



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.16

(21) Номер заявки
201600338

(22) Дата подачи заявки
2012.03.30

(51) Int. Cl. **C07K 16/22** (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКАЯ СВЯЗЫВАЮЩАЯ МОЛЕКУЛА, СВЯЗЫВАЮЩАЯСЯ С VEGF И ANG2

(31) **11160921.0**

(32) **2011.04.01**

(33) **EP**

(43) **2016.09.30**

(62) **201301108; 2012.03.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Гшвинд Андреас, Отт Рене Георг (DE),
Букно Жоашен, Бюйз Мари-Анж,
Депла Эрик (BE)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) WO-A1-2010040508
JEFFREY L. BROWN ET AL.: "A Human Monoclonal Anti-ANG2 Antibody Leads to Broad Antitumor Activity in Combination with VEGF Inhibitors and Chemotherapy Agents in Preclinical Models", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, AMERICAN ASSOCIATION OF CANCER RESEARCH, US, vol. 9, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 145-156, XP002639543, ISSN: 1535-7163, DOI: DOI:10.1158/1535-7163, MCT-09-0554 [retrieved on 2010-01-12] the whole document

SCHEUER W. ET AL.: "468 Anti-tumoral and anti-metastatic activity of a tetravalent bispecific antibody (TAVi6) targeting VEGF and Angiopoietin-2", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER. SUPPLEMENT, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 8, no. 7, 1 November 2010 (2010-11-01), pages 150-151, XP027498158, ISSN: 1359-6349, DOI: DOI:10.1016/S1359-6349(10)72175-3 [retrieved on 2010-11-01] the whole document

WO-A1-2007068895

WO-A2-2007089445

US-A1-2008242587

H. HASHIZUME ET AL.: "Complementary Actions of Inhibitors of Angiopoietin-2 and VEGF on Tumor Angiogenesis and Growth", CANCER RESEARCH, vol. 70, no. 6, 15 March 2010 (2010-03-15), pages 2213-2223, XP055003824, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1977 the whole document

V. R. DOPPALAPUDI ET AL.: "Chemical generation of bispecific antibodies", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 107, no. 52, 28 December 2010 (2010-12-28), pages 22611-22616, P055003821, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1016478108 the whole document

W. SCHAEFER ET AL.: "Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 108, no. 27, 5 July 2011 (2011-07-05), pages 11187-11192, XP055003817, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1019002108 the whole document

MARVIN J. S. ET AL.: "BISPECIFIC ANTIBODIES FOR DUAL-MODALITY CANCER THERAPY: KILLING TWO SIGNALING CASCADES WITH ONE STONE", CURRENT OPINION IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 9, no. 2, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 184-193, XP009067444, ISSN: 1367-6733 the whole document

HARMSSEN M. M. ET AL.: "Properties, production, and applications of camel id single-domain antibody fragments", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 77, no. 1, 18 August 2007 (2007-08-18), pages 13-22, XP019560673, ISSN: 1432-0614, DOI: DOI:10.1007/S00253-007-1142-2 the whole document

RUDIKOFF S. ET AL.: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, WASHINGTON, DC; US, vol. 79, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP007901436, ISSN: 0027-8424, DOI: DOI:10.1073/PNAS.79.6.1979 the whole document

(57) В патенте описаны связывающие молекулы, которые связываются и с VEGF, и с Ang2, и способы их получения. Кроме того, описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие эти связывающие молекулы, экспрессионные векторы, содержащие эти нуклеиновые кислоты, клетки-хозяева, фармацевтическая композиция, содержащая в качестве действующего вещества по меньшей мере

одну указанную связывающую молекулу и предназначенная для лечения заболевания, которое ассоциировано с опосредуемыми VEGF и/или опосредуемыми Ang2 воздействиями на ангиогенез.

036746 B1

036746 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к связывающим молекулам, связывающимся с VEGF И ANG2, способам их получения, молекулам нуклеиновых кислот, к экспрессионным векторам и клеткам - хозяевам с этими нуклеиновыми кислотами, фармацевтической композиции, содержащей в качестве действующего вещества по меньшей мере одну из представленных связывающих молекул.

Предпосылки создания изобретения

Когда опухоли достигают критического размера, составляющего примерно 1 мм^3 , они начинают зависеть от ангиогенеза для обеспечения поступления с кровью кислорода и питательных веществ, позволяющих им продолжать рост. Антиангиогенные терапии стали важным методом лечения при некоторых типах опухолей. Эти терапии сфокусированы на блокаде пути VEGF (Ferrara и др., *Nat Rev Drug Discov.* 3(5), май 2004 г., сс. 391-400) путем нейтрализации VEGF (авастин) или его рецепторов (сутент и сорафиниб). Современные проведенные на мышах исследования продемонстрировали, что ангиопоэтин-2 (Ang2), лиганд Tie2-рецептора, контролирует ремоделирование сосудов, обеспечивая функционирование других ангиогенных факторов, таких как VEGF. Ang2 экспрессируется главным образом эндотелиальными клетками, установлено, что имеет место его сильная индукция под действием гипоксии и других ангиогенных факторов, и было продемонстрировано, что он регулирует пластичность сосудов опухоли, что позволяет сосудам реагировать на VEGF и FGF2 (Augustin и др., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(3), март 2009 г., сс. 165-177). Установлено, что элиминирование или ингибирование Ang2 приводит к пониженному ангиогенезу (Gale и др., *Dev Cell.* 3(3), сентябрь 2002 г., сс. 302-304; Falcon и др., *Am J Pathol.* 175(5), ноябрь 2009 г., сс. 2159-2170), что согласуется с указанной ролью. Повышенные концентрации Ang2 в сыворотке обнаружены у пациентов с колоректальным раком (CRC), NSCLC и меланомой (Goede и др., *Br J Cancer.* 103(9), 26 октября 2010 г., сс. 1407-1414; Park и др., *Chest.* 132(1), июль 2007 г., сс. 200-206; Helfrich и др., *Clin Cancer Res.* 15(4), 15 февраля 2009 г., сс. 1384-1392). При CRC-раке уровни Ang2 в сыворотке коррелируют с терапевтическим ответом на анти-VEGF терапию.

Система Ang-Tie состоит из двух рецепторов (Tie1 и Tie2) и трех лигандов (Ang1, Ang2 и Ang4) (Augustin и др., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(3), март 2009 г., сс. 165-177). Tie2, Ang1 и Ang2 являются наиболее хорошо изученными представителями этого семейства, Tie1 представляет собой сиротский рецептор, а роль Ang4 в ремоделировании сосудов подлежит изучению. Ang2 и Ang1 опосредуют противоположные функции при связывании с Tie2 и активации. Опосредуемая Ang2 активация Tie2 приводит к активации эндотелиальных клеток, диссоциации перицитов, просачиванию из сосудов и индукции и разрастанию сосудов. В отличие от Ang2 передача сигналов Ang1 поддерживает целостность сосудов путем рекрутмента перицитов, поддерживая тем самым состояние покоя эндотелиальных клеток.

Ангиопоэтин 2 (Ang2) представляет собой секретируемый лиганд для тирозинкиназного Tie2-рецептора с молекулярной массой 66 кДа (Augustin и др., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(3), март 2009 г., сс. 165-177). Ang2 состоит из N-концевого "coiled-coil" домена и C-концевого фибриногенподобного домена, последний необходим для взаимодействия с Tie2. Ang2 экспрессируется главным образом эндотелиальными клетками, было установлено, что имеет место его сильная индукция под действием гипоксии и других ангиогенных факторов, включая VEGF. Tie2 обнаружен в эндотелиальных клетках, гематопозитических стволовых клетках и опухолевых клетках. Установлено, что Ang2-Tie2 регулирует пластичность сосудов опухоли, что позволяет сосудам реагировать на VEGF и FGF2.

In vitro установлено, что Ang2 действует в качестве несильного митогена, хемоаттрактанта и индуктора образования трубочек в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC). Ang2 индуцирует фосфорилирование тирозина при эктопической экспрессии Tie2 в фибробластах и стимулирует передачу сигналов по ходу транскрипции, таких как фосфорилирование ERK-MAPK, АКТ и FAK, в HUVEC. Описано антагонистическое воздействие Ang2 на индуцируемые Ang1 ответы эндотелиальных клеток.

Установлено, что дефицит Ang2 приводит у мышей к выраженному дефекту лимфатической структуры. Хотя снижение уровня Ang2 не имеет решающего значения для развития эмбриональных сосудов, мыши с дефицитом Ang2 имели устойчивые дефекты сосудов в сетчатке и почке. В сочетании со схемой динамики экспрессии Ang2 в местах ангиогенеза (например, в яичнике), указанные данные свидетельствуют о том, что Ang2 контролирует ремоделирование сосудов, обеспечивая функции других ангиогенных факторов, таких как VEGF.

Система Ang2-Tie2 имеет решающее значение в процессе ангиогенного "переключения" и на последних стадиях ангиогенеза опухоли. Для экспрессии Ang2 характерна сильная повышающая регуляция в ассоциированном с опухолью эндотелии. Замедленный рост опухолей обнаружен при имплантации в мышей с дефицитом Ang2, прежде всего на ранних стадиях роста опухоли. Установлено, что терапевтическая блокада Ang2 с помощью МАт к Ang2 обладает широким спектром эффективности в отношении моделей различных опухолей, созданных с использованием ксенотрансплантатов.

Описано дополнительное воздействие МАт к Ang2 с использованием ингибиторов VEGFR2 (МАт и низкомолекулярные ингибиторы).

Как обобщено в US 2008/0014196 и WO 2008/101985 ангиогенез принимает участие в патогенезе ряда нарушений, включая плотные (солидные) опухоли и метастазы, а также глазные болезни. Одним из

наиболее важных проангиогенных факторов является сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), который обозначают также как VEGF-A или фактор сосудистой проницаемости (VPF). VEGF принадлежит к семейству генов, включающему плацентарный фактор роста (PLGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и VEGF-F. Альтернативный сплайсинг мРНК единичного гена человеческого VEGF приводит к образованию по меньшей мере шести изоформ (VEGF 121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 и VEGF206), при этом наиболее часто встречающейся изоформой является VEGF 165.

Идентифицировано два тирозинкиназных рецептора VEGF (VEGFR), которые взаимодействуют с VEGF, а именно, VEGFR-1 (который обозначают также как Flt-1) и VEGFR-2 (который обозначают также как KDR или Flk-1). VEGFR-1 обладает наиболее высокой аффинностью к VEGF, а VEGFR-2 характеризуется несколько более низкой аффинностью к VEGF. У Ferrara (Endocrine Rev., 25, 2004, сс. 581-611) представлено подробное описание VEGF, данные о его взаимодействии с рецепторами и его функция при нормальных и патологических процессах описаны, например, у Hoeber и др., Pharmacol. Rev., 56, 2004, сс. 549-580.

Известно, что VEGF представляет собой имеющий решающее значение регулятор как нормального, так и аномального ангиогенеза (Ferrara и Davis-Smyth, Endocrine Rev., 18, 1997, сс. 4-25; Ferrara, J. Mol. Med., 77, 1999, сс. 527-543). По сравнению с другими факторами роста, которые участвуют в процессах формирования сосудов, VEGF является уникальным благодаря его высокой специфичности в отношении эндотелиальных клеток в сосудистой системе. В большинстве человеческих опухолей обнаружена сверхэкспрессия мРНК VEGF. В случае роста опухолей ангиогенез, по-видимому, имеет решающее значение для перехода от гиперплазии к неоплазии и для обеспечения питания, необходимого для роста и метастазирования опухоли (Folkman и др., Nature 339, 1989, с. 58), что позволяет опухолевым клеткам приобретать преимущества с позиций роста по сравнению со здоровыми клетками. Таким образом, антиангиогенные терапии могут стать важным средством лечения некоторых типов опухолей. Эти терапии сфокусированы на блокаде VEGF-пути (Ferrara и др., Nat Rev Drug Discov., 3(5), май 2004 г., сс. 391-400).

VEGF принимает участие также в патогенезе глазных болезней. Обнаружен высокий уровень корреляции между концентрацией VEGF в глазных жидкостях и наличием активной пролиферации кровеносных сосудов у пациентов с диабетическими и другими связанными с ишемией ретинопатиями. Кроме того, в современных исследованиях продемонстрирована локализация VEGF в хориоидальных неоваскулярных мембранах у пациентов, страдающих возрастной дегенерацией желтого пятна (AMD). При различных воспалительных заболеваниях обнаружена также повышающая регуляция VEGF. VEGF принимает участие в патогенезе ревматоидного артрита (РА), воспалительного заболевания, в котором ангиогенез играет значительную роль.

Раскрытие роли VEGF в ангиогенезе и различных процессах свидетельствует о том, что он представляет собой новую потенциальную мишень для терапевтического вмешательства. Функцию VEGF ингибировали с помощью малых молекул, которые блокируют или предупреждают активацию рецепторных тирозинкиназ VEGF (Schlaeppli и Wood, Cancer Metastasis Rev., 18, 1999, сс. 473-481) и, как следствие, оказывают воздействие на путь трансдукции сигнала рецептора VEGF. Цитотоксические конъюгаты, содержащие бактериальные или растительные токсины, могут ингибировать стимулирующее действие VEGF на ангиогенез опухолей. Например, конъюгаты VEGF-токсин DT385 (домены дифтерийного токсина, слитые или химически конъюгированные с VEGF 165), эффективно ингибируют рост опухолей *in vivo*. Ингибирование роста опухолей можно осуществлять также путем введения мутанта Flk-1 или растворимых VEGF-рецепторов с использованием ретровирусов.

Разработаны нейтрализующие VEGF антитела, такие как A4.6.1 и MV833, которые блокируют связывание VEGF с его рецепторами, и в доклинических исследованиях была продемонстрирована их противоопухолевая активность (Kim и др., Nature, 362, 1993, сс. 841-844; Folkman Nat. Med., 1, 1995, сс. 27-31; Presta и др., Cancer Res., 57, 1997, сс. 4593-4599; Kanai и др., Int. J. Cancer, 77, 1998, сс. 933-936; Ferrara и Alitalo, Nat. Med., 5, 1999, сс. 1359-1364; 320, 340). Обзор исследований с использованием терапевтических подходов, основанных на применении антител к VEGF, представлен у Campochiaro и Hackett, Oncogene, 22, 2003, сс. 6537-6548.

В клинических исследованиях наиболее изученным является антитело A4.6.1, которое обозначают также как бевацизумаб (Avastin®; фирма Genentech, Сан-Франциско, шт. Калифорния).

В WO 2008/101985 описаны иммоноглобулиновые единичные вариабельные домены верблюдовых (VHH или "Nanobodies®", представленные в настоящем описании), которые связываются с VEGF, и их применение для лечения состояний и заболеваний, отличающихся чрезмерным и/или патологическим ангиогенезом или неоваскуляризацией.

Таким образом, в основу настоящего изобретения была положена задача разработать новые ангиогенные связывающие молекулы, предназначенные для лечения человека.

Способы предупреждения, лечения, облегчения и/или диагностирования указанных заболеваний, нарушений или состояний заключаются в том, что применяют или вводят указанные связывающие молекулы и содержащие их композиции. Фармакологичные активные связывающие молекулы, композиции и/или способы обладают преимуществами по сравнению с агентами, композициями и/или методами, ко-

которые применяют в настоящее время и/или которые известны в данной области. Указанные преимущества включают улучшенные терапевтические и/или фармакологические свойства и/или другие обладающие преимуществами свойства, например, для целей изготовления, прежде всего по сравнению с каноническими антителами, описанными выше, или их фрагментами.

Краткое изложение сущности изобретения

Первым объектом изобретения являются связывающие молекулы, которые имеют последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 207, с SEQ ID NO: 210, с SEQ ID NO: 213, но в которых в качестве N-концевой аминокислоты отсутствует аспарагиновая кислота (D).

Более конкретно, биспецифическая связывающая молекула практически содержит (I) Ang2-связывающий компонент, который специфически связывается по меньшей мере с одним эпитопом Ang2, и (II) VEGF-связывающий компонент, который специфически связывается по меньшей мере с одним эпитопом VEGF, где компоненты сцеплены друг с другом таким образом, что они одновременно связываются с Ang2 и VEGF или таким образом, что они связываются в определенный момент времени с Ang2 или VEGF.

Как должно быть очевидно специалисту в данной области, настоящее изобретение можно отнести к биспецифическим связывающим молекулам, которые включают другие анти-Ang2 или анти-VEGF иммуноглобулиновые единичные вариabельные домены, такие как доменные антитела.

Другим объектом изобретения являются нуклеиновые кислоты, кодирующие биспецифические связывающие молекулы, а также клетки-хозяева и экспрессионный вектор, которые их содержат.

Изобретение относится также к фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере одну биспецифическую связывающую молекулу, предлагаемую в изобретении, она предназначена для лечения заболевания, которое ассоциировано с опосредуемыми VEGF и/или опосредуемыми Ang2 воздействиями на ангиогенез, в частности для лечения рака.

Изобретение относится также к способу получения биспецифических связывающих молекул, включающий этапы:

культивирования клетки-хозяина, включающей молекулу нуклеиновой кислоты, обеспечивающих экспрессию указанной связывающей молекулы; и

выделение или извлечение этой связывающей молекулы, которая экспрессируется этой клеткой-хозяином, из культуры.

Дополнительно этот способ включает этап очистки этой связывающей молекулы.

Было установлено, что Ang2-связывающий компонент биспецифических связывающих молекул может связываться с Ang2 по меньшей мере в 5000 сильнее, предпочтительно в 10000 раз сильнее, чем с Ang1 или Ang4. Это должно в большой степени позволять избегать блокады активации опосредуемой Ang1 передачи сигналов, что может препятствовать требуемому антиангиогенному действию.

Установлено также, что VEGF-связывающий компонент биспецифических связывающих молекул связывается с VEGF-A с аффинностью по меньшей мере в 1000 раз более высокой, предпочтительно по меньшей мере в 5000 раз более высокой, более предпочтительно по меньшей мере в 10000 раз более высокой, чем с VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D или PLGF. Благодаря наиболее выраженному связыванию с VEGF-A не происходит взаимодействия с передачей сигнала VEGFR3, которой модулирует ангиогенез лимфатических сосудов.

Кроме того, благодаря биспецифической природе (VEGF- и Ang2-связывающие компоненты в одной молекуле) проникновение в опухоль обеих функциональностей неизбежно должно быть одинаковым, что должно гарантировать, что благоприятные действия объединенного антагонизма VEGF и Ang2 должно распространяться на всю глубину проникновения в опухоль. Это может являться преимуществом по сравнению с применением комбинации индивидуальных антагонистов к этим мишеням, поскольку глубина проникновения индивидуальных антагонистов всегда может варьироваться в некоторой степени.

Определения

Если не указано или определено иное, то все применяемые понятия употребляются в их обычном значении, принятом в данной области, которое очевидно специалистам в данной области. В качестве ссылки можно указать, например, стандартные руководства, такие как Sambrook и др., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2-ое изд., тома 1-3, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Lewin, "Genes IV", изд-во Oxford University Press, New York, 1990, и Roitt и др., "Immunology" (2-ое изд.), изд-во Gower Medical Publishing, London, New York, 1989, а также документы, касающиеся общего уровня техники, процитированные в настоящем описании; кроме того, если не указано иное, все методы, стадии, процессы и манипуляции, которые не описаны конкретно в деталях, можно осуществлять (и их осуществляли) хорошо известными методами, что должно быть очевидно специалисту в данной области. И в этом случае также в качестве ссылки можно, например, указать на известные руководства, сведения, касающиеся общего уровня техники, указанные выше, и дополнительные процитированные в них ссылки.

Понятие "биспецифическая связывающая молекула" относится к молекуле, которая содержит по меньшей мере одну Ang2-связывающую молекулу (или "Ang2-связывающий компонент") и по меньшей мере одну VEGF-связывающую молекулу (или "VEGF-связывающий компонент"). Биспецифическая свя-

связывающая молекула может содержать более одной Ang2-связывающей молекулы и/или более одной VEGF-связывающей молекулы, что имеет место в том случае, когда биспецифическая связывающая молекула содержит бипаратопную (что будет описано ниже) Ang2-связывающую молекулу и/или бипаратопную VEGF-связывающую молекулу, в той части молекулы, которая связывается с Ang2 или с VEGF т.е. в ее "Ang2-связывающем компоненте" или (анти-Ang2-компоненте) или "VEGF-связывающем компоненте" (или в анти-VEGF-компоненте) соответственно. Однако понятие "биспецифический" в этом контексте не предусматривает, что из биспецифической связывающей молекулы исключаются дополнительные связывающие компоненты, которые имеют связывающую специфичность в отношении молекул, отличных от VEGF и Ang2. Примерами указанных дополнительных связывающих компонентов являются (но не ограничиваясь только ими) связывающие компоненты, которые связываются с сывороточным альбумином.

