



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121047** (13) **C2**

(51) МПК (2020.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61P 25/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: a 2017 11486</p> <p>(22) Дата подання заявки: 27.04.2016</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.03.2020</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 15305642.9</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 27.04.2015</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.06.2018, Бюл.№ 12</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.03.2020, Бюл.№ 6</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/EP2016/059338, 27.04.2016</p>	<p>(72) Винахідник(и): Жуанно Александра (FR)</p> <p>(73) Власник(и): ПЬЕР ФАБР МЕДІКАМЕНТ, 45, place Abel Gance, 92100 Boulogne-Billancourt, France (FR)</p> <p>(74) Представник: Новікова Лідія Аркадіївна, реєстр. №36</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2007126876 A2, 08.11.2007 US 2013084243 A1, 04.04.2013</p>
---	---

(54) АНТИТІЛО ДО IGF-1R ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ РАКУ

(57) Реферат:

Винахід стосується антитіла до IGF-1R (рецептора інсуліноподібного фактора росту 1), способу виявлення *in vitro* або *ex vivo* наявності і/або локалізації пухлинних клітин, експресуючих IGF-1R та набору, що містить таке антитіло.

UA 121047 C2

Даний винахід належить до нового антитіла, зокрема, до моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з IGF-1R, а також до послідовностей амінокислот та нуклеїнових кислот, кодуєчих вказане антитіло.

5 Рецептор інсуліноподібного фактора росту 1, який називається IGF-1R (або іноді IGF1R), являє собою рецептор з тирозинкіназою активністю, який має 70% гомології з інсуліновим рецептором IR. IGF-1R являє собою глікопротеїн з молекулярною масою приблизно 350000. Це гетеротетрамерний рецептор, в якому кожна з половин, зв'язаних дисульфідними містками, складається з позаклітинної α -субодиниці та трансмембранної β -субодиниці. IGF-1R зв'язує IGF1 та IGF2 з дуже високою афінністю (K_d 1 нМ), але у рівній мірі здатний зв'язуватися з інсуліном з афінністю в 100-1000 разів нижче. І навпаки, IR зв'язує інсулін з дуже високою афінністю, хоча IGF зв'язуються тільки з інсуліновим рецептором з афінністю в 100 разів нижче. Тирозинкіназні домени IGF-1R та IR мають дуже високу гомологію послідовностей, тоді як зони з більш слабкою гомологією відповідно належать до багатой на цистеїн ділянки, розташованої на α -субодиниці і на С-кінцевій частині β -субодиниці. Відмінності в послідовностях, що спостерігаються в α -субодиниці, розташовані в ділянці зв'язування лігандів і тому лежать в основі відносної афінності IGF-1R та IR до IGF та інсуліну, відповідно. Відмінності у С-кінцевій частині β -субодиниці призводять до розбіжності у сигнальних шляхах двох рецепторів; мітогенні, диференціювальні та антиапоптозні ефекти опосередковуються IGF-1R, тоді як активація IR, насамперед, включає ефекти на рівні метаболічних шляхів.

20 Роль системи IGF в канцерогенезі стала предметом інтенсивних досліджень в останні 20 років. Ця зацікавленість виникла у зв'язку з виявленням того факту, що IGF-1R, додатково до його мітогенних та антиапоптозних властивостей, мабуть, необхідний для становлення та підтримання трансформованого фенотипу. Фактично було точно встановлено, що у величезному різноманітті клітин надекспресія або конститутивна активація IGF-1R призводить до росту клітин незалежно від носія в середовищах, які не містять фетальної бичачої сироватки, і до утворення пухлин у бестимусних мишей. Сама по собі ця властивість не є унікальною, оскільки ціла низка продуктів надекспресованих генів може трансформувати клітини, включаючи значну кількість рецепторів факторів росту. Однак вирішальним відкриттям, яке наглядно продемонструвало основну роль, що виконує IGF-1R в трансформації, було виявлення того, що IGF-1R клітини, в яких ген, кодуєчий IGF-1R, був інактивованим, є повністю несприйнятливими до трансформації різними агентами, звичайно здатними трансформувати клітини, такими як білок E5 вірусу папіломи великої рогатої худоби, надекспресія EGFR або PDGFR, Т-антиген SV 40, активований Ras або комбінація цих двох останніх факторів.

35 В такому контексті IGF-1R довгий час розглядався як цікава мішень в онкології. Була ініційована велика кількість проєктів, направлених на IGF-1R (із застосуванням гуманізованих або людських антитіл або низькомолекулярних сполук), для розробки антагоністів IGF-1R для лікування ракових захворювань, і було виконано більше 70 клінічних випробувань за різними показаннями. Проте, до сьогоднішнього дня жоден з цих проєктів не був успішним, і на ринку немає антитіл до IGF-1R.

40 Метою даного винаходу є одержання щонайменше одного реагенту, який може бути використаний як діагностичний або прогностичний біомаркер для виявлення і/або моніторингу онкогенних розладів, особливо тих, що характеризуються експресією IGF-1R, або тих, що опосередковані аберантною експресією IGF-1R.

45 Раніше повідомлялося про попередні спроби одержати антитіло, що має цінність, яке можна використовувати як відповідний діагностичний або прогностичний інструмент, але жодна з них не була задовільною.

Як буде видно з наступних прикладів, автори винаходу несподівано показали, що комерційно доступні антитіла, які донині звичайно використовуються для кількісної оцінки пухлин, експресуючих IGF-1R, мабуть, є неактуальними, оскільки вони дають помилково позитивний і/або помилково негативний результат. Ця проблема призвела, зокрема, до невдачі в клінічних випробуваннях з антитілами до IGF-1R через вибір пацієнтів, а не реальної активності антитіл до IGF-1R.

Більше того, перші випробування, виконані з використанням комерційно доступних антитіл, показали невідповідність між кількісною оцінкою IGF-1R і протипухлинною активністю цільових ADC (англ. antibody drug conjugate – кон'югат антитіло–лікарський засіб), що використовуються в терапії.

Даний винахід призначений для усунення цієї проблеми за допомогою нового антитіла, яке, на відміну від вже існуючих, здатне до деформації, що корелює з фармакологією терапії, націленої на IGF-1R.

Згідно з першим аспектом, об'єктом даного винаходу є виділене антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, який з високою афінністю зв'язується з IGF-1R, переважно з людським IGF-1R, і тому може бути використаний у способах діагностики патологічних гіперпроліферативних онкогенних розладів, опосередкованих експресією IGF-1R.

5 Один з варіантів здійснення винаходу належить до антитіла або його антигензв'язуючого фрагмента, який містить шість ділянок, визначаючих комплементарність (CDR), послідовностей SEQ ID No. 1, 2, 3, 4, 5 та 6.

Згідно з одним варіантом здійснення, винахід належить до антитіла до IGF-1R або його антигензв'язуючого фрагмента, яке характеризується тим, що воно містить:

10 i) важкий ланцюг, що містить CDR-H1 послідовності SEQ ID No. 1, CDR-H2 послідовності SEQ ID No. 2 та CDR-H3 послідовності SEQ ID No. 3; і

ii) легкий ланцюг, що містить CDR-L1 послідовності SEQ ID No. 4, CDR-L2 послідовності SEQ ID No. 5 та CDR-L3 послідовності SEQ ID No. 6.

15 Терміни «антитіло», «антитіла», «ат» або «імуноглобулін» використовуються взаємозамінно у найширшому значенні та включають моноклональні антитіла, виділенні, сконструйовані, одержані шляхом хімічного синтезу або рекомбінантні антитіла (наприклад, повнорозмірні або інтактні моноклональні антитіла), поліклональні антитіла, полівалентні антитіла або мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла), а також фрагмент антитіла, за умови, що всі вони виявляють потрібну біологічну активність. Згідно з одним з варіантів здійснення, винахід належить до рекомбінантного антитіла.

20 Вираз «антитіло до IGF-1R», що використовується у даному описі, вважається аналогічним виразу «анти-IGF-1R антитіло» та означає антитіло, здатне зв'язуватися з IGF-1R.

25 Під «IGF-1R-зв'язуючим фрагментом» або «антигензв'язуючим фрагментом» антитіла мається на увазі будь-який пептид, поліпептид або білок, який зберігає здатність зв'язуватися з мішенню IGF-1R (яка також звичайно називається антигеном) антитіла. В одному з варіантів здійснення винаходу такі «антигензв'язуючі фрагменти» вибирають з групи, яка складається з Fv, scFv (sc означає одноланцюжковий), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc фрагментів або діател, або будь-якого фрагмента, час напівжиття якого був збільшений за допомогою хімічної модифікації, такої як додавання поліалкіленгліколю, такого як поліетиленгліколь («ПЕГіювання») (пегільовані фрагменти називають Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG або Fab'-PEG) («PEG» означає поліетиленгліколь), або шляхом включення в ліпосому, при цьому вказані фрагменти мають щонайменше один з характерних CDR антитіла згідно з винаходом. Переважно, вказані «антигензв'язуючі фрагменти» будуть складатися з або будуть містити часткову послідовність варіабельної ділянки важкого або легкого ланцюга антитіла, з якого вони одержані, при цьому вказана часткова послідовність є достатньою для зберігання такої самої специфічності зв'язування, як у антитіла, з якого вона одержана, і достатньої афінності, переважно, щонайменше рівною 1/100, більш переважно, щонайменше 1/10 афінності антитіла, з якого вона одержана, відносно мішені.

40 Переважно, вказаний «фрагмент, зв'язуючий IGF-1R» або «антигензв'язуючий фрагмент» містить щонайменше:

i) CDR-H1 послідовності SEQ ID No. 1, CDR-H2 послідовності SEQ ID No. 2 та CDR-H3 послідовності SEQ ID No. 3; а також

ii) CDR-L1 послідовності SEQ ID No. 4, CDR-L2 послідовності SEQ ID No. 5 та CDR-L3 послідовності SEQ ID No. 6.

45 Під термінами «зв'язування», «зв'язує» тощо мається на увазі, що антитіло або будь-який його антигензв'язуючий фрагмент формує з антигеном комплекс, який відносно стабільний у фізіологічних умовах. Специфічне зв'язування можна охарактеризувати рівноважною константою дисоціації, яка становить щонайменше приблизно 1×10^{-6} M або менше. Способи визначення того, чи будуть дві молекули зв'язуватися, добре відомі в даній галузі техніки і включають, наприклад, рівноважний діаліз, поверхневий плазмонний резонанс і тому подібне. Щоб уникнути невизначеності треба пояснити, що це не означає, що вказане антитіло не може зв'язуватися з іншим антигеном або чинити йому протидію на низькому рівні. Тим не менш, як варіант здійснення, вказане антитіло зв'язується тільки з вказаним антигеном.

55 Під ділянками CDR маються на увазі гіперваріабельні ділянки важких і легких ланцюгів імуноглобулінів відповідно до визначення Міжнародної інформаційної системи імуногенетики (IMGT).

60 Унікальна нумерація IMGT була створена для порівняння варіабельних доменів незалежно від антигенного рецептора, типу ланцюга або виду [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, F., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27,

55-77 (2003)]. В унікальній нумерації IMGT консервативні амінокислоти завжди мають одну і ту саму позицію, наприклад, цистеїн 23 (1st-CYS), триптофан 41 (CONSERVED-TRP), гідрофобна амінокислота 89, цистеїн 104 (2nd-CYS), фенілаланін або триптофан 118 (J-PHE або J-TRP). Унікальна нумерація IMGT пропонує стандартизоване розмежування каркасних ділянок (FR1-IMGT: позиції з 1 по 26, FR2-IMGT: з 39 по 55, FR3-IMGT: з 66 по 104, і FR4-IMGT: з 118 по 128) і ділянок, які визначають комплементарність: CDR1-IMGT: з 27 по 38, CDR2-IMGT: з 56 по 65, і CDR3-IMGT: з 105 по 117. Оскільки проміжки представляють незайняті позиції, то довжини CDR-IMGT (показані в дужках і розділені крапками, наприклад, [8.8.13]) стають важливою інформацією. Унікальна нумерація IMGT використовується в 2D графічних представленнях, позначених як IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], і в 3D структурах в IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Потрібно розуміти, що, не всупереч опису даного винаходу, ділянки, які визначають комплементарність, або CDR, означають гіперваріабельні ділянки важких і легких ланцюгів імуноглобулінів, як визначено відповідно до системи нумерації IMGT.

Тим не менш, CDR також можуть бути визначені відповідно до системи нумерації Kabat (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, і пізніші редакції). Існують три CDR важкого ланцюга і три CDR легкого ланцюга. В даному контексті термін «CDR» в однині та множині застосовується для позначення, залежно від випадку, однієї або більше або навіть всіх ділянок, які містять більшість амінокислотних залишків, відповідальних за афінність зв'язування антитіла з антигеном або епітопом, який воно розпізнає. Щоб спростити читання даної заявки, CDR відповідно до Kabat не визначають. Тим не менш, для фахівця в даній галузі було б нескладно, використовуючи визначення CDR відповідно до IMGT, визначити CDR відповідно до Kabat.

Згідно з окремим варіантом здійснення, антитіло до IGF-1R за винаходом характеризується тим, що воно містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID No. 7 або будь-якої послідовності, щонайменше на 90% гомологічної з послідовністю SEQ ID No. 7.

Згідно з окремим варіантом здійснення, антитіло до IGF-1R згідно з винаходом характеризується тим, що воно містить варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID No. 8 або будь-якої послідовності, щонайменше на 90% гомологічної з послідовністю SEQ ID No. 8.

Згідно з ще одним варіантом здійснення, антитіло, яке позначається як 816C12, характеризується тим, що воно містить послідовність варіабельного домену важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID No. 7 або послідовність, що має щонайменше 80%, переважно, 85%, 90%, 95% та 98% гомологію після оптимального вирівнювання з послідовністю SEQ ID No. 7; і/або тим, що воно містить послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID No. 8 або послідовність, що має щонайменше 80%, переважно, 85%, 90%, 95% та 98% гомологію після оптимального вирівнювання з послідовністю SEQ ID No. 8.

В контексті даного винаходу «відсоток гомології» між двома послідовностями нуклеїнових кислот або амінокислот означає відсоток ідентичних нуклеотидів або амінокислотних залишків між двома порівнюваними послідовностями, одержаний після оптимального вирівнювання, при цьому даний відсоток є чисто статистичним, і відмінності між цими двома послідовностями розподілені випадковим чином по їх довжині. Порівняння двох послідовностей нуклеїнових кислот або амінокислот традиційно виконується шляхом порівняння послідовностей після їх оптимального вирівнювання, при цьому вказане порівняння можна проводити по сегментах або за допомогою «вікна вирівнювання». Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння може бути здійснене, окрім порівняння вручну, за допомогою алгоритму пошуку локальних гомологій Сміта і Уотермана (Smith and Waterman) (1981) [Ad. App. Math. 2:482], за допомогою алгоритму пошуку локальної гомології Нідлмана і Вунша (Neddleman and Wunsch) (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], за допомогою способу пошуку подібності Пірсона і Ліпмана (Pearson and Lipman) (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] або за допомогою комп'ютерного програмного забезпечення, що використовує ці алгоритми (GAP, BESTFIT, FASTA та TFASTA в пакеті програмного забезпечення Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Медісон, Вісконсин, США, або за допомогою програмного забезпечення для порівняння BLAST NR або BLAST P). Для амінокислотної послідовності, яка має щонайменше 80%, переважно, щонайменше 85%, 90%, 95% та 98% гомологію з еталонною амінокислотною послідовністю, переважні приклади включають послідовності, які містять еталонну послідовність, визначені модифікації, зокрема, делецію, додавання або заміну щонайменше

однієї амінокислоти, усікання або подовження. У випадку заміни однієї або більше послідовних або непослідовних амінокислот переважними є такі заміни, в яких замінювані амінокислоти замінюються «еквівалентними» амінокислотами. В даному контексті вираз «еквівалентні амінокислоти» використовується для позначення будь-яких амінокислот, які можуть бути

5

замінені одною зі структурних амінокислот без зміни при цьому біологічних активностей відповідних антитіл, і конкретні приклади таких замін представлені нижче.

Еквівалентні амінокислоти можуть бути визначені або на основі їх структурної гомології з амінокислотами, які вони замінюють, або за результатами порівняльних аналізів біологічної активності різних антигензв'язуючих білків, які можуть бути утворені.

10

Як обмежувальний приклад у Таблиці 1 нижче представлені можливі заміни, які можуть бути здійснені без суттєвої зміни біологічної активності відповідного модифікованого антигензв'язуючого білка; зворотні заміни, зрозуміло, також можливі в тих самих умовах.

Таблиця 1

Вихідний залишок	Заміна(и)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser(S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp(W)	Tyr,
Tyr(Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

15

Окремим аспектом винаходу є те, що антитіло або будь-який його антигензв'язуючий фрагмент не зв'язується з інсуліновим рецептором (IR).

Згідно з іншим варіантом здійснення антитіло за винаходом складається з моноклонального антитіла.

20

Термін «моноклональне антитіло» або «Mab» при використанні в даному описі належить до антитіла, одержаного з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто індивідуальні антитіла популяції ідентичні, за виключенням можливих природних мутацій, які можуть бути присутніми в незначних кількостях. Моноклональні антитіла високоспецифічні, будучи направлені проти одного епітопа. Таке моноклональне антитіло може бути одержане при вирощуванні одного клону В клітин або гібридоми. Моноклональні антитіла також можуть бути рекомбінантними, тобто одержаними методами білкової інженерії. Моноклональні антитіла також можуть бути виділені з фагової бібліотеки антитіл. Крім того, на відміну від препаратів поліклональних антитіл, які звичайно включають різні антитіла, направлені проти різних детермінант або епітопів, кожне моноклональне антитіло направлено проти одного епітопа антигена. Винахід належить до антитіла, виділеного або одержаного шляхом очищення з природних джерел або одержаного шляхом генетичної рекомбінації або хімічного синтезу.

25

30

В іншому варіанті здійснення антитіло за винаходом складається з рекомбінантного антитіла. Термін «рекомбінантне антитіло» належить до антитіла, яке є результатом експресії рекомбінантної ДНК в живих клітинах. Рекомбінантне антитіло згідно з даним винаходом одержують з використанням лабораторних способів генетичної рекомбінації, добре відомих фахівцям у даній галузі, що утворюють послідовності ДНК, які не можуть бути виявлені в біологічних організмах.

35

В іншому варіанті здійснення антитіло за винаходом складається з хімічно синтезованого антитіла.

«Антитіло до IGF-1R» включає (без протиріччя опису) мишачу, а також химерну і гуманізовану форми вказаного антитіла до IGF-1R.

5 Для більшого розуміння наступна таблиця 2 ілюструє послідовності антитіла 816C12, визначені згідно з IMGT.

Таблиця 2

Антитіло	Нумерація CDR	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	SEQ ID No.
816C12 I-4894	IMGT	CDR-H1		1
		CDR-H2		2
		CDR-H3		3
			CDR-L1	4
			CDR-L2	5
			CDR-L3	6
		Варіабельний домен		7
			Варіабельний домен	8

10 В одному варіанті здійснення моноклональне антитіло включає мишаче, химерне і гуманізоване антитіла. Антитіло може бути одержане з гібридами мишачого походження, депонованої у Французькій колекції культур мікроорганізмів (CNCM, Інститут Пастера, Париж, Франція), причому вказану гібридому одержують шляхом злиття спленоцитів/лімфоцитів імунізованих мишей Balb/C і клітин клітинної лінії Sp 2/O-Ag 14 мієломи.

15 Згідно з іншим аспектом даний винахід належить до мишачої гібридомі, здатної секретувати моноклональне антитіло за винаходом, зокрема, до гібридомі мишачого походження, депонованої в CNCM, Інститут Пастера, Париж, Франція, 17 вересня 2014 р. під номером I-4894.

Моноклональне антитіло, позначене тут як 816C12, або будь-який його антигензв'язуючий фрагмент, що секретується вказаною гібридомою I-4894, безумовно, є частиною даного винаходу.

20 Даний винахід належить до антитіла до IGF-1R або його антигензв'язуючого фрагмента, яке характеризується тим, що воно секретоване гібридомою, депонованою в CNCM, Інститут Пастера, Париж, 17 вересня 2014 р. під номером I-4894.

В даному винаході також описана мишача гібридома, зареєстрована в CNCM, Інститут Пастера, Париж, 17 вересня 2014 р. під номером I-4894.

25 Новий аспект даного винаходу належить до виділеної нуклеїнової кислоти, яка характеризується тим, що вона вибрана серед наступних нуклеїнових кислот:

а) нуклеїнова кислота, кодує антитіло за даним винаходом;

30 б) нуклеїнова кислота, яка містить послідовність, вибрану з послідовностей SEQ ID No. 9 або 10, або послідовність, що має після оптимального вирівнювання щонайменше 80%, переважно, 85%, 90%, 95% та 98% гомологію з послідовностями SEQ ID No. 9 або 10; і

с) нуклеїнові кислоти, комплементарні нуклеїновим кислотам, визначеним в а) або б).

В таблиці 3 нижче наведені різні нуклеотидні послідовності, що стосуються антитіла 816C12 за даним винаходом.

Таблиця 3

Антитіло	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	SEQ ID No.
816C12 I-4894	Варіабельний домен		9
		Варіабельний домен	10

35

40 Терміни «нуклеїнова кислота», «нуклеїнова послідовність», «нуклеїновокислотна послідовність», «полінуклеотид», «олігонуклеотид», «полінуклеотидна послідовність» і «нуклеотидна послідовність», що взаємозамінно використовуються в даному описі, означають точну послідовність нуклеотидів, модифікованих або немодифікованих, що визначає фрагмент або ділянку нуклеїнової кислоти, яка містить або не містить неприродні нуклеотиди і яка є або дволанцюжковою ДНК, одностанцюжковою ДНК, або транскрипційними продуктами вказаних ДНК.

Тут також потрібно зазначити, що даний винахід не належить до нуклеотидних послідовностей в їх природному хромосомному середовищі, тобто в природному стані.

Послідовності даного винаходу були виділені і/або очищені, тобто були взяті прямо або опосередковано, наприклад, шляхом копіювання, при цьому їх середовище було щонайменше частково модифіковане. Також тут потрібно зазначити виділенні нуклеїнові кислоти, одержані шляхом рекомбінантної генетики за допомогою, наприклад, клітин-хазяїв, або одержані шляхом хімічного синтезу.

Даний винахід також належить до вектора, який містить нуклеїнову кислоту, описану в даному винаході.

Зокрема, даний винахід спрямований на клонуєчі і/або експресійні вектори, які містять таку нуклеотидну послідовність.

Вектори за даним винаходом, переважно, містять елементи, які дозволяють експресувати і/або секретувати нуклеотидні послідовності в даній клітині-хазяїні. Вектор, таким чином, може містити промотор, сигнали ініціації та закінчення трансляції, а також придатні ділянки регуляції транскрипції. Він повинен мати здатність стабільно зберігатися в клітині-хазяїні і може додатково мати специфічні сигнали, які визначають секрецію трансльованого білка. Ці різні елементи відбираються та оптимізуються фахівцями в даній галузі відповідно до клітини-хазяїна, що використовується. З цією метою нуклеотидні послідовності можуть бути вставлені у вектори, що самореплікуються, у вибраному хазяїні або можуть бути інтегративними векторами вибраного хазяїна.

Такі вектори одержують способами, що звичайно використовуються фахівцями в даній галузі, і одержані в результаті клони можуть бути введені в придатного хазяїна стандартними способами, такими як ліпофекція, електропорація, тепловий шок або хімічні способи.

Вектори є, наприклад, векторами плазмідного або вірусного походження. Вони використовуються для трансформації клітин-хазяїв для клонування або експресії нуклеотидних послідовностей за винаходом.

Даний винахід також містить клітини-хазяї, трансформовані вектором, описаним в даному винаході, або які містять його.

Клітина-хазяїн може бути вибрана серед прокаріотичних або еукаріотичних систем, таких як бактеріальні клітини, наприклад, а також дріжджові клітини або клітини тварин, зокрема, клітини ссавців. Також можуть бути використані клітини комах або рослин.

Даний винахід також стосується тварин, за виключенням людини, які містять трансформовану клітину за даним винаходом.

Інший аспект даного винаходу стосується способу одержання антитіла відповідно до даного винаходу або одного з його функціональних фрагментів, який характеризується тим, що включає наступні етапи:

а) культивування в середовищі і в культуральних умовах, придатних для клітини-хазяїна за даним винаходом; і

б) витягання вказаного антитіла або одного з його функціональних фрагментів, одержаних таким чином, з культурального середовища або з вказаних культивованих клітин.

Трансформовані клітини згідно з даним винаходом можуть бути використані у способах одержання рекомбінантних поліпептидів згідно з даним винаходом. Способи одержання поліпептиду згідно з даним винаходом у рекомбінантній формі, що характеризуються використанням вектору і/або клітини, трансформованої вектором згідно з даним винаходом, також входять у даний винахід. Переважно клітину, трансформовану вектором згідно з даним винаходом, культивують в умовах, які дозволяють експресувати вказаний поліпептид і витягати вказаний рекомбінантний пептид.

Як вже згадувалося, клітина-хазяїн може бути вибрана з прокаріотичних або еукаріотичних систем. Зокрема, можна ідентифікувати нуклеотидні послідовності за винаходом, які сприяють секреції в такій прокаріотичній або еукаріотичній системі. Вектор згідно з даним винаходом, що несе таку послідовність, може бути таким чином вигідно використаний для продукції рекомбінантних білків, призначених для секреції. Дійсно, очищенню цих рекомбінантних білків, що представляють інтерес, буде сприяти той факт, що вони знаходяться в супернатанті клітинної культури, а не всередині клітин-хазяїв.

Також розкриті застосування антитіла за винаходом як біомаркера. Дані способи можуть бути використані для виявлення або діагностики різних гіперпроліферативних онкогенних розладів, зв'язаних з експресією IGF-1R, наприклад, але не обмежуючись ними, раку передміхурової залози, остеосарком, раку легені, раку молочної залози, раку ендометрія, гліобластоми, раку товстої кишки, раку шлунка, раку нирки, раку підшлункової залози, раку голови і шиї або будь-якого іншого раку, зв'язаного з експресією IGF-1R. Як буде зрозуміло фахівцю в даній галузі, рівень експресії антитіла, зв'язаний з визначеним розладом, буде варіювати залежно від характеру і/або тяжкості вже існуючого стану.

Введення антитіл за даним винаходом будь-яким із стандартних способів, відомих фахівцям у даній галузі (наприклад, місцево, парентерально, внутрішньом'язово тощо), дає надзвичайно корисний спосіб виявлення диспластичних клітин у зразку, а також дозволяє лікарю-клініцисту контролювати терапевтичний режим пацієнта, придатного лікування від гіперпроліферативного розладу, зв'язаного або опосередкованого експресією IGF-1R.

Антитіло згідно з даним винаходом або його антигензв'язуючий фрагмент знайдуть застосування в різних медичних або дослідних цілях, включаючи виявлення, діагностику, прогнозування і встановлення стадії різних патологій, зв'язаних з експресією IGF-1R.

Один з варіантів здійснення даного винаходу належить до антитіла до IGF-1R або його антигензв'язуючого фрагмента, як описано вище, для застосування як агента для виявлення пухлинних клітин, експресуючих IGF-1R.

Іншим варіантом здійснення даного винаходу є антитіло до IGF-1R або його антигензв'язуючий фрагмент, як описано вище, для застосування в *in vitro* або *ex vivo* діагностиці або прогнозуванні онкогенного розладу, зв'язаного з експресією IGF-1R.

Поняття «діагностика» захворювання, що використовується в даному документі, належить до процесу проявлення або виявлення наявності патологічного гіперпроліферативного онкогенного розладу, зв'язаного з експресією IGF-1R або опосередкованого нею, моніторингу прогресування захворювання, а також проявлення або виявлення клітин або зразків, які вказують на розлад, зв'язаний з експресією IGF-1R.

«Прогнозування» при використанні в даному описі означає оцінку ймовірності виживання від захворювання або передбачення можливого розвитку або результату захворювання. Наприклад, якщо зразок від суб'єкта є негативним при забарвленні антитілом до IGF-1R, «прогноз» для такого суб'єкта буде краще ніж, якщо б зразок був позитивним при IGF-1R забарвленні. Зразки можна оцінити за рівнями експресії IGF-1R за допомогою відповідної шкали, як буде більш детально описано далі.

Антитіло до IGF-1R може знаходитися в формі імунокон'югата або міченого антитіла для одержання сигналу, який можна виявити і/або кількісно оцінити. При використанні з відповідними мітками або іншими відповідними біомолекулами або хімічними речовинами, що виявляються, антитіло до IGF-1R, зокрема, може бути використане для діагностичного і прогностичного застосування *in vitro* та *in vivo*.

Мітки для застосування в імунологічних аналізах, як правило, відомі фахівцям у даній галузі і включають ферменти, радіоізотопи і флуоресцентні, люмінесцентні та хромогенні речовини, в тому числі забарвлені частинки, такі як колоїдне золото або латексні кульки. Придатні імунологічні аналізи включають фермент-зв'язане імуносорбентне дослідження (ELISA). Фахівцям у даній галузі добре відомі різні типи міток і способи кон'югації міток з антитілами до IGF-1R, такі як ті, що викладені нижче.

При використанні в даному описі термін «онкогенний розлад, зв'язаний з експресією IGF-1R» включає в себе захворювання та інші розлади, при яких було показано або передбачалося, що наявність високих рівнів IGF-1R (аберрантних) у суб'єкта, що страждає на розлад, або обумовлює патофізіологію розладу, або є фактором, сприяючим погіршенню розладу. Альтернативно, такі розлади можуть підтверджуватися, наприклад, підвищенням рівнів IGF-1R на поверхні клітини в уражених клітинах або тканинах суб'єкта, що страждає на розлад. Підвищення рівнів IGF-1R може бути виявлене при використанні антитіла до IGF-1R.

В деяких варіантах здійснення, термін «підвищена експресія», коли він використовується по відношенню до IGF-1R, належить до рівнів експресії білка або гена, які демонструють статистично значуще підвищення експресії (виміряної за допомогою експресії РНК або експресії білка) у порівнянні з контролем.

Одним з варіантів здійснення є антитіло до IGF-1R або його антигензв'язуючий фрагмент, описані вище, для застосування у визначенні того, чи буде для пацієнта з онкогенним розладом корисним лікування інгібітором, націленим на шлях IGF-1R, переважно, антитілом до IGF-1R як таким, у складі комбінованої терапії або у вигляді кон'югата.

Вираз «інгібітор, націлений на шлях IGF-1R», що використовується в даному описі, означає будь-яку сполуку, здатну зменшувати або інгібувати тирозинкіназну активність IGF-1R шляхом зв'язування або з лігандом (лігандами) IGF-1R, або з самим IGFR. Прикладами таких інгібіторів є білки, пептиди, антитіла або кон'югати «антитіло – лікарський засіб» або будь-яка хімічна сполука, які діють як антагоністи IGF-1R, антисмислові олігонуклеотиди або міРНК (англ. siRNA, small interfering RNA – малі інтерферуючі РНК), що інгібують експресію гена IGF-1R або гена, кодуєчого один з лігандів IGFR, або будь-який інший лікарський засіб або сполуку, відомі фахівцям у даній галузі.

Більш конкретно, в контексті даного опису інгібітор, націлений на шлях IGF-1R, охоплює будь-яку сполуку або молекулу, здатну зв'язуватися з IGF-1R та інгібувати зв'язування його ліганда(ів).

5 Ще більш конкретно, в контексті даного опису інгібітор, націлений на шлях IGF-1R, охоплює будь-яке моноклональне антитіло, яке зв'язується з IGF-1R.

В ще одному переважному варіанті здійснення винаходу інгібітор, націлений на шлях IGF-1R, складається з кон'югата антитіло–лікарський засіб (ADC), де фрагмент «антитіло» націлений на IGF-1R, а фрагмент «лікарський засіб» може бути вибраний з будь-яких лікарських засобів, таких як цитотоксичний засіб, цитостатичний засіб, токсини тощо. У наведеному як
10 приклад варіанті здійснення фрагмент «лікарський засіб» може складатися з ауристатину, аналога або похідного.

Об'єктом даного винаходу також є спосіб виявлення *in vitro* або *ex vivo* наявності і/або локалізації пухлинних клітин, експресуючих IGF-1R, у суб'єкта, при цьому вказаний спосіб включає етапи:

15 (a) контактування біологічного зразка від вказаного суб'єкта з антитілом до IGF-1R або його антигензв'язуючим фрагментом відповідно до даного винаходу, як описано вище; і

(b) виявлення зв'язування вказаного антитіла до IGF-1R або його антигензв'язуючого фрагмента з вказаним біологічним зразком.

Даний винахід також належить до *in vitro* або *ex vivo* способу виявлення і/або кількісного вимірювання і/або визначення рівня експресії IGF-1R, переважно на поверхні клітин, у суб'єкта, при цьому вказаний спосіб включає етапи:

(a) контактування біологічного зразка від вказаного суб'єкта з антитілом до IGF-1R або його антигензв'язуючим фрагментом згідно з даним винаходом, як описано вище; і

25 (b) виявлення і/або кількісного вимірювання і/або визначення рівня зв'язування вказаного антитіла до IGF-1R або його антигензв'язуючого фрагмента з вказаним біологічним зразком.

Зв'язування антитіла до IGF-1R можна виявити і/або кількісно виміряти і/або визначити за допомогою різних способів аналізу, доступних фахівцю в даній галузі. Хоча в даний винахід включені будь-які придатні засоби для проведення аналізу, зокрема, можна зазначити сортування клітин з активованою флуоресценцією (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS), ELISA, вестерн-блоттінг та імуногістохімію (IHC). Переважні способи включають IHC та FACS.

30 Винахід також описує спосіб визначення *in vitro* або *ex vivo* відсотка пухлинних клітин, експресуючих IGF-1R, у суб'єкта, при цьому вказаний спосіб включає етапи:

(a) контактування біологічного зразка від вказаного суб'єкта з антитілом до IGF-1R або його антигензв'язуючим фрагментом, як описано вище; і

35 (b) кількісного вимірювання відсотка клітин, експресуючих IGF-1R, в біологічному зразку.

В іншому варіанті здійснення винаходу запропонований спосіб визначення *in vitro* або *ex vivo* рівня експресії IGF-1R в пухлинних клітинах або в пухлині у суб'єкта, при цьому вказаний спосіб включає стадії:

40 (a) контактування біологічного зразка від вказаного суб'єкта з антитілом до IGF-1R або його антигензв'язуючим фрагментом, як описано вище; і

(b) кількісного вимірювання рівня зв'язування вказаного антитіла до IGF-1R або його антигензв'язуючого фрагмента з IGF-1R у вказаному біологічному зразку.

45 Як буде зрозуміло фахівцю в даній галузі, рівень зв'язування антитіла до IGF-1R з IGF-1R можна кількісно виміряти будь-яким способом, відомим фахівцю в даній галузі. Переважні способи включають використання імуноферментних процесів, таких як аналіз ELISA, імунофлуоресценція, IHC, радіоімунний аналіз (RIA) або FACS.

Згідно зі способом за даним винаходом, рівень зв'язування вказаного антитіла до IGF-1R або його антигензв'язуючого фрагмента з IGF-1R кількісно вимірюють шляхом сортування клітин з активованою флуоресценцією (FACS) або імуногістохімії (IHC).

50 «Біологічним зразком» може бути будь-який зразок, який може бути узятий у суб'єкта. Такий зразок повинен дозволяти визначати рівні експресії біомаркера згідно з винаходом. Таким чином, природа зразка буде залежати від природи пухлини.

Переважні біологічні зразки включають такі зразки, як зразок крові, зразок плазми або зразок лімфи, якщо рак являє собою рідку (не солідну) пухлину.

55 Переважні біологічні зразки включають такі зразки, як зразок, взятий при біопсії, або зразок, взятий під час хірургічного резекційного лікування, якщо рак являє собою тверду (солідну) пухлину.

Переважно, біологічний зразок являє собою біологічну рідину, таку як сироватка, клітини цілісної крові, зразок тканини або біоптат людського походження. Зразок може включати,

наприклад, біоптат тканини, який можна зручно проаналізувати на наявність патологічного онкогенного розладу, зв'язаного з експресією IGF-1R.

Після визначення рівня експресії IGF-1R в досліджуваних біологічних зразках результати можуть бути зіставлені з результатами для контрольних зразків, які одержані аналогічно досліджуваним біологічним зразкам, але від людей, які не мають онкогенного розладу, зв'язаного з експресією IGF-1R. Якщо рівень IGF-1R в досліджуваному біологічному зразку значно підвищений, можна зробити висновок, що існує висока ймовірність того, що у суб'єкта, від якого був одержаний зразок, є або буде розвиватися вказаний розлад.

Винахід належить до способу *in vitro* або *ex vivo* діагностики або прогнозування пухлини, експресуючої IGF-1R, де вказаний спосіб включає стадії (i) визначення рівня експресії IGF-1R за допомогою способу визначення *in vitro* або *ex vivo* рівня експресії IGF-1R в пухлинних клітинах або в пухлині у суб'єкта відповідно до даного винаходу і як описано вище, та (ii) порівняння рівня експресії, визначеного на стадії (i), з еталонним рівнем експресії IGF-1R з нормальної тканини або тканини, що не експресує IGF-1R.

Що стосується розробки направленої протипухлинної терапії, діагностика за допомогою імуногістологічних методів дає *in situ* інформацію про рівні експресії рецептора і, таким чином, дозволяє вибирати пацієнтів, схильних до лікування, на основі рівня експресії рецепторів, необхідного для такого лікування.

Визначення стадії має потенційну прогностичну цінність і забезпечує критерії для розробки оптимальної терапії (Simpson et al., J. Clin. Oncology 18:2059 (2000)). Наприклад, вибір стратегії лікування солідних пухлин оснований на оцінці стадії розповсюдження пухлини, яку звичайно здійснюють з використанням системи класифікації злоякісних пухлин, основаної на визначенні трьох факторів: T – розміру первинної пухлини, N – стану лімфатичних вузлів, M – наявності або відсутності віддалених метастазів (TNM, Tumor/Node/Metastasis), Американського об'єднаного комітету з раку (AJCC). Загальновизнане, що хоча цей тест і система стадіювання надають деяку цінну інформацію відносно стадії діагностованого у пацієнта солідного раку, вона є неточною та недостатньою. Зокрема, вона не дозволяє ідентифікувати ранні стадії розвитку пухлини.

Інший варіант здійснення складається зі способу визначення *in vitro* або *ex vivo* кількісної оцінки IGF-1R пухлинних клітин або пухлини у суб'єкта, при цьому вказаний спосіб включає стадії:

(a) контактування біологічного зразка від вказаного суб'єкта з антитілом до IGF-1R або його антигензв'язуючим фрагментом, як описано вище;

(b) кількісного вимірювання за допомогою сортування клітин з активованою флуоресценцією (FACS) або імуногістохімії (IHC) рівня зв'язування вказаного антитіла до IGF-1R або його антигензв'язуючого фрагмента з IGF-1R у вказаному біологічному зразку; і

(c) кількісної оцінки пухлинних клітин або пухлини шляхом порівняння кількісного рівня, вимірюваного на стадії (b), з відповідною шкалою, основаною на двох параметрах, якими є інтенсивність забарвлення і відсоток позитивних клітин.

В одному варіанті здійснення антитіло до IGF-1R здатне зв'язувати IGF-1R, коли зразки тканини фіксовані в формаліні, фіксовані в замінювачі формаліну, фіксовані в Glyco-fixx, залиті парафіном і/або заморожені.

Для оцінки прогностичного значення IGF-1R може використовуватися будь-який традиційний спосіб аналізу ризиків. Типові способи аналізу включають регресійний аналіз Кокса (Cox regression analysis), який являє собою напівпараметричний метод моделювання виживання або часу до настання визначеної події в цензурованих випадках (Hosmer and Lemeshow, 1999; Cox, 1972). На відміну від інших аналізів виживання, наприклад, таблиць виживання Life Tables або методу Каплана-Мейєра (Kaplan-Meier), аналіз Кокса дозволяє включати в моделі прогностичні змінні (коваріати). Використовуючи традиційний спосіб аналізу, наприклад, аналіз Кокса, можна перевірити гіпотези відносно кореляції статусу експресії IGF-1R в первинній пухлині з часом до початку рецидиву захворювання (час ремісії або час до метастазування) або з часом до настання смерті з причини захворювання (час загальної виживаності). Регресійний аналіз Кокса також відомий як модель пропорційних ризиків Кокса. Цей спосіб є стандартним способом перевірки прогностичної цінності пухлинного маркера для тривалості життя пацієнта. При використанні в багатофакторному режимі паралельно досліджують вплив декількох коваріат, що дозволяє ідентифікувати індивідуальні коваріати, які мають незалежну прогностичну цінність, тобто найкорисніші маркери. Термін негативний або позитивний «статус IGF-1R» також може позначатися як [IGF-1R (-)] або [IGF-1R (+)].

Під час діагностики або моніторингу раку зразок може бути «оцінений кількісно». У своїй найпростішій формі кількісна оцінка може бути категорично негативною або категорично

позитивною, виходячи з візуального огляду зразків при імуногістохімії. Більш складна кількісна оцінка включає оцінювання за двома параметрами – інтенсивність забарвлення та частка забарвлених («позитивних») клітин серед тих, що аналізуються.

«Статус IGF-1R» за визначенням винаходу належить до класифікації пухлини на 5 належність її до IGF-1R-позитивного [IGF-1R (+)] або IGF-1R-негативного [IGF-1R (-)] класу на основі визначення рівня експресії IGF-1R, виміряного будь-якими способами, такими як імуногістохімія (IHC), сортування клітин з активованою флуоресценцією FACS, або іншими способами, відомими фахівцю в даній галузі.

В одному з варіантів здійснення винаходу для забезпечення стандартизації зразки можна 10 оцінювати за рівнями експресії GF-1R за різними шкалами, більша частина яких основана на оцінці інтенсивності реакційного продукту і відсотку позитивних клітин (Payne et al., Predictive markers in breast cancer – the present (Прогностичні маркери при раку молочної залози – сьогоdnішній день), Histopathology 2008, 52, 82-90).

Згідно з іншим варіантом здійснення, вказана кількісна оцінка, зокрема, на стадії (с) способу 15 за даним винаходом, передбачає використання відповідної шкали, основаної на інтенсивності забарвлення і відсотку позитивних клітин.

Як перший приклад, за аналогією зі швидкою кількісною оцінкою за шкалою Allred для IHC 20 оцінки рецептора естрогену і рецептора прогестерону, зразки можна оцінювати за рівнями експресії GF-1R на загальній шкалі від 0 до 8, що об'єднує оцінку інтенсивності реактивності і частки забарвлених клітин (Harvey JM, Clarck GM, Osborne CK, Allred DC; J. Clin. Oncol. 1999; 17; 1474-1481). Зокрема, перший критерій інтенсивності реактивності кількісно оцінюють за шкалою від 0 до 3, при цьому 0 відповідає «відсутності реактивності», а 3 відповідає «сильній реактивності». Другий критерій частки реактивності підраховують за шкалою від 0 до 5, де 0 25 відповідає «відсутності реактивності», а 5 – «от 67 до 100% частки реактивності». Показник інтенсивності реактивності та оцінку частки реактивності потім підсумовують та одержують загальну оцінку за шкалою від 0 до 8. Загальна оцінка від 0 до 2 вважається негативною, тоді як загальна оцінка від 3 до 8 вважається позитивною.

Відповідно до цієї шкали терміни негативний або позитивний «статус IGF-1R» пухлин або 30 пухлинних клітин, що використовуються в даному описі, належать до рівнів експресії IGF-1R, що відповідають значенням від 0 до 2 або від 3 до 8 за шкалою Allred, відповідно.

Наведена далі Таблиця 4 ілюструє критерії оцінки результатів IHC відповідно до методів Allred.

Таблиця 4

Інтенсивність імунореактивності	Оцінка 1	Доля реактивності	Оцінка 2
Відсутність реактивності	0	Відсутність реактивності	0
Слабка реактивність	1	<1%	1
Помірна реактивність	2	1-10%	2
Сильна реактивність	3	11-33%	3
	-	34-66%	4
	-	67-100%	5
Загальна оцінка (оцінка 1 + оцінка 2)	Інтерпретація		
0-2	Негативна		
3-8	Позитивна		

35 Згідно з винаходом, спосіб характеризується тим, що вказана прийнятна шкала є шкалою від 0 до 8, де відсутність реактивності оцінюють як 0, а сильну реактивність, яка становить від 67 до 100% частки реактивності, оцінюють як 8.

Таким чином, згідно з переважним варіантом здійснення, спосіб визначення in vitro або ex vivo кількісної оцінки IGF-1R пухлинних клітин або пухлини у суб'єкта відповідно до даного 40 винаходу характеризується тим, що на стадії (с) вказана прийнятна шкала є шкалою від 0 до 8, де відсутність реактивності оцінюють як 0, а сильну реактивність, яка становить від 67 до 100% частки реактивності, оцінюють як 8.

Іншими словами, описується і заявляється спосіб визначення in vitro або ex vivo статусу пухлини або пухлинних клітин у суб'єкта, де вказаний спосіб включає стадії:

45 (a) кількісної оцінки пухлини або пухлинних клітин від суб'єкта відповідно до шкали Allred; і
(b) – і) визначення того, що статус пухлини або пухлинних клітин відповідає [IGF-1R(+)] з оцінкою за шкалою Allred від 3 до 8; або

– ii) визначення того, що статус пухлини або пухлинних клітин відповідає [IGF-1R(-)] з оцінкою за шкалою Allred від 0 до 2.

Згідно з окремим аспектом винаходу, статус пухлини або пухлинних клітин відповідає [IGF-1R (+)] з оцінкою 3 за шкалою Allred.

5 Згідно з окремим аспектом винаходу, статус пухлини або пухлинних клітин відповідає [IGF-1R (+)] з оцінкою 4 за шкалою Allred.

Згідно з окремим аспектом винаходу, статус пухлини або пухлинних клітин відповідає [IGF-1R (+)] з оцінкою 5 за шкалою Allred.

10 Згідно з окремим аспектом винаходу, статус пухлини або пухлинних клітин відповідає [IGF-1R (+)] з оцінкою 6 за шкалою Allred.

Згідно з окремим аспектом винаходу, статус пухлини або пухлинних клітин відповідає [IGF-1R (+)] з оцінкою 7 за шкалою Allred.

Згідно з окремим аспектом винаходу, статус пухлини або пухлинних клітин відповідає [IGF-1R (+)] з оцінкою 8 за шкалою Allred.

15 Згідно з ще одним окремим аспектом винаходу, статус пухлини або пухлинних клітин відповідає [IGF-1R (+)] з оцінкою за шкалою Allred від 3 до 8.

Інший описаний в даній роботі спосіб визначення *in vitro* або *ex vivo* статусу IGF-1R пухлинних клітин або пухлини у суб'єкта характеризується тим, що спосіб включає стадії:

20 (a) кількісної оцінки IGF-1R пухлинних клітин або пухлини у вказаного суб'єкта згідно зі способом за п. 18; і

(b) визначення того, що статус IGF-1R пухлинних клітин або пухлини відповідає [IGF-1R(+)] з оцінкою від 3 до 8; або

(c) визначення того, що статус IGF-1R пухлинних клітин або пухлини відповідає [IGF-1R(-)] з оцінкою від 0 до 2.

25 Як другий приклад, за аналогією зі стандартним підрахунком для оцінки рецептора HER-2 за допомогою ІНС, зразки, наприклад, можна кількісно оцінювати за рівнями експресії IGF-1R за допомогою дещо простішого способу кількісної оцінки, що поєднує інтенсивність забарвлення (переважно, мембранного забарвлення) і частку клітин, які виявляють забарвлення, в об'єднаній шкалі від 0 до 3+.

30 За цією шкалою, що називається спрощеною шкалою, 0 і 1+ відповідають негативному забарвленню, тоді як 2+ і 3+ відповідають позитивному забарвленню. Тим не менш, оцінки від 1+ до 3+ можуть бути перекодовані на позитивні, оскільки кожна позитивна оцінка може бути зв'язана із значно більш високим ризиком рецидиву і смертельного результату захворювання у порівнянні з оцінкою 0 (негативний статус), але збільшення інтенсивності в низці позитивних оцінок може забезпечити додаткове зниження ризику.

35 Загалом кажучи, терміни негативний або позитивний «статус IGF-1R» пухлин або пухлинних клітин, що використовуються в даному описі, належать до рівнів експресії IGF-1R, які відповідають оцінкам 0–1+ або 2+–3+ за спрощеною шкалою, відповідно. Треба розглядати тільки повну реактивність периферичної мембранної частини інвазивної пухлини, яка часто зовнішнім виглядом нагадує «дротяну сітку». Відповідно до діючих правил, зразки, оцінені як граничні (тобто які мають оцінку 2+ або 3+) відносно IGF-1R, повинні бути піддані додатковій оцінці. Результати ІНС аналізу треба виключити, і або повторити їх, або перевірити за допомогою FISH або будь-якого іншого способу, якщо, як обмежувальний приклад, контроль не відповідає очікуваному, артефакти зачіпають більшу частину зразку, і зразок має сильну мембранну позитивність нормальних протоків молочної залози (внутрішній контроль), що дозволяє говорити про підвищене демаскування антигена.

Для більшого розуміння ці параметри представлені в наведеній далі Таблиці 5.

Таблиця 5

Статус IGF-1R-	Опис ІНС
0	Відсутність реактивності або мембранної реактивності в менше, ніж 10% пухлинних клітин
1+	Слабка/ледве помітна мембранна реактивність виявлена в більше, ніж 10% пухлинних клітин. Клітини імунореактивні тільки в частині мембрани.
2+	Повна мембранна реактивність від слабкої до помірної проявляється в більше, ніж 10% пухлинних клітин.
3+	Сильна повна реактивність проявляється в більше, ніж 10% пухлинних клітин.

Спосіб за винаходом характеризується тим, що вказана прийнятна шкала є шкалою від 0 до 3+, де відсутність мембранної реактивності пухлинних клітин оцінюється як 0, а сильна повна реактивність в більше, ніж 10% пухлинних клітин оцінюється як 3+.

5 Більш детально, як описано вище, вказана прийнятна шкала є шкалою від 0 до 3, де відсутність мембранної реактивності пухлинних клітин оцінюється як 0; слабо помітна мембранна реактивність в більше, ніж 10% пухлинних клітин оцінюється як 1+; повна мембранна реактивність від слабкої до помірної в більше, ніж 10% пухлинних клітин оцінюється як 2+; і сильна повна реактивність в більше, ніж 10% пухлинних клітин оцінюється як 3+.

10 Іншими словами, описується і заявляється спосіб визначення *in vitro* або *ex vivo* статусу пухлини за пухлинними клітинами від суб'єкта, де вказаний спосіб включає стадії (а) кількісної оцінки пухлини або пухлинних клітин від суб'єкта відповідно до спрощеної шкали, як описано вище; і (b) визначення того, що статус пухлини або пухлинних клітин відповідає [IGF-1R(+)] з оцінкою 2+ або 3+; або (c) визначення того, що статус пухлини або пухлинних клітин відповідає [IGF-1R(-)] з оцінкою від 0 або 1+.

15 Згідно з окремим аспектом винаходу, пухлину або пухлинні клітини відповідають [IGF-1R (+)] з оцінкою 2+.

Згідно з окремим аспектом винаходу, пухлина відповідає або пухлинні клітини відповідають [IGF-1R (+)] з оцінкою 3+.

20 Згідно з ще одним окремим аспектом винаходу, пухлина відповідає або пухлинні клітини відповідають [IGF-1R (+)] з оцінкою 2+ або 3+.

Згідно з іншим варіантом здійснення, винахід належить до способу визначення *in vitro* або *ex vivo* статусу IGF-1R пухлинних клітин або пухлини у суб'єкта, при цьому вказаний спосіб включає стадії:

25 (a) кількісної оцінки вказаних IGF-1R пухлинних клітин або вказаної пухлини у вказаного суб'єкта відповідно до способу даного винаходу, описаного вище; і

(b) - i) визначення того, що статус IGF-1R пухлинних клітин або пухлини відповідає [IGF-1R(+)] з оцінкою 2+ або 3+; або

- ii) визначення того, що статус IGF-1R пухлинних клітин відповідає [IGF-1R(-)] з оцінкою 0 або 1+.

30 Як правило, результати випробування або аналізу можуть бути представлені в будь-якому з множини форматів. Результати можуть бути представлені в якісному форматі. Наприклад, протокол випробувань може вказувати лише, був або не був виявлений конкретний поліпептид, можливо, також з вказівкою меж виявлення. Результати можуть відображатися в напівкількісному форматі. Наприклад, можуть бути визначені різні діапазони, і діапазонам може бути привласнене кількісне значення (наприклад, від 0 до 3+ або від 0 до 8, залежно від використовуваної шкали), забезпечуючи тим самим визначений ступінь кількісної інформації. Така оцінка може відобразити різні фактори, наприклад, кількість клітин, в яких виявлений IGF-1R, інтенсивності сигналу (яка може вказувати на рівень експресії IGF-1R або клітин, несучих IGF-1R) і так далі. Результати можуть відображатися у кількісному форматі, наприклад, у вигляді відсотка клітин, в яких виявлений IGF-1R, у вигляді концентрації білка і так далі.

35 Середньому фахівцю в даній галузі треба враховувати, що тип результату, що забезпечується випробуванням, буде варіюватися залежно від технічних обмежень випробування та біологічної значущості, пов'язаної з виявленням поліпептиду. Наприклад, у випадку деяких поліпептидів важливу інформацію забезпечує чисто кількісний результат (наприклад, виявляється або ні поліпептид при визначеному рівні виявлення). В інших випадках необхідний більш кількісний результат (наприклад, співвідношення рівня експресії поліпептиду в тестованому зразку і нормального рівня).

40 Згідно з іншим аспектом, описаний спосіб діагностики патологічного гіперпроліферативного онкогенного розладу або сприйнятливості до патологічного стану, зв'язаного з експресією IGF-1R, у суб'єкта, при цьому вказаний спосіб включає стадії:

50 (a) визначення наявності або відсутності клітин, несучих IGF-1R, в зразку за допомогою способу виявлення клітин, експресуючих IGF-1R, і/або способу визначення рівня експресії IGF-1R відповідно до даного винаходу, і

55 (b) діагностики патологічного стану або сприйнятливості до патологічного стану на підставі наявності або відсутності вказаних клітин, несучих IGF-1R.

В описаних у даній роботі способах виявлення клітин, експресуючих IGF-1R, або збільшення рівнів IGF-1R звичайно вказує на наявність у пацієнта розладу, опосередкованого IGF-1R, або про підозру на нього.

60 Даний винахід також пропонує спосіб прогнозування ризику розвитку раку у індивідуума, при цьому вказаний спосіб включає визначення рівня експресії IGF-1R в зразку тканини за

допомогою способу визначення клітин, експресуючих IGF-1R, і/або способу визначення рівня експресії IGF-1R відповідно до даного винаходу, де високий рівень експресії IGF-1R свідчить про високий ризик розвитку раку.

Винахід також належить до способу оцінки агресивності пухлини.

5 «Агресивність пухлини» при використанні в даному документі відноситься до швидкого росту пухлини і тенденції до швидкого її поширення.

Згідно з одним з варіантів здійснення, вказаний спосіб оцінки агресивності пухлини включає стадії:

10 (а) визначення рівня IGF-1R, що експресується клітинами в зразку пухлини, за допомогою способу визначення клітин, експресуючих IGF-1R, і/або способу визначення рівня експресії IGF-1R відповідно до даного винаходу,

(b) визначення рівня IGF-1R, що експресується в еквівалентному зразку тканини, взятому від того самого індивідуума в більш пізній час, за допомогою способу визначення клітин, експресуючих IGF-1R, і/або способу визначення рівня експресії IGF-1R відповідно до даного винаходу, і

15 (с) визначення співвідношення між рівнем експресії, визначеним на стадії (а), і рівнем, визначеним на стадії (b),

де зміна співвідношення експресії IGF-1R в зразку пухлини протягом часу дає інформацію про ризик прогресування раку.

20 В переважному варіанті здійснення відношення рівня, визначеного на стадії (а), до рівня, визначеного на стадії (b), більше 1, вказує на агресивність. Згідно з іншим варіантом здійснення, співвідношення, менше або рівне 1, вказує на неагресивність.

Іншим аспектом даного винаходу є моніторинг експресії IGF-1R у відповідь на проведення терапії, націленої на шлях IGF-1R, за допомогою способу виявлення і/або кількісного визначення IGF-1R і/або визначення рівня експресії відповідно до даного винаходу. Такий моніторинг може бути дуже корисним у випадку, коли вказана терапія викликає знижуючу регуляцію і/або деградацію IGF-1R.

Крім того, об'єктом винаходу є спосіб визначення того, чи є онкогенний розлад сприйнятливим до лікування лікарським засобом, який містить антитіло, націленим на шлях IGF-1R, при цьому вказаний спосіб включає стадії:

(а) визначення *in vitro* або *ex vivo* статусу IGF-1R пухлинних клітин в пухлині суб'єкта згідно зі способом кількісної оцінки за даним винаходом, як описано вище, і

35 (b) у випадку, якщо статус IGF-1R пухлинних клітин або пухлини відповідає IGF-1R(+), визначення того, що онкогенний розлад є сприйнятливим до лікування лікарським засобом, який містить антитіло, націленим на шлях IGF-1R.

Зокрема, моніторинг експресії IGF-1R на поверхні клітини може бути важливим інструментом для оцінки ефективності лікування під час клінічних досліджень і під час «індивідуальної» терапії.

40 Таким чином, дана заявка пропонує способи визначення для суб'єкта придатної схеми лікування.

Збільшення або зменшення рівня IGF-1R, яке може бути визначене за допомогою способу виявлення і/або визначення рівня експресії відповідно до даного винаходу, є показником розвитку раку, зв'язаного з IGF-1R. Таким чином, вимірюючи збільшення числа клітин, експресуючих IGF-1R, або зміну концентрації IGF-1R, присутнього в різних тканинах або клітинах, можна визначити, чи є ефективною та або інша схема лікування, направлена на зменшення інтенсивності злоякісної пухлини, зв'язаної з IGF-1R.

Ще одним об'єктом винаходу також є спосіб визначення *in vitro* або *ex vivo* ефективності схеми лікування, призначеної для полегшення онкогенного розладу, зв'язаного з IGF-1R, у суб'єкта, що страждає на вказаний розлад, при цьому вказаний спосіб включає стадії:

50 (а) визначення першого рівня експресії IGF-1R за допомогою способу виявлення і/або визначення рівня експресії відповідно до даного винаходу, як описано вище, в першому біологічному зразку, при цьому вказаний перший біологічний зразок відповідає першому моменту часу лікування;

55 (b) визначення другого рівня експресії IGF-1R за допомогою способу виявлення і/або визначення рівня експресії відповідно до даного винаходу, як описано вище, у другому біологічному зразку, при цьому вказаний другий біологічний зразок відповідає другому, більш пізньому, моменту часу лікування;

(с) обчислення співвідношення першого рівня експресії, визначеного на стадії (а), і другого рівня експресії, визначеного на стадії (b); і

(d) визначення того, що ефективність вказаної схеми лікування є високою, якщо співвідношення, обчислене на стадії (c), більше 1; або ж визначення того, що ефективність вказаної схеми лікування є низькою, якщо співвідношення, обчислене на стадії (c), менше або дорівнює 1.

5 Згідно з переважним варіантом здійснення, вказана схема лікування, призначена для полегшення онкогенного розладу, зв'язаного з IGF-1R, у суб'єкта, що страждає на вказаний розлад, включає проведення для суб'єкта терапії, націленої на шлях IGF-1R.

10 Як ще один об'єкт винаходу запропонований спосіб візуалізації *in vivo* онкогенного розладу, зв'язаного з експресією IGF-1R, за допомогою способу виявлення і/або визначення рівня експресії відповідно до даного винаходу. Такий спосіб корисний для локалізації *in vivo* пухлинних клітин і для моніторингу їх інвазивності. Рівним чином, спосіб є корисним для моніторингу прогресування і/або реакції на лікування у пацієнтів з раніше діагностованим раком, опосередкованим IGF-1R.

15 Варіантом здійснення винаходу є спосіб визначення локалізації пухлинних клітин, експресуючих IGF-1R, у суб'єкта, при цьому вказаний спосіб включає стадії:

а) введення суб'єкту антитіла до IGF-1R або його антигензв'язуючого фрагмента відповідно до даного винаходу; і

б) виявлення зв'язування вказаного антитіла до IGF-1R, де зв'язування вказує на присутність пухлинних клітин.

20 Для визначення присутності експресуючої пухлини можна використовувати різні способи, відомі фахівцям у даній галузі. Тим не менш, переважними засобами є IHC та FACS.

25 Згідно з іншим аспектом, винахід пропонує реагент для візуалізації *in vivo*, де вказаний реагент включає антитіло до IGF-1R або його антигензв'язуючий фрагмент відповідно до даного винаходу, при цьому вказане антитіло до IGF-1R переважно є міченим, більш переважно, міченим радіоактивним ізотопом.

Даний винахід також передбачає застосування вказаного реагенту для медичної візуалізації у пацієнта, що страждає на рак, опосередкований IGF-1R.

Спосіб згідно з даним винаходом включає стадії:

30 (а) введення вказаному пацієнту ефективної для візуалізації кількості реагенту для візуалізації за винаходом,

(б) виявлення вказаного реагенту.

Згідно з переважним варіантом здійснення винаходу, агент для візуалізації включає антитіло до IGF-1R або його антигензв'язуючий фрагмент відповідно до даного винаходу та активну частину.

35 «Активна частина» при використанні в даному документі являє собою агент, який дозволяє виявляти *in vivo* вказаний реагент для візуалізації. Активна частина згідно з винаходом включає, зокрема, радіоактивні елементи, такі як технецій-99m (99mTc), мідь-67 (Cu-67), скандій-47 (Sc-47), лютецій-77 (Lu-177) мідь-64 (Cu-64), ітрій-86 (Y-86) або йод-124 (I-124).

40 Агент для візуалізації вводять у кількості, ефективній для діагностичного застосування у ссавця, такого як людина, і потім визначають локалізацію і накопичення агента для візуалізації. Локалізацію і накопичення агента для візуалізації можна виявити шляхом радіонуклідної візуалізації, радіосцинтиграфії, ядерної магнітно-резонансної візуалізації, комп'ютерної томографії, позитронно-емісійної томографії, комп'ютерної аксіальної томографії, рентгенографії або магнітно-резонансної візуалізації, флуоресцентного виявлення і хемілюмінесцентного виявлення.

45 Що стосується розробки направленої протипухлинної терапії, діагностування за допомогою імуногістологічних методик дає *in situ* інформацію про рівні експресії рецептора, наприклад, відносно розміру і/або локалізації пухлини. Таким чином, діагностика дозволяє вибирати пацієнтів, сприйнятливих до лікування, на основі рівня експресії рецепторів, необхідного для такого лікування.

Особливо цікавим аспектом винаходу є спосіб вибору пацієнта, хворого на рак, для якого визначають, чи буде корисним введення терапевтичної кількості лікарського засобу, що містить антитіло, націленого на шлях IGF-1R, при цьому вказаний спосіб включає стадії:

(а) визначення рівня експресії IGF-1R згідно зі способом за винаходом, описаним вище;

55 (б) порівняння рівня експресії, визначеного на попередній стадії (а), з еталонним рівнем експресії; і

(с) вибір пацієнта, для якого лікування лікарським засобом, який містить антитіло, націленим на шлях IGF-1R, імовірно буде корисним, якщо співвідношення рівня експресії, одержаного на стадії (а), і еталонного рівня експресії більше 1; або

(d) вибір пацієнта, для якого лікування лікарським засобом, який містить антитіло, націленим на шлях IGF-1R, імовірно не буде корисним, якщо співвідношення рівня експресії, одержаного на стадії (a), і еталонного рівня експресії менше або дорівнює 1.

Рівень експресії IGF-1R переважно порівнюють або вимірюють у порівнянні з рівнями в контрольній клітині або зразку, які також називаються «еталонним рівнем» або «еталонним рівнем експресії». Поняття «еталонний рівень», «еталонний рівень експресії», «контрольний рівень» і «контроль» у даному описі використовують взаємозамінно. «Контрольний рівень» означає окремий вихідний рівень, що вимірюється в зіставній контрольній клітині, яка, як правило, не має ознак раку або іншого захворювання. Вказана контрольна клітина може бути одержана від того самого індивідуума, оскільки навіть у пацієнта з раковим захворюванням тканина, яка є місцем пухлини, разом з тим включає і непухлинну здорову тканину. Вона також може бути одержана від іншого індивідуума, який є здоровим, або у якого не виявлене того захворювання, на яке хворіє індивідуум, від якого одержаний уражений або випробований зразок. В контексті даного винаходу, термін «еталонний рівень» належить до «контрольного рівня» експресії IGF-1R, що використовується для оцінки вимірюваного рівня експресії IGF-1R в зразку пацієнта, що містить ракову клітину. Наприклад, у випадку якщо рівень IGF-1R в біологічному зразку пацієнта вище, ніж еталонний рівень IGF-1R, буде вважатися, що клітини мають високий рівень експресії, або надекспресію, IGF-1R. Еталонний рівень може бути визначений за допомогою цілої низки способів. Таким чином, рівні експресії можуть визначати клітини, несучі IGF-1R, або, як альтернатива, рівень експресії IGF-1R не залежить від кількості клітин, експресуючих IGF-1R. Внаслідок цього, еталонний рівень для кожного пацієнта може бути заданий за допомогою еталонного співвідношення IGF-1R, де еталонне співвідношення може бути визначене будь-яким зі способів визначення еталонних рівнів, описаних в даному контексті.

Наприклад, контроль може бути заданий величиною, яка може приймати різні форми. Це може бути одне граничне значення, таке як медіанне або середнє значення. «Еталонний рівень» може бути одним граничним значенням, рівною мірою прийнятним до кожного з пацієнтів індивідуально, або ж еталонний рівень може варіюватися залежно від конкретних субпопуляцій пацієнтів. Так, наприклад, люди похилого віку можуть мати еталонний рівень, який відрізняється від такого у більш молодих людей з тією самою формою раку, а еталонний рівень у жінок може відрізнятися від еталонного рівня у чоловіків з такою самою формою раку. Як альтернатива, «еталонний рівень» може бути визначений шляхом вимірювання рівня експресії IGF-1R у неопластичних ракових клітинах з тієї самої тканини, що і тканина досліджуваних неопластичних клітин. Рівним чином, «еталонний рівень» може бути деяким співвідношенням рівнів IGF-1R в неопластичних клітинах пацієнта і рівнів IGF-1R в непухлинних клітинах того самого пацієнта. «Еталонний рівень» також може бути рівнем IGF-1R культивованих *in vitro* клітин, які можна використовувати для імітації пухлинних клітин, або які можна використовувати будь-яким іншим чином, дозволяючим одержувати рівні експресії, які точно визначають еталонний рівень. З іншого боку, «еталонний рівень» може бути встановлений на основі порівняльних груп, наприклад, таких як групи, які не мають підвищених рівнів IGF-1R, і групи, які мають підвищені рівні IGF-1R. Іншим прикладом порівняльних груп можуть бути групи пацієнтів, які мають конкретне захворювання, стан або симптоми, і групи без цього захворювання. Задане значення може бути встановлене, наприклад, коли випробовувану популяцію ділять порівну (або нерівно) на групи, такі як група низького ризику, група середнього ризику і група високого ризику.

Еталонний рівень також можна визначити шляхом порівняння рівня IGF-1R в популяціях пацієнтів з однаковим видом раку. Це може бути здійснено, наприклад, шляхом аналізу гістограми, в якій графічно представлена уся когорта пацієнтів, де перша вісь являє собою рівень IGF-1R, а друга – кількість пацієнтів у когорті, чії пухлинні клітини експресують IGF-1R на заданому рівні. За допомогою ідентифікації підмножин популяції когорти, які мають однакові або схожі рівні IGF-1R, можуть бути визначені дві або більше окремих груп пацієнтів. Потім на основі рівня, який найбільше розрізняє ці окремі групи, можна визначити еталонний рівень. Еталонний рівень також може представляти рівні двох або більше маркерів, одним з яких є IGF-1R. Два або більше маркерів можуть бути описані, наприклад, співвідношенням величин рівнів кожного маркера.

Аналогічно, практично здорова популяція буде мати «нормальний» діапазон, який відрізняється від такого у популяції, про яку відомо, що вона має захворювання, зв'язане з експресією IGF-1R. Відповідно, вибране задане значення може враховувати категорію, в яку потрапляє людина. Відповідні діапазони і категорії можуть бути вибрані фахівцем у даній галузі за допомогою усього лише звичайних експериментів. Під «підвищеним», «збільшеним»

значенням мається на увазі показник, високий відносно вибраного контролю. Як правило, контроль буде оснований на практично здорових нормальних пацієнтах відповідної вікової групи.

5 Треба також розуміти, що як контроль відповідно до винаходу, крім заданих значень, можуть використовуватися зразки матеріалів, що випробовуються паралельно з експериментальними матеріалами. Приклади включають тканину або клітини, одержані одночасно від того самого суб'єкта, наприклад, частини однієї біопсії або частини одного зразка клітин суб'єкта.

10 Згідно з іншим варіантом здійснення, винахід належить до фармацевтичної композиції для візуалізації *in vivo* онкогенного захворювання, зв'язаного з експресією IGF-1R, що включає антитіло до IGF-1R або його антигензв'язуючий фрагмент відповідно до даного винаходу, описані вище, або його мічений антигензв'язуючий фрагмент і фармацевтично прийнятний носій.

15 Згідно з іншим аспектом, також описаний набір для виявлення пухлинних клітин, експресуючих IGF-1R, у пацієнта, який характеризується тим, що вказаний набір містить щонайменше антитіло до IGF-1R або його антигензв'язуючий фрагмент, як описано вище, і переважно, антитіло 816C12.

20 В обсяг винаходу також входять упаковані матеріали, які включають комбінацію реагентів у заданих кількостях з інструкціями для проведення діагностичного аналізу, наприклад, набори. Набір містить антитіла до IGF-1R для виявлення і кількісного визначення IGF-1R *in vitro*, наприклад, за допомогою ELISA. Якщо антитіло до IGF-1R мічене ферментом, в набір будуть включені субстрати і кофактори, що потрібні для ферменту (наприклад, попередник субстрату, який забезпечує хромофор або флуорофор, що піддається виявленню). Крім цього можуть бути включені й інші домішки, такі як стабілізатори, буфери (наприклад, блокуючий буфер або лізуючий буфер) тощо. Такий набір може включати коробку, розділену на відсіки, куди

25 вміщується один або більше контейнерів, такий як флакони, пробірки тощо, де контейнери містять окремі елементи винаходу. Наприклад, один контейнер може містити перше антитіло, зв'язане з нерозчинним або частково розчинним носієм. Другий контейнер може містити розчинне мічене для виявлення друге антитіло в ліофілізованій формі або в розчині. Коробка може також включати третій контейнер, який містить мічене для виявлення третє антитіло в ліофілізованій формі або в розчині. Набір такого типу може бути використаний в сендвіч-аналізі за винаходом. Етикетка або аркуш-вкладиш можуть містити опис композиції та інструкції для передбачуваного використання *in vitro* або діагностики.

30 Відносні кількості різних реагентів можуть широко варіюватися для забезпечення в розчині концентрацій реагентів, які суттєво оптимізують чутливість аналізу. Зокрема, реагенти можуть бути надані у вигляді сухих порошоків, звичайно ліофілізованих, які включають допоміжні речовини (ексципієнти), які при розчиненні будуть забезпечувати розчин реагенту відповідної концентрації.

35 Згідно з ще одним аспектом, антитіла до IGF-1R або їх антигензв'язуючі фрагменти, такі як детально описані в даному контексті відповідно до даного винаходу, мічені речовиною, що виявляється, так що вони можуть бути упаковані та використовуватися, наприклад, в наборах, для діагностики або ідентифікації клітин, які мають зазначений вище антиген. Необмежувальні приклади таких міток включають флуорофори, такі як флуоресцеїнізотіоціанат; хромофори, радіонукліди, біотин або ферменти. Такі мічені антитіла до IGF-1R можуть бути використані, наприклад, для гістологічної локалізації антигена, ELISA, сортування клітин, а також в інших

45 імунологічних способах виявлення або кількісної оцінки IGF-1R і клітин, несучих цей антиген.

Даний винахід також спрямований на набір, де вказаний набір характеризується тим, що він включає антитіло до IGF-1R або його антигензв'язуючі фрагменти відповідно до даного винаходу.

50 Даний винахід також належить до набору, де вказаний набір характеризується тим, що він включає химерне або гуманізоване антитіло до IGF-1R або його антигензв'язуючі фрагменти, які можуть бути одержані з 6 CDR, які мають послідовності SEQ ID No. 1–6, антитіла до IGF-1R або його антигензв'язуючих фрагментів відповідно до даного винаходу.

Також запропоновані набори, які можуть бути використані як позитивний контроль для очищення або імунопреципітації IGF-1R з клітин. Набір для виділення та очищення IGF-1R може містити антитіло до IGF-1R або його антигензв'язуючі фрагменти, як детально описано в даному

55 контексті відповідно до даного винаходу, з'єднані з гранулами (наприклад, з гранулами сефарози). Можуть бути запропоновані набори, які містять антитіла для виявлення і кількісного визначення IGF-1R *in vitro*, наприклад, в ELISA. Набір включає контейнер та етикетку або аркуш-вкладиш, вкладений або зв'язаний з контейнером. Можуть бути включені додаткові

60 контейнери, які містять, наприклад, розріджувачі та буфери, контрольні антитіла. Етикетка або

вкладиш можуть містити опис композиції та інструкції для передбачуваного використання *in vitro* або діагностики.

Зокрема, винахід належить до набору для визначення *in vitro* або *ex vivo* статусу IGF-1R пухлинних клітин пухлини у суб'єкта за допомогою описаних тут способів. Згідно з переважним варіантом здійснення, як буде описано в прикладі, винахід належить до набору для визначення статусу IGF-1R пухлини або пухлинних клітин методами IHC і/або FACS.

Згідно з окремим варіантом здійснення, винахід складається з набору, який включає щонайменше антитіло до IGF-1R або його антигензв'язуючий фрагмент за даним винаходом, як описано вище, при цьому вказане антитіло є міченим.

Згідно з переважним варіантом здійснення, набір згідно з винаходом також включає реагент, що використовується для визначення ступеня зв'язування між вказаним антитілом до IGF-1R та IGF-1R.

В іншому переважному варіанті здійснення набір за винаходом, що використовується для визначення *in vitro* або *ex vivo* рівня експресії IGF-1R в пухлині, експресуючій IGF-1R, також включає реагент для кількісного вимірювання рівня зв'язування між вказаним міченим антитілом до IGF-1R та IGF-1R.

В ще одному варіанті здійснення набір за винаходом також містить: i) реагент для виявлення ступеня зв'язування між вказаним міченим антитілом до IGF-1R та IGF-1R; i) ii) позитивний і негативний контрольні зразки для кількісного вимірювання рівня експресії IGF-1R.

Вказаний набір може додатково містити поліклональне антитіло, специфічне до мишачих антитіл або до людських/гуманізованих антитіл, переважно, вказане поліклональне антитіло, специфічне до мишачих, гуманізованих або людських антитіл, є міченим.

Відповідно до окремого варіанта здійснення винаходу, набір для вибору *in vitro* пацієнта, хворого на рак, для якого визначено, чи буде корисним терапевтичне введення інгібітора, націленого на IGF-1R шлях, може включати: i) реагент для виявлення ступеня зв'язування між вказаним антитілом до IGF-1R та IGF-1R; ii) контрольний рівень, який зкорельований з чутливістю до інгібітора IGF-1R і/або iii) контрольний рівень, який зкорельований з резистентністю до інгібітора IGF-1R.

Винахід також належить до набору для визначення того, чи буде для пацієнта з онкогенним розладом корисним лікування лікарським засобом, який містить антитіло, націленим на шлях IGF-1R, який характеризується тим, що вказаний набір містить щонайменше антитіло до IGF-1R або його антигензв'язуючий фрагмент за даним винаходом, як описані вище.

В іншому варіанті здійснення, вказаний набір характеризується тим, що він також включає:

i) реагент для виявлення ступеня зв'язування між вказаним антитілом до IGF-1R та IGF-1R на поверхні пухлинних клітин; і/або

ii) реагент для кількісного вимірювання рівня зв'язування між вказаним антитілом до IGF-1R та IGF-1R на поверхні пухлинних клітин.

Інші характеристики і переваги винаходу наведені в продовженні опису з прикладами та графічними матеріалами, пояснення до яких представлені нижче.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ.

Фіг. 1: Графічне зображення величин оптичної щільності (OD), одержане при використанні антитіла 816C12 в rhIGF1R ELISA. Узгодження даних і EC_{50} визначають за допомогою додатку Prism.

Фіг. 2A-2C: Імуногістохімічні (IHC) картини розпізнавання залитої в парафін пухлини MCF-7 з використанням антитіла 816C12 (Фіг. 2A), G11 анти-IGF-1R антитіла (Roche Ventana) (Фіг. 2B) або AF-305 анти-IGF-1R антитіла (R&D system) (Фіг. 2C).

Фіг. 3: *In vivo* активність анти-IGF-1R ADC на ксенотрансплантатній моделі MCF-7.

Фіг. 4A-4C: Імуногістохімічні (IHC) картини розпізнавання залитої в парафін пухлини SBC-5 з використанням антитіла 816C12, G11 анти-IGF-1R антитіла (Roche Ventana) (Фіг. 4B) або AF-305 анти-IGF-1R антитіла (R&D system) (Фіг. 4C).

Фіг. 5: *In vivo* активність анти-IGF-1R ADC на ксенотрансплантатній моделі SBC-5.

ОПИС ПРИКЛАДІВ ЗДІЙСНЕННЯ ВИНАХОДУ

Приклад 1: Створення та відбір 816C12

Моноклональні антитіла (Mab) проти rhIGF-1R одержували та відбирали як описано нижче.

Самиць мишей Balb/C імунізували шляхом підшкірного введення 10 мкг рекомбінантного людського білка IGF-1R (R&D Systems, 391-GR) з ад'ювантом Фрейнда. Імунізацію повторювали три рази з інтервалами в 2 тижні. Четверту ін'єкцію проводили шляхом внутрішньочеревного введення в присутності ад'юванта.

Через три дні проводили злиття клітин селезінки з клітинами міеломи SP2OAg14 з 50% ПЕГ. Після 14 днів метаболічної селекції на середовищі HAT (англ. hypoxanthine, aminopterin,

thymidine – гіпоксантин, аміноптерин, тимідин) гібридомні супернатанти (надосадові рідини) досліджували за допомогою FACS, Використовуючи людські клітини раку молочної залози MCF7. Зберігали тільки MCF7-зв'язуючі антитіла.

Потім антитіла, що представляють інтерес, клонували шляхом граничного розведення. Через вісім днів після клонування супернатанти знову відбирали шляхом FACS з використанням клітин MCF7. Було збережено три позитивних клони. Ізотипування секретованих антитіл проводили з використанням набору SBA clonotyping system-HRP від Southern Biotechnologies (Cat: 5300-05). Нарешті, один з клонів розмножували і заморожували.

Для подальшого визначення характеристик антитіла 816C12 виконували дослідження ELISA гібридомних супернатантів, таких як rhIGF-1R, або rmIGF-1R, або rhIR. При проведенні усіх прямих ELISA досліджувани білки іммобілізували (1 мкг/мл) на дні кожної лунки. Після насичення в лунки додавали гібридомні супернатанти. Після інкубаційного періоду протягом 1 години і стадії промивання для виявлення використовували розчин поліклонального антитіла, помічений козиними антитілами до імуноглобуліну (IgG) миші, кон'югованими з пероксидазою хрину (HRP), перед додаванням субстрату TMB. Реакцію зупиняли додаванням 1M розчину H₂SO₄ перед визначенням оптичної щільності (OD) за допомогою спектрофотометра на довжині хвилі 450 нм. Дані представлені нижче в Таблиці 6.

Таблиця 6

Величини OD, одержані при 5 мкг/мл за допомогою ELISA

	rhIGF-1R покриття	rmIGF-1R покриття	rhIR покриття
816C12	2,622	0,065	0,055
Позитивний контроль	2,338	1,293	1,077
Негативний контроль	0,055	0,065	0,048

Крива залежності «доза–ефект» для антитіла 816C12 на rhIGF-1R покритті представлена на Фіг. 1. Величини EC₅₀ визначені з використанням додатку Prism.

Дані показали, що антитіло 816C12 розпізнає тільки rhIGF-1R з EC₅₀ 0,41 нМ. Воно не зв'язується ні з мишачою формою IGF-1R, ні з людською IR.

Приклад 2: Оцінка кореляції стадіювання за допомогою антитіла за винаходом і активності кон'югата антитіло–лікарський засіб (ADC), націленого на IGF-1R, на ксенотрансплантатній моделі MCF-7

Для кореляції ступеня злоякісності пухлин з фармакологією пухлини оцінювали (розділ 2.1) і потім виконували *in vivo* експерименти на ксенотрансплантатній моделі MCF-7 з використанням ADC, що містить націлений на IGF-1R фрагмент антитіла, заздалегідь інтерналізованого, і лікарський фрагмент, що складається з ауристатину (розділ 2.2).

2.1: Імуногістохімічне виявлення експресії IGF-1R на ксенотрансплантатній моделі MCF-7

Зрізи тканини з ксенотрансплантата MCF-7 депарафінували, регідратували і вміщували в буфер для демаскування Target Retrieval Buffer 1X (Dako S1699) на киплячій бані, попередньо нагрітій до температури 98 °C, для високотемпературного демаскування антигена при температурі 98 °C протягом 40 хвилин і потім протягом ще 20 хвилин в буфері Target Retrieval Buffer. Після трьох промивань в сольовому трис-буфері з 0,05% Твін-20 (англ. Tris Buffer Saline–0,05% tween 20 (TBS-T)) (Dako S3006) ендогенну пероксидазну активність блокували за допомогою блокуючого реагенту для пероксидази Peroxidase Blocking Reagent (Dako K4007) протягом п'яти хвилин. Зрізи промивали TBS-T та інкубували з блокуючим реагентом (UltraV block-TA-125UB- LabVision) протягом 5 хвилин перед інкубацією або з моноклональним антитілом 810D12 (5 мкг/мл), або з мишачим IgG1/каппа (5 мкг/мл, X0931, Dako) як негативний контроль протягом 1 години при кімнатній температурі. Зрізи промивали TBS-T та інкубували з Envision (Dako) протягом 30 хвилин. Для утворення реакційного продукту коричневого кольору використовували діамінобензидин (Dako K3468). Препарати занурювали на 2 хвилини в гематоксилін для контр-забарвлення (Dako S3309).

Анти-IGF-1R моноклональне антитіло 816C12 за даним винаходом вибірково забарвлює клітинну мембрану MCF-7. При такій ІНС процедурі коричневий реакційний продукт корелює з позитивним забарвленням клітинної мембрани, а недостатність коричневого реакційного продукту корелює з негативним забарвленням і відсутністю візуалізації клітинної мембрани. При використанні мембранного алгоритму оцінка забарвлення пухлинних клітин MCF-7 відповідала 3+ (Фіг. 2A). При використанні антитіла G11 (Roche Ventana) або анти-IGF-1R антитіла AF-305 (R&D система) зрізи тієї самої пухлини були оцінені на 2+ (Фіг. 2B і 2C, відповідно).

2.2: In vivo активність анти-IGF-1R ADC на ксенотрансплантатній моделі MCF-7
 Анти-IGF-1R ADC оцінювали in vivo на ксенотрансплантатній моделі MCF-7.

Всі процедури з тваринами виконували відповідно до правил 2010/63/UE Директиви із захисту тварин, яких використовують для наукових цілей. Протокол був схвалений Комітетом з етики роботи з тваринами Інституту П'єра Фабра. П'ять мільйонів клітин MCF-7 вводили підшкірно 7-тижневим швейцарським/бестимусним мишам. Перед ін'єкцією клітин в лівий бік мишей імплантували гранули естрогену (Innovative Research of America), щоб вивільнити естрогени, необхідні для росту пухлин MCF-7 in vivo.

Через двадцять днів після імплантації клітин MCF-7, коли пухлини досягли середнього розміру 120–150 мм³, тварин розділили на групи по 6 мишей залежно від розміру та аспекту пухлини. Анти-IGF-1R ADC інокулювали внутрішньочеревно циклом по 6 ін'єкцій кожні чотири дні (Q4d4). Стан здоров'я тварин контролювали щоденно. Об'єм пухлини вимірювали за допомогою електронного циркуля двічі на тиждень до закінчення випробування. Об'єм пухлини обчислювали за наступною формулою: $\pi/6 \times \text{довжина} \times \text{ширина} \times \text{висота}$. Токсичність оцінювали за вагою тварин три рази на тиждень. Статистичний аналіз проводили на кожному етапі з використанням тесту Манна-Уїтні.

Введення анти-IGF-1R ADC значно інгібувало ріст пухлини і навіть викликало повну регресію росту пухлини (Фіг. 3), як і очікувалося, для пухлини, класифікованої як 3+, але не для пухлини, класифікованої як 2+.

Приклад 3: Оцінка кореляції стадіювання за допомогою антитіла за винаходом і активності ADC, націленого на IGF-1R, на ксенотрансплантатній моделі SBC-5

Для кореляції ступеня злоякісності пухлин з фармакологією пухлини оцінювали (розділ 3.1) і потім виконували in vivo експерименти на ксенотрансплантатній моделі SBC-5 з використанням ADC, що містить націлений на IGF-1R фрагмент антитіла і лікарський фрагмент, що складається з ауристатину (розділ 3.2).

3.1: Імуногістохімічне виявлення експресії IGF-1R на ксенотрансплантатній моделі SBC-5

Рівень IGF-1R аналізували, використовуючи протокол, аналогічний описаному в розділі 2.1 Прикладу 2 вище.

При виявленні IGF-1R за допомогою 816C12 були виявлені низькі рівні (1+) (Фіг. 4A). При виявленні IGF-1R за допомогою G11 антитіла (Roche Ventana) або AF-305 анти-IGF-1R антитіл (R&D System) зрізи тієї самої пухлини були оцінені як 3+ (Фіг. 4B і 4C, відповідно).

3.2: In vivo активність анти-IGF-1R-ADC на ксенотрансплантатній моделі SBC-5

Анти-IGF-1R ADC оцінювали in vivo на ксенотрансплантатній моделі SBC-5.

Всі процедури з тваринами виконували відповідно до правил 2010/63/UE Директиви із захисту тварин, яких використовували для наукових цілей. Протокол був схвалений Комітетом з етики роботи з тваринами Інституту П'єра Фабра. П'ять мільйонів клітин SBC-5 вводили підшкірно 7-тижневим бестимусним мишам. Через дванадцять днів після імплантації клітин, коли пухлини досягли середнього розміру 150 мм³, тварин розділили на групи по 6 мишей залежно від розміру та аспекту пухлини. Анти-IGF-1R ADC інокулювали внутрішньочеревно циклом по 6 ін'єкцій кожні чотири дні (Q4d6). Стан здоров'я тварин контролювали щоденно. Об'єм пухлини вимірювали за допомогою електронного циркуля двічі на тиждень до закінчення випробування. Об'єм пухлини обчислювали за наступною формулою: $\pi/6 \times \text{довжина} \times \text{ширина} \times \text{висота}$. Токсичність оцінювали за вагою тварин три рази на тиждень. Статистичний аналіз проводили на кожному етапі з використанням тесту Манна-Уїтні.

Ін'єкція анти-IGF-1R ADC не впливала на прогресування пухлинних клітин SBC-5 (Фіг. 5), як і очікувалося, для пухлини, класифікованої як 1+, але не для пухлини, класифікованої як 3+.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT
 JOUHANNEAUD, Alexandra

<120> АНТИТЕЛО ДО IGF-1R ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ РАКУ

<130> D34866

<140> PCT/EP2016/059339

<141> 2016-04-27

<150> EP 15305642.9

<151> 2015-04-27

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> 816C12 I-4894, heavy chain, CDR-H1

<400> 1

Gly His Thr Phe Thr Ser Tyr Val

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> 816C12 I-4894, heavy chain, CDR-H2

<400> 2

Ile Asn Pro His Asn Asp Val Thr

1 5

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> 816C12 I-4894, heavy chain, CDR-H3

<400> 3

Val Ser Thr Ala Tyr Tyr Gly Asn Gly Arg Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> 816C12 I-4894, light chain, CDR-L1

<400> 4

Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
 1 5

<210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> 816C12 I-4894, light chain, CDR-L2

<400> 5

Tyr Thr Ser
 1

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> 816C12 I-4894, light chain, CDR-L3

<400> 6

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> 816C12 I-4894, heavy chain, Variable domain

<400> 7

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Val Leu His Trp Met Lys Arg Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

```

                35                40                45

Gly Tyr Ile Asn Pro His Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
 50                55                60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Tyr Ser Ser Thr Val Tyr
 65                70                75                80

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

Val Ser Thr Ala Tyr Tyr Gly Asn Gly Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly
                100                105                110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
                115                120

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> S16C12 I-4894, light chain, Variable domain

<400> 8

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
                20                25                30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
                35                40                45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
 50                55                60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
                85                90                95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
                100                105

```


<210> 9
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> 816C12 I-4894, heavy chain, Variable domain

<400> 9
 gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg
 60
 tcttgcgaagg cttctggaca cacattcact agctatgttt tgcactggat gaagcggaag
 120
 cctgggcagg gcottgagtg gattggatat attaatoctc acaatgatgt tactaagtac
 180
 aatgagaatt tcaaaggcaa ggcacactg acttcagaca aatactccag cacagtctac
 240
 atggaggtca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtgt attactgtgt aagtaccgcc
 300
 tactatggta acggcggta cttogatgtc tggggggcag ggaccacggt cacogtctcc
 360
 tca
 363

<210> 10
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> 816C12 I-4894, light chain, Variable domain

<400> 10
 gatatccaga tgacacagac tacatctctc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc
 60
 atcagttgca ggycaagtca ggacattac aattatttaa actggtatca gcagaaaaca
 120
 gatggaactg ttaaactctc gatctactac acatcaagat tacactcagg agtctcatca
 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tggaaacagat tattctctca ccattagcaa cotggagcaa
 240
 gaagatattg ccacttattt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtggac gttcgggtgga
 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa a
 321

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Антитіло до рецептора інсуліноподібного фактора росту 1 (IGF-1R) або його антигензв'язуючий фрагмент, де антитіло містить:
 - 5 i) важкий ланцюг, що містить CDR-H1 послідовності SEQ ID NO: 1, CDR-H2 послідовності SEQ ID NO: 2 і CDR-H3 послідовності SEQ ID NO: 3; і
 - ii) легкий ланцюг, що містить CDR-L1 послідовності SEQ ID NO: 4, CDR-L2 послідовності SEQ ID NO: 5 і CDR-L3 послідовності SEQ ID NO: 6.
- 10 2. Антитіло до IGF-1R за п. 1, де антитіло містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO: 7 або будь-якої послідовності, щонайменше на 90 % гомологічної з послідовністю SEQ ID NO: 7; і/або варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO: 8 або будь-якої послідовності, щонайменше на 90 % гомологічної з послідовністю SEQ ID NO: 8.
- 15 3. Антитіло до IGF-1R або його антигензв'язуючий фрагмент, де антитіло секретоване гібридомою, депонованою в CNCM, Інститут Пастера, Париж, 17 вересня 2014 р. під номером I-4894.
4. Антитіло до IGF-1R або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-3 для застосування як агента для виявлення пухлинних клітин, експресуючих IGF-1R, або для визначення рівня експресії пухлинних клітин, експресуючих IGF-1R.
- 20 5. Антитіло до IGF-1R або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-3 для застосування в *in vitro* або *ex vivo* діагностиці або прогнозуванні онкогенного розладу, зв'язаного з експресією IGF-1R.
6. Антитіло до IGF-1R або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-3 для застосування у визначенні того, чи буде для пацієнта з онкогенним розладом імовірно корисним лікування інгібітором, націленим на шлях IGF-1R, переважно антитілом до IGF-1R як таким, в складі комбінованої терапії або у вигляді кон'югата.
- 25 7. Спосіб виявлення *in vitro* або *ex vivo* наявності і/або локалізації пухлинних клітин, експресуючих IGF-1R, у суб'єкта, при цьому вказаний спосіб включає стадії:
 - 30 (a) контактування біологічного зразка від вказаного суб'єкта з антитілом до IGF-1R або його антигензв'язуючим фрагментом за будь-яким з пп. 1-3; і
 - (b) виявлення зв'язування вказаного антитіла до IGF-1R або його антигензв'язуючого фрагмента з вказаним біологічним зразком.
8. Спосіб визначення *in vitro* або *ex vivo* відсотка пухлинних клітин, експресуючих IGF-1R, у суб'єкта, при цьому вказаний спосіб включає стадії:
 - 35 (a) контактування біологічного зразка від вказаного суб'єкта з антитілом до IGF-1R або його антигензв'язуючим фрагментом за будь-яким з пп. 1-3; і
 - (b) кількісного вимірювання відсотка клітин, експресуючих IGF-1R, в біологічному зразку.
9. Спосіб визначення *in vitro* або *ex vivo* рівня експресії IGF-1R в пухлинних клітинах у суб'єкта, при цьому вказаний спосіб включає стадії:
 - 40 (a) контактування біологічного зразка від вказаного суб'єкта з антитілом до IGF-1R або його антигензв'язуючим фрагментом за будь-яким з пп. 1-3; і
 - (b) кількісного вимірювання рівня зв'язування вказаного антитіла до IGF-1R або його антигензв'язуючого фрагмента з IGF-1R у вказаному біологічному зразку.
10. Спосіб визначення *in vitro* або *ex vivo* кількісної оцінки IGF-1R пухлинних клітин або пухлини у суб'єкта, при цьому вказаний спосіб включає стадії:
 - 45 (a) контактування біологічного зразка від вказаного суб'єкта з антитілом до IGF-1R або його антигензв'язуючим фрагментом за будь-яким з пп. 1-3;
 - (b) кількісного вимірювання за допомогою сортування клітин з активованою флуоресценцією (FACS) або імуногістохімії (IHC) рівня зв'язування вказаного антитіла до IGF-1R або його антигензв'язуючого фрагмента з IGF-1R у вказаному біологічному зразку; і
 - (c) кількісної оцінки пухлинних клітин або пухлини шляхом порівняння кількісного рівня, виміряного на стадії (b), з відповідною шкалою, основою на двох параметрах, якими є інтенсивність забарвлення і відсоток позитивних клітин.
- 50 11. Спосіб визначення того, чи є онкогенний розлад сприйнятливим до лікування лікарським засобом, який містить антитіло, націленим на шлях IGF-1R, при цьому вказаний спосіб включає стадії:
 - 55 (a) визначення *in vitro* або *ex vivo* статусу IGF-1R пухлинних клітин або пухлини суб'єкта згідно зі способом за п. 10, і

(b) визначення того, що, якщо статус IGF-1R пухлинних клітин або пухлини є IGF-1R(+), онкогенний розлад буде сприйнятливим до лікування лікарським засобом, який містить антитіло, націленим на шлях IGF-1R.

5 12. Спосіб визначення *in vitro* або *ex vivo* ефективності схеми лікування, призначеної для полегшення онкогенного розладу, зв'язаного з IGF-1R, у суб'єкта, що страждає на вказаний розлад, при цьому спосіб включає стадії:

(a) визначення першого рівня експресії IGF-1R за п. 9 в першому біологічному зразку, при цьому вказаний перший біологічний зразок відповідає першому моменту часу вказаного лікування;

10 (b) визначення другого рівня експресії IGF-1R за п. 9 у другому біологічному зразку, при цьому вказаний другий біологічний зразок відповідає другому, більш пізньому, моменту часу вказаного лікування;

(c) обчислення співвідношення першого рівня експресії, визначеного на стадії (a), і другого рівня експресії, визначеного на стадії (b); і

15 (d) визначення того, що ефективність даної схеми лікування є високою, якщо співвідношення, обчислене на стадії (c), більше 1; або визначення того, що ефективність даної схеми лікування є низькою, якщо співвідношення, обчислене на стадії (c), менше або дорівнює 1.

13. Спосіб вибору пацієнта, хворого на рак, для якого визначають, чи буде корисним введення терапевтичної кількості лікарського засобу, що містить антитіло, націленого на шлях IGF-1R, при цьому спосіб включає стадії:

20 (a) визначення рівня експресії IGF-1R згідно зі способом за п. 9;

(b) порівняння рівня експресії, визначеного на попередній стадії (a), з еталонним рівнем експресії; і

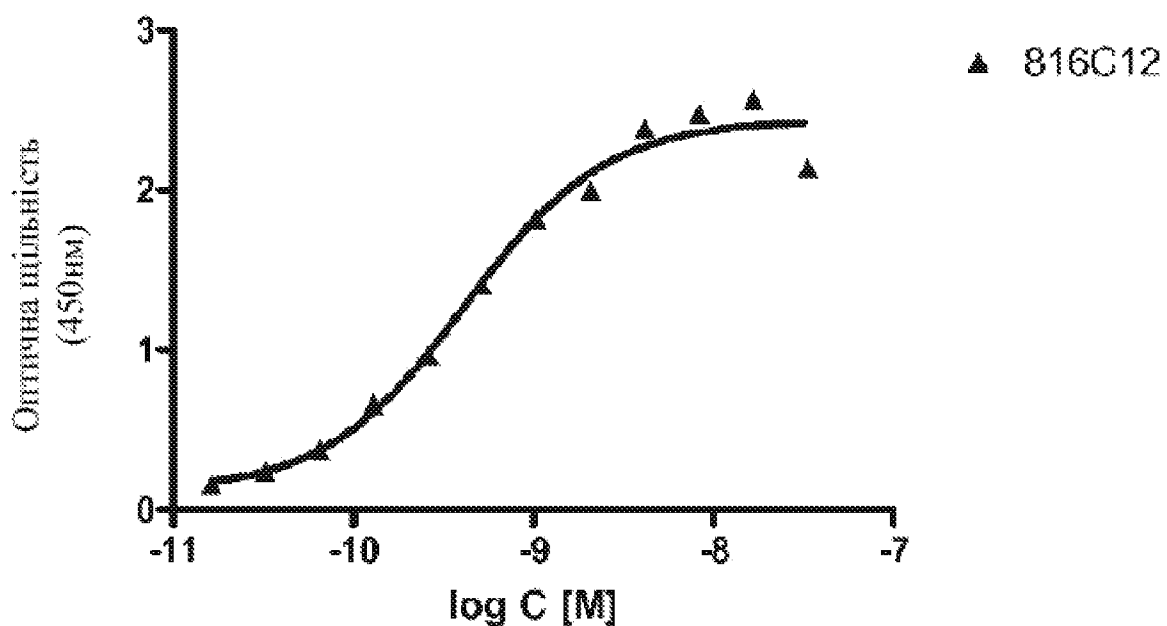
25 (c) вибору пацієнта, для якого лікування лікарським засобом, який містить антитіло, націленим на шлях IGF-1R, імовірно буде корисним, якщо співвідношення рівня експресії, визначеного на стадії (a), і еталонного рівня експресії більше 1; або

(d) вибору пацієнта, для якого лікування лікарським засобом, який містить антитіло, націленим на шлях IGF-1R, імовірно не буде корисним, якщо співвідношення рівня експресії, визначеного на стадії (a), і еталонного рівня експресії менше або дорівнює 1.

30 14. Набір для виявлення пухлинних клітин, експресуючих IGF-1R, у пацієнта, де вказаний набір містить щонайменше антитіло до IGF-1R або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-3.

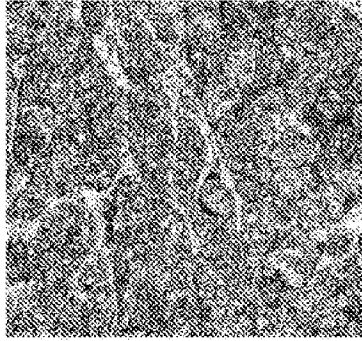
35 15. Набір для визначення того, чи буде для пацієнта з онкогенним розладом імовірно корисним лікування лікарським засобом, який містить антитіло, націленим на шлях IGF-1R, де набір містить щонайменше антитіло до IGF-1R або його антигензв'язуючий фрагмент за будь-яким з пп. 1-3.

rh IGF1R ELISA

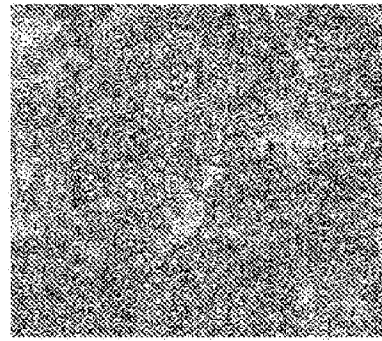


	816C12
Сигмоїдальний дозозалежний ефект (змінний нахил)	
Оптимальні значення	
Нижнє значення	0.1163
Верхнє значення	2.438
LogEC ₅₀	-9.380
Кутовий коефіцієнт Хілла	1.116
EC ₅₀	4.173e-010

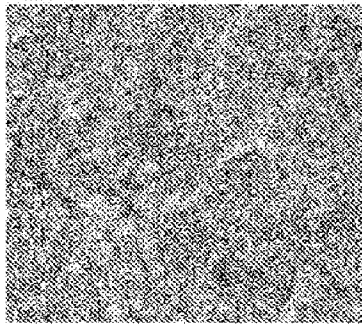
ФІГ. 1



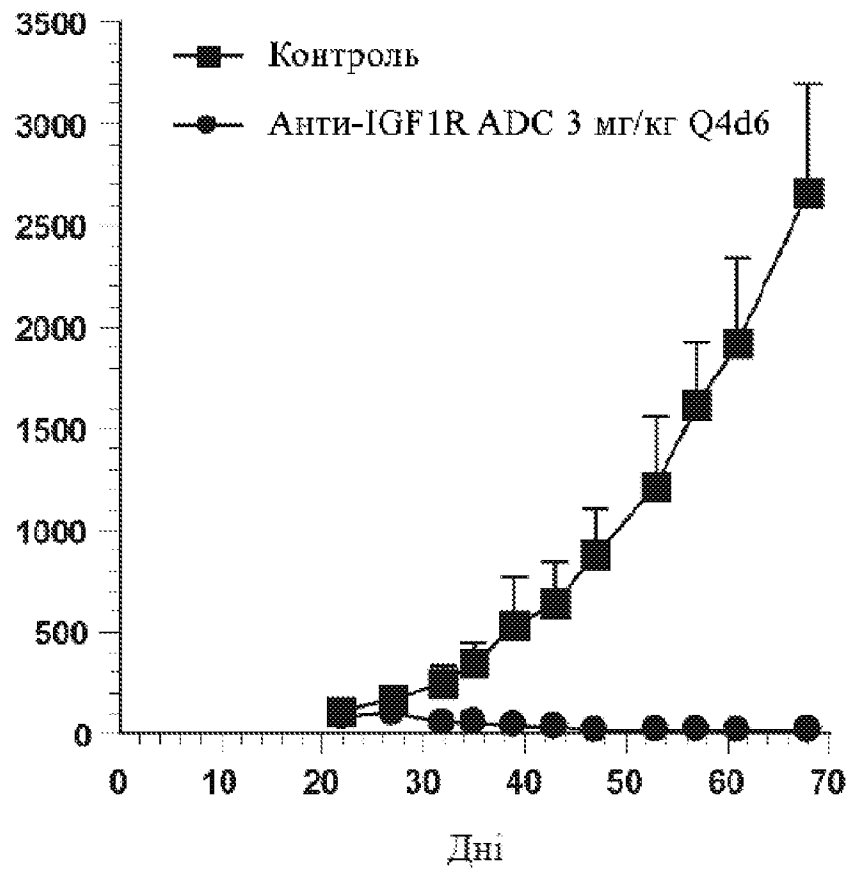
ФІГ. 2А



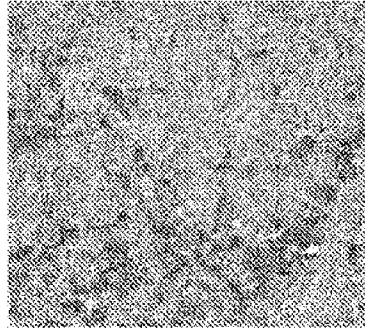
ФІГ. 2В



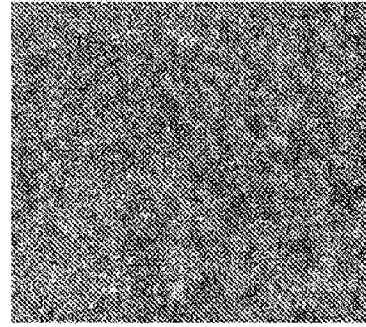
ФІГ. 2С



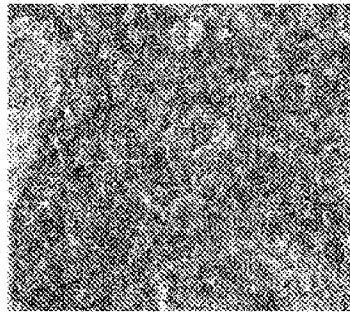
ФІГ. 3



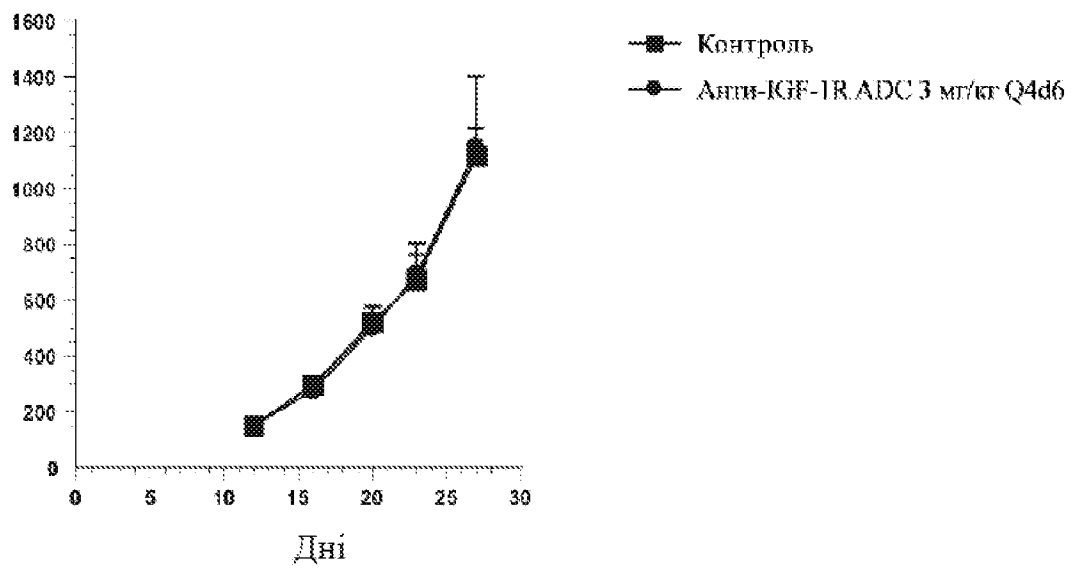
ФІГ. 4А



ФІГ. 4В



ФІГ. 4С



ФІГ. 5

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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