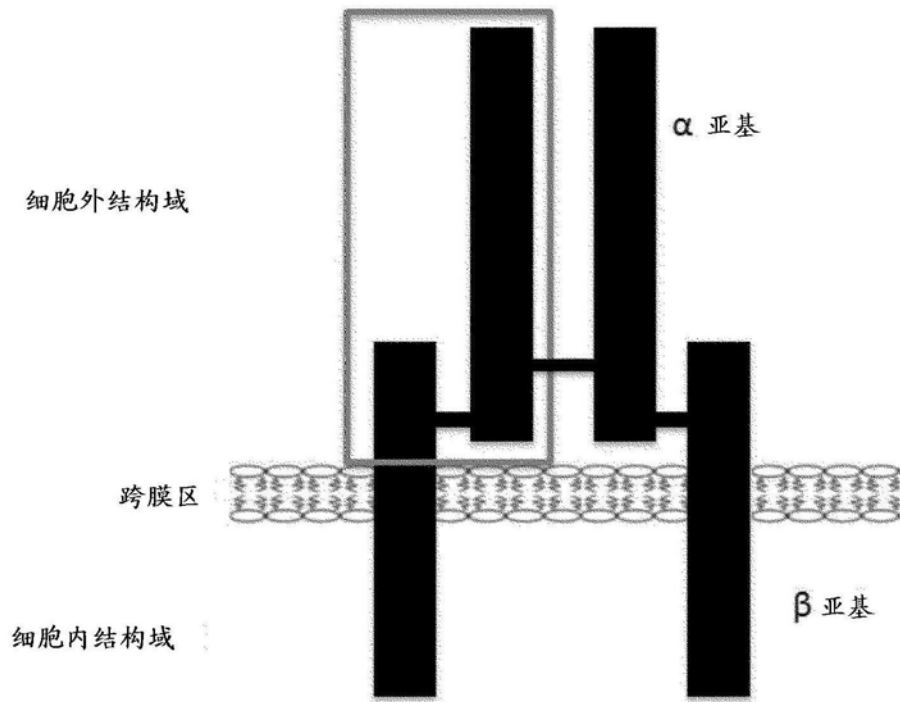


图1

MKSGSGGGSP	TSLWGLLFLS	AALSLWPTSG	EICGPGIDIR	NDYQQLKRLE	NCTVIEGYLH	60
ILLISKAEDY	RSYRFPKLTV	ITEYLLLFRV	AGLESLGDLF	PNLTVIRGWK	LFYNYALVIF	120
EMTNLKDIGL	YNLRNITRGA	IRIEKNADLC	YLSTVDWSLI	LDAVSNNYIV	GNKPPKECGD	180
LCPGTMECKP	MCEKTTINNE	YNYRCWTTNR	CQKMCPSTCG	KRACTENNEC	CHPECLGSCS	240
APDNDTACVA	CRHYYYAGVC	VPACPPNTYR	FEGWRCVDRD	FCANILSAES	SDSEGFVIHD	300
GECMQECPSG	FIRNGSQSMY	CIPCEGPCPK	VCEEEKKTKT	IDSVTSAQML	QGCTIFKGNL	360
LINIRRGNNI	ASELENFMGL	IEVVTGYVKI	RHSHALVSL	FLKNLRLILG	EEQLEGNYSF	420
YVLDNQNLQQ	LWDWDHRNLT	IKAGKMYFAF	NPKLCVSEIY	RMEEVTGTKG	RQSKGDINTR	480
NNGERASCES	DVLHFTSTTT	SKNRITITWH	RYPDPYRDL	ISFTVYYKEA	PFKNVTEYDG	540
QDACGSNSWN	MVDVDLPPNK	DVEPGILLHG	LKPWTQYAVY	VKAVTLTMVE	NDHIRGAKSE	600
ILYIRTNASV	PSIPLDVL	SNSSSQLIVK	WNPPSLPNGN	LSYYIVRWQR	QPQDGYLYRH	660
NYCSKDKIPI	RKYADGTIDI	EEVTENPKTE	VCGGEKGPCC	ACPKTEAEKQ	AEKEEAERYK	720
<u>VFENFLHNSI</u>	<u>FVPRPE</u> <i>kr</i>	DVMQVANTTM	SSRSRNTTAA	DTYNITDPEE	LETEYPPFES	780
RVDNKERTVI	SNLRPFTLYR	IDIHSCNHEA	EKLGCASASF	VFARTMPAEG	ADDIPGPVTW	840
EPRPENSIFL	KWPEPENPNG	LILMYEIKYG	SQVEDQRECV	SRQEYRKYGG	AKLNRLNPNG	900
YTARIQATSL	SGNGSWTDPV	FFYVQAKTGY	ENFIHLIIAL	PVAVLLIVGG	LVIMLYVFHR	960
KRNNSRLGNG	VLYASVNPEY	FSAADVYVPD	EWEVAREKIT	MSRELQGGSF	GMVYEGVAKG	1020
VVKDEPETRV	AIKTVNEAAS	MRERIEFLNE	ASVMKEFNCH	HVVRLLGVS	QGQPTLVIME	1080
LMTRGDLKSY	LRSLRPENEM	NPVLAPPSLS	KMIQMAGEIA	DGMAYLNANK	FVHRDLAARN	1140
CMVAEDFTVK	IGDFGMTRDI	YETDYYRKGG	KGLLPVRWMS	PESLKDGVFT	TYSDVWSFGV	1200
VLWEIATLAE	QPYQGLSNEQ	VLRFVMEGGL	LDKPDNCPDM	LFELMRMCWQ	YNPKMRPSFL	1260
EIISSIKEEM	EPGFREVSYF	YSEENKLPEP	EELDLEPENM	ESVPLDPSAS	SSSLPLPDRH	1320
SGHKAENGPG	PGVLVLRASF	DERQPYAHMN	GGRKNERALP	LPQSSTC		1367

图2

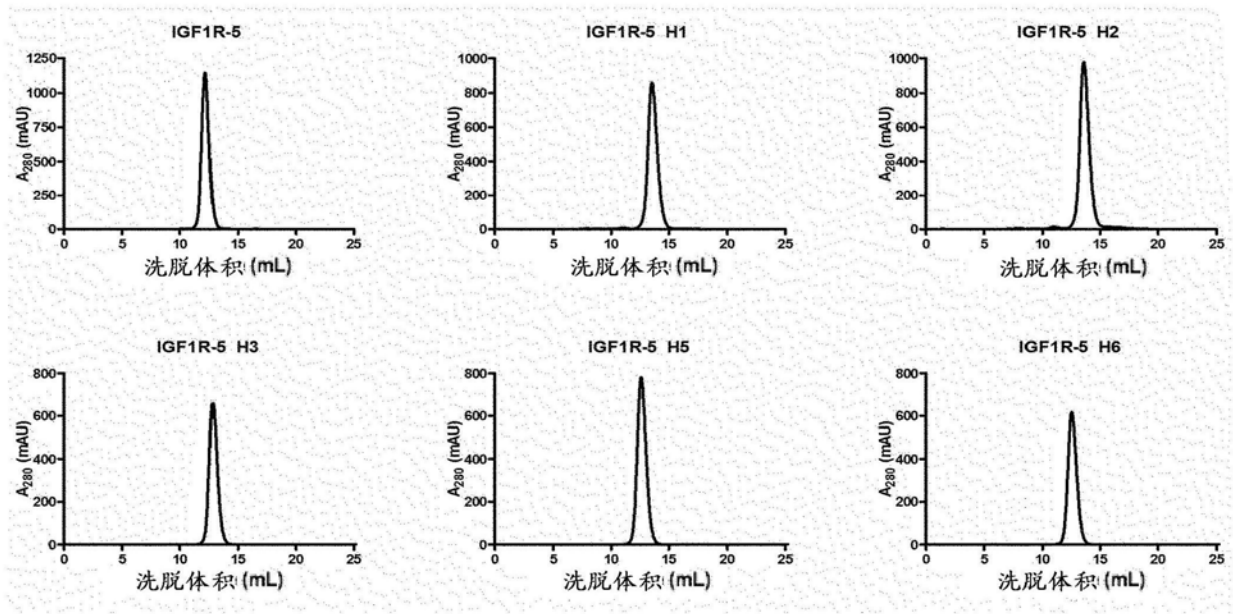


图3A

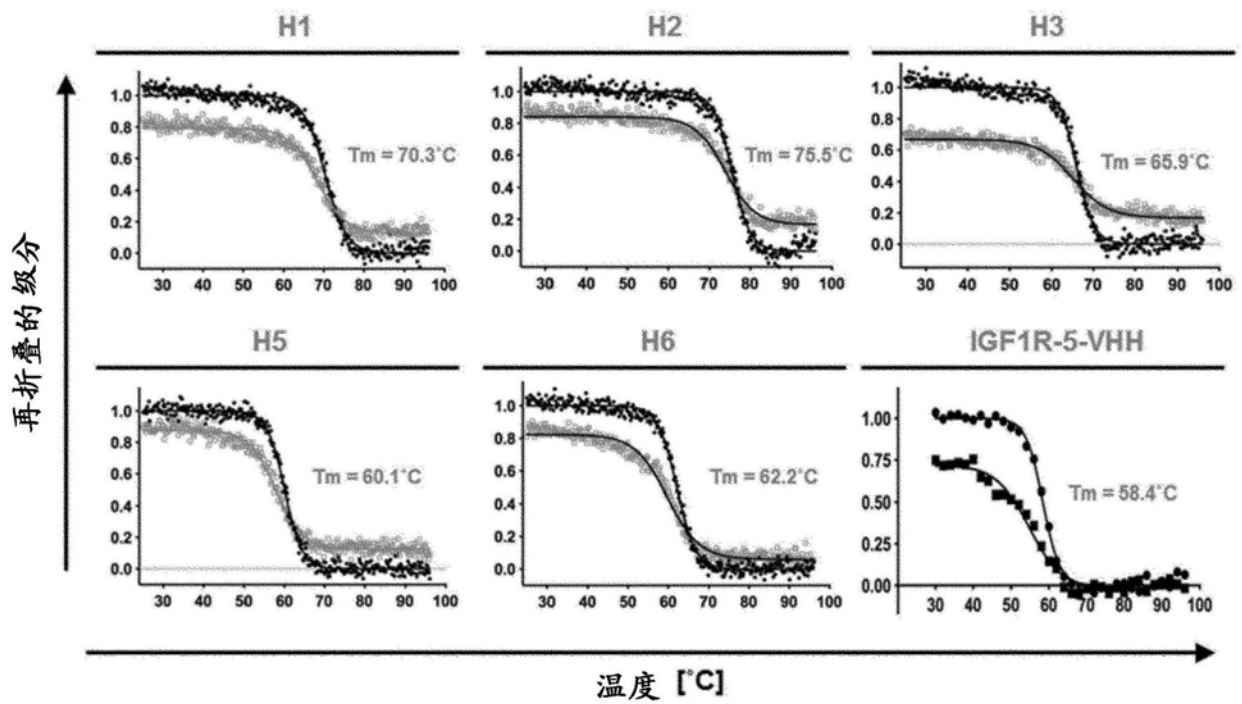


图3B

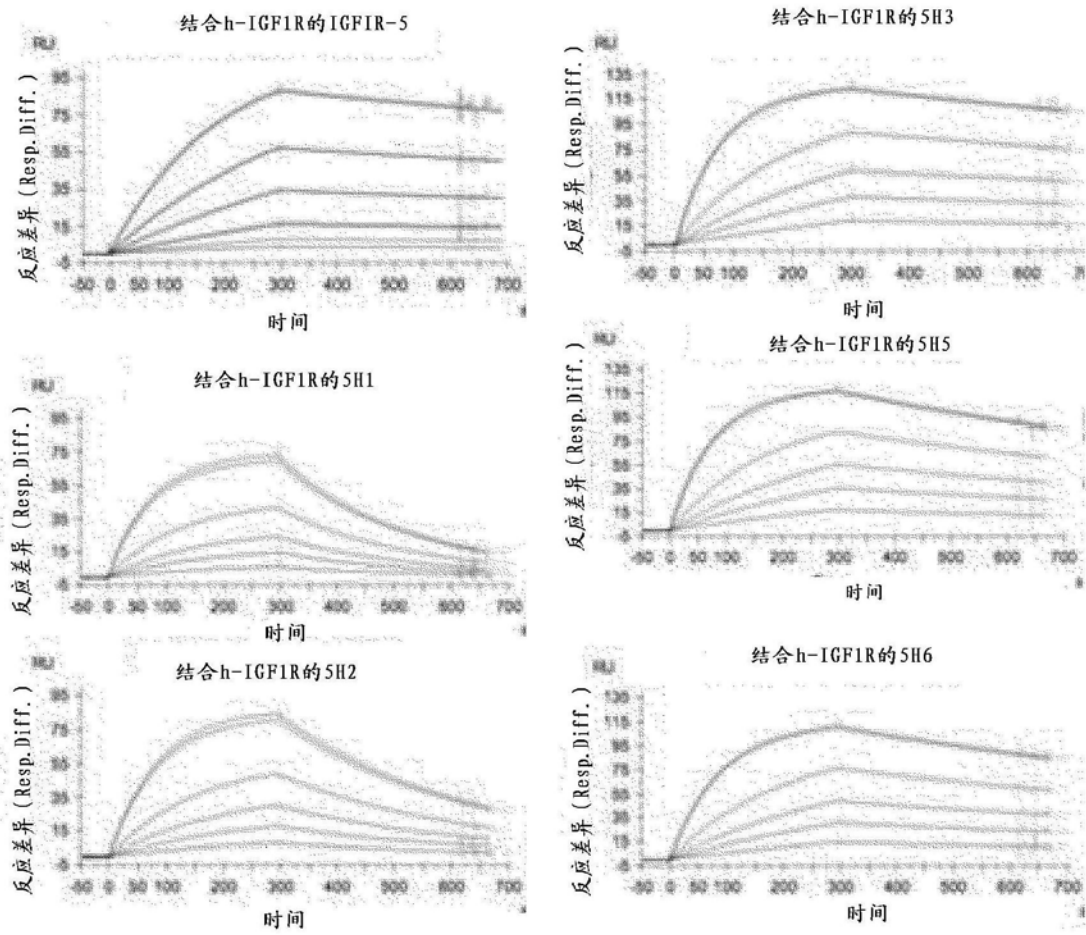


图3C

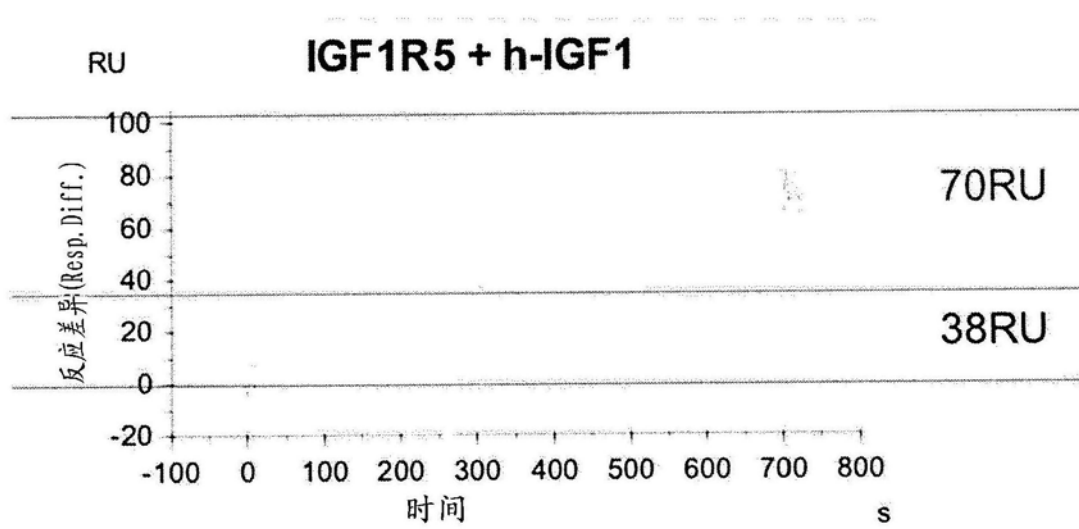


图3D

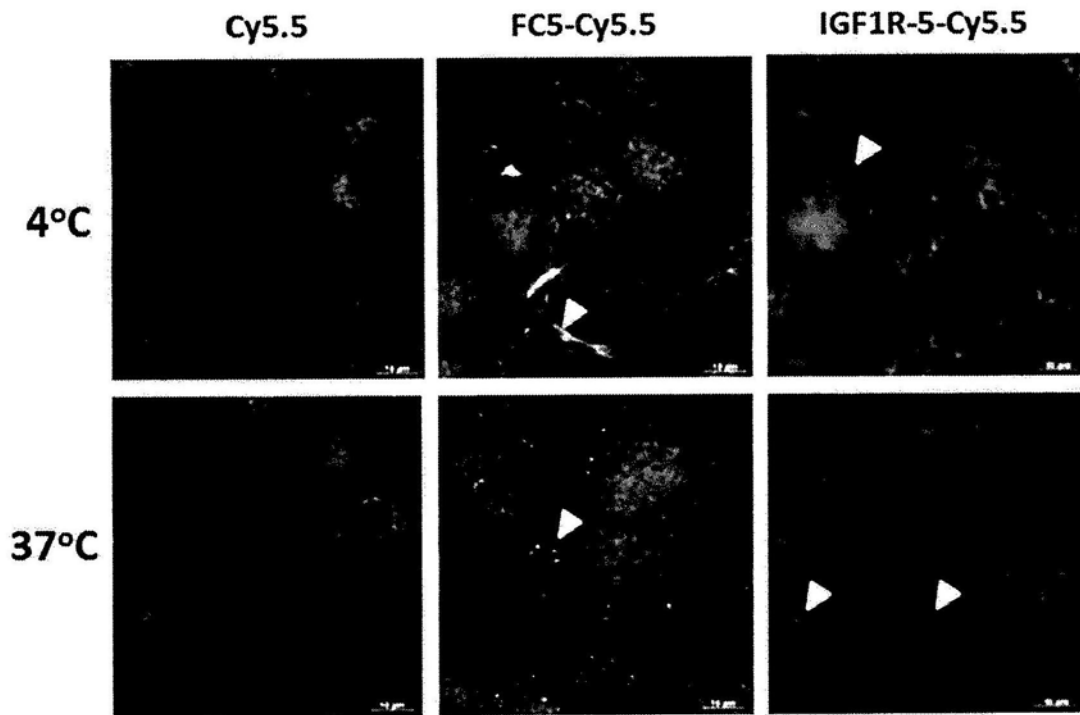


图4

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVATIDWGDGGARYANS
 VKGRFTISRDNAGTMYLQMNNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTQVTVSS
 MTVDKKLEPSGPSTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMI SLTPKVTCVVVDVSE
 DDPDVQISWVFNVEVHTAQQTTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPSPI
 IERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLD
 SDGSYFIYSKLNMKTSKWEKTD SFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK

图5A

EPSPGPISTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMI SLTPKVTCVVVDVSEDDPDVQI
 SWVFNVEVHTAQQTTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKI
 KGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSY
 FIYSKLNMKTSKWEKTD SFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGGGGSGGGGSQVKLEESGGGLVQ
 AGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFVATIDWGDGGARYANSVKGRFTISRDNAGT
 MYLQMNNLEPEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTQVTVSS

图5B

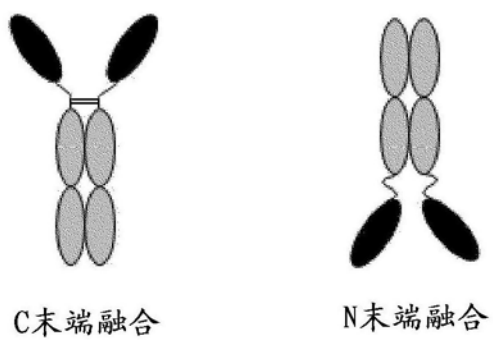


图5C

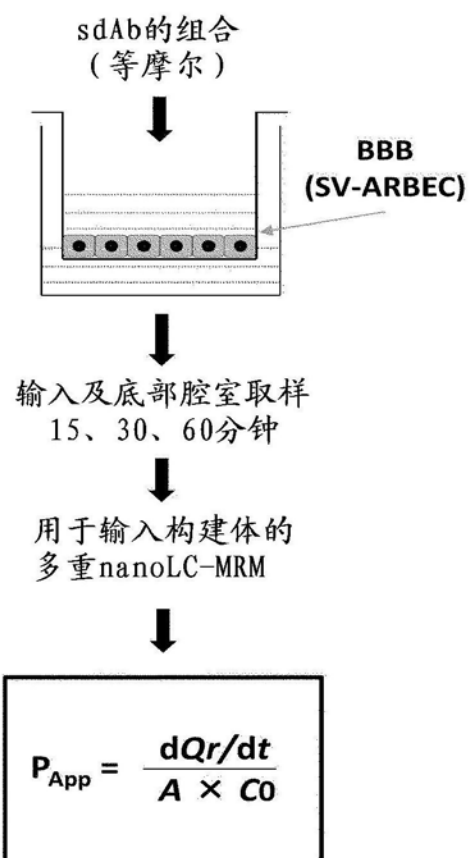


图6A

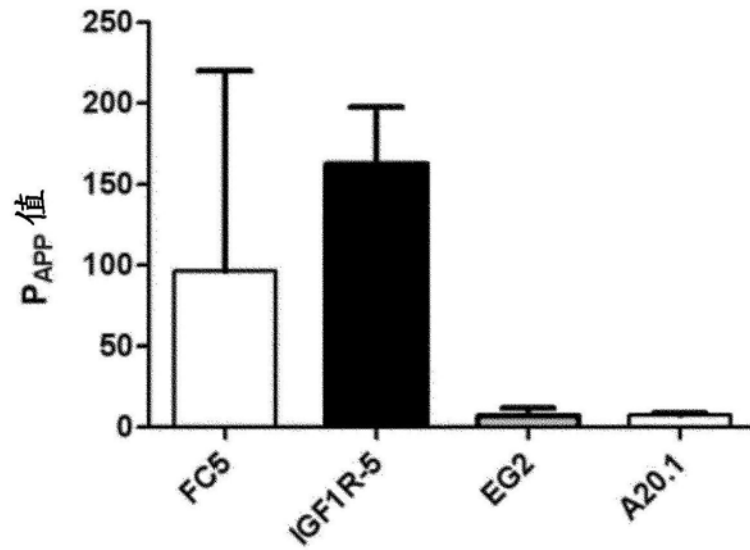


图6B

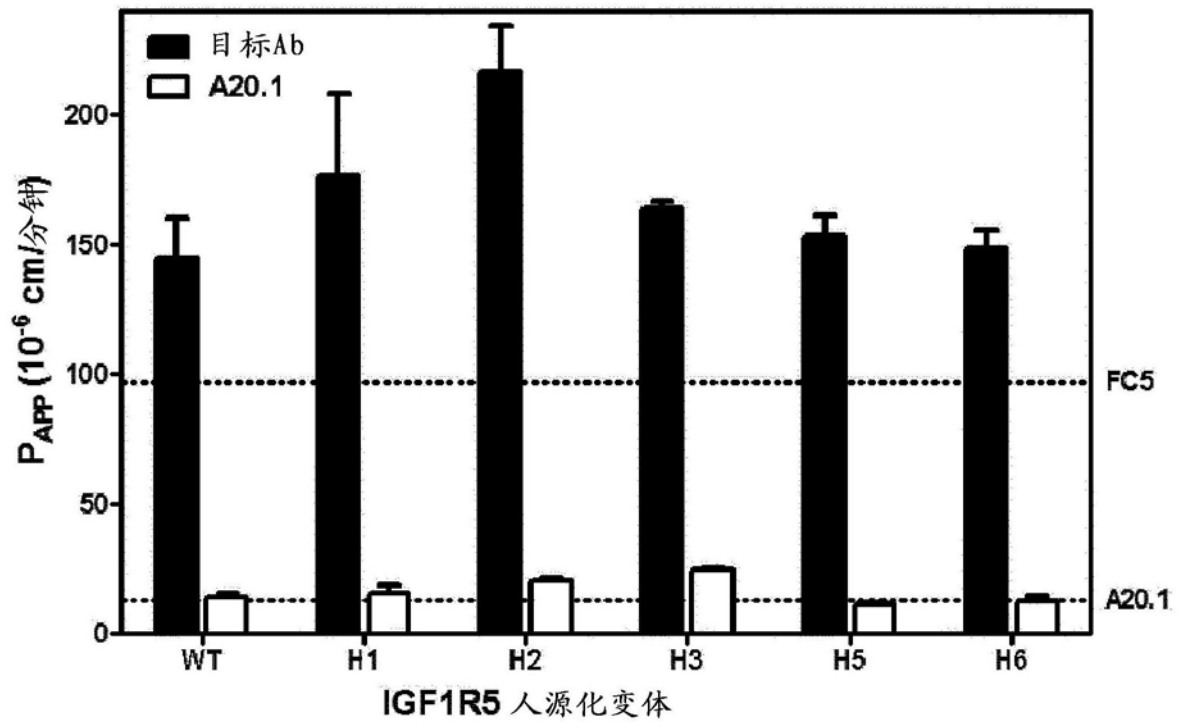


图6C

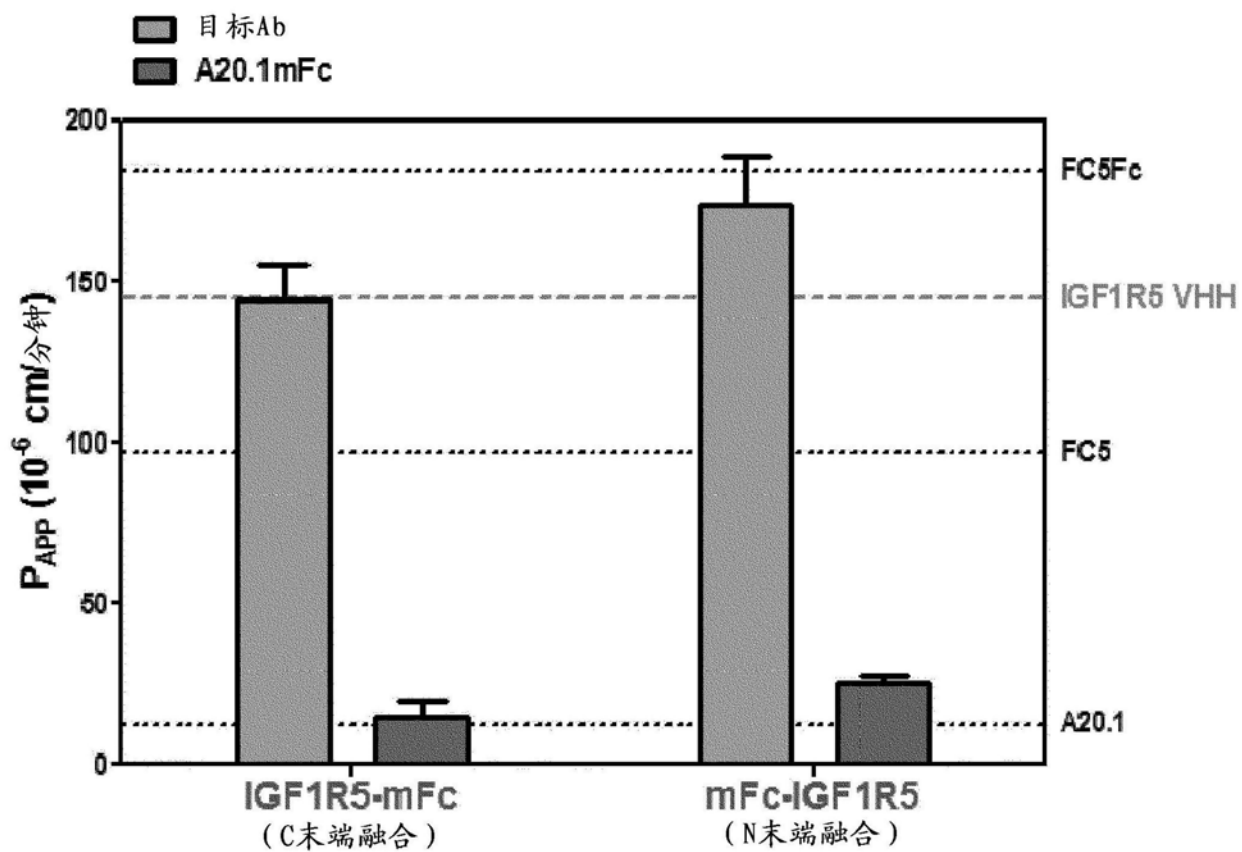


图6D

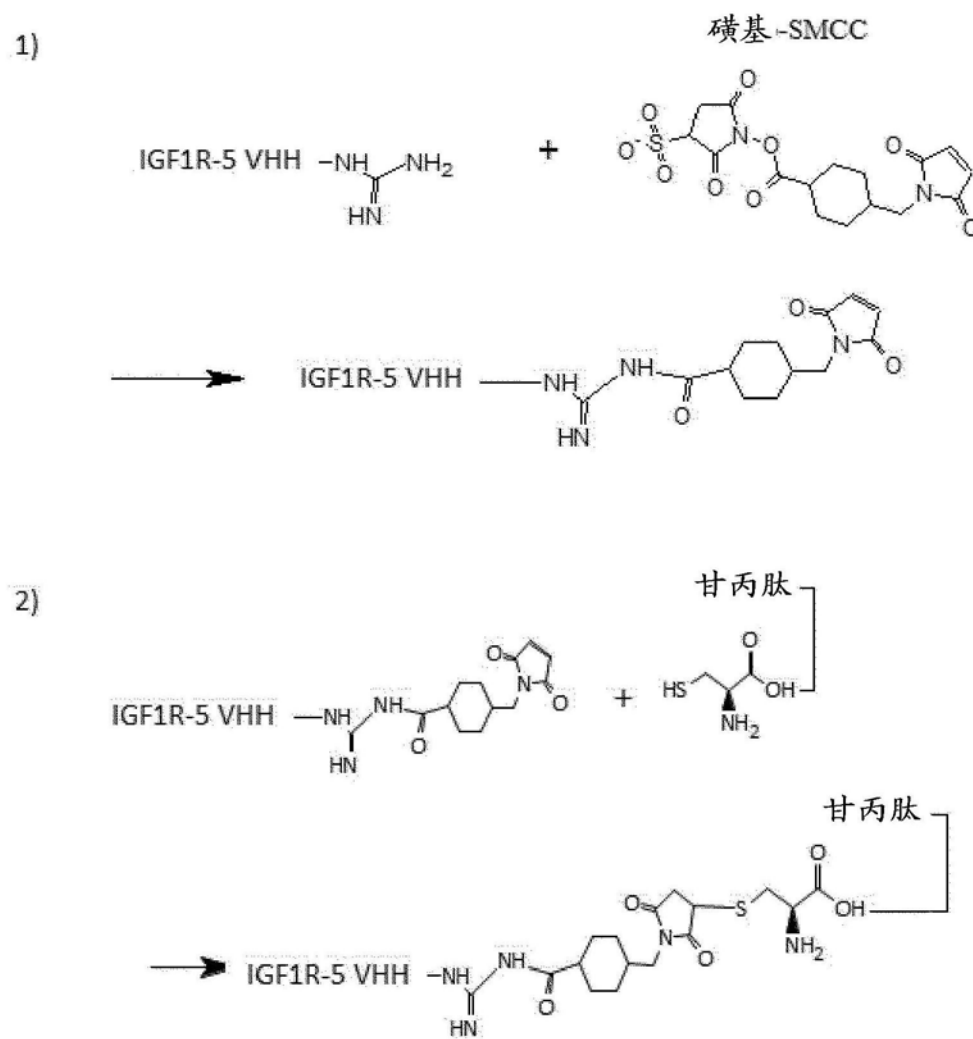


图7

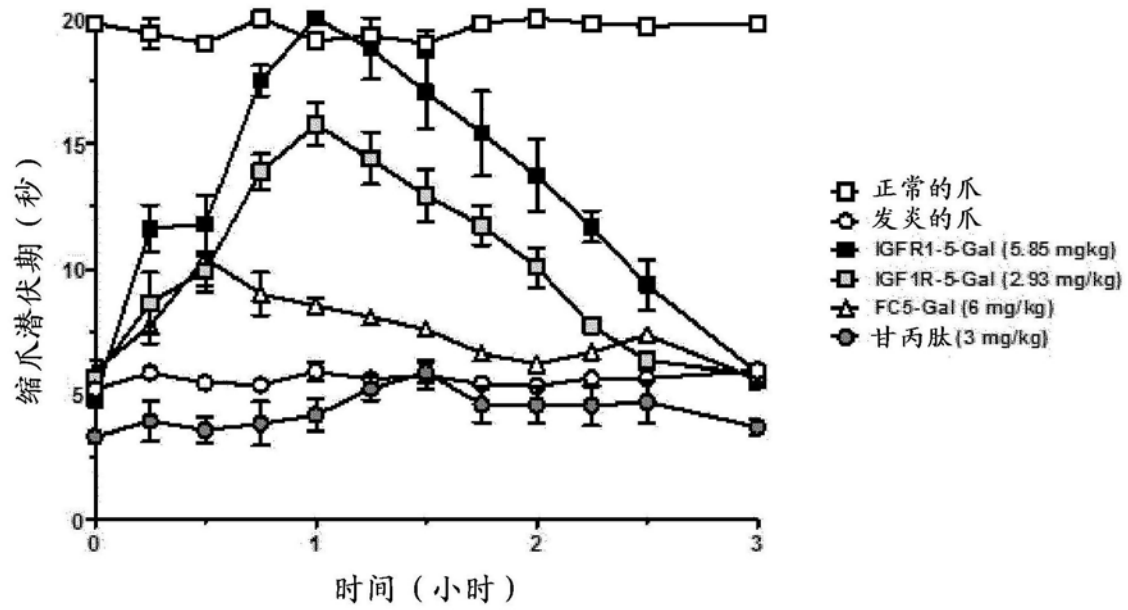


图8A

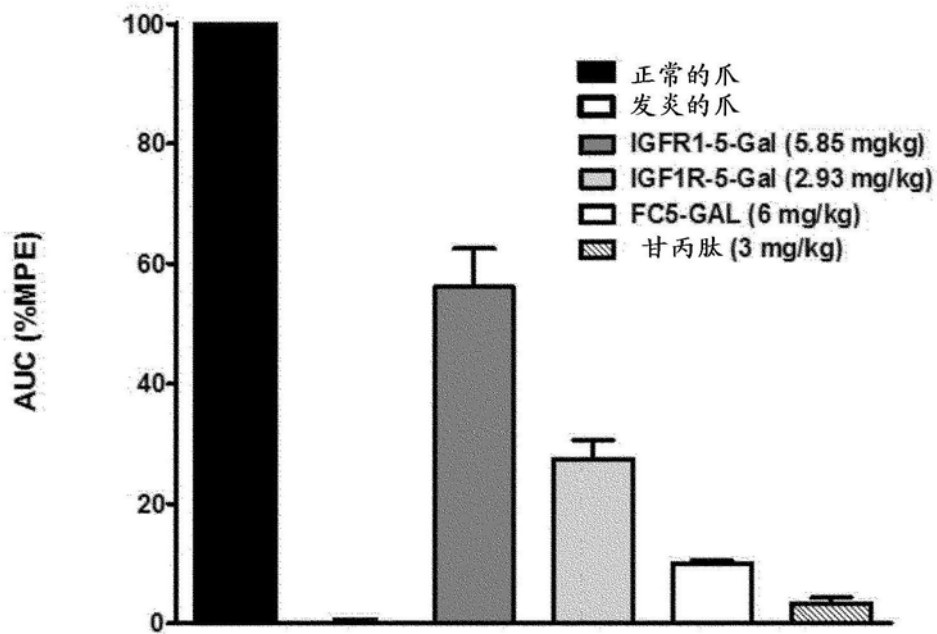


图8B

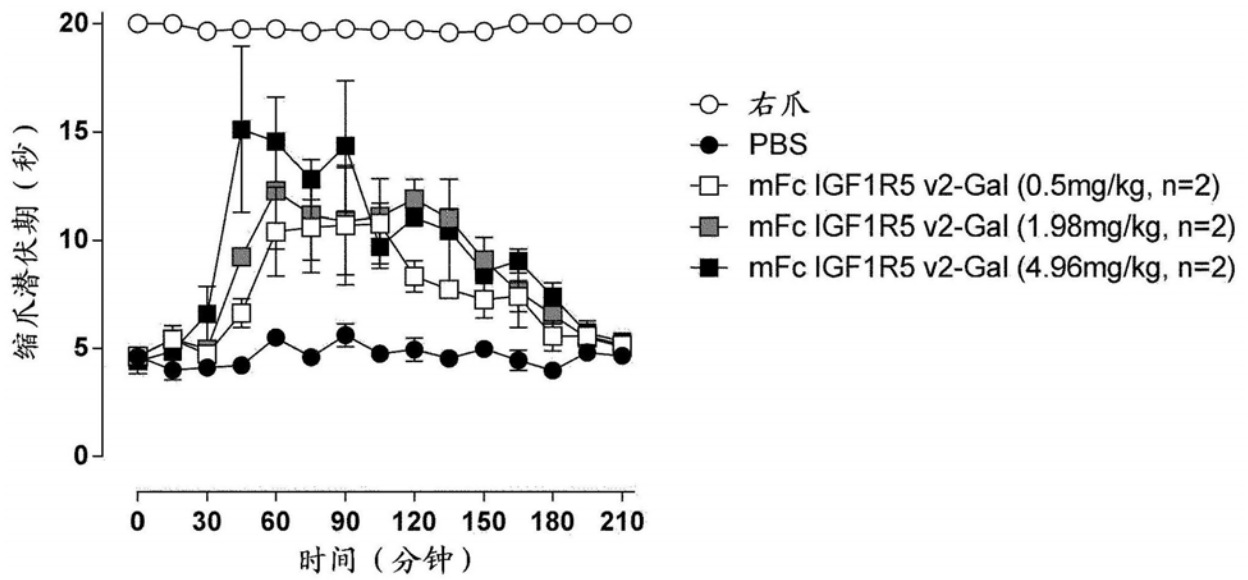


图8C

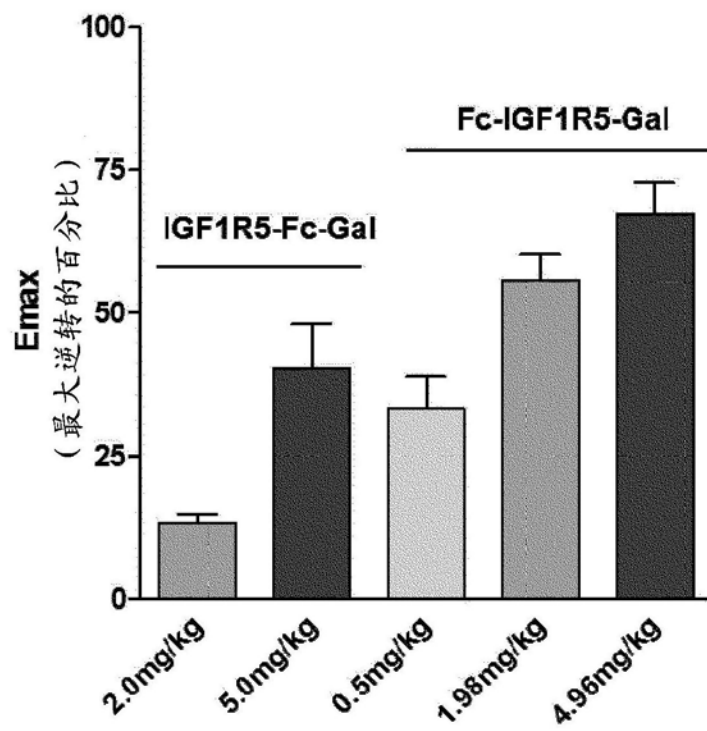


图8D

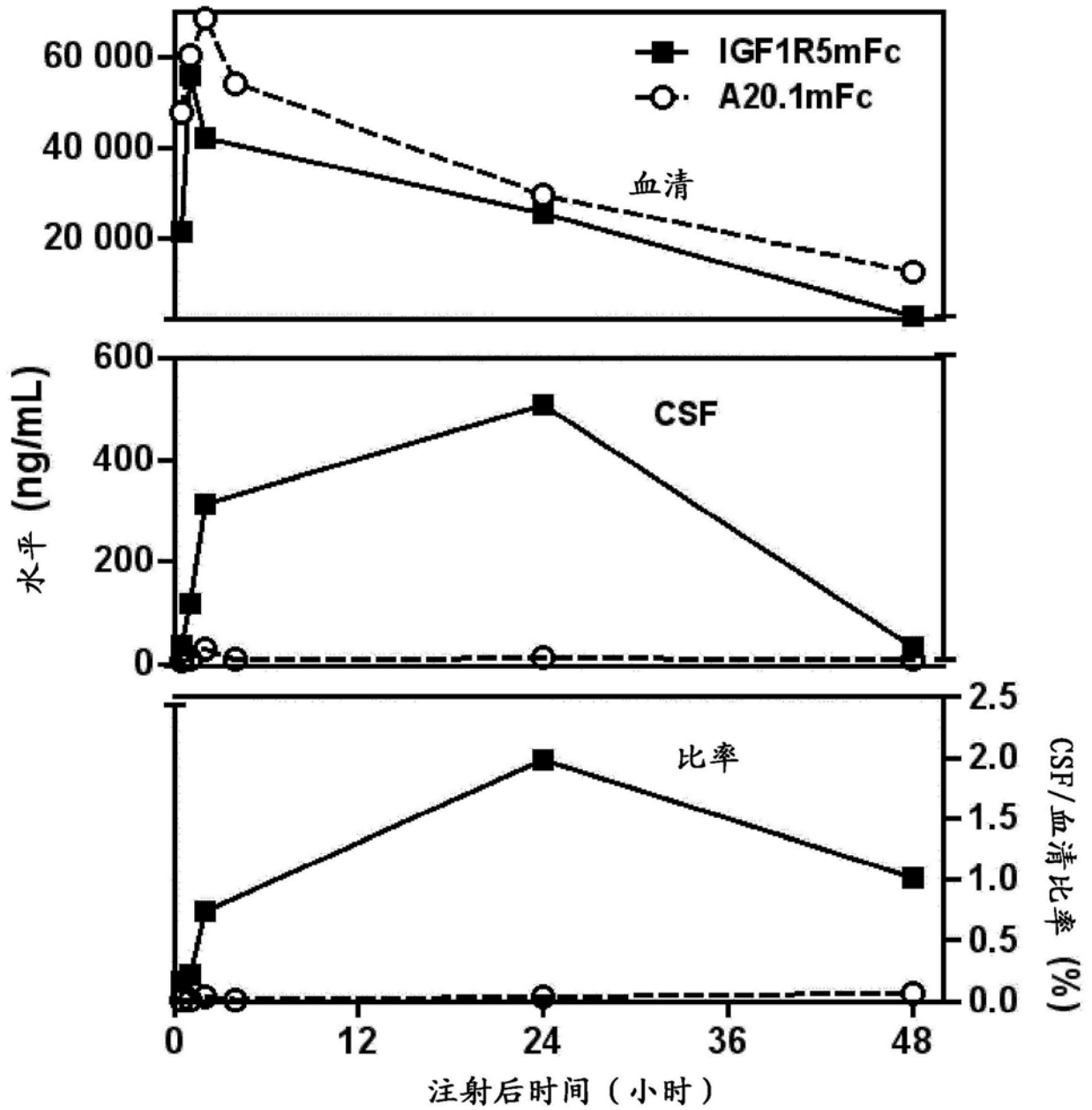


图9

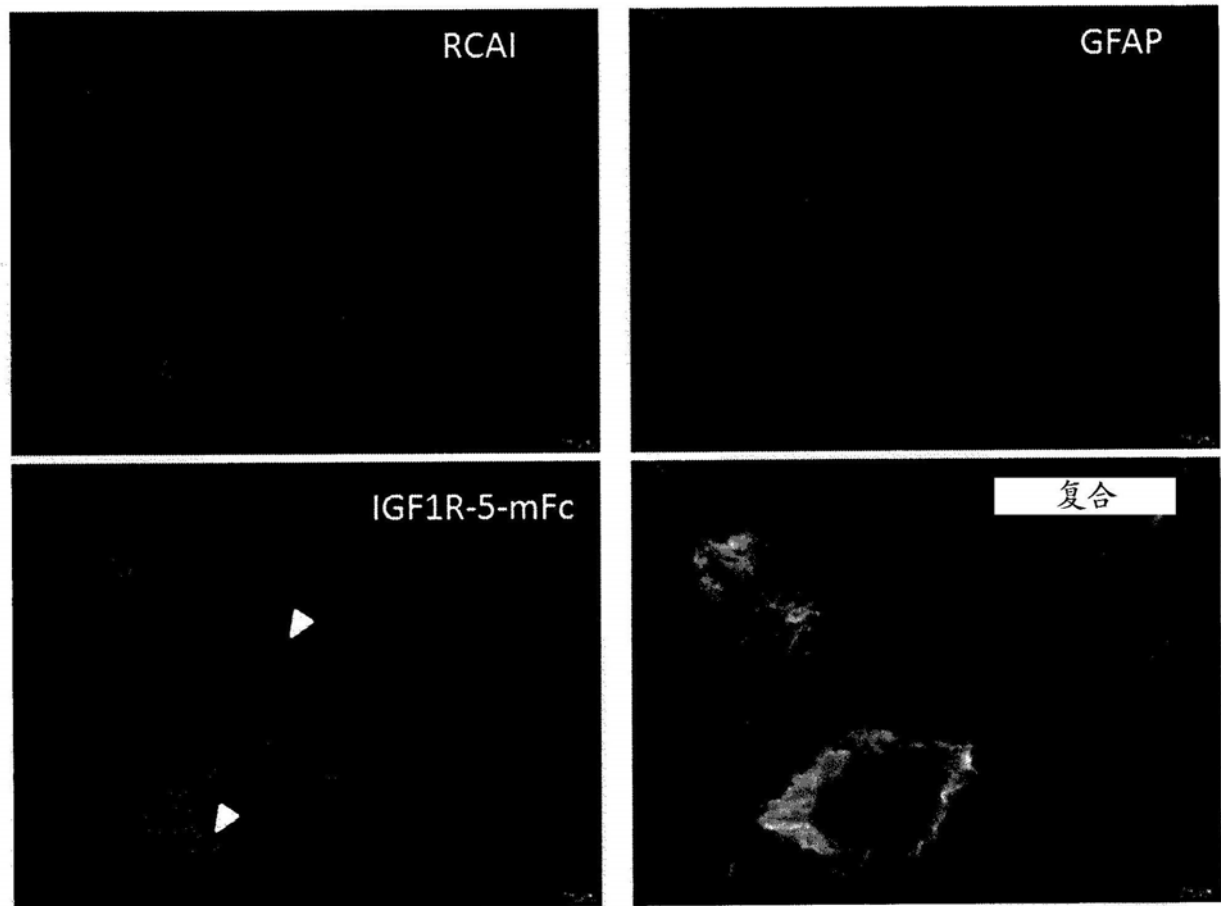


图10

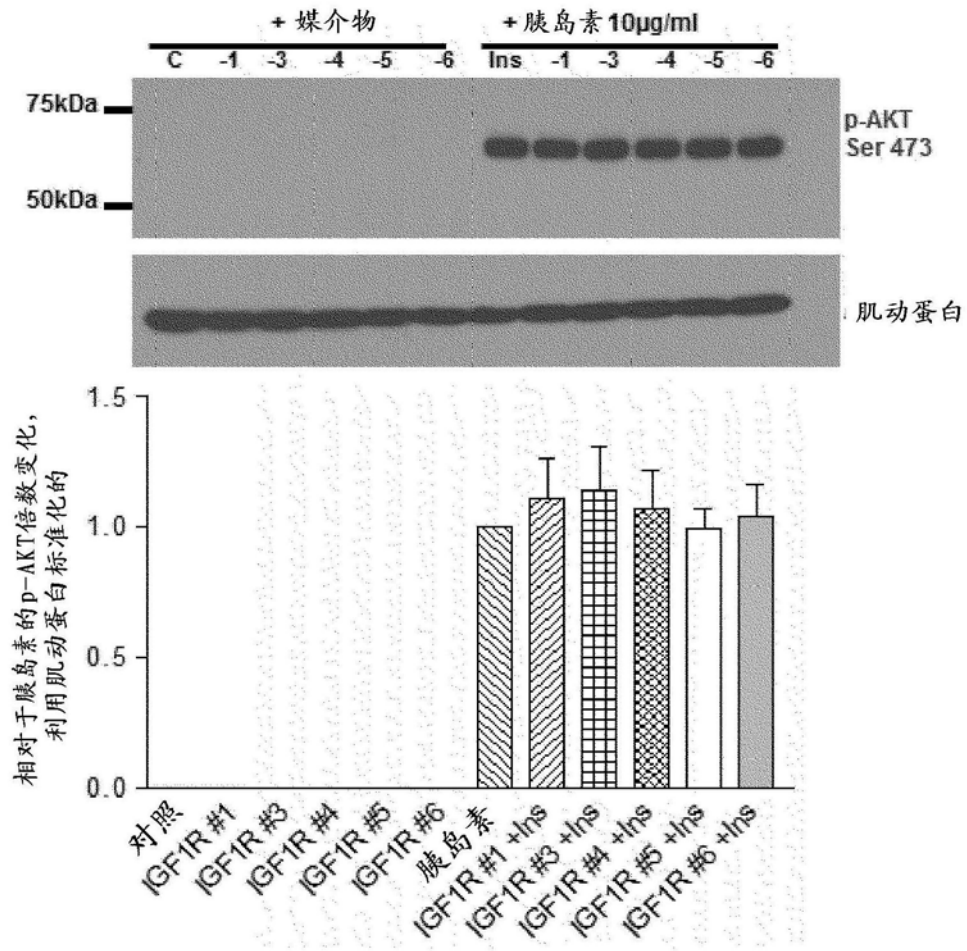


图11A

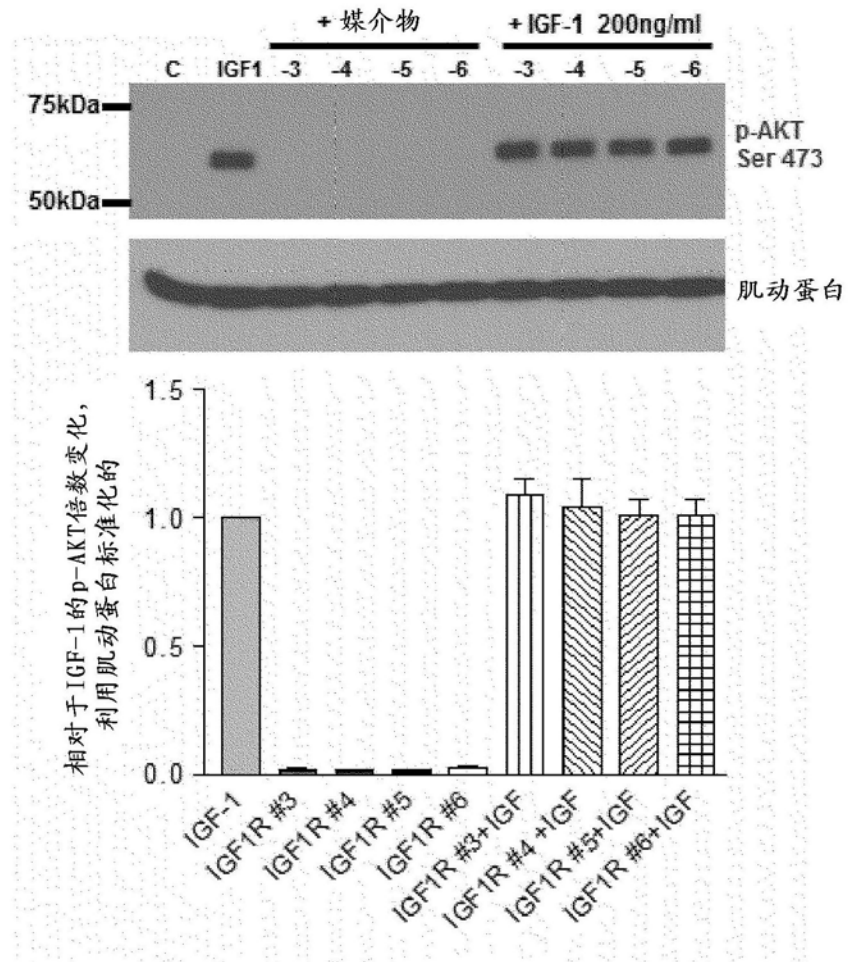


图11B

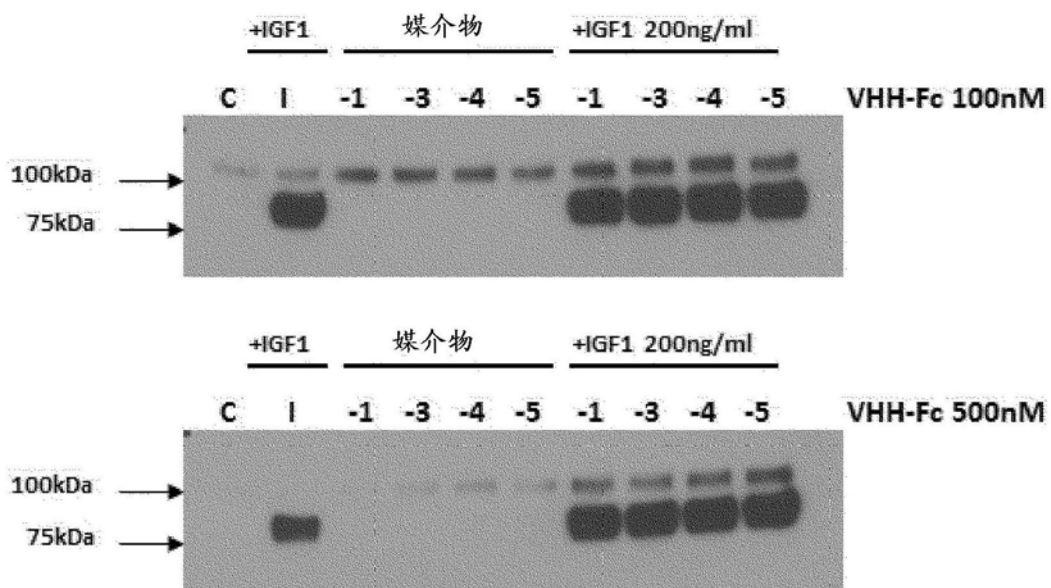


图11C

专利名称(译)	胰岛素样生长因子1受体特异性抗体及其用途		
公开(公告)号	CN106536555B	公开(公告)日	2019-10-18
申请号	CN201480078382.8	申请日	2014-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	加拿大国家研究委员会		
申请(专利权)人(译)	加拿大国家研究委员会		
当前申请(专利权)人(译)	加拿大国家研究委员会		
[标]发明人	D 斯坦尼米洛维克 K 凯默里奇 A S 哈坎尼 T 苏利 M阿巴比 格赫劳迪 B马西 R吉尔伯特		
发明人	D·斯坦尼米洛维克 K·凯默里奇 A·S·哈坎尼 T·苏利 M·阿巴比-格赫劳迪 B·马西 R·吉尔伯特		
IPC分类号	C07K16/28 A61K39/395 A61K49/00 C07K16/46 C07K17/00 C12N15/13 G01N33/53		
CPC分类号	A61K47/6811 A61K47/6849 A61K49/0002 A61K49/0058 A61K2039/505 C07K16/2863 C07K16/465 C07K2317/22 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/35 C07K2317/565 C07K2317/569 C07K2317/64 C07K2317/77 C07K2317/90 C07K2317/92 C07K2317/94 G01N33/57492 G01N33/68 G01N33/74 G01N2333/71 G01N2333/72 G01N2570/00 G01N2800/28		
审查员(译)	高赞		
优先权	61/948831 2014-03-06 US		
其他公开文献	CN106536555A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

血脑屏障(BBB)阻止大于500道尔顿的分子从血液转运至脑。受体介导的转胞吞(RMT)促进与形成BBB的脑内皮细胞上的受体结合的特定分子转运穿过BBB。鉴定了通过RMT迁移穿过BBB的胰岛素样生长因子1受体(IGF 1R)结合性抗体或其片段。所述抗体或片段被用于递送货物分子穿过BBB，其中所述货物分子可以是治疗剂或可检测试剂。所述抗体是骆驼VHH，通过用933个氨基酸的IGF 1R多肽免疫美洲驼来制备。还产生了骆驼VHH的人源化形式。