Если не указано иное, то понятия "иммуноглобулин" и "последовательность иммуноглобулина", если их используют в контексте настоящего описания касательно состоящего только из тяжелых цепей антитела или канонического состоящего из 4 цепей антитела, применяют в качестве общих понятий, которые включают полноразмерное антитело, его индивидуальные цепи, а также все его области, домены или фрагменты (включая (но, не ограничиваясь только ими) антигенсвязывающие домены или фрагменты, такие как VHH-домены или VH/VL-домены соответственно). Кроме того, понятие "последовательность" в контексте настоящего описания (например, в понятиях типа "последовательность иммуноглобулина", "последовательность антитела" "последовательность (единичного) варибельного домена", "последовательность VHH" или "последовательность белка"), как это обычно принято, относится как к соответствующим аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновых кислот или нуклеотидным последовательностям, которые их кодируют, если из контекста не следует более ограниченная интерпретация.

Понятие "домен (область)" (полипептида или белка) в контексте настоящего описания относится к складчатой белковой структуре, которая обладает способностью сохранять свою третичную структуру, независимо от остального белка. Как правило, домены ответственны за отдельные функциональные свойства белков и во многих случаях их можно добавлять, удалять или переносить в другие белки без потери функции оставшейся части белка и/или домена.

Понятие "иммуноглобулиновый домен" в контексте настоящего описания относится к глобулярной области цепи антитела (такой, например, как цепь канонического состоящего из 4 цепей антитела или состоящего из тяжелых цепей антитела) или к полипептиду, который состоит практически из указанной глобулярной области. Иммуноглобулиновые домены отличаются тем, что они сохраняют присущую иммуноглобулину складчатую структуру молекул антитела, которая представляет собой 2-слойный "сэндвич", состоящий примерно из 7 антипараллельных бета-цепей, упакованных в две бета-складки, необязательно стабилизированных с помощью консервативного дисульфидного мостика. Иммуноглобулиновый домен содержит варибельный(ые) домен(ы), т.е. один или несколько иммуноглобулиновых варибельных доменов. Понятие "иммуноглобулиновый варибельный домен (область)" в контексте настоящего описания относится к иммуноглобулиновому домену, состоящему практически из четырех "каркасных участков", как они определены в данной области, и обозначены ниже как "каркасный участок 1" или "FR1"; "каркасный участок 2" или "FR2"; "каркасный участок 3" или "FR3" и "каркасный участок 4" или "FR4" соответственно; указанные каркасные участки перемежаются тремя "гиперварибельными участками, участками, определяющими комплементарность" или "CDR", как они определены в данной области, и обозначены ниже как "гиперварибельный участок 1" или "CDR1"; "гиперварибельный участок 2" или "CDR2" и "гиперварибельный участок 3" или "CDR3" соответственно. Таким образом, общую структуру или последовательность варибельного домена иммуноглобулина можно обозначать как: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. Именно варибельный(ые) домен(ы) иммуноглобулина придает(ют) специфичность антителу в отношении антигена, поскольку он(они) несут антигенсвязывающий центр. В контексте настоящего изобретения предпочтительными являются иммуноглобулиновые единичные варибельные домены типа VHH и доменных антител.

Понятие "иммуноглобулиновый единичный варибельный домен" в контексте настоящего описания относится к иммуноглобулиновому варибельному домену, который обладает способностью специфически связываться с эпитопом антигена без спаривания с дополнительным иммуноглобулиновым варибельным доменом. Одним из примеров иммуноглобулиновых единичных варибельных доменов согласно настоящему изобретению являются "доменные антитела", такие как единичные варибельные домены VH и VL (VH-домены и VL-домены). Другим примером иммуноглобулиновых единичных варибельных доменов являются "VHH-домены" (или просто "VHH") из представителей верблюдовых, как указано ниже в настоящем описании.

В свете вышеуказанных определений антигенсвязывающий домен канонического состоящего из 4 цепей антитела (такого как молекула IgG, IgM, IgA, IgD или IgE; известная в данной области) или Fab-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, Fv-фрагмента, такого как связанный дисульфидным мостиком Fv или scFv-фрагмент, или димерного антитела (диабоди) (которые все известны в данной области), выведенный из указанного канонического состоящего из 4 цепей антитела, не следует рассматривать как иммуногло-

булиновый единичный переменный домен, поскольку в этих случаях связывание с соответствующим эпитопом антигена в норме не может осуществляться с помощью одного (единичного) иммуноглобулинового домена, а должно происходить посредством спаривания (ассоциации) иммуноглобулиновых доменов, таких как переменные области легкой и тяжелой цепей, т.е. с помощью пары VH-VL иммуноглобулиновых доменов, которые совместно связываются с эпитопом соответствующего антигена.

"VHH-домены", которые обозначают также как VHH, V_HH-домены, фрагменты VHH-антитела и VHH-антитела, впервые были описаны как антигенсвязывающие иммуноглобулиновые (переменные) домены "состоящих из тяжелых цепей антител" (т.е. "антител, в которых отсутствуют легкие цепи"), Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S., Robinson G., Hamers C, Songa E.B., Bendahman N., Hamers R. в: "Naturally occurring antibodies devoid of light chains"; Nature 363, 1993, сс. 446-448). Понятие "VHH-домен" было выбрано для того, что можно было отличать эти переменные домены от переменных областей тяжелых цепей, которые присутствуют в канонических состоящих из 4 цепей антителах (они обозначены далее как "V_H-домены (области)" или "VH-домены (области)") и от переменных областей легких цепей, которые присутствуют в канонических состоящих из 4 цепей антителах (они обозначены далее как "V_L-домены (области)" или "VL-домены (области)"). VHH-домены могут специфически связываться с эпитопом без дополнительного антигенсвязывающего домена (в отличие от VH- или VL-доменов в каноническом состоящем из 4 цепей антителе, в котором для распознавания эпитопа требуется присутствие VL-домена в сочетании с VH-доменом). VHH-

домены представляют собой небольшие, сильные и эффективные распознающие антиген структуры (единицы), образованные единичным иммуноглобулиновым доменом.

В контексте настоящего изобретения понятия VHH-домен, VHH, V_HH-домен, фрагмент VHH-антитела, VHH-антитело, а также "Nanobody®" и "домен Nanobody®" ("Nanobody" является товарным знаком компании Ablynx N.V.; Гент, Бельгия) применяют взаимозаменяемо, и они относятся к иммуноглобулиновым единичным переменным доменам (которые имеют следующее строение: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, и которые специфически связываются с эпитопом, не требуя присутствия второго иммуноглобулинового переменного домена), и они отличаются от VH-доменов наличием так называемых "отличительных остатков, остатков-маркеров", как они определены, например, в WO 2009/109635, фиг. 1.

Аминокислотные остатки иммуноглобулинового единичного переменного домена, например, VHH, нумеруют согласно общей номенклатуре Кэбота для VH-доменов ("Sequence of proteins of immunological interest", изд-во US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, публикация № 91), в том виде, в котором ее применяют для VHH-доменов верблюдовых, например, как продемонстрировано на фиг 2 у Riechmann и Muyldermans, J. Immunol. Methods 231, 1999, сс. 25-38. Согласно этой нумерации:

- FR1 содержит аминокислотные остатки, присутствующие в положениях 1-30,
- CDR1 содержит аминокислотные остатки, присутствующие в положениях 31-35,
- FR2 содержит аминокислотные остатки, присутствующие в положениях 36-49,
- CDR2 содержит аминокислотные остатки, присутствующие в положениях 50-65,
- FR3 содержит аминокислотные остатки, присутствующие в положениях 66-94,
- CDR3 содержит аминокислотные остатки, присутствующие в положениях 95-102 и
- FR4 содержит аминокислотные остатки, присутствующие в положениях 103-113.

Однако следует отметить, что, как хорошо известно для V_H-доменов и для VHH-доменов, общее количество аминокислотных остатков в каждом CDR может варьироваться и может не соответствовать общему количеству аминокислотных остатков, указанных в номенклатуре Кэбота (т.е. одно или несколько положений согласно номенклатуре Кэбота может быть незанятым в фактической последовательности или фактическая последовательность может содержать большее количество аминокислотных остатков, чем количество остатков, которое должно присутствовать согласно номенклатуре Кэбота). Это означает, что, в целом, нумерация по Кэботу может как соответствовать, так и не соответствовать фактической нумерации аминокислотных остатков в фактической последовательности.

В данной области известны альтернативные методы нумерации аминокислотных остатков V_H-доменов, указанные методы также можно применять аналогичным образом к VHH-доменам. Однако, в настоящем описании, формуле изобретения и на чертежах нумерация соответствует номенклатуре Кэбота, и ее применяют к описанным выше VHH-доменам, если специально не указано иное.

Общее количество аминокислотных остатков в VHH-домене, как правило, составляет от 110 до 120, чаще от 112 до 115. Однако следует отметить, что для целей настоящего изобретения можно применять также как более короткие, так и более длинные последовательности.

Имуноглобулиновые единичные переменные домены (например, VHH и "доменные" антитела), имеют ряд уникальных структурных характеристик и функциональных свойств, которые делают их наиболее предпочтительными для применения в терапии в качестве функциональных антигенсвязывающих молекул. В частности (но, не ограничиваясь только ими), VHH-домены (которые "созданы" природой таким образом, что они могут функционально связываться с антигеном без спаривания с переменной областью легкой цепи) могут функционировать как единичные относительно мелкие функциональные антигенсвязывающие структурные единицы.

Благодаря своим уникальным свойствам иммуноглобулиновые единичные переменные домены, как они определены в настоящем описании, типа VHH или VH (или VL), либо индивидуально, либо в качестве части более крупного полипептида, например, бипаратопной молекулы, обладают рядом важных преимуществ:

только один домен необходим для связывания антигена с высокой аффинностью и высокой селективностью, поэтому отсутствует как необходимость в наличии двух отдельных доменов, так и необходимость в требовании, чтобы эти два домена находились в правильной пространственной конформации и конфигурации (т.е. необходимость в применении специально созданных линкеров, как в случае scFv);

иммуноглобулиновые единичные переменные домены можно экспрессировать с одной молекулы нуклеиновой кислоты и при этом отсутствует необходимость в какой-либо пост-трансляционной модификации (типа гликозилирования);

иммуноглобулиновые единичные переменные домены легко можно конструировать в многовалентных и мультиспецифических форматах (что подробно обсуждено ниже в настоящем описании);

иммуноглобулиновые единичные переменные домены обладают высокой специфичностью и аффинностью к мишени, низкой присущей им токсичностью и их можно вводить путями, отличными от инфузии или инъекции;

иммуноглобулиновые единичные переменные домены обладают высокой устойчивостью к нагреванию, pH, протеазам и другим денатурирующим агентам или условиям и поэтому их можно получать, хранить или транспортировать без применения охлаждающего оборудования;

иммуноглобулиновые единичные переменные домены можно легко и относительно дешево получать как в лабораторном, так и в промышленном масштабе. Например, иммуноглобулиновые единичные переменные домены и полипептиды, содержащие их, можно получать с использованием ферментации микроорганизмов (что более подробно описано ниже) и для этой цели не требуется применения экспрессионных систем млекопитающих, что имеет место в случае канонических антител;

иммуноглобулиновые единичные переменные домены являются относительно небольшими (примерно 15 кДа или в 10 раз меньше, чем канонический IgG) по сравнению с каноническими состоящими из 4 цепей антителами и их антигенсвязывающими фрагментами, и поэтому для них характерна высокая (более высокая) способность проникать в ткани (включая, но, не ограничиваясь только ими) плотные опухоли и другие плотные ткани) и их можно вводить в более высоких дозах, чем дозы канонических состоящих из 4 цепей антител и их антигенсвязывающих фрагментов;

VHH обладают специфической так называемой "способностью связываться с сайтом, расположенном в расщелине (бороздке)" (в том числе благодаря их удлиненной CDR3-петле, в отличие от VH-доменов состоящих из 4 цепей антител), и поэтому для них являются доступными также мишени и эпитопы, которые не доступны для канонических состоящих из 4 цепей антител и их антигенсвязывающих фрагментов;

VHH обладают важным преимуществом, которое заключается в том, что они обладают высокой растворимостью и очень высокой стабильностью и не имеют тенденцию к агрегации (что имеет место в случае полученных из антител мышей антигенсвязывающих доменов, описанных у Ward и др., Nature 341, 1989, сс. 544-546)).

Иммуноглобулиновые единичные переменные домены, не ограничены каким-либо конкретным биологическим источником, из которого их получают, или конкретным методом получения. Например, процесс получения VHH может включать следующие стадии:

(1) выделение VHH-домена из встречающегося в естественных условиях содержащего (только) тяжелые цепи антитела; или скрининг библиотеки содержащих (только) тяжелые цепи антител или VHH, и выделение из них VHH;

(2) экспрессия молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей VHH-домен, имеющий встречающуюся в естественных условиях последовательность;

(3) "гуманизация" (или оптимизация последовательности) VHH, необязательно после созревания аффинности, с помощью имеющей встречающуюся в естественных условиях последовательности, или экспрессия нуклеиновой кислоты, которая кодирует гуманизированный VHH;

(4) "камелизация" (согласно описанному ниже методу) иммуноглобулинового единичного переменного домена тяжелой цепи встречающегося в естественных условиях антитела, полученного из различных видов животных, в частности видов млекопитающих, таких как человек, или экспрессия молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный камелизированный домен;

(5) "камелизация" VH или экспрессия молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей камелизированный VH;

(6) применение методик для получения синтетических или полусинтетических белков, полипептидов или других аминокислотных последовательностей;

(7) получение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей VHH-домен, с помощью методов синтеза нуклеиновых кислот с последующей экспрессией полученной таким образом нуклеиновой кислоты;

(8) подвергание содержащих тяжелые цепи антител или VHH процессу созревания аффинности, мутагенезу (например, неспецифическому мутагенезу или сайтаправленному мутагенезу) и/или любой(ым)

другой(им) обработке(ам) для повышения аффинности и/или специфичности VHH; и/или

(9) сочетание или выбор некоторых из вышеизложенных стадий. Приемлемые методы и процессы осуществления указанных выше стадий известны в данной области и должны быть очевидны специалисту в данной области. Например, методы получения VHH-доменов, которые связываются со специфическим антигеном или эпитопом, описаны в WO 2006/040153 и WO 2006/122786.

Иммуноглобулиновые единичные вариабельные домены или присутствующие в полипептидах представляют собой VHH-домены, аминокислотная последовательность которых практически соответствует аминокислотной последовательности встречающегося в естественных условиях VHH-домена, но является гуманизированной (имеет оптимизированную последовательность) необязательно в результате созревания аффинности), т.е. имеет(ют) место замена(ы) одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности указанного встречающегося в естественных условиях VHH на один или несколько аминокислотных остатков, которые находятся в соответствующем(их) положении(ях) в вариабельной области тяжелой цепи канонического состоящего из 4 цепей человеческого антигена. Для этой цели можно применять методы, известные в данной области, которые являются общепринятыми для специалиста в данной области.

Гуманизированный VHH-домен может содержать одну или несколько последовательностей полностью человеческих каркасных участков и может содержать последовательности человеческих каркасных участков, выведенные из последовательностей человеческой зародышевой линии Vh3, таких как DP-29, DP-47, DP-51, или их части, или обладать высоким уровнем гомологии с ними, необязательно в сочетании с JH-последовательностями, такими как JH5. Так, протокол гуманизации может предусматривать замену любого из остатков VHH на соответствующие остатки каркасного участка 1, 2 и 3 (FR1, FR2 и FR3) генов VH зародышевой линии, таких как DP 47, DP 29 и DP 51, либо индивидуально, либо в комбинации. Приемлемые каркасные участки (FR) иммуноглобулиновых единичных вариабельных доменов можно выбирать из участков, описанных, например, в WO 2006/004678, и в частности, они включают так называемые классы "KERE" и "GLEW". Наиболее предпочтительными являются иммуноглобулиновые единичные вариабельные домены, которые имеют аминокислотную последовательность G-L-E-W примерно в положениях 44-47, и их соответствующие гуманизированные копии. Гуманизированный VHH-домен может содержать одну или несколько последовательностей полностью человеческого каркасного участка.

Например, применяемая с целью гуманизации замена VHH, принадлежащих к 103 P,R,S-группе и/или GLEW-группе (что описано ниже), представляет собой замену 108Q на 108L. Методы гуманизации иммуноглобулиновых единичных вариабельных доменов известны в данной области.

Связывающие иммуноглобулиновые единичные вариабельные домены с улучшенными с позиций терапевтического применения свойствами, например, обладающие повышенной аффинностью или пониженной иммуногенностью, можно получать из индивидуальных связывающих молекул с помощью методик, известных в данной области, таких как созревание аффинности (например, используя в качестве исходных синтетические, произвольные или встречающиеся в естественных условиях последовательности иммуноглобулинов), CDR-трансплантация, гуманизация, объединение фрагментов, полученных из различных последовательностей иммуноглобулинов, ПЦР-сборка с использованием перекрывающихся праймеров и аналогичные методики, предназначенные для конструирования последовательностей иммуноглобулинов, которые хорошо известны специалисту в данной области; или любой приемлемой комбинации любых вышеизложенных методов, что обозначают также понятием "оптимизация последовательности", употребляемым в настоящем описании. В качестве ссылки можно указать, например, стандартные руководства, а также можно использовать приведенное ниже описание и сведения, представленные в примерах.

При необходимости связывающую молекулу, которая обладает повышенной аффинностью, получают из другой связывающей молекулы путем созревания аффинности, последняя представляет собой "родительскую" связывающую молекулу относительно молекулы с созревшей аффинностью.

Ранее были описаны методы получения VHH, которые связываются со специфическим антигеном или эпитопом, см., например, WO 2006/040153 и WO 2006/122786. Как подробно описано в указанных документах, VHH-домены, выведенные из представителей верблюдовых, можно "гуманизировать" (в контексте настоящего описания этот процесс обозначен также как "оптимизация последовательности", при этом "оптимизация последовательности" помимо гуманизации может включать дополнительную модификацию последовательности с помощью одной или нескольких мутаций, которые позволяют получать VHH с улучшенными свойствами, таких как удаление потенциальных сайтов пост-трансляционных модификаций) путем замены одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности исходной последовательности VHH на один или несколько аминокислотных остатков, которые находятся в соответствующем(их) положении(ях) в VH-области канонического состоящего из 4 цепей человеческого антигена. Гуманизированный VHH-домен может содержать одну или несколько последовательностей полностью человеческого каркасного участка и может содержать последовательности человеческих каркасных участков, выведенные из DP-29, DP-47, DP-51, или их части, необязательно в сочетании с JH-последовательностями, такими как JH5.

"Доменные антитела", которые обозначают также как "Dab" или "dAb" (понятия "доменные" антитела и "dAb" являются товарным знаком группы компаний GlaxoSmithKline), описаны, например, у Ward E.S. и др. в: "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*", *Nature* 341, 1989, сс. 544-546; у Holt L.J. и др. в: "Domain antibodies: proteins for therapy", *TRENDS in Biotechnology* 21(11), 2003, сс. 484-490 и в WO 2003/002609.

Доменные антитела в основном соответствуют VH- или VL-доменам антител из представителей млекопитающих, не относящихся к верблюдовым, в частности человеческих состоящих из 4 цепей антител. Для придания способности связываться с эпитопом в виде единичного антигенсвязывающего домена, т.е. без спаривания с VL- или VH-доменом соответственно, требуется осуществлять специфическую селекцию в отношении указанных антигенсвязывающих свойств, например, с использованием библиотек человеческих последовательностей единичных VH- или VL-доменов.

Доменные антитела подобно VHH имеют молекулярную массу, составляющую от примерно 13 до примерно 16 кДа, если их выводят из полностью человеческих последовательностей, и они не нуждаются в гуманизации, например, для терапевтического применения на людях. Также как и в случае VHH-доменов, их можно с успехом экспрессировать также в прокариотических системах экспрессии, что приводит к существенному снижению общей стоимости производства.

Кроме того, что также должно быть очевидно специалисту в данной области, можно "трансплантировать" один или несколько указанных выше CDR в другие "каркасы", включая (но, не ограничиваясь только ими) человеческие каркасы или неиммуноглобулиновые каркасы. Приемлемые каркасы и методики такой трансплантации CDR известны в данной области.

Понятия "эпитоп" и "антигенная детерминанта", которые можно применять взаимозаменяемо, относятся к участку макромолекулы, такой как полипептид, который распознается антигенсвязывающими молекулами, такими как канонические антитела или полипептиды, и более конкретно антигенсвязывающими центрами указанных молекул. Эпитопы представляют собой минимальный сайт связывания для иммуноглобулина и поэтому представляют собой специфическую мишень для иммуноглобулина.

Считают, что полипептид (такой как иммуноглобулин, антитело, иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен или в целом связывающая молекула или ее фрагмент), который может "связываться с" или "специфически связываться с", который обладает "аффинностью к" и/или "специфичностью к" определенному эпитопу, антигену или белку (или по меньшей мере одному его участку, фрагменту или эпитопу), "действует против" или является "направленным против" указанного эпитопа, антигена или белка, или является "связывающей" молекулой в отношении указанного эпитопа, антигена или белка. В этом контексте VEGF-связывающий компонент можно обозначать также как "VEGF-нейтрализующий" компонент.

Как правило, понятие "специфичность" относится к ряду антигенов или эпитопов различных типов, с которыми конкретная антигенсвязывающая молекула или молекула антигенсвязывающего белка (такая как иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен) может связываться. Специфичность антигенсвязывающей молекулы можно определять на основе ее аффинности и/или авидности. Аффинность, характеризующаяся константой равновесия реакции диссоциации комплекса антиген: антигенсвязывающий белок (KD), является мерой силы связывания между эпитопом и антигенсвязывающим центром антигенсвязывающего белка: чем меньше величина KD, тем выше сила связывания между эпитопом и антигенсвязывающей молекулой (в альтернативном варианте аффинность можно выражать в виде константы аффинности (KA), которая представляет собой 1/KD). Как должно быть очевидно специалисту в данной области (например, после ознакомления с представленным ниже дополнительным описанием), аффинность можно определять хорошо известным методом в зависимости от специфичности представляющего интерес антигена. Авидность представляет собой меру силы связывания между антигенсвязывающей молекулой (такой как иммуноглобулин, антитело, иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен или полипептид, содержащий их) и соответствующего антигена. Авидность связана как с аффинностью между эпитопом и его антигенсвязывающим центром антигенсвязывающей молекулы, так и с количеством соответствующих сайтов связывания, которые присутствует в антигенсвязывающей молекуле.

Часть антигенсвязывающей молекулы, которая распознает эпитоп, называется паратопом.

Если не указано иное, то понятие "VEGF-связывающая молекула" или "Ang2-связывающая молекула" включает антитела к VEGF или к Ang2, фрагменты антитела к VEGF или антитела к Ang2, "молекулы, напоминающие антитело к VEGF" или "молекулы, напоминающие антитело к Ang2", как они определены в настоящем описании, и конъюгаты, включающие любую из них. Антитела представляют собой (но, не ограничиваясь только ими) моноклональные и химерные моноклональные антитела. Понятие "антитело" относится к полным иммуноглобулинам, например, моноклональным антителам, которые получают путем рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, а также к фрагментам антител или "молекулам, напоминающим антитела", включая одноцепочечные антитела и линейные антитела, так называемые "SMIP" ("Small Modular Immunopharmaceuticals"), малые модульные иммунофармацевтические средства), например, описанные в WO 02/056910. Напоминающие антитела молекулы включают иммуноглобулиновые единичные вариабельные домены, представленные в настоящем описании. Другими приме-

рами напоминающих антитела молекул являются антитела из суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) или молекулы с трансплантированными CDR.

Понятие "Ang2-связывающая молекула" или "VEGF-связывающая молекула" соответственно относится как к одновалентным мишеням связывающим молекулам (т.е. к молекулам, которые связываются с одним эпитопом соответствующей мишени), так и к двух- или мновалентным связывающим молекулам (т.е. связывающим молекулам, которые связываются с более чем одним эпитопом, например, "бипаратопным" молекулам, как они описаны ниже). Ang2-(или VEGF)-связывающие молекулы, которые содержат более одного связывающегося с Ang2 (или VEGF) иммуноглобулинового единичного варибельного домена, обозначают также как "форматированные" связывающие молекулы, они могут содержать в мишень связывающем компоненте помимо иммуноглобулиновых единичных варибельных доменов также линкеры и/или фрагменты с эффекторными функциями, например, фрагменты, удлинняющие время полужизни, типа альбуминсвязывающих иммуноглобулиновых единичных варибельных доменов, и/или партера по слиянию типа сывороточного альбумина и/или присоединенного полимера типа ПЭГ.

Понятие "бипаратопная Ang2-(или VEGF)-связывающая молекула" или "бипаратопный иммуноглобулиновый единичный варибельный домен" в контексте настоящего описания означает связывающую молекулу, которая содержит первый иммуноглобулиновый единичный варибельный домен и второй иммуноглобулиновый единичный варибельный домен, как они определены в настоящем описании, при этом две молекулы связываются с двумя неперекрывающимися эпитопами соответствующего антигена. Бипаратопные связывающие молекулы состоят из иммуноглобулиновых единичных варибельных доменов, которые обладают различными специфичностями в отношении эпитопа. Паратопом называют часть антигенсвязывающей молекулы (такой как антитело или иммуноглобулиновый единичный варибельный домен), которая распознает эпитоп.

Форматированная связывающая молекула может, хотя этот является менее предпочтительным, содержать также два идентичных иммуноглобулиновых единичных варибельных домена или содержать два различных иммуноглобулиновых единичных варибельных домена, которые распознают один и тот же или перекрывающиеся эпитопы или соответствующий антиген. В этом случае касательно VEGF два иммуноглобулиновых единичных варибельных домена могут связываться с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом в каждом из двух мономеров, которые образуют димер VEGF.

Как правило, связывание связывающих молекул характеризуется значением константы диссоциации (K_D), составляющей от $10E-5$ до $10E-14$ молей/л (М) или менее, и предпочтительно от $10E-7$ до $10E-14$ молей/л (М) или менее, более предпочтительно от $10E-8$ до $10E-14$ молей/л и еще более предпочтительно от $10E-11$ до $10E-13$, по данным, полученным, например, с помощью Biacore- или Kinexa-анализа), и/или значением константы ассоциации (K_A), составляющей по меньшей мере $10E8$ ME^{-1} , более предпочтительно по меньшей мере $10E9$ ME^{-1} , например, по меньшей мере $10E11$ ME^{-1} . Как правило, считается, что любое значение величины K_D , превышающее $10E-4$ М, свидетельствует о неспецифическом связывании. Предпочтительно связывание полипептидас требуемым антигеном, т.е. VEGF или Ang2 соответственно, должно характеризоваться значением K_D , составляющим менее $500nM$, предпочтительно менее $200nM$, более предпочтительно менее $10nM$, например, менее $500pM$. Специфическое связывание антигенсвязывающего участка с антигеном или эпитопом можно определять с помощью любого приемлемого хорошо известного метода, такого, например, как анализы, представленные в настоящем описании, анализ Скэтчарда и/или анализы связывания в условиях конкуренции (анализы конкурентного связывания), такие как радиоиммуноанализы (РИА), ферментные иммуноанализы (ФИА) и "сэндвич"-анализы в условиях конкуренции и их различные варианты, хорошо известные в данной области.

Аминокислотные остатки обозначают согласно стандартному трехбуквенному или однобуквенному коду аминокислот, что хорошо известно и является общепризнанным в данной области. При сравнении двух аминокислотных последовательностей понятие "различие в аминокислотах" относится к инсерциям, делециям или заменам указанного количества аминокислотных остатков в определенном положении референс-последовательности по сравнению со второй последовательностью. В случае замены(ы) указанные(ая) замены(а) предпочтительно должны(а) представлять собой консервативные(ую) аминокислотные(ую) замены(у), это означает, что аминокислотный остаток заменяют на другой аминокислотный остаток сходного химического строения, который оказывает незначительное влияние или практически не оказывает влияния на функцию, активность или другие биологические свойства полипептида. Указанные консервативные аминокислотные замены хорошо известны в данной области, например они описаны в WO 98/49185, при этом консервативные аминокислотные замены предпочтительно представляют собой замены, при которых одну из аминокислот из следующих групп (I) - (V) заменяют на другой аминокислотный остаток, входящий в эту же группу: (I) небольшие алифатические неполярные или имеющие невысокую полярность остатки: Ala, Ser, Thr, Pro и Gly; (II) полярные отрицательно заряженные остатки и их (незаряженные) амиды: Asp, Asn, Glu и Gln; (III) полярные положительно заряженные остатки: His, Arg и Lys; (IV) крупные алифатические неполярные остатки: Met, Leu, Ile, Val и Cys; и (V) ароматические остатки: Phe, Tyr и Trp. Наиболее предпочтительными являются следующие аминокислотные замены: Ala на Gly или на Ser; Arg на Lys; Asn на Gln или на His; Asp на Glu; Cys на Ser; Gln на Asn; Glu на Asp; Gly на Ala или на Pro; His на Asn или на Gln; Ile на Leu или на Val; Leu на Ile или на Val; Lys на Arg,

на Gln или на Glu; Met на Leu, на Tyr или на Ile; Phe на Met, на Leu или на Tyr; Ser на Thr; Thr на Ser; Trp на Tyr; Tyr на Trp или на Phe; Val на Ile или на Leu.

Молекула полипептида или нуклеиновой кислоты рассматривается как "практически выделенная" (находится в "практически выделенной" форме), например, из ее нативного биологического источника и/или реакционной среды или среды для культивирования, из которой ее получают, когда она отделена по меньшей мере от одного компонента, с которым она обычно ассоциирована в указанном источнике или указанной среде, такой как другой белок /полипептид, другая нуклеиновая кислота, другой биологический компонент или макромолекула или по меньшей мере один загрязнитель, примесь или минорный компонент. В частности, молекула полипептида или нуклеиновой кислоты рассматривается как "практически выделенная", когда степень ее чистоты повышена по меньшей мере в 2 раза, в частности по меньшей мере в 10 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 100 раз и вплоть до 1000 раз или более. Молекула полипептида или нуклеиновой кислоты, которая находится в "практически выделенной форме", предпочтительно является практически гомогенной, что определяют с помощью приемлемого метода, такого как приемлемый хроматографический анализ, электрофорез в полиакриламидном геле.

"Идентичность последовательностей" последовательностей двух VEGF-связывающих молекул или последовательностей двух Ang2-связывающих молекул означает процент аминокислот, идентичных для последовательностей. Его можно рассчитывать или определять согласно методу, изложенному в разделе f) на с. 49 и с. 50 WO 2008/020079. "Сходство последовательностей" означает процент аминокислот, которые либо идентичны, либо представляют собой консервативные аминокислотные замены.

В данной области известны альтернативные методы нумерации аминокислотных остатков VH-доменов, указанные методы аналогичным образом можно применять для нумерации VHH-доменов. Однако в настоящем описании, формуле изобретения и на чертежах, если не указано иное, используют нomenclature Кэбота для нумерации VHH-доменов, которая описана выше.

VEGF-связывающая молекула или Ang2-связывающая молекула "с созревшей аффинностью", в частности, VHH или доменное антитело, несет одно или несколько изменений в одном или нескольких CDR, что приводит к улучшенной аффинности к VEGF или Ang2 по сравнению с соответствующей родительской VEGF-связывающей молекулой или VEGF-связывающей молекулой. VEGF-связывающие молекулы или Ang2-связывающие молекулы с созревшей аффинностью можно получать методами, описанными в данной области, например, описанными у Marks и др., *Biotechnology* 10, 1992, сс. 779-783 или у Barbas и др., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91, 1994, сс. 3809-3813.; Shier и др., *Gene* 169, 1995, сс. 147-155; Yelton и др., *Immunol.* 155, 1995, сс. 1994-2004; Jackson и др., *J. Immunol.* 154(7), 1995, сс. 3310-3319 и у Hawkins и др., *J. Mol. Biol.* 226(3), 1992, сс. 889-896; у K.S. Johnson и R.E. Hawkins в: "Affinity maturation of antibodies using phage display", изд-во Oxford University Press, 1996. В контексте настоящего изобретения "аминокислотные последовательности SEQ ID NO: x" включают, если не указано иное, аминокислотную последовательность, которая на 100% идентична последовательности, представленной в соответствующей SEQ ID NO: x;

а) аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80% идентичны последовательности, представленной в соответствующей SEQ ID NO: x;

б) аминокислотные последовательности, которые имеют 3, 2 или 1 различие в аминокислотах относительно последовательности, представленной в соответствующей SEQ ID NO: x.

Понятие "рак" и "злокачественный" относится или описывает физиологическое состояние у млекопитающих, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым ростом/пролиферацией клеток. Примерами рака, который можно лечить с помощью биспецифической связывающей молекулы является (но, не ограничиваясь только ими) карцинома, лимфома, бластома, саркома и лейкоз. Более конкретными примерами указанных видов рака, которые предложено лечить с помощью антагонистов VEGF согласно US 2008/0014196, являются плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарцинома легкого, плоскоклеточная карцинома легкого, рак брюшины, печеночноклеточный рак, рак желудочно-желудочной системы, рак поджелудочной железы, глиобластома, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатома, рак молочной железы, рак ободочной кишки, колоректальный рак, саркома эндометрия или матки, карцинома слюнных желез, рак почки, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карцинома печени, рак желудка, меланома и различные виды рака головы и шеи. Нарушение регуляции ангиогенеза может приводить ко многим нарушениям, которые можно лечить с помощью фармацевтических композиций и способов. Эти нарушения включают как ненеопластические, так и неопластические состояния. Неопластические заболевания включают (но, не ограничиваясь только ими) описанные выше заболевания.

Ненеопластические нарушения включают (но, не ограничиваясь только ими) нарушения, которые в US 2008/0014196 предложено лечить с помощью антагонистов VEGF, а именно, нежелательную или aberrantную гипертрофию, артрит, ревматоидный артрит (РА), псориаз, псориазные бляшки, саркоидоз, атеросклероз, атеросклеротические бляшки, диабетические и другие пролиферативные ретинопатии, включая ретинопатию недоношенных, ретролентальную фиброплазию, неоваскулярную глаукому, возрастную дегенерацию желтого пятна, диабетический макулярный отек, неоваскуляризацию роговицы, неоваскуляризацию трансплантата роговицы, отторжение трансплантата роговицы, ретиальную/хориоид-

дальнюю неоваскуляризацию, неоваскуляризацию угла глаза (покраснение), глазное связанное с неоваскуляризацией заболевание, васкулярный рестеноз, артериовенозные пороки развития (AVM), менингиому, гемангиому, ангиофибром, гиперплазии щитовидной железы (включая болезнь Грейвса), трансплантацию роговицы и другой ткани, хроническое воспаление, воспаление легких, острое легочное повреждение/РДСВ (респираторный дистресс-синдром взрослых), сепсис, первичную легочную гипертензию, злокачественные пульмональные выпоты, отек головного мозга (например, ассоциированный с острым "ударом"/закрытым повреждением головы/травмой), синовиальное воспаление, формирование паннуса при РА, оссифицирующий миозит, гипертрофическое образование костной ткани, остеоартрит (ОА), рефрактерные асциты, поликистозное заболевание яичника, эндометриоз, болезни, связанные с накоплением жидкости в "третьем" пространстве организма (панкреатит, компартмент-синдром, ожоги, болезнь кишечника), фиброиды матки, преждевременные роды, хроническое воспаление, такое как IBD (болезнь Крона и неспецифический язвенный колит), отторжение почечного аллотрансплантата, воспалительное заболевание кишечника, нефротический синдром, нежелательный или aberrантный рост тканевой массы (неракового происхождения), суставы при гемофилических артропатиях, гипертрофические рубцы, прекращение роста волос, синдром Ослера-Вебера, гнойную грануломатозную ретролентальную фиброплазию, склеродерму, трахому, васкулярные адгезии, синовиит, дерматит, презклампсию, асциты, перикардиальный выпот (например, ассоциированный с перикардитом) и плевральный выпот.

Подробное описание изобретения

Первым объектом настоящего изобретения является биспецифическая связывающая молекула, содержащая Ang2-связывающий компонент и VEGF-связывающий компонент.

Биспецифическая связывающая молекула может содержать по меньшей мере один VEGF-связывающий компонент и по меньшей мере один Ang2-связывающий компонент, который дополнительно содержит по меньшей мере еще один связывающий компонент, а также, возможно, компонент, связывающий сывороточный альбумин (молекула, связывающая сывороточный альбумин).

Компонент связывающей молекулы, который связывает сывороточный альбумин, может представлять собой выделенный иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен или полипептид, содержащий один или несколько иммуноглобулиновых единичных вариабельных доменов, где указанный иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен состоит из четырех каркасных участков и трех гипервариабельных участков CDR1, CDR2 и CDR3 соответственно и где указанный CDR3 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 257, 260, 263, 266, 269, 272 или 275.

Кроме того, один или несколько иммуноглобулиновый(ых) единичный(ых) вариабельный(их) домен(ов) компонента, связывающего сывороточный альбумин, могут(ет) содержать:

- а) CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из первой группы аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 257, 260, 263, 266, 269, 272 или 275;
- б) CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из второй группы аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 255, 258, 261, 264, 267, 270 или 273;
- в) CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из второй группы аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 256, 259, 262, 265, 268, 271 или 274.

А также указанный(ые) один или несколько иммуноглобулиновый(ых) единичный(ых) вариабельный(их) домен(ов) компонента, связывающего сывороточный альбумин, могут представлять собой VHH, которые предпочтительно имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98 или 254.

Указанный Ang2-связывающий компонент и указанный

VEGF-связывающий компонент могут содержать по меньшей мере один Ang2-связывающий иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен и по меньшей мере один VEGF-связывающий иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен соответственно.

Кроме того, указанный Ang2-связывающий компонент и указанный VEGF-связывающий компонент, содержащие по меньшей мере один Ang2-связывающий иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен и по меньшей мере один VEGF-связывающий иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен соответственно, при этом, каждый из иммуноглобулиновых единичных вариабельных доменов могут содержать четыре каркасных участка и три гипервариабельных участка CDR1, CDR2 и CDR3 соответственно.

Так, анти- Ang2 и/или анти-VEGF-компонент, входящий в биспецифические связывающие молекулы может включать два (или большее количество) анти-Ang2 (или анти-VEGF соответственно) иммуноглобулиновых единичных вариабельных доменов, где мишенью иммуноглобулиновых единичных вариабельных доменов являются различные эпитопы в Ang2 (или VEGF). Таким образом, два иммуноглобулиновых единичных вариабельных домена в биспецифической связывающей молекуле должны иметь различную антигенную специфичность и, следовательно, различные CDR-последовательности.

Указанные двухвалентные связывающие молекулы называют также "бипаратопными конструкциями однодоменных антител (если иммуноглобулиновые единичные вариабельные домены состоят или практически состоят из однодоменных антител) или "бипаратопными VHH-конструкциями" (если имму-

ноглобулиновые единичные переменные домены состоят или практически состоят из VHH) соответственно, поскольку два иммуноглобулиновых единичных переменных домена должны включать два различных паратопа.

В биспецифической связывающей молекуле одна или обе связывающие молекулы могут быть двухвалентными; например, VEGF-связывающий компонент может быть бипаратопным и Ang2-связывающий компонент может представлять собой один иммуноглобулиновый единичный переменный домен или VEGF-связывающий компонент может представлять собой один иммуноглобулиновый единичный переменный домен и Ang2-связывающий компонент может быть бипаратопным.

В биспецифических связывающих молекулах предпочтительно VEGF-связывающий компонент может содержать двухвалентный VEGF-связывающий иммуноглобулиновый единичный переменный домен, например, бипаратопный VHH.

Указанный VEGF-связывающий иммуноглобулиновый единичный переменный домен может содержать два или большее количество VEGF-связывающих VHH, которые представляют собой:

а) идентичные VHH, которые обладают способностью блокировать взаимодействие человеческого рекомбинантного VEGF с человеческим рекомбинантным VEGFR-2 с уровнем ингибирования >60%, или

б) различные VHH, которые связываются с неперекрывающимися эпитопами VEGF, где по меньшей мере один VHH обладает способностью блокировать взаимодействие человеческого рекомбинантного VEGF с человеческим рекомбинантным VEGFR-2 с уровнем ингибирования >60%, и где по меньшей мере один VHH может блокировать указанное взаимодействие с уровнем ингибирования < 60%.

VEGF-связывающий компонент содержит по меньшей мере переменный домен с четырьмя кармашками участками и тремя гиперпеременными участками CDR1, CDR2 и CDR3 соответственно, где указанный CDR3 имеет аминокислотную последовательность Ser Arg Ala Tyr Xaa Ser Xaa Arg Leu Arg Leu Xaa Xaa Thr Tyr Xaa Tyr, представленную в SEQ ID NO: 1, в которой

Xaa в положении 5 обозначает Gly или Ala;

Xaa в положении 7 обозначает Ser или Gly;

Xaa в положении 12 обозначает Gly, Ala или Pro;

Xaa в положении 13 обозначает Asp или Gly;

Xaa в положении 16 обозначает Asp или Glu; и

при этом, указанный VEGF-связывающая молекула обладает способностью блокировать взаимодействие человеческого рекомбинантного VEGF165 с человеческим рекомбинантным VEGFR-2 с уровнем ингибирования $\geq 60\%$.

Кроме того, Xaa в положении 5 может обозначать Gly, Xaa в положении 7 может обозначать Ser, Xaa в положении 12 может обозначать Ala и Xaa в положении 13 может обозначать Asp.

В частности, указанный CDR3 имеет последовательность, выбранную из

SEQ ID NO: 2 SRAYGSSRLRLGDTYDY,

SEQ ID NO: 3 SRAYGSSRLRLADTYDY;

SEQ ID NO: 4 SRAYGSSRLRLADTYEY;

SEQ ID NO: 5 SRAYGSGRLRLADTYDY;

SEQ ID NO: 6 SRAYASSRLRLADTYDY;

SEQ ID NO: 7 SRAYGSSRLRLPDTYDY;

SEQ ID NO: 8 SRAYGSSRLRLPGTYDY.

А также VEGF-связывающая молекула может содержать один или несколько иммуноглобулиновых единичных переменных доменов, каждый из которых содержит

а) CDR3, аминокислотная последовательность которого выбрана из первой группы последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2-8;

б) CDR1 и CDR2, аминокислотные последовательности которых входят, как показано в таблице 3, в число последовательностей, выбранных из второй группы аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 9-46, при указанная вторая последовательность содержит соответствующий CDR3, выбранный из указанных в подпункте а).

Имуноглобулиновые единичные переменные домены могут представлять собой VHH.

А именно, VHH могут иметь аминокислотные последовательности, выбранные из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 9-46.

А также, VHH могут иметь аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 25.

VEGF-связывающий компонент можно получать в результате созревания аффинности и/или оптимизации последовательности вышеуказанного VHH, например, к VHH, полученному в результате оптимизации последовательности VHH, аминокислотная последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 18. Примерами являются VHH, которые имеют аминокислотные последовательности, выбранные из последовательностей, представленных в SEQ IDNO: 47-57.

VEGF-связывающий компонент можно форматировать различными методами, например, он может

быть бипаратопным или может содержать два идентичных иммуноглобулиновых единичных переменных домена. Указанные VEGF-связывающие компоненты могут содержать два или большее количество VHH, которые представляют собой:

- а) идентичные VHH, которые обладают способностью блокировать взаимодействие человеческого рекомбинантного VEGF с человеческим рекомбинантным VEGFR-2 с уровнем ингибирования $\geq 60\%$, или
- б) различные VHH, которые связываются с неперекрывающимися эпитопами VEGF, где по меньшей мере один VHH обладает способностью блокировать взаимодействие человеческого рекомбинантного VEGF с человеческим рекомбинантным VEGFR-2 с уровнем ингибирования $\geq 60\%$, и где связывание по меньшей мере одного VHH может блокировать указанное взаимодействие с уровнем ингибирования $\leq 60\%$.

Процент блокирования указанного взаимодействия с уровнем ингибирования $\geq 60\%$ или $\leq 60\%$ соответственно можно отнести к уровню ингибирования, определенному с помощью гомогенного анализа усиленного за счет эффекта близости люминисценции (AlphaScreen®), конкурентного ELISA, анализа на основе резонанса плазмона (SPR) (Biacore®), которые применяли в примерах.

Ниже в настоящем описании активность VHH согласно подпункту а), обозначают также как "блокирующая рецептор" активность, а активность VHH согласно подпункту б) обозначают также как "неблокирующая рецептор" активность.

Для блокирующих рецептор VHH может быть предпочтителен уровень ингибирования $> 80\%$, более предпочтительно $> 90\%$; наиболее предпочтительные VHH являются полными блокаторами рецептора, т.е. для них характерен уровень ингибирования, равный 100% .

VEGF-связывающий компонент может содержать два или большее количество идентичных VHH, указанных в подпункте а), выбранных из VHH, аминокислотные последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 9-46, или VHH, полученных в результате созревания аффинности и/или оптимизации последовательностей указанных VHH. VHH можно выбирать из VHH, аминокислотные последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 47-57.

Форматированный VEGF-связывающий компонент может содержать два VHH, каждый из которых имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57.

В форматированных VEGF-связывающих компонентах, которые содержат два различных VHH,

а) указанный(ые) один или несколько VHH, для которых характерен уровень ингибирования $\geq 60\%$, можно выбрать из:

I. VHH, которые имеют аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 9-46, или

II. VHH, которые получены в результате созревания аффинности и/или оптимизации последовательности указанных VHH, и где

б) указанный(ые) один или несколько VHH, для которых характерен уровень ингибирования $\leq 60\%$, выбирают из

I. SEQ ID NO: 58-124 или

II. VHH, которые получены в результате созревания аффинности и/или оптимизации последовательностей указанных VHH.

Два VHH, которые могут входить в полипептиды, аминокислотные последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 128-168, также могут быть разделены линкерными последовательностями, указанными в табл. 15.

В VEGF-связывающем компоненте VHH, указанный в подпункте а) I, может иметь аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, и VHH, указанный в подпункте б) I, может иметь аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64.

В других VEGF-связывающих компонентах VHH, указанные в подпункте а) II, могут быть выбраны из VHH, которые имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47-57, и VHH, указанные в подпункте б) II, могут быть выбраны из VHH, которые имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 125-127.

Наиболее предпочтительным является бипаратопный VEGF-связывающий компонент, который содержит два VHH, один из которых имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57, и один из которых имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 127.

Ang2-связывающий компонент может содержать по меньшей мере переменный домен с четырьмя каркасными участками и тремя гиперпеременными участками CDR1, CDR2 и CDR3 соответственно, и где указанный CDR3 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, которые представлены в SEQ ID NO: 226, 229, 232, 235, 238, 241, 244, 247, 250 или 253.

Указанный Ang2-связывающий компонент может представлять собой выделенный иммуноглобулиновый единичный переменный домен или полипептид, содержащий один или несколько иммуноглобулиновых единичных переменных доменов, где указанный иммуноглобулиновый единичный вари-

белый домен может содержать четыре каркасных участка и три гипервариабельных участка CDR1, CDR2 и CDR3 соответственно, и где CDR3 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, которые представлены в SEQ ID NO: 226, 229, 232, 235, 238, 241, 244, 247, 250 или 253.

Кроме того, указанный иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен Ang2-связывающего компонента может содержать

а) CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из первой группы аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 226, 229, 232, 235, 238, 241, 244, 247, 250 или 253 (см. также таблицу 49);

б) CDR1, имеющий аминокислотные последовательности, которые входят, как показано в таблице 36-А, 38-А, 41-А или 45-А, в качестве частичной последовательности в последовательность, выбранную из второй группы аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 224, 227, 230, 233, 236, 239, 242, 245, 248 или 251 (см. также таблицу 49);

в) CDR2, имеющий аминокислотные последовательности, которые входят, как показано в табл. 36-А, 38-А, 41-А или 45-А в качестве частичной последовательности в последовательность, выбранную из второй группы аминокислотных последовательностей, которые представлены в SEQ ID NO: 225, 228, 231, 234, 237, 240, 243, 246, 249 или 252 (см. также таблицу 49).

Иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен Ang2-связывающего компонента может представлять собой VHH, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, которые представлены в SEQ ID NO: 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222 или 223.

А так же иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен Ang2-связывающего компонента можно получить путем созревания аффинности или гуманизации иммуноглобулинового единичного вариабельного домена.

А также VHH можно получить путем созревания аффинности или гуманизации VHH Ang2-связывающего компонента.

Аминокислотная последовательность Ang2-связывающего VHH может быть выбрана из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222 или 223.

Приемлемыми для осуществления процедуры созревания аффинности родительскими Ang2-связывающими молекулами являются, например, описанные выше VHH, аминокислотные последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 214, 215, 216, 217, 218 или 219.

Таким образом, описаны Ang2-связывающие молекулы, полученные путем созревания аффинности и/или оптимизации последовательности вышеуказанного VHH, например, к VHH, который был получен путем оптимизации последовательности VHH, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 217, 218, 219, 220, 221, 222 или 223. Аминокислотные последовательности, которые представляли собой "источник", применяемый для создания последних VHH, представлены в SEQ ID NO: 214, 215 или 261. Кроме того, эти аминокислотные последовательности могут быть пригодны в качестве Ang2-связывающих компонентов, которые можно применять в связывающих молекулах.

Как указано в настоящем описании, связывающая молекула может содержать по меньшей мере один компонент, связывающий сывороточный альбумин. Так, в частности, предпочтительные связывающие молекулы могут иметь по меньшей мере один VEGF-связывающий компонент, по меньшей мере один Ang2-связывающий компонент и по меньшей мере один компонент, связывающий сывороточный альбумин. Порядок указанных трех связывающих компонентов может представлять собой любой возможный порядок, например, порядок, представленный в таблице 36-Б, 38-Б, 40, 41-Б, 42, 43, 45-Б, 46-А или 47-А или на фиг. 20, 23, 27 или 30, например, VEGF -, Ang2- или связывающий сывороточный альбумин компонент может находиться на N-конце или на C-конце. В частности, "1D01" (SEQ ID NO: 214), "11B07", "00027" (SEQ ID NO: 216), "00908", "7G08" (SEQ ID NO: 215), "00919", "00921" (SEQ ID NO: 220), "00928" (SEQ ID NO: 221), "00932", "00933", "00934", "00935", "00936", "00937", "00938" (SEQ ID NO: 222) или "00956" (SEQ ID NO: 223) в таблицах и в описании к чертежам обозначают Ang2-связывающие компоненты, а "00038" обозначает VEGF-связывающий компонент и "ALB11" обозначает компонент, связывающий сывороточный альбумин. Ни один из них не ограничен конкретной последовательностью, а обозначает Ang2-, VEGF - и связывающий сывороточный альбумин компонент в целом, при применении в контексте возможных конструкций связывающих молекул.

Однако предпочтительно, чтобы компонент, связывающий сывороточный альбумин, находился между VEGF - и Ang2-связывающим компонентом (или наоборот), при этом наиболее предпочтительно, чтобы по меньшей мере один VEGF-связывающий компонент находился на N-конце, за ним следовал по меньшей мере один компонент, связывающий сывороточный альбумин, а затем по меньшей мере один Ang2-связывающий компонент, расположенный на C-конце. Установлено, что такой порядок является наиболее предпочтительным.

Таким образом, связывающие молекулы, которые содержат по меньшей мере один VEGF-связывающий компонент, по меньшей мере один Ang2-связывающий компонент и по меньшей мере один

компонент, связывающий сывороточный альбумин, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 180-213, могут быть наиболее предпочтительными.

Понятие "по меньшей мере один" связывающий (VEGF, Ang2 или сывороточный альбумин) компонент при применении в контексте настоящего описания указывает на то, что связывающая молекула может содержать один, два, три, четыре или пять связывающих VEGF, Ang2 и/или сывороточный альбумин компонентов (т.е. субстанций/единиц), которые предпочтительно представляют собой иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен, указанный в настоящем описании.

VEGF- и/или Ang2-связывающие компоненты с улучшенными с позиций терапевтического применения свойствами, например, обладающие повышенной аффинностью или пониженной иммуногенностью, можно получать из индивидуальных VEGF -или Ang2-связывающих компонентов с помощью методик, известных в данной области техники, таких как созревание аффинности (например, используя в качестве исходных синтетические, произвольные или встречающиеся в естественных условиях последовательности иммуноглобулинов), CDR-трансплантация, гуманизация, объединение фрагментов, полученных из различных последовательностей иммуноглобулинов, ПЦР-сборка с использованием перекрывающихся праймеров и аналогичные методики, предназначенные для конструирования последовательностей иммуноглобулинов, которые хорошо известны специалисту в данной области техники; или любой приемлемой комбинации любых вышеизложенных методов, обозначенных также как "оптимизация последовательностей". В качестве ссылки можно указать, например, стандартные руководства, а также можно использовать приведенное ниже описание и сведения, представленные в примерах.

При необходимости VEGF- или Ang2- связывающий компонент, с повышенной аффинностью получают путем созревания другого VEGF- или Ang2-связывающего компонента, последний представляет собой "родительский" VEGF- или Ang2-связывающий компонент относительно молекулы с созревшей аффинностью.

В анти-VEGF или анти-Ang2 VHH, начинающихся с EVQ, N-концевой остаток E можно заменять на D (что часто приводит к оптимизации последовательности) или он может отсутствовать (для экспрессии VHH в E.coli). Для форматированных VEGF-связывающих молекул, это применяют, как правило, только для VHH, расположенных на N-конце.

Предпочтительная (но, не ограничиваясь только ею) применяемая с целью гуманизации замена в VHH-доменах, принадлежащих к 103 P,R,S-группе и/или GLEW-группе (что описано ниже), представляет собой замену 108Q на 108L. Методы гуманизации иммуноглобулиновых единичных вариабельных доменов известны в данной области.

А также иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен может представлять собой доменное антитело, представленное в настоящем описании.

Кроме того, репрезентативные представители класса VEGF- и/или Ang2-связывающих иммуноглобулиновых единичных вариабельных доменов имеют аминокислотные последовательности, которые соответствуют аминокислотной последовательности встречающегося в естественных условиях VH-домена, который был "камелизирован", т.е. изменен путем замены одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности, встречающейся в естественных условиях вариабельной области тяжелой цепи канонического состоящего из 4 цепей антитела на один или несколько аминокислотных остатков, которые находятся в соответствующем(их) положении(ях) в VHH-доме состоящего из тяжелой цепи антитела. Это можно осуществлять хорошо известным методом, который очевиден специалисту в данной области, и дополнительную информацию о котором можно почерпнуть из WO 1994/04678. Указанная "камелизация" может затрагивать главным образом аминокислотные положения, которые находятся в области контакта VH-VL, и так называемые остатки-маркеры верблюдовых (см., например, также WO 1994/04678). Подробное описание указанных методов "гуманизации" и "камелизации" и предпочтительные последовательности каркасных участков, которые пригодны для осуществления этих методов, можно дополнительно почерпнуть из сведений, представленных на с. 46 и с. 98 WO 2006/040153 и с. 107 WO 2006/122786.

VEGF-связывающие компоненты, например, иммуноглобулиновые единичные вариабельные домены, обладают специфичностью в отношении VEGF, поскольку они содержат один или несколько иммуноглобулиновых единичных вариабельных доменов, специфически связывающихся с одним или несколькими эпитопами молекулы VEGF. Вышесказанное относится и к Ang2-связывающим компонентам.

Специфическое связывание VEGF-связывающего компонента с антигеном VEGF можно определять с помощью любого приемлемого хорошо известного метода, включая, например, такие как анализ Скэтчарда и/или анализы связывания в условиях конкуренции, такие как радиоиммуноанализы (РИА), ферментные иммуноанализы (ФИА и ELISA) и конкурентные "сэндвич"-анализы и их различные варианты, хорошо известные в данной области. Это же относится к определению связывания Ang2-связывающего компонента с его антигеном.

Касательно антигена VEGF VEGF-связывающий компонент, например, иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен, не ограничен происхождением из какого-либо конкретного вида. Так, иммуноглобулиновые единичные вариабельные домены, предпочтительно связываются с человеческим

VEGF, если они предназначены для лечения человека. Однако иммуноглобулиновые единичные переменные домены могут связываться с VEGF из других видов млекопитающих. Иммуноглобулиновый единичный переменный домен, который связывается с VEGF из одного из видов, может обладать перекрестной реактивностью с VEGF, который имеет последовательность, отличную от человеческой, из одного или нескольких других видов. Например, иммуноглобулиновые единичные переменные домены, которые связываются с человеческим VEGF, могут обладать перекрестной реактивностью с VEGF из одного или нескольких других видов приматов и/или VEGF из одного или нескольких видов животных, которых применяют в качестве животных, на которых моделируют заболевание, например, обезьян, мышей, крыс, кроликов, свиней, собак, и, в частности из животных, на которых моделируют заболевания и нарушения, ассоциированные с опосредуемыми VEGF действиями на ангиогенез (например, в качестве видов и животных моделей, упомянутых в настоящем описании). Иммуноглобулиновые единичные переменные домены, которые обладают указанной перекрестной реактивностью, являются важными для исследовательских целей и/или для разработки лекарственных средств, поскольку позволяют тестировать иммуноглобулиновые единичные переменные домены, на признанных моделях заболеваний, созданных на таких животных как обезьяны, в частности обезьяны циномогус или макак резус, или мыши и крысы.

В свете перекрестной реактивности с одной или несколькими молекулами VEGF из видов, отличных от человека, которая(ые) предназначена(ны) для применения на животной модели при разработке терапевтического антагониста VEGF, является предпочтительным, когда VEGF-связывающий компонент распознает эпитоп в той области представляющего интерес VEGF, которая обладает высокой степенью идентичности с человеческим VEGF.

Иммуноглобулиновый единичный переменный домен распознает эпитоп, который полностью или частично локализован в области VEGF, которая пригодна для связывания с его рецептором, в частности с VEGFR-2, который, как установлено, является рецептором, активация которого обуславливает неоваскуляризацию опухолей. Иммуноглобулиновые единичные переменные домены блокируют активацию VEGF-рецептора, в частности активацию VEGFR-2, по меньшей мере частично, предпочтительно в значительной степени и наиболее предпочтительно полностью.

Как указано выше, способность VEGF-связывающего компонента блокировать взаимодействие между VEGF и его рецепторами, в частности, VEGFR-2, можно определять с помощью гомогенного анализа усиленной за счет эффекта близости люминисценции (AlphaScreen®), конкурентного ELISA или анализа на основе резонанса плазмона (SPR) (Biacore®), которые описаны в примерах.

Предпочтительно связывание иммуноглобулинового единичного переменного домена с VEGF характеризуется величиной аффинности, составляющей менее 500нМ, предпочтительно менее 200нМ, более предпочтительно менее 10нМ, например, менее 500пМ (что определяют с помощью анализа на основе резонанса поверхностного плазмона, описанного в примере 5.7). Вышесказанное относится и к связыванию иммуноглобулинового единичного переменного домена с ангиопоэтином.

Предпочтительно для иммуноглобулиновых единичных переменных доменов характерны величины IC_{50} , измеренные с помощью конкурентного ELISA, который описан в примере 5.1, составляющие от 10^{-6} до 10^{-10} молей/л или менее, более предпочтительно от 10^{-8} до 10^{-10} молей/л или менее и еще более предпочтительно от 10^{-9} до 10^{-10} молей/л или менее.

Связывание с VEGF VEGF-связывающих иммуноглобулиновых единичных переменных доменов, характеризуется величиной константы диссоциации (K_D), составляющей от 10^{-5} до 10^{-12} молей/л (М) или менее и предпочтительно от 10^{-7} до 10^{-12} молей/л (М) или менее и более предпочтительно от 10^{-8} до 10^{-12} молей/л (М), и/или величиной константы ассоциации (K_A), составляющей по меньшей мере $10^7 M^{-1}$, предпочтительно по меньшей мере $10^8 M^{-1}$, более предпочтительно по меньшей мере $10^9 M^{-1}$, например, по меньшей мере $10^{12} M^{-1}$; и в частности, величиной K_D , составляющей менее 500нМ, предпочтительно менее 200нМ, более предпочтительно менее 10нМ, например, менее 500пМ. Таким образом, можно определять величины K_D и K_A иммуноглобулинового единичного переменного домена, характеризующие связывание с VEGF. Указанное относится и к связывающему Ang2 иммуноглобулиновому единичному переменному домену.

Бипаратонные VEGF-связывающие компоненты, которые содержат два или большее количество иммуноглобулиновых единичных переменных доменов, практически состоят из или содержат (I) первый иммуноглобулиновый единичный переменный домен, специфически связывающийся с первым эпитопом VEGF, и (II) второй иммуноглобулиновый единичный переменный домен, специфически связывающийся со вторым эпитопом VEGF, где первый эпитоп VEGF и второй эпитоп VEGF не являются идентичными эпитопами. Другими словами, указанный полипептид, содержит или практически состоит из двух или большего количества иммуноглобулиновых единичных переменных доменов, мишенью которых являются по меньшей мере два неперекрывающихся эпитопа, присутствующих в VEGF, при этом указанные иммуноглобулиновые единичные переменные домены связаны друг с другом таким образом, чтобы они могли одновременно связываться с VEGF. В этом плане полипептид можно рассматривать как "двухвалентную" или "многовалентную" иммуноглобулиновую конструкцию и прежде всего

как "многовалентную конструкцию иммуноглобулинового единичного переменного домена", если полипептид содержит по меньшей мере два сайта связывания с VEGF. (Указанные конструкции обозначают также как "форматированные" VEGF-связывающие молекулы, например, "форматированные" VHH). С соответствующими изменениями указанное относится также к бипаратопным Ang2-связывающим компонентам.

Указанный VEGF- или Ang2-связывающий компонент, включает (по меньшей мере) два анти-VEGF или анти-Ang2 иммуноглобулиновых единичных переменных домена, при этом мишенью (указанных) двух иммуноглобулиновых единичных переменных доменов предпочтительно являются неперекрывающиеся эпитопы молекулы VEGF или молекулы ангиопоэтина соответственно. Таким образом, эти два иммуноглобулиновых единичных переменных домена должны обладать специфичностью в отношении различных антигенов и поэтому содержать различные CDR-последовательности. По этой причине указанные полипептиды, в контексте настоящего описания можно обозначать также как "бипаратопные полипептиды" или "бипаратопные конструкции доменных антител" (если иммуноглобулиновые единичные переменные домены состоят или практически состоят из доменных антител), или "бипаратопные VHH-конструкции" (если иммуноглобулиновые единичные переменные домены состоят или практически состоят из VHH) соответственно, поскольку два иммуноглобулиновых единичных переменных домена должны включать два различных паратопа.

Если полипептид, представляет собой бипаратопную молекулу, указанную в настоящем описании, то по меньшей мере один из компонентов иммуноглобулинового единичного переменного домена связывается с эпитопом таким образом, что взаимодействие между рекомбинантным человеческим VEGF и рекомбинантным человеческим VEGFR-2 блокируется, что характеризуется уровнем ингибирования $\geq 80\%$. Как продемонстрировано в экспериментах, описанных в заявке, определенные форматированные молекулы содержат два VHH, которые оба блокируют рецептор VEGFR2, что характеризуется уровнем ингибирования $\geq 80\%$. Определенные VHH, блокируют VEGFR-2 с уровнем ингибирования 100%, т.е. они являются полными блокаторами.

В обоих случаях дополнительные последовательности и фрагменты могут присутствовать в VEGF-связывающих молекулах, например, на N-конце, C-конце или они могут быть локализованы между двумя иммуноглобулиновыми единичными переменными доменами, например, линкерные последовательности и последовательности, обеспечивающие эффекторные функции, которые более детально описаны ниже.

Согласно другому, VEGF-связывающий компонент может включать более двух анти-VEGF иммуноглобулиновых единичных переменных доменов, т.е. три, четыре или даже еще большее количество анти-VEGF VHH. В этом случае по меньшей мере два из анти-VEGF иммуноглобулиновых единичных переменных доменов направлены против неперекрывающихся эпитопов внутри молекулы VEGF, а любой дополнительный иммуноглобулиновый единичный переменный домен может связываться с любым из двух неперекрывающихся эпитопов и/или дополнительным эпитопом, который присутствует в молекуле VEGF.

Два или большее количество иммуноглобулиновых единичных переменных доменов могут независимо друг от друга представлять собой VHH или доменные антитела и/или любой другой вид иммуноглобулиновых единичных переменных доменов, таких как VL-домены, указанные в настоящем описании, при условии, что эти иммуноглобулиновые единичные переменные домены должны связываться с антигеном, т.е. VEGF или ангиопоэтином соответственно.

Подробное описание связывающих компонентов представлено в основном для VEGF-связывающего компонента. Однако все особенности и характеристики, представленные в настоящем описании для VEGF-связывающего компонента, относятся также (после внесения соответствующих изменений) и к Ang2-связывающему компоненту.

Связывающие молекулы, присутствующие в биспецифических связывающих молекулах (Ang2-связывающие молекулы в Ang2-связывающем компоненте или VEGF-связывающие молекулы в VEGF-связывающем компоненте или два смежных Ang2- и VEGF-связывающих компонента), можно соединять друг с другом непосредственно (т.е. без применения линкера) или через линкер. Линкер предпочтительно представляет собой пептидный линкер и его выбирают так, чтобы он давал связываться двум различным связывающим молекулам с каждым из неперекрывающихся эпитопов на мишенях, которые присутствуют либо в одной и той же молекуле-мишени, либо в двух различных молекулах.

В случае бипаратопных связывающих молекул выбор линкеров для Ang2-или VEGF-связывающего компонента зависит среди прочего от эпитопов и, в частности, расстояния между эпитопами на мишени, с которыми связываются иммуноглобулиновые единичные переменные домены, и очевиден для специалиста в данной области техники на основе настоящего описания, необязательно после проведения ограниченного количества некоторых рутинных экспериментов.

Две связывающие молекулы (два VHH или доменных антитела или VHH и доменное антитело) или два связывающих компонента можно соединять друг с другом через дополнительный VHH или доменное антитело соответственно (в таких связывающих молекулах два или большее количество иммуноглобули-

новых единичных переменных доменов можно соединять непосредственно с дополнительным иммуноглобулиновым единичным переменным доменом или посредством приемлемых линкеров). Указанные дополнительные VHH или доменные антитела могут, например, представлять собой VHH или доменное антитело, которые обеспечивают увеличенное время полужизни. Например, последний VHH или последнее доменное антитело может представлять собой конструкцию, которая обладает способностью связываться с (человеческим) сывороточным белком, таким как (человеческий) сывороточный альбумин или (человеческий) трансферрин.

Альтернативно этому, два или большее количество иммуноглобулиновых единичных переменных доменов, которые связываются с соответствующей мишенью, можно соединять в серии (либо непосредственно, либо с помощью приемлемого линкера) и дополнительный VHH или дополнительное доменное антитело (которые могут обеспечивать увеличенное время полужизни) можно соединять непосредственно или с помощью линкера с одной из этих двух или большего количества вышеуказанных иммуноглобулиновых последовательностей.

Приемлемые линкеры представлены в настоящем описании в сочетании со специфическими полипептидами, и они могут, например, содержать (но, не ограничиваясь только ею) аминокислотную последовательность, при этом аминокислотная последовательность предпочтительно состоит из 9 или большего количества аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере из 17 аминокислот, например, примерно из 20-40 аминокислот. Однако, хотя верхний предел не имеет решающего значения, но его выбирают, исходя из соображений пригодности, например, для биофармацевтического производства таких полипептидов.

Линкерная последовательность может представлять собой встречающуюся в естественных условиях последовательность или не встречающуюся в естественных условиях последовательность. Для применения в терапевтических целях линкер предпочтительно является неиммуногенным для индивидуума, которому вводят биспецифическую связывающую молекулу.

Одной из пригодных групп линкерных последовательностей являются линкеры, выведенные из шарнирной области тяжелой цепи антител, описанные в WO 1996/34103 и WO 1994/04678.

Другими примерами являются полиаланиновые линкерные последовательности, такие как Ala-Ala-Ala.

Другими предпочтительными примерами линкерных последовательностей являются Gly/Ser-линкеры различной длины, такие как (gly_xser_y)_z-линкеры, включая (gly₄ser)₃, (gly₄ser)₄, (gly₄ser), (gly₃ser), gly₃ и (gly₃ser)₂.

Некоторые примеры линкеров представлены в табл. 15 (SEQ ID NO: 128 - 168), например, линкеры GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (35GS; SEQ ID NO: 169);

GGGGSGGGGS (9GS; SEQ ID NO: 170);

GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (40GS; SEQ ID NO: 171).

Если биспецифическую связывающую молекулу модифицируют посредством присоединения полимера, например, полиэтиленгликольного (ПЭГ) (полиэтиленгликоль) фрагмента, то линкерная последовательность предпочтительно включает аминокислотный остаток, такой как цистеин или лизин, позволяющий осуществлять модификацию, например, ПЭГилирование в линкерной области.

Примерами линкеров, пригодных для ПЭГилирования, являются:

GGGGCGGGGS («GS9,C5», SEQ ID NO: 172),

GGGGCGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS («GS25,C5», SEQ ID NO: 173),

GGGSGGGSGGGGCGGGSGGGSGGGSGGG («GS27,C14», SEQ ID NO: 174),

GGGGSGGGSGGGGCGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS («GS35,C15», SEQ ID NO: 175) и

GGGGCGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS («GS35,C5», SEQ ID NO: 176).

Кроме того, линкер может представлять собой также поли(этиленгликольный) фрагмент, что описано, например, в WO 2004/081026.

А так же, иммуноглобулиновые единичные переменные домены могут быть соединены друг с другом через другой фрагмент (необязательно посредством одного или двух линкеров), такой как другой полипептид, который в предпочтительном, может представлять собой дополнительный иммуноглобулиновый единичный переменный домен, описанный выше. Указанный фрагмент может либо являться практически неактивным, либо может обладать биологической активностью, такой как улучшение требуемых свойств полипептида, либо может придавать полипептиду одно или несколько дополнительных требуемых свойств. Например, фрагмент может (но, не ограничиваясь только этим) удлинять время по-

лу жизни белка или полипептида и/или снижать их иммуногенность или улучшать любое другое требуемое свойство.

Биспецифическая связывающая молекула может включать, прежде всего, если она предназначена для применения или ее применяют в качестве терапевтического агента, фрагмент, который удлиняет время полужизни полипептида в сыворотке или другой общей воде организма пациента. Понятие "время полужизни" определяют как время, необходимое для снижения концентрации (модифицированного) полипептида на 50% *in vivo*, например, в результате расщепления полипептида и/или клиренса, и/или секвестирования с помощью естественных механизмов.

Более конкретно, указанный удлиняющий время полужизни фрагмент можно ковалентно связывать или сливать с иммуноглобулиновым единичным переменным доменом, и он может представлять собой (но, не ограничиваясь только ими) Fc-область, остаток альбумина, фрагмент остатка альбумина, альбуминсвязывающий остаток, такой как иммуноглобулиновый единичный переменный домен антитела к альбумину, трансферринсвязывающий остаток, такой как иммуноглобулиновый единичный переменный домен антитела к трансферрину, полиоксикарбонильную молекулу, такую как молекула полиэтиленгликоля, альбуминсвязывающий пептид или производное гидроксиэтилкрахмала (HES).

Биспецифическая связывающая молекула может также содержать фрагмент, который связывается с антигеном, присутствующим в крови, таким как сывороточный альбумин, сывороточные иммуноглобулины, тироксинсвязывающий белок, фибриноген или трансферрин, что удлиняет время полужизни *in vivo* образовавшегося полипептида. Указанный фрагмент может представлять собой альбуминсвязывающий иммуноглобулин и наиболее предпочтительно альбуминсвязывающий иммуноглобулиновый единичный переменный домен, такой как альбуминсвязывающий VHH-домен.

Указанный альбуминсвязывающий иммуноглобулиновый единичный переменный домен, если он предназначен для применения на людях, предпочтительно связывается с человеческим сывороточным альбумином и предпочтительно представляет собой гуманизированный альбуминсвязывающий VHH-домен.

Иммуноглобулиновые единичные переменные домены, которые связываются с человеческим сывороточным альбумином, известны в данной области и описаны более подробно, например, в WO 2006/122786. В частности, пригодный для связывания с VHH альбумин представляет собой ALB 1 и его гуманизированную копию ALB 8 (WO 2009/095489). Однако можно также с успехом применять другие альбуминсвязывающие VHH-домены, упомянутые в вышеуказанной патентной публикации.

Наиболее приемлемым альбуминсвязывающим VHH-доменом является ALB8, который состоит из или содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98 или 254.

Два иммуноглобулиновых единичных переменных домена, предпочтительно VHH, можно сливать с молекулой сывороточного альбумина, как это описано, например, в WO 2001/79271 и WO 2003/59934. Например, согласно подходу, изложенному в WO 2001/79271, слитый белок можно получать с помощью общепринятой методики рекомбинации: молекулу ДНК, кодирующую сывороточный альбумин, или ее фрагмент связывают с ДНК, кодирующей биспецифическую связывающую молекулу, полученную конструкцией встраивают в плазмиду, которую можно применять для экспрессии в выбранной клетке-хозяине, например, в клетке дрожжей типа *Pichia pastoris*, или в бактериальной клетке, и затем клетку-хозяина трансфектировать слитой нуклеотидной последовательностью и выращивать в приемлемых условиях. Последовательность человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), которую можно применять, представлена в SEQ ID NO: 99.

Кроме того, приводящая к удлинению времени полужизни модификация полипептида (указанная модификация снижает также иммуногенность полипептида), заключается в присоединении пригодного фармакологически приемлемого полимера, такого как поли(этиленгликоль) (ПЭГ) с прямой или разветвленной цепью или его производные (например, метоксиполи(этиленгликоль) или мПЭГ). Как правило, можно использовать любую приемлемую форму ПЭГилирования, такую как ПЭГилирование, известное в данной области для антител и фрагментов антител (включая (но, не ограничиваясь только ими) "доменные" антитела и scFv-фрагменты); в качестве ссылки можно указать, например, Chapman, *Nat. Biotechnol.*, 54, 2002, сс. 531-545; Veronese и Harris, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 2003, сс. 453-456; Harris и Chess, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2, 2003 и WO 2004/060965.

Кроме того, в продажу поступают различные реагенты для ПЭГилирования полипептидов, например, от фирм Nektar Therapeutics, США или NOF Corporation, Япония, такие как серии Sunbright® EA, серии SH, серии MA, серии C A и серии ME, такие как Sunbright® ME-100MA, Sunbright® ME-200MA и Sunbright® ME-400MA.

Предпочтительно применяют сайтнаправленное ПЭГилирование, в частности через остаток цистеина (см., например, Yang и др., *Protein Engineering* 16, 2003, сс. 761-770). Например, для этой цели ПЭГ можно присоединять к остатку цистеина, который в естественных условиях присутствует в полипептиде, полипептид можно модифицировать так, чтобы в него можно было вводить один или несколько остатков цистеина для присоединения ПЭГ, или аминокислотную последовательность, содержащую один или несколько остатков цистеина, предназначенных для присоединения ПЭГ, можно сливать с N- и/или C-

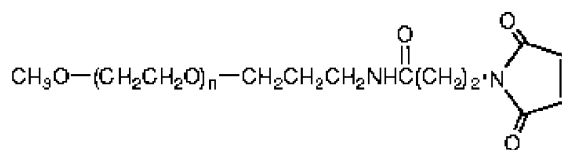
концом полипептида для всех указанных подходов можно применять методики конструирования белков, хорошо известные специалисту в данной области техники.

Для полипептидов можно применять ПЭГ с молекулярной массой, превышающей 5 кДа, например, превышающей 10 кДа, но более низкой чем 200 кДа, например, более низкой чем 100 кДа; например, составляющей от 20 до 80 кДа.

Касательно ПЭГилирования следует указать, что биспецифическая связывающая молекула, которая ПЭГилирована в одном или нескольких аминокислотных положениях, предпочтительно таким образом, что ПЭГилирование (1) либо удлиняет время полужизни *in vivo*; (2) либо снижает иммуногенность; (3) либо обеспечивает одно или несколько дополнительных ценных свойств, хорошо известных для ПЭГилирования; (4) либо не оказывает существенного воздействия на аффинность полипептида с его мишенью (например, не снижает указанную аффинность более чем на 50% и более предпочтительно более чем на 10% при определении с помощью приемлемого анализа, описанного в данной области); и/или (5) либо не оказывает влияния на любое другое из требуемых свойств биспецифических связывающих молекул. Приемлемые ПЭГ-группы и методы их присоединения, либо специфические, либо неспецифические, хорошо известны специалисту в данной области техники. Кроме того, в продажу поступают различные реагенты для ПЭГилирования полипептидов, например, от фирм Nektar Therapeutics, США или NOF Corporation, Япония, такие как серии Sunbright® EA, серии SH, серии MA, серии CA и серии ME, такие как Sunbright® ME-100MA, Sunbright® ME-200MA и Sunbright® ME-400MA.

А также, ПЭГилированный полипептид может включать один ПЭГ-фрагмент линейного ПЭГ с молекулярной массой 40 или 60 кДа, при этом ПЭГ-фрагмент присоединен к полипептиду в линкерной области и, в частности, к остатку Cys в положении 5 линкерного пептида GS9, представленного в SEQ ID NO: 93, в положении 14 линкерного пептида GS27, представленного в SEQ ID NO: 95, или в положении 15 линкерного пептида GS35, представленного в SEQ ID NO: 96, или в положении 5 линкерного пептида 35GS, представленного в SEQ ID NO: 97.

Биспецифическую связывающую молекулу можно ПЭГилировать с помощью одного из указанных выше реагентов для ПЭГилирования, такого как "Sunbright® ME-400MA", химическая формула которого представлена ниже:



Биспецифические связывающие молекулы, которые содержат линкер и/или обеспечивающие удлинение времени полужизни функциональные группы, имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 81 и на фиг. 48.

Иммуноглобулиновые единичные вариабельные домены могут представлять собой доменные антигены, как они определены в контексте настоящего описания.

Иммуноглобулиновые единичные вариабельные домены, которые присутствуют в биспецифических связывающих молекулах могут иметь также последовательности, которые соответствуют встречающемуся в естественных условиях VH-домену, который был "камелизирован", т.е. изменен путем замены одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности, встречающейся в естественных условиях вариабельной области тяжелой цепи канонического состоящего из 4 цепей антитела на один или несколько аминокислотных остатков, которые находятся в соответствующем(их) положении(ях) в VHH-домеине состоящего из тяжелой цепи антитела. Это можно осуществлять хорошо известным методом, который очевиден специалисту в данной области техники и дополнительную информацию о котором можно почерпнуть из WO 94/04678. Указанная "камелизация" может затрагивать главным образом аминокислотные положения, которые находятся в области контакта VH-VL, и так называемые остатки-маркеры верблюдовых (см., например, также WO 1994/04678). Подробное описание указанных методов "гуманизации" и "камелизации" и предпочтительные последовательности карманных участков, которые пригодны для осуществления этих методов, можно дополнительно почерпнуть из сведений, представленных на с. 46 и с. 98 WO 2006/040153 и с. 107 WO 2006/122786.

Связывающие компоненты обладают специфичностью в отношении Ang2 или VEGF соответственно, поскольку они содержат один или несколько иммуноглобулиновых единичных вариабельных доменов, специфически связывающихся с одним или несколькими эпитопами молекулы Ang2 или молекулы VEGF соответственно.

Специфическое связывание связывающей молекулы с антигеном Ang2 или VEGF можно определять с помощью любого приемлемого хорошо известного метода, включая, например, представленные в настоящем описании методы, такие как анализ Скэтчарда и/или анализы связывания в условиях конкуренции, такие как радиоиммуноанализы (РИА), ферментные иммуноанализы (ФИА и ELISA) и "сэндвич"-анализы в условиях конкуренции, и их различные варианты, хорошо известные в данной области.

Касательно антигена Ang2 или VEGF соответственно иммуноглобулиновый единичный вариабель-

ный домен не ограничен происхождением из какого-либо конкретного вида. Так, иммуноглобулиновые единичные переменные домены предпочтительно связываются с человеческим Ang2 или человеческим VEGF соответственно, если они предназначены для лечения человека. При этом иммуноглобулиновые единичные переменные домены, которые связываются с Ang2 или VEGF соответственно из других видов млекопитающих, или полипептиды, содержащие их, также описаны в заявке. Иммуноглобулиновый единичный переменный домен, который связывается с Ang2 или VEGF из одного из видов, может давать перекрестную реакцию с соответствующим антигеном из одного или нескольких других видов. Например, иммуноглобулиновые единичные переменные домены, которые связываются с человеческим антигеном, могут обладать перекрестной реактивностью с соответствующим антигеном из одного или нескольких других видов приматов и/или антигеном из одного или нескольких видов животных, которых применяют в качестве животных, на которых моделируют заболевание, например, обезьян (в частности циномогус или макак резус), мышей, крыс, кроликов, свиней, собак), в частности из животных, на которых моделируют заболевания и нарушения, которые можно модулировать путем ингибирования Ang2 (например, в качестве видов и животных моделей, упомянутых в настоящем описании). Иммуноглобулиновые единичные переменные домены, которые обладают указанной перекрестной реактивностью, являются важными для исследовательских целей и/или для разработки лекарственных средств, поскольку позволяют тестировать иммуноглобулиновые единичные переменные домены, на признанных моделях заболеваний, созданных на таких животных как обезьяны, в частности циномогус или макак резус, или мыши и крысы.

Кроме того, связывающие компоненты не ограничены или не определены конкретным доменом или антигенной детерминантой антигена, который/которая является их мишенью. Предпочтительно с позиций перекрестной реактивности с одним или несколькими молекулами антигенов из видов кроме человека, которая(ые) предназначена(ы) для применения в качестве животных моделей при разработке терапевтического антагониста Ang2/VEGF, связывающий компонент распознает эпитоп в области соответствующего антигена, которая обладает высокой степенью идентичности с человеческим антигеном. Например, при применении мышинной модели анти-Ang2 иммуноглобулиновый единичный переменный домен, входящий в биспецифические связывающие молекулы, распознает эпитоп, который полностью или частично локализован в FLD-домене Ang2, для которого характерна высокая идентичность при сравнении человеческой и мышинной последовательности.

Предпочтительно VEGF-связывающий компонент связывается с изоформами VEGF VEGF165 и/или VEGF121.

Другим объектом изобретения являются молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют биспецифические связывающие молекулы. Указанные молекулы нуклеиновых кислот в контексте настоящего описания обозначают также как "нуклеиновые кислоты, предлагаемые в изобретении", и они могут иметь также форму генетической конструкции, указанной в настоящем описании. Нуклеиновая кислота может представлять собой геномную ДНК, кДНК или синтетическую ДНК (такую как ДНК с наиболее часто встречающимися кодонами, которая специально адаптирована для экспрессии в выбранной клетке-хозяине или организме-хозяине). Нуклеиновая кислота может находиться в практически выделенной форме, как указано выше в настоящем описании.

Нуклеиновая кислота может иметь также форму вектора, может присутствовать в векторе и/или представлять собой часть вектора, такого, например, как плазида, космида или YAC. Вектор может представлять собой прежде всего экспрессионный вектор, т.е. вектор, который может обеспечивать экспрессию биспецифической молекулы *in vitro* и/или *in vivo* (т.е. в приемлемой/приемлемой клетке-хозяине, организме-хозяине и/или экспрессионной системе). Указанный экспрессионный вектор, как правило, содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, которая функционально связана с одним или несколькими приемлемыми регуляторными элементами, такими как промотор(ы), энхансер(ы), терминатор(ы) и т.п. Указанные элементы и их отбор с позиций экспрессии конкретной последовательности в конкретном хозяине находятся в компетенции специалиста в данной области. Конкретные примеры регуляторных элементов и других элементов, пригодных или необходимых для экспрессии D114-связывающих молекул таких как промоторы, энхансеры, терминаторы, факторы интеграции, маркеры для селекции, лидерные последовательности, репортерные гены и т.п., описаны, например, на сс.131-133 WO 2006/040153.

Нуклеиновые кислоты, можно создавать или получать хорошо известным методом (например, путем автоматического синтеза ДНК и/или методом рекомбинантной ДНК) на основе информации об аминокислотных последовательностях полипептидов, которая представлена в настоящем описании, и/или их можно выделять из пригодного встречающегося в естественных условиях источника.

Следующим объектом изобретения являются клетки-хозяева, которые экспрессируют или в которых может происходить экспрессия одной или нескольких биспецифических связывающих молекул; и/или которые содержат нуклеиновую кислоту, предлагаемую в изобретении. Клетки-хозяева могут представлять собой бактериальные клетки; другими пригодными клетками являются клетки дрожжей, клетки грибов или клетки млекопитающих.

Приемлемыми бактериальными клетками являются клетки грамотрицательных штаммов бактерий,

таких как штаммы *Escherichia coli*, *Proteus* и *Pseudomonas*, и грамположительных штаммов бактерий, таких как штаммы *Bacillus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus* и *Lactococcus*. Приемлемыми грибными клетками являются клетки видов *Trichoderma*, *Neurospora* и *Aspergillus*. Приемлемыми клетками дрожжей является клетки видов *Saccharomyces* (например, *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (например, *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (например, *Pichia pastoris* и *Pichia methanolica*) и *Hansenula*.

Приемлемыми клетками млекопитающих являются, например, CHO-клетки, ВНК-клетки, HeLa-клетки, COS-клетки и т.п. Однако можно использовать также клетки амфибий, клетки насекомых, клетки растений и любые другие клетки, которые применяют в данной области для экспрессии гетерологичных белков.

Изобретение относится также к способам получения биспецифической связывающей молекулы, как правило, заключающимся в том, что осуществляют стадии, на которых:

культивируют клетки-хозяева, которые содержат нуклеиновую кислоту, обладающую способностью кодировать биспецифическую связывающую молекулу в условиях, которые обеспечивают экспрессию биспецифической связывающей молекулы, предлагаемой в изобретении; и

высвобождают или выделяют из культуры полипептид, экспрессируемый клетками-хозяевами; и необязательно дополнительно очищают и/или модифицируют, и/или включают в препаративную форму биспецифическую связывающую молекулу, предлагаемую в изобретении.

Для производства в промышленном масштабе предпочтительными организмами-хозяевами являются штаммы *E. coli*, *Pichia pastoris* и *S. cerevisiae*, которые пригодны для крупномасштабной экспрессии, производства и ферментации, и прежде всего для крупномасштабной экспрессии, производства и ферментации фармацевтических продуктов.

Выбор конкретной экспрессионной системы зависит, в частности, от требований к определенным пост-трансляционным модификациям, более конкретно к гликозилированию. Для получения биспецифической связывающей молекулы, для которой гликозилирование является желательным или необходимым, требуется применять для экспрессии клетки-хозяева млекопитающих, обладающие способностью гликозилировать белок. В этом плане специалисту в данной области техники должно быть очевидно, что полученная схема гликозилирования (т.е. вид, количество и положение присоединенных остатков) должна зависеть от клетки или клеточной линии, применяемой для экспрессии.

Биспецифические связывающие молекулы, можно получать либо в клетке, согласно описанному выше методу, внутриклеточно (например, в цитозоле, периплазме или в тельцах включения), а затем выделять из клеток-хозяев и необязательно дополнительно очищать; либо их можно получать внеклеточно (например, в среде, в которой культивируют клетки-хозяева), а затем выделять из культуральной среды и необязательно дополнительно очищать.

Методы и реагенты, которые применяют для получения полипептидов с помощью рекомбинантной ДНК, такие как специфические приемлемые экспрессионные векторы, методы трансформации или трансфекции, маркеры для селекции, методы индукции экспрессии белков, условия культивирования и т.п., известны в данной области. Аналогично этому методики выделения и очистки белков, применяемые в методе производства полипептида, хорошо известны специалисту в данной области.

Пептид может иметь аминокислотную последовательность CDR3, входящую в конструкцию анти-VEGF-VNH, которая имеет аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей, которые представлены в SEQ ID NO: 9-57 и или SEQ ID NO: 58-127 соответственно.

Эти пептиды соответствуют CDR3, выведенным из VNH. Их, в частности, молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют их, можно применять для трансплантации CDR для того, чтобы заменять CDR3 в цепи иммуноглобулина или для инсерции в неиммуноглобулиновый каркас, например, ингибитор протеазы, ДНК-связывающий белок, цитохром b562, состоящий из пучка спиралей белок, связанный дисульфидным мостиком пептид, липокаин или антикалин, которые придают указанному каркасу способность связываться с мишенью. Метод трансплантации CDR хорошо известен в данной области и его широко применяли, например, для гуманизации антител (которые, как правило, содержит CDR из антитела грызунов, трансплантированные в каркасные участки Fv человеческого антитела).

Для получения иммуноглобулинового или неиммуноглобулинового каркаса, содержащего CDR3, ДНК, которая кодирует указанную молекулу, можно получать с помощью стандартных методов молекулярной биологии, например, с помощью синтеза генов, "отжига" олигонуклеотидов или на основе перекрывающихся ПЦР-фрагментов, которые описаны, например, у Daugherty и др., *Nucleic Acids Research*, т. 19, 9, 1991, сс. 2471-2476. Метод инсерции VNH-CDR3 в неиммуноглобулиновый каркас описан у Nicaise и др., *Protein Science*, 13, 2004, сс. 1882-1891.

Описана также фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одну биспецифическую связывающую молекулу и может также необязательно содержать один или несколько хорошо известных дополнительных компонентов указанных композиций, т.е. которые зависят от предполагаемого применения композиции. Для фармацевтического применения на основе биспецифической связывающей молекулы, или полипептида, который ее содержит, можно приготавливать формы в виде фармацевтического препарата или композиции, содержащего/содержащей по меньшей мере одну биспецифическую связывающую молекулу и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель

или эксципиент и/или адъювант и необязательно один или несколько дополнительных фармацевтически активных полипептидов и/или соединений. Примерами таких препаративных форм являются (но, не ограничиваясь только ими) формы, пригодные для орального введения, для парентерального введения (например, с помощью внутривенной, внутримышечной или подкожной инъекции или внутривенной инфузии), для местного применения, для применения путем ингаляции, с помощью кожного пластыря, с помощью имплантата, суппозитория и т.д. Указанные приемлемые для введения формы, которые могут быть твердыми, полутвердыми или жидкими в зависимости от пути введения, а также методы и носители для их применения в препаратах, должны быть очевидны специалисту в данной области и дополнительно представлены в настоящем описании.

Фармацевтическая композиция может содержать по меньшей мере одну биспецифическую связывающую молекулу, в частности один иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен, или полипептид, который его содержит, и по меньшей мере один приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент (т.е. пригодный для фармацевтического применения) и необязательно одну или несколько дополнительных активных субстанций.

Биспецифические связывающие молекулы можно включать в препаративную форму и вводить с помощью любого пригодного хорошо известного метода: см. ссылки, прежде всего касающиеся иммуноглобулиновых единичных вариабельных доменов, например, в WO 2004/041862, WO 2004/041863, WO 2004/041865, WO 2004/041867 и WO 2008/020079, а также в стандартных справочниках, таких как Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-ое изд., изд-во Mack Publishing Company, США, 1990, Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 21-ое изд., изд-во Lippincott Williams и Wilkins, 2005 или Handbook of Therapeutic Antibodies, под ред. S. Dubel, изд-во Wiley, Weinheim, 2007 (см., например, сс. 252-255).

Например, иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен можно включать в препаративную форму и вводить любым методом, широко применяемым для канонических антител и фрагментов антител (включая ScFv и димерные антитела) и других фармацевтически активных белков. Указанные препаративные формы и методы их получения должны быть очевидны специалисту в данной области и, например, включают препараты, пригодные для парентерального введения (например, внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, внутримышечного, внутрисосудового, внутриартериального или внутриоболочечного введения) или для местного (т.е. трансдермального или внутридермального) применения.

Препараты для парентерального введения могут представлять собой, например, стерильные растворы, суспензии, дисперсии или эмульсии, которые можно применять для инфузии или инъекции. Приемлемыми носителями или разбавителями для таких препаратов являются, например (но, не ограничиваясь только ими) стерильная вода и фармацевтически приемлемые водные буферы и растворы, такие как забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы, раствор Хэнкса; водные растворы масел; глицерин; этанол; гликоли, такие как пропиленгликоль, или также минеральные масла, животные масла и растительные масла, например, арахисовое масло, соевое масло, а также их приемлемые смеси. Как правило, предпочтительными являются водные растворы или суспензии.

Так, биспецифическую связывающую молекулу можно вводить системно, например, орально, в сочетании с фармацевтически приемлемым наполнителем, таким как инертный разбавитель или усвояемый съедобный носитель. Для орального терапевтического применения биспецифическую связывающую молекулу можно объединять с одним или несколькими эксципиентами и применять в форме предназначенных для приема внутрь таблеток, трансбуккальных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и т.п. Указанные композиции и препараты должны содержать связывающую молекулу в количестве, составляющем по меньшей мере 0,1%. Указанное процентное содержание в композициях и препаратах может, естественно, варьироваться и может, как правило, составлять от примерно 2 до примерно 60% в пересчете на массу указанной стандартной дозы лекарственного средства. Количество биспецифической связывающей молекулы в предназначенных для терапевтического применения композициях является таким, чтобы получать эффективный уровень доз.

Таблетки, пилюли, капсулы и т.п. могут содержать также связывающие агенты, эксципиенты, разрыхлители, замасливатели и подслащивающие вещества или корригенты, например, упомянутые на сс. 143-144 WO 2008/020079. Когда стандартная доза лекарственного средства представляет собой капсулу, то она может содержать помимо продуктов указанного выше типа жидкий носитель, такой как растительное масло или полиэтиленгликоль.

Различные другие материалы могут присутствовать в виде покрытий или их можно применять для другой модификации физической формы твердой стандартной дозы лекарственного средства. Например, на таблетки, пилюли и капсулы можно наносить покрытие из желатина, воска, шеллака или сахара и т.п. Сироп или эликсир может включать биспецифические связывающие молекулы, сахарозу или фруктозу в качестве подслащивающего вещества, метил- и пропилпарабены в качестве консервантов, краситель и корригент, такой как вишневая или апельсиновая отдушка. Естественно, любой продукт, применяемый для приготовления любой стандартной дозы лекарственного средства, должен быть фармацевтически приемлемым и практически нетоксичным в применяемых количествах. Кроме того, биспецифические связывающие молекулы, можно включать в препараты или устройства с замедленным высвобождением.

Препараты и формы для орального введения могут иметь также энтеросолюбильное покрытие, которое позволяет конструкциям сохраняться в среде желудка и проходить в кишечник. Более конкретно препараты и формы для орального введения можно приготавливать в виде, который позволяет осуществлять введение в требуемый отдел желудочно-кишечного тракта. Кроме того, для введения в желудочно-кишечный тракт можно применять суппозитории.

Биспецифические связывающие молекулы можно вводить также внутривенно или внутривентриально с помощью инфузии или инъекции, что более подробно описано на сс. 144 и 145 WO 2008/020079.

В случае предназначенных для местного применения биспецифических связывающих молекул их требуется наносить на кожу в виде композиций или форм в сочетании с приемлемым для дерматологического применения носителем, который может быть твердым или жидким, что более подробно описано на с. 145 WO 2008/020079.

Как правило, концентрация биспецифических связывающих молекул в жидкой композиции, такой как лосьон, должна составлять примерно 0,1-25 мас.%, предпочтительно примерно 0,5-10 мас.%. Концентрация в полутвердой или твердой композиции, такой как гель или порошок, должна составлять примерно 0,1-5 мас.%, предпочтительно примерно 0,5-2,5 мас.%.

Количество биспецифических связывающих молекул, которое требуется для лечения, должно варьироваться не только в зависимости от конкретной выбранной биспецифической связывающей молекулы, но также от пути введения, природы состояния, подлежащего лечению, и возраста и состояния пациента, и, в конце концов, оно определяется предписанием лечащего врача или клинициста. Кроме того, доза биспецифических связывающих молекул варьирует в зависимости от клетки-, опухоли-, ткани-, трансплантата-или органа-мишени.

Требуемую дозу, как правило, можно применять в виде однократной дозы или в виде разделенных доз, которые предназначены для введения с соответствующими интервалами, например, в виде двух, трех, четырех или большего количества субдоз в день. Режим введения самих субдоз можно дополнительно разделять, например, на ряд введений, разделенных "пустыми" промежутками без обработки; например, на несколько ингаляций с использованием инсультатора, или путем внесения нескольких капель в глаз.

Схема введения может включать пролонгированную ежедневную обработку. Под "пролонгированной" подразумевают обработку в течение периода времени, составляющего по меньшей мере две недели и предпочтительно несколько недель, месяцев или лет. Необходимость изменений в этой схеме приема доз может определять обычный специалист в данной области с помощью общепринятых экспериментов, указанных в настоящем описании (см., Remington's Pharmaceutical Sciences, под ред. Martin E.W., 4-ое изд., изд-во Mack Publishing Co., Easton, PA). Дозу может регулировать также каждый лечащий врач в случае любых осложнений.

Применение биспецифических связывающих молекул, например, иммуноглобулиновых единичных переменных доменов или содержащих их полипептидов, возможно для следующих терапевтических целей:

для предупреждения, лечения и/или облегчения нарушения, заболевания или состояния, прежде всего у человека, которое ассоциировано с опосредуемыми VEGF- и /или Ang2 воздействиями на ангиогенез, или которое можно предупреждать, лечить или облегчать посредством модуляции пути передачи сигналов Notch и/или передачи сигналов Tie2 с помощью биспецифической связывающей молекулы в способе лечения пациента, который нуждается в такой терапии, заключающемся в том, что вводят индивидууму, который нуждается в этом, в фармацевтически активном количестве по меньшей мере одну биспецифическую связывающую молекулу, например иммуноглобулиновый единичный переменный домен, или содержащую их фармацевтическую композицию;

для приготовления лекарственного средства, предназначенного для предупреждения, лечения или облегчения нарушений, заболеваний или состояний, ассоциированных с опосредуемыми VEGF и/или опосредуемыми Ang2 воздействиями на ангиогенез;

в качестве действующего вещества в фармацевтической композиции или лекарственном средстве, применяемой/применяемом для указанных выше целей.

Заболевание или состояние может представлять собой рак или злокачественное заболевание, указанное в настоящем описании.

Другое заболевание может представлять собой глазную болезнь, ассоциированную с опосредуемыми VEGF и/или опосредуемыми Ang2 воздействиями на ангиогенез, или которую можно лечить или облегчать посредством модуляции пути передачи сигналов Notch и/или передачи сигналов Tie2 с помощью биспецифической связывающей молекулы.

В зависимости от подлежащего лечению злокачественного заболевания биспецифическую связывающую молекулу можно применять индивидуально или в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, в частности, выбранными из химиотерапевтических средств типа повреждающих ДНК агентов или терапевтически активных соединений, которые ингибируют ангиогенез, пути трансдукции сигналов или точки контроля митоза в раковых клетках.

Дополнительные терапевтические средства можно вводить одновременно, необязательно в виде

компонента одного и того же фармацевтического препарата, или до, или после введения биспецифической связывающей молекулы.

Дополнительное терапевтическое средство может представлять собой (но, не ограничиваясь только ими) один или несколько ингибиторов, выбранных из группы ингибиторов EGFR, VEGFR, HER2-neu, Her3, AuroraA, AuroraB, PLK и PI3-киназы, FGFR, PDGFR, Raf, Ras, KSP, PDK1, PTK2, IGF-R или IR.

Другими примерами дополнительных терапевтических агентов могут быть ингибиторы CDK, Akt, src/bcr-abl, cKit, cMet/HGF, c-Myc, Flt3, HSP90, антагонисты hedgehog, ингибиторы JAK/STAT, Mek, mTor, NF каппаВ, протеасом, Rho, ингибитор пути передачи сигналов wnt или ингибитор пути убикитинизации или другой ингибитор пути передачи сигналов Notch.

Примерами ингибиторов киназы Аутога являются (но, не ограничиваясь только ими) PHA-739358, AZD-1152, AT 9283, CYC-116, R-763, VX-680, VX-667, MLN-8045, PF-3814735.

Примером ингибитора PLK является GSK-461364.

Примерами ингибиторов raf являются BAY-73-4506 (который является также ингибитором VEGFR), PLX 4032, RAF-265 (который является также ингибитором VEGFR), сорафениб (который является также ингибитором VEGFR) и XL 281.

Примерами ингибиторов KSP являются испинесиб, ARRY-520, AZD-4877, CK-1122697, GSK 246053A, GSK-923295, MK-0731 и SB-743921.

Примерами ингибиторов src и/или bcr-abl являются дасатиниб, AZD-0530, босутиниб, XL 228 (который является также ингибитором IGF-1R), нилотиниб (который является также ингибитором PDGFR и cKit), иматиниб (который является также ингибитором cKit) и NS-187.

Примером ингибитора PDK1 является BX-517.

Примером ингибитора Rho является BA-210.

Примерами ингибиторов PI3 -киназы являются PX-866, BEZ-235 (который является также ингибитором mTor), XL 418 (который является также ингибитором Akt), XL-147 и XL 765 (который является также ингибитором mTor).

Примерами ингибиторов cMet или HGF являются XL-184 (который является также ингибитором VEGFR, cKit, Flt3), PF-2341066, MK-2461, XL-880 (который является также ингибитором VEGFR), MGCD-265 (который является также ингибитором VEGFR, Ron, Tie2), SU-11274, PHA-665752, AMG-102 и AV-299.

Примером ингибитора c-Myc является CX-3543.

Примерами ингибиторов Flt3 являются AC-220 (который является также ингибитором cKit and PDGFR), KW 2449, лестауртиниб (который является также ингибитором VEGFR, PDGFR, PKC), TG-101348 (который является также ингибитором JAK2), XL-999 (который является также ингибитором cKit, FGFR,

PDGFR и VEGFR), сунитиниб (который является также ингибитором PDGFR, VEGFR и cKit) и тан-дутиниб (который является также ингибитором PDGFR и cKit).

Примерами ингибиторов HSP90 являются танеспимицин, алвеспимицин IPI-504 и CNF 2024.

Примерами ингибиторов JAK/STAT являются CYT-997 (который взаимодействует также с тубулином), TG 101348 (который является также ингибитором Flt3) и XL-019.

Примерами ингибиторов Mek являются ARRY-142886, PD-325901, AZD-8330 и XL 518.

Примерами ингибиторов mTor являются темсиrolimus, AP-23573 (который действует также как ингибитор VEGF), эверолимус (кроме того, является ингибитором VEGF), XL-765 (который является также ингибитором PI3-киназы) и BEZ-235 (который является также ингибитором PI3-киназы).

Примерами ингибиторов Akt являются перифосин, GSK-690693, RX-0201 и трицирибин.

Примерами ингибиторов cKit являются AB-1010, OSI-930 (который действует также в качестве ингибитора VEGFR), AC-220 (который является также ингибитором Flt3 и PDGFR), тандутиниб (который является также ингибитором Flt3 и PDGFR), акситиниб (который является также ингибитором VEGFR и PDGFR), XL-999 (который является также ингибитором Flt3, PDGFR, VEGFR, FGFR), сунитиниб (который является также ингибитором Flt3, PDGFR, VEGFR) и XL-820 (который действует также как ингибитор VEGFR и PDGFR), имиаиниб (который является также ингибитором bcr-abl), нилотиниб (который является также ингибитором bcr-abl и PDGFR).

Примерами антагонистов hedgehog являются IPI-609 и CUR-61414.

Примерами ингибиторов CDK являются селициклиб, AT-7519, P-276, ZK-CDK (который является также ингибитором VEGFR2 и PDGFR), PD-332991, R-547, SNS-032, PHA-690509 и AG 024322.

Примерами ингибиторов протеасомы являются бортезомиб, карфилзомиб и NPI-0052 (который является также ингибитором NF каппаВ).

Примером ингибитора NF каппаВ-пути является NPI-0052.

Примером ингибитора пути убикитинизации является HBX-41108.

Кроме того, дополнительное терапевтическое средство может представлять собой антиангиогенный агент.

Примерами антиангиогенных агентов являются ингибиторы FGFR, PDGFR и VEGFR или соответствующие лиганды (например, ингибиторы VEGF типа пэгаптаниба или антитело к VEGF бевасизумаб) и

талидомида, указанные агенты выбраны из группы, включающей (но, не ограничиваясь только ими) бевасизумаб, мотесаниб, CDP-791, SU-14813, телатиниб, KRN-951, ZK-CDK (который является также ингибитором CDK), ABT-869, BMS-690514, RAF-265, IMC-KDR, IMC-18F1, IMiD (иммуномодуляторные лекарственные средства), производное талидомида CC-4047, леналидомид, ENMD 0995, IMC-D11, Ki 23057, бриваниб, цедираниб, XL-999 (который является также ингибитором cKit и Flt3), 1B3, CP 868596, IMC 3G3, R-1530 (который является также ингибитором Flt3), сунитиниб (который является также ингибитором cKit и Flt3), акситиниб (который является также ингибитором cKit), лестауртиниб (который является также ингибитором Flt3 и PKC), ваталаниб, тандутиниб (который является также ингибитором Flt3 и cKit), пазопаниб, GW 786034, PF-337210, IMC-1121B, AVE-0005, AG-13736, E-7080, CHIR 258, сорафениб тозилат (который является также ингибитором Raf), RAF-265 (который является также ингибитором Raf), вантетаниб, CP-547632, OSI-930, AEE-788 (EGFR и Her2), BAY-57-9352 (который является также ингибитором Raf), BAY-73-4506 (который является также ингибитором Raf), XL 880 (который является также ингибитором cMet), XL-647 (который является также ингибитором EGFR и EphB4), XL 820 (который является также ингибитором cKit) и нилотиниб (который является также ингибитором cKit и bcr-abl).

Дополнительное терапевтическое средство можно выбирать также из ингибиторов EGFR, оно может представлять собой низкомолекулярный ингибитор EGFR или антитело к EGFR. Примерами антител к EGFR являются (но, не ограничиваясь только ими) цетуксимаб, панитумумаб, матузумаб; примером низкомолекулярного ингибитора EGFR является gefitinib. Другим примером модулятора EGFR является конъюгат EGF с токсином.

Из ингибиторов EGFR и Her2, которые можно применять в сочетании с биспецифической связывающей молекулой следует упомянуть лапатиниб, gefitinib, эрлотиниб, цетуксимаб, трастузумаб, нимотузумаб, залутумумаб, вандетаниб (который является также ингибитором VEGFR), пертузумаб, XL-647, HKI-272, BMS-599626, ARRY-334543, AV 412, mAB-806, BMS-690514, JNJ-26483327, AEE-788 (который является также ингибитором VEGFR), ARRY-333786, IMC-11F8, ZemaB.

Другими агентами, которые целесообразно применять для лечения в сочетании с биспецифической связывающей молекулой являются тоситумумаб и ибритумумаб тиуксетан (два меченных с помощью радиоактивных изотопов антитела к CD20), алемтузумаб (антитело к CD52), деносуаb (ингибитор лиганда фактора дифференцировки остеокластов), галиксимаб (антагонист CD80), офатумумаб (ингибитор CD20), занолумумаб (антагонист CD4), SGN40 (модулятор лиганда рецептора CD40), ритуксимаб (ингибитор CD20), мапатумумаб (агонист рецептора TRAIL-1), REGN421(SAR153192) или OMP-21M18 (ингибиторы D114).

Другими химиотерапевтическими лекарственными средствами, которые можно применять в сочетании с биспецифическими связывающими молекулами, являются (но, не ограничиваясь только ими) гормоны, аналоги гормонов и антигормональные средства (например, тамоксифен, торемифен, ралоксифен, фулвестрант, мегестрола ацетат, флутамид, нилутамид, бикалутамид, ципротерона ацетат, финастерид, бусерелина ацетат, флуорокортисон, флуоксиместерон, медроксипрогестерон, острейотид, арзоксифен, пасирейотид, вапреотид), ингибиторы ароматазы (например, анастрозол, летрозол, лиарозол, эксеместан, атаместан, форместан), агонисты и антагонисты LHRH (например, гoserелина ацетат, леупролид, абареликс, цетрореликс, деслорелин, гистрелин, трипторелин), антиметаболиты (например, антифолаты типа метотрексата, пеметрекседа, аналоги пиримидина типа 5-фторурацила, капецитабина, децитабина, неларабина и гемцитабина, аналоги пурина и аденозина, такие как меркаптопурина тиогуанин, кладрибин и пентостатин, цитарабин, флударабин); противоопухолевые антибиотики (например, антрациклины, такие как доксорубин, даунорубин, эпирубин и идарубин, митомицин-С, блеомицин, дактиномицин, пликамицин, митоксантрон, пиксантрон, стрептозоцин); производные платины (например, цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин, лобоплатин, сатраплатин); алкилирующие средства (например, эстрамустин, меклорэтамин, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфид, дакарбазин, циклофосфамид, ифосфамид, гидроксимочевина, темозоломид, нитрозомочевина, такие как кармустин и ломустин, тиотепид); антимитотические средства (например, алкалоиды барвинка типа винбластин, виндесин, винорелбин, винфлунина и винкристин; и таксаны, такие как паклитаксел, доцетаксел и их препаративные формы, ларотаксел, симотаксел и эпотилоны типа иксабепилона, патупилона, ZK-EPO); ингибиторы топоизомеразы (например, эпиподофиллотоксины, такие как этопосид и этопифос, тенипосид, амсакрин, топотекан, иринотекан) и химиотерапевтические агенты смешанного типа, такие как амифостин, анагрелид, интерферон альфа, прокарабазин, митотан и порфирин, бексаротен, цеlexоксид.

Эффективность биспецифических связывающих молекул или содержащих их полипептидов или содержащих их фармацевтических композиций можно оценивать с помощью приемлемого анализа *in vitro*, клеточного анализа, анализа *in vivo* и/или на хорошо известных животных моделях, или с помощью любой их комбинации в зависимости от специфического представляющего интерес заболевания или нарушения. Приемлемые анализы и животные модели очевидны специалисту в данной области техники, и они представляют собой анализы, представленные в настоящем описании, и применяемые ниже в примерах, например, анализ пролиферации.

Данные, полученные в экспериментах, проведенных при создании изобретения, подтверждают, что

биспецифические связывающие молекулы обладают свойствами, которые превышают свойства связывающих молекул, известных из существующего уровня техники. Одним из указанных свойств является полное ингибирование взаимодействия VEGF165-VEGFR2 и низкое значение IC_{50} , которое можно рассчитывать, например, на основе полученных с помощью ELISA данных, представленных на фиг. 1 и в таблице 5, а также значения IC_{50} (нМ) для VHN по данным AlphaScreen-анализа, которые представлены на фиг. 3, 17, 18 и в табл.7; и данные об уровне аффинности K_D (нМ) очищенных VHN к рекомбинантному человеческому VEGF и мышинному VEGF, которые представлены в таблице 9, 10 и на фиг. 5. Кроме того, что видно из табл.13, связывающие VEGF агенты, обладают высокой эффективностью, т.е. при применении в концентрациях, находящихся в субнаномолярном диапазоне, при оценке пролиферации клеток линии HUVEC. Эти данные свидетельствуют о том, что биспецифические связывающие молекулы являются перспективными кандидатами, которые могут обладать терапевтической эффективностью в отношении заболеваний и нарушений, ассоциированных с опосредуемыми VEGF-воздействиями на ангиогенез, таких как рак.

Диагностирования заболевания может заключаться в том, что:

- а) приводят в контакт образец со связывающей молекулой, предлагаемой в изобретении, и
- б) определяют связывание указанной связывающей молекулы с образцом, и
- в) сравнивают связывание, обнаруженное на стадии (б), со стандартом, при этом различие в связывании с указанным образцом является диагностическим в отношении заболевания или нарушения, ассоциированного с опосредуемыми VEGF- и/или Ang2 воздействиями на ангиогенез.

Для указанного и других вариантов применения может оказаться целесообразным дополнительно модифицировать биспецифическую связывающую молекулу, например, путем интродукции функциональной группы, которая является компонентом специфически связывающейся пары, такой как связывающаяся пара биотин-(стрепт)авидин. Указанную функциональную группу можно применять для соединения связывающей молекулы с другим белком, полипептидом или химическим соединением, который/которое связан/связано с другой половиной связывающейся пары, т.е. посредством формирования связывающейся пары. Например, биспецифическую связывающую молекулу, можно конъюгировать с биотином и связывать с другим белком, полипептидом, соединением или носителем, который конъюгирован с авидином или стрептавидином. Например, указанную конъюгированную биспецифическую связывающую молекулу можно применять в качестве репортера, например, в диагностической системе, в которой выявляемый образующий сигнал агент конъюгирован с авидином или стрептавидином.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано

- на фиг. 1 - результаты, демонстрирующие, что очищенные одновалентные VHN блокируют взаимодействие hVEGF165/hVEGFR2-Fc (ELISA);
- на фиг. 2 - результаты, демонстрирующие, что очищенные одновалентные VHN блокируют взаимодействие hVEGF165/hVEGFR1-Fc (ELISA);
- на фиг. 3 - результаты, демонстрирующие, что очищенные одновалентные VHN блокируют взаимодействие hVEGF165/hVEGFR2-Fc (AlphaScreen);
- на фиг. 4 - результаты, демонстрирующие, что очищенные одновалентные VHN блокируют взаимодействие hVEGF165/hVEGFR1-Fc (AlphaScreen);
- на фиг. 5 - результаты, демонстрирующие связывание одновалентных VHN с рекомбинантным человеческим и мышинным VEGF (ELISA);
- на фиг. 6 - результаты, демонстрирующие связывание одновалентных VHN с человеческим VEGF121;
- на фиг. 7- результаты демонстрирующие, что очищенные VHN не связываются с VEGFB, VEGFC, VEGFD и P1GF;
- на фиг. 8 - результаты демонстрирующие, что форматированные VHN блокируют взаимодействие hVEGF165/hVEGFR2-Fc (ELISA);
- на фиг. 9 - результаты демонстрирующие, что форматированные VHN блокируют взаимодействие hVEGF165/hVEGFR1-Fc (ELISA);
- на фиг. 10 - результаты демонстрирующие, что форматированные VHN блокируют взаимодействие hVEGF165/hVEGFR2-Fc (AlphaScreen);
- на фиг. 11 - результаты, демонстрирующие, что форматированные VHN блокируют взаимодействие hVEGF165/hVEGFR1-Fc (AlphaScreen);
- на фиг. 12 - результаты, демонстрирующие, что форматированные VHN блокируют взаимодействие mVEGF164/mVEGFR2-Fc (AlphaScreen);
- на фиг. 13 - результаты, демонстрирующие, что форматированные VHN связываются с мышинным и человеческим VEGF;
- на фиг. 14 - результаты, демонстрирующие, что форматированные VHN не связываются с VEGFB, VEGFC, VEGFD и P1GF;
- на фиг. 15 - результаты, демонстрирующие, что форматированные VHN связываются с VEGF 121;
- на фиг. 16 - сравнительный анализ последовательности VHN VEGFBII23B04 и человеческой кон-

сенсусной последовательности зародышевой линии VH3/JH;

на фиг. 17 - результаты, демонстрирующие, что варианты VHH VEGFBII23B04 блокируют взаимодействие hVEGF165/hVEGFR2-Fc (AlphaScreen);

на фиг. 18 - результаты, демонстрирующие, что клоны VEGFBII23B04 с оптимизированной последовательностью блокируют взаимодействие hVEGF 165/hVEGFR2-Fc (AlphaScreen);

на фиг. 19 - сравнительный анализ последовательности VHH VEGFBII5B05 и человеческой консенсусной последовательности зародышевой линии VH3/JH;

на фиг. 20 - описание двухвалентных VHH к Ang2;

на фиг. 21 - результаты, демонстрирующие, что очищенные двухвалентные VHH к Ang2 блокируют взаимодействие hAng2-hTie2 (25-1), mAng2-mTie2 (25-2) и cAng2-cTie2 (25-3) (ELISA);

на фиг. 22 - результаты, демонстрирующие, что очищенные двухвалентные VHH к Ang2 блокируют взаимодействие hAng1-hTie2 (ELISA);

на фиг. 23 - описание трехвалентных биспецифических VHH VEGFxAng2;

на фиг. 24 - результаты, демонстрирующие, что очищенные трехвалентные нанотела VEGFxAng2 блокируют взаимодействие hVEGF-hVEGFR2 (AlphaScreen);

на фиг. 26 - результаты, демонстрирующие, что очищенные трехвалентные VHH VEGFxAng2 блокируют взаимодействие hAng2-hTie2 (ELISA);

на фиг. 26 - описание трехвалентных и четырехвалентных биспецифических VHH VEGFxAng2;

на фиг. 27 - результаты, демонстрирующие, что очищенные трехвалентные и четырехвалентные VHH VEGFxAng2 блокируют взаимодействие hVEGF-hVEGFR2 (31-1) и hVEGF-hVEGFR1 (31-2) (AlphaScreen);

на фиг. 28 - результаты, демонстрирующие, что очищенные трехвалентные и четырехвалентные VHH VEGFxAng2 блокируют взаимодействие hAng2-hTie2 (32-1), mAng2-mTie2 (32-2) и cAng2-cTie2 (32-3) (ELISA);

на фиг. 29 - результаты, демонстрирующие, что очищенные трехвалентные и четырехвалентные VHH VEGFxAng2 блокируют опосредуемое hAng2 выживание клеток HUVEC;

на фиг. 30 - описание биспецифических VHH VEGFxAng2 с оптимизированной последовательностью и аффинностью;

на фиг. 31 - результаты, демонстрирующие, что очищенные VHH VEGFANGBII00022-25-28 VEGFxAng2 блокируют взаимодействие hVEGF-hVEGFR2 (35-1) и hVEGF-hVEGFR1 (35-2) (AlphaScreen);

на фиг. 32 - результаты, демонстрирующие, что очищенные VHH VEGFANGBII00022-25-28 VEGFxAng2 связываются с человеческим VEGF165 (36-1) и hVEGF121 (36-2) (ELISA);

на фиг. 33 - результаты, демонстрирующие, что очищенные VHH VEGFANGBII00022-25-28 VEGFxAng2 связываются с (А) мышинным и (Б) крысиным VEGF164 (ELISA);

на фиг. 34 - результаты, демонстрирующие, что очищенные VHH VEGFANGBII00022-25-28 VEGFxAng2 связываются с (А) человеческим VEGF-B, (Б) человеческим VEGF-C, (В) человеческим VEGF-D и (Г) человеческим PlGF (ELISA);

на фиг. 35 - результаты, демонстрирующие, что очищенные VHH VEGFANGBII00022-25-28 VEGFxAng2 блокируют взаимодействие hAng2-hTie2 (39-1), mAng2-mTie2 (39-2) и cAng2-cTie2 (39-3) (ELISA);

на фиг. 36 - результаты, демонстрирующие, что очищенные VHH VEGFANGBII00022-25-28 VEGFxAng2 блокируют взаимодействие hAng1-hTie2 (ELISA);

на фиг. 37 - результаты, демонстрирующие, что очищенные VHH VEGFANGBII00022-25-28 VEGFxAng2 блокируют опосредуемое hAng2 выживание клеток HUVEC.

Материалы и методы

а) Получение VEGF109 и оценка его функциональной активности.

кДНК, кодирующую связывающий рецептор домен изоформы человеческого сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF165 (GenBank: AAM03108.1; АК-остатки 27-135), клонировали в векторе pET28a (фирма Novagen, Мэдисон, шт. Висконсин) и сверхэкспрессировали в E.coli (BL21 Star DE3) в виде меченного с помощью His нерастворимого белка. Экспрессию индуцировали путем добавления 1мМ изопропилтиогалактозида (ИПТГ) и давали осуществляться в течение 4 ч при 37°C. Клетки собирали центрифугированием и лизировали путем облучения клеточного дебриса ультразвуком. Тельца включения выделяли центрифугированием. После стадии отмывки с помощью 1% Тритон X 100 (фирма Sigma-Aldrich) белки солибилизовали с помощью 7,5М гидрохлорида гуанидина и осуществляли повторную укладку (рефолдинг) путем последовательных циклов диализа в течение ночи с использованием буферов с концентрациями мочевины, понижающимися с 6М до 0М. Повторно уложенный белок очищали с помощью ионообменной хроматографии с использованием колонки MonoQ5/50GL (фирма Amersham BioSciences) и последующей гель-фильтрации на колонке Супердекс75 10/300 GL (фирма Amersham BioSciences). Чистоту и гомогенность белка подтверждали методом ДСН-ПААГ и Вестерн-блоттинга. Кроме того, оценивали с помощью ELISA активность в отношении связывания с VEGFR1, VEGFR2 и бевацизумабом. Для этой цели рекомбинантный человеческий VEGF109 (1 мкг/мл) иммобилизовали в

течение ночи при 4°C в 96-луночном планшете MaxiSorp (фирма Nunc, Висбаден, Германия). Лунки блокировали раствором казеина (1%). Добавляли серийные разведения VEGFR1, VEGFR2 или бевацизумаба в сенсibilизированный VEGF109 планшет и оценивали связывание с использованием конъюгированного со щелочной фосфатазой (AP) козьего античеловеческого IgG, Fc-специфического (фирма Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Вест-Гров, шт. Пенсильвания, США) и последующей ферментативной реакции в присутствии субстрата PNPP (пара-нитрофенилфосфат) (фирма Sigma-Aldrich). Установлено, что VEGF109 может связываться с VEGFR1, VEGFR2 и бевацизумабом, что свидетельствует об активности полученного VEGF109.

б) Конъюгация VEGF165 с KLN и оценка функциональной активности VEGF165, конъюгированного с KLN.

Рекомбинантный человеческий VEGF165 (фирма R&D Systems, Миннеаполис, шт. Миннесота, США) конъюгировали с гемоцианином лимфы улитки, выращенной в условиях марикультуры (mcKLN), используя набор Imject Immunogen EDC, содержащий mcKLN (фирма Pierce, Рокфорд, шт. Иллинойс, США), согласно инструкциям производителя. Эффективность конъюгации полипептида с mcKLN подтверждали с помощью ДСН-ПААГ. Функциональную активность конъюгированного белка оценивали с помощью ELISA: для этой цели конъюгированный с KLN VEGF165 (2 мкг/мл) иммобилизовали в течение ночи при 4°C в 96-луночном планшете MaxiSorp (фирма Nunc, Висбаден, Германия). Лунки блокировали раствором казеина (1%). Добавляли серийные разведения VEGFR1 или VEGFR2 и оценивали связывание с использованием конъюгированного с пероксидазой из хрена (HRP) козьего античеловеческого IgG, Fc-специфического (фирма Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Вест-Гров, шт. Пенсильвания, США) и последующей ферментативной реакции в присутствии субстрата ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) (фирма Pierce, Рокфорд, шт. Иллинойс, США). Конъюгированный с KLN белок все еще сохранял способность взаимодействовать с VEGFR1, VEGFR2 и бевацизумабом, это подтверждает, что соответствующие эпитопы VEGF165 все еще являлись доступными.

Пример 1. Иммунизация с использованием различных форматов VEGF индуцирует гуморальный иммунный ответ у лам.

1.1. Иммунизации.

После одобрения Комитетом по этике департамента ветеринарной медицины (Университет Гента, Бельгия), иммунизировали 4 лам (обозначены №№ 264, 265, 266, 267) согласно стандартным протоколам, осуществляя 6 внутримышечных инъекций (100 или 50 мкг/дозу с недельными интервалами) рекомбинантного человеческого VEGF109. Для первой инъекции в день 0 применяли форму в полном адъюванте Фрейнда (фирма Difco, Детройт, шт. Мичиган, США), а для последующих инъекций применяли форму в неполном адъюванте Фрейнда (фирма Difco, Детройт, шт. Мичиган, США). Кроме того, иммунизировали четырех лам (обозначены №№ 234, 235, 280 и 281) согласно следующему протоколу: 5 внутримышечных инъекций с использованием конъюгированного с KLN человеческого VEGF165 (100 или 50 мкг/дозу с двухнедельными интервалами) с четырьмя последующими внутримышечными инъекциями человеческого VEGF109 (первая доза 100 мкг, затем через 2 недели три инъекции с использованием 50 мкг/дозу с недельными интервалами).

1.2. Оценка индуцированных VEGF иммунных ответов у лам.

Для мониторинга VEGF-специфических сывороточных титров применяли анализ ELISA, при осуществлении которого взятый в концентрации 2 мкг/мл рекомбинантный человеческий VEGF 165 или VEGF 109 иммобилизовали в течение ночи при 4°C в 96-луночном планшете MaxiSorp (фирма Nunc, Висбаден, Германия). Лунки блокировали раствором казеина (1%). После добавления разведений сыворотки выявляли связанный общий IgG, используя конъюгированное с пероксидазой из хрена (HRP) козье антитело к иммуноглобулину лам (фирма Bethyl Laboratories Inc., Монтгомери, шт. Техас, США) и осуществляя последующую ферментативную реакцию в присутствии субстрата ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) (фирма Pierce, Рокфорд, шт. Иллинойс, США). Для лам №№ 264, 265, 266 и 267 осуществляли дополнительный анализ методом ELISA, в котором оценивали специфические для изотипа ответы против VEGF165 и VEGF109. Специфические для изотипа ответы выявляли с использованием мышиных МАт, специфически распознающих канонический IgG1 лам и состоящие только из тяжелой цепи IgG2 и IgG3 лам (Daley и др., Clin. Diagn. Lab. Imm. 12, 2005, сс. 380-386), после чего использовали кроличье антимышиное антитело, конъюгированное с HRP (фирма DAKO). Для визуализации полученных с помощью ELISA результатов использовали ТМВ в качестве хромогенного субстрата и определяли абсорбцию при 450 нм. Данные о титрах в сыворотке каждой лампы представлены в табл. 1.

Таблица 1. Антитело-обусловленный специфический сывороточный ответ на обработку VEGF165 и VEGF109 ELISA (твердая фаза сенсibilизирована рекомбинантным белком)

Лама	Иммуноген	Рекомбинантный человеческий EGF165				Рекомбинантный человеческий VEGF109			
		Общий IgG	IgG1	IgG2	IgG3	Общий IgG	IgG1	IgG2	IgG3
234	VEGF165-KLH + VEGF109	++	n/d	n/d	n/d	++	n/d	n/d	n/d
235	VEGF165-KLH + VEGF109	++	n/d	n/d	n/d	++	n/d	n/d	n/d
280	VEGF165-KLH + VEGF109	+	n/d	n/d	n/d	+	n/d	n/d	n/d
281	VEGF165-KLH + VEGF109	+	n/d	n/d	n/d	+	n/d	n/d	n/d
264	VEGF109	n/d	++	+	+	++	++	+	+
265	VEGF109	n/d	++	+	+	+	++	+	+
266	VEGF109	n/d	++	+	+/-	++	++	+	+/-
267	VEGF109	n/d	+/-	-	-	+/-	+/-	-	-

n/d: не определяли.

Пример 2. Клонирование популяций содержащих только тяжелую цепь фрагментов антител и получение фага.

После последней инъекции иммуногена получали образцы иммунных тканей иммунизированных лам в качестве источника В-клеток, которые продуцировали антитела с тяжелой цепью. Как правило, собирали по два 150-миллилитровых образца крови через 4 и 8 дней после последней инъекции антигена и у каждого животного получали биопсию одного лимфатического узла через 4 дня после последней инъекции антигена. Из образцов крови получали мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), используя фиколл-пак согласно инструкциям производителя (фирма Amersham Biosciences, Пискатавей, шт. Нью-Джерси, США). Из РВМС и биопсии лимфатических узлов экстрагировали общую РНК, которую применяли в качестве исходного материала для амплификации с помощью ОТ-ПЦР кодирующих VHH ДНК-сегментов согласно методу, описанному в WO 2005/044858. Для каждой иммунизированной лампы конструировали библиотеку путем объединения общей РНК, выделенной из всех собранных образцов иммунных тканей каждого животного. В целом, метод состоял следующем: популяцию амплифицированных с помощью ПЦР VHH клонировали с использованием специфических сайтов рестрикции в векторе, созданном для облегчения фагового дисплея библиотеки VHH. Вектор выводили из pUC119, и он содержал промотор LacZ, последовательность, кодирующую белок gIII фага M13, ген, обуславливающий устойчивость к ампициллину или карбенициллину, сайт множественного клонирования и гибридную лидерную последовательность gIII-pelB (pAX050). В рамке считывания с кодирующей последовательностью VHH вектор кодировал С-концевую с-тус-метку и His6-MeTKy. Фаг получали согласно стандартным протоколам и хранили после стерилизации фильтрацией при 4°C для последующего применения.

Пример 3. Селекция VEGF-специфических VHH с помощью фагового дисплея.

Фаговые библиотеки VHH применяли для различных стратегий селекции, используя различные условия селекции. Варьировали следующие компоненты: I) формат белка VEGF (rhVEGF165, rhVEGF109 или gmVEGF164), II) метод презентации антигена (твердофазный метод: непосредственно на сенсibilизированных планшетах или через биотиную метку на сенсibilизированных нейтравидином планшетах; или жидкофазный метод: инкубация в растворе с последующей иммобилизацией на сенсibilизированных нейтравидином планшетах), III) концентрацию антигена и IV) метод элюции (элюция с использованием трипсина или конкурентная элюция с использованием VEGFR2). Все селекции осуществляли в 96-луночных планшетах Maxisorp (фирма Nunc, Висбаден, Германия).

Селекции осуществляли следующим образом: фаговые библиотеки инкубировали при КТ с взятым в различных концентрациях антигеном VEGF, либо находящимся в растворе, либо иммобилизованным на твердой подложке. После инкубации в течение 2 ч с последующей интенсивной отмывкой элюировали связанный фаг. Когда для фаговой элюции применяли трипсин, то протеазную активность сразу же нейтрализовали, применяя 0,8мМ протеазный ингибитор ABSF. Сборы фага, обогащенные по сравнению с фоновым уровнем (контроль без антигена), применяли для заражения E. coli. Зараженные клетки E. coli либо применяли для получения фага для следующего цикла селекции (сохранение ("спасение") фага), либо высевали на агаровые пластины (LB+amp+глюкоза (2%)) для анализа индивидуальных клонов VHH. Для скрининга продукта селекции в отношении специфических связывающих агентов индивидуальные колонии изымали из агаровых пластин и выращивали в объеме 1 мл в 96-луночных планшетах с глубокими лунками. Контролируемую LacZ экспрессию VHH индуцировали, добавляя ИПТГ (конечная концентрация 0,1-1мМ). Получали экстракты содержимого периплазматического пространства (пери-

плазматические экстракты) (в объеме ~80 мкл) согласно стандартным методам.

Пример 4. Идентификация связывающих VEGF и блокирующих VEGF-рецептор VHH.

Периплазматические экстракты тестировали в отношении связывания с человеческим VEGF165 с помощью ELISA. В целом, метод состоял в следующем: рекомбинантный человеческий VEGF165 (2 мкг/мл) иммобилизовали при 4°C в 96-луночной планшете MaxiSorp (фирма Nunc, Висбаден, Германия). Лунки блокировали с помощью раствора казеина (1%). После добавления, как правило, 10-кратного разведения периплазматических экстрактов связывание VHH оценивали с использованием мышиного антитела к тус (фирма Roche) и антимышиного антитела, конъюгированного с HRP (фирма DAKO). Клоны, для которых ELISA-сигналы более чем в 3 раза превышали фоновые, рассматривали как клоны VHH, обладающие способностью связывать VEGF.

Кроме того, периплазматические экстракты подвергали скринингу в отношении взаимодействия человеческого VEGF165/человеческий VEGFR2 с использованием AlphaScreen-анализа (гомогенный анализ усиленной за счет эффекта близости люминисценции) для оценки блокирующей способности VHH. Человеческий VEGF 165 биотинилировали с помощью реагента сульфо-NHS-LC-биотин (фирма Pierce, Рокфорд, шт. Иллинойс, США). Химеру человеческого VEGFR2/Fc (фирма R&D Systems, Миннеаполис, шт. Миннесота, США) иммобилизовали с помощью VHH к человеческой Fc-области, который сшивали с акцепторными гранулами согласно инструкциям производителя (фирма Perkin Elmer, Валтхам, шт. Массачусетс, США). Для оценки нейтрализующей способности VHH периплазматические экстракты разводили в соотношении 1/25 в ЗФР-буфере, содержащем 0,03% Твин 20 (фирма Sigma-Aldrich), и предварительно инкубировали с 0,4нМ биотинилированным человеческим VEGF165 в течение 15 мин при комнатной температуре (КТ). Для этой цели добавляли смесь акцепторных гранул (10 мкг/мл) и 0,4нМ VEGFR2-huFc и дополнительно инкубировали в течение 1 ч при КТ в темноте. Затем добавляли донорские гранулы (10 мкг/мл) с последующей инкубацией в течение 1 ч при КТ в темноте. Флуоресценцию измеряли с помощью планшет-ридера типа Envision Multilabel (фирма Perkin Elmer, Уолтем, шт. Массачусетс, США), при длине волны возбуждения 680 нм и длине волны испускания от 520 до 620 нм. Периплазматические экстракты, содержащие "несоответствующий" VHH, применяли в качестве отрицательного контроля. Периплазматические экстракты, содержащие анти-VEGF165 VHH, которые обладали способностью снижать флуоресцентный сигнал более чем на 60% относительно сигнала, соответствующего отрицательному контролю, рассматривали как соответствующие требованиям ("хиты"). Все "хиты", идентифицированные с помощью AlphaScreen, подтверждали с использованием конкурентного ELISA. Для этой цели химеру (1 мкг/мл), содержащую человеческий VEGFR2 (фирма R&D Systems, Миннеаполис, шт. Миннесота, США), применяли для сенсibilизации 96-луночного планшета MaxiSorp (фирма Nunc, Висбаден, Германия). Пятикратные разведения периплазматических экстрактов инкубировали в присутствии биотинилированного человеческого VEGF165 в фиксированной концентрации (4нМ) в ЗФР-буфере, содержащем 0,1% казеина и 0,05% Твин 20 (фирма Sigma-Aldrich). Связывание этих комплексов VHH/bio-VEGF165 с планшетом, сенсibilизованным химерой, содержащей человеческий VEGFR2, выявляли с помощью конъюгированного с пероксидазой из хрена (HRP) экстравидина (фирма Sigma, Сент-Луис, шт. Миссури, США). Идентификационные номера (ID) VHH-последовательностей и соответствующие АК-последовательности VEGF-связывающих (не блокирующих рецептор) VHH и ингибирующих (блокирующих рецептор) VHH представлены в табл. 2 и 3 соответственно.

Таблица 2. ID последовательностей и АК-последовательности одновалентных "не блокирующих рецептор" анти-VEGF VHH (FR, каркасный участок; CDR, гипервариабельный участок)

VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII 01C02/ 58	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCTASGGS FS	SYGMG	WFRQSPGKER EFVS	AISESYNTYCSDS VRG	RFTISRDNKTNTVYLQMN SLTPDDTAIYYCAA	SPTILLTTEQWYKY	WGQCTQVT VSS
VEGFBII 01E07/ 59	EVQLVESGGGLVQA CDSLRLSCVATGRT FR	ASDMG	WFRQAPGKER EFVA	AINWSGLSTFYTD SVKG	RFTISRDNNDGALYLQMN TLKPEDTAVYSCAA	GRIPSSSRFSSPAAYAS	WGQCTQVT VSS
VEGFBII 03D12/ 60	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCTASTSI YT	ITVMA	WFRQAPGKER EFVA	AITWSAPTYYAD SVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDSAIYYCAA	DRFKGRSIVTPSDYRY	WGQCTQVT VSS
VEGFBII 04B08/ 61	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGSA VG	DITVA	WYRQAPGIQR QLVA	TITPSGYTYWDF VKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAIYYCNT	QFY	WGQCTQVT VSS
VEGFBII 05B02/ 62	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	TDDVG	WFRQAPGKER EFVA	VIRWSTGGTYTSD SVKG	RFTISRDNKNTMYLQMN SLKPEDTAVYCAA	RSRPLGAGAWYSGEKHYN Y	WGQCTQVT VSS
VEGFBII 05B03/ 63	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRS FS	HYNMG	WFRQAPGKER EFVA	SIRGGGGSTTYAN SVKD	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYCAA	TAFYRGFPYDYDY	WGQCTQVT VSS
VEGFBII 05B05/ 64	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCVAGSIR FM	SMA	WYRQAPGKIR ELVA	RISGGGTAYVDS VKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKAEDTAVYVCNT	FSSRPNP	WGQCTQVT VSS
VEGFBII 06G02/ 65	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGNI FS	NNAMA	WYRQAPGKQR ELVA	RISGGGGFTYYLD SVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYVCNA	AYRTYNY	WGQCTQVT VSS
VEGFBII 07A03/ 66	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASTSI YS	ITVMA	WFRQAPGKES EFVA	AITWSAPSSYYAD SVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDSAIYYCAA	DRFKGRSIVTRSDYKY	WGQCTQVT VSS
VEGFBII 07A06/ 67	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAVSTSI YS	ISVMA	WFRQAPGKER AFVA	AITWSAPTYYAD SVKG	RFTISRDNKNTVYLQTN SLKPEDSAIYYCAA	DRFKGRSIVTRSDYRY	WGQCTQVT VSS
VEGFBII 07D08/ 68	EVQLVESGGGLVQT GGSLRLSCAASGRT FS	NYAMA	WFRQAPGKER EFVS	AINQRGSNTNYAD SVKG	RFTISRDSAKNSVFLQMN SLKPEDTAVYCAA	STWYGYSTYARREERYRY	WGQCTQVT VSS

VEGFBII 08D09/69	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAASGRS FS	DNVMG	WFRQAAGKER EFVA	HISRGGSRTYAE SVKG	RFTISRDNKTKMYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	SRSVALATARPYDY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 08E07/70	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCTTSGLT FS	SYVMG	WFRQAPGKER EFVA	TISWNKISTITYD SVKG	RFTVSRDNKNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	DASRPTLRIPQY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 08F06/71	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAASGSI VR	SDVMG	WYRQAPGKQR ELVA	FIRSLGSTYYAGS VKG	RFTISRDDAANTVYLQMN NLKPEDTAVYYCNA	RFSGESY	WGQGTPTVT VSS
VEGFBII 08F07/72	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAVSGST FG	LYAMG	WFRQAPGRER EFLS	AITWSAGDTQYAD SVKG	RFTISRDNARNTVNLQMN GLKPEDTAVYYCAG	RQWGGTTYHHGSYAY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 09A09/73	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAASGIR FM	SMA	WYRQAPGKHR ELVA	RISSEGTAYYDS VKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKAEDTAVYYCNT	FSSRPNP	WGAGTTVT VSS
VEGFBII 09A12/74	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAASGRT FS	TDDVG	WFRQAPGKER EFVA	VIRWSTGGTYTSD SVAG	RFTLSRDNAKNTMYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	RSRPLGAGAWYTGETRYD S	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 09D05/75	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAASGLS FS	RYCMG	WFRQAPGKER EFVI	AISEYDNVYTADS VRG	RFTISRDNKSTVYLQMN SLKSEDATVYYCAA	SPTELLSTDEWYKY	WGRGTQVT VSS
VEGFBII 09F05/76	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAASGRT FS	TDDVG	WFRQAPGKER EFVA	VIRWSTGGTYTSD SVKG	RFTLSRDNAKNTMYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	RSRPLGAGAWYTGETRYN Y	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 10C07/77	EVQLVESGGGLVQA GGSRLSLCAASARA FS	NYAMG	WFRQVPGRER SVKG	VITRSPSNTYYTD SVKG	RFTISRDNAKNIIVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	HYWNSDSYTYTDSRWYNY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 10E07/78	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAASGRT FS	NYAMG	WFRQAPGKER VLVA	DISSSGINTYVAD AVKG	RFTISRDNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	SAWWYSQMARDNYRY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 10G04/79	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAASGDT LS	RYAMG	WFRQAPGKER SVKG	SINTSGKRTSYAD SMKG	RFAVSRDNNAKNTGYLQMN SLKLEDTATYYCAA	DRFFGSDSNEPRAYRY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 10G05/80	EVQLVESGGGLVQA GESLRLSCVASGIT FS	NYNMG	WFRQAPGKER EFVA	TIRHHGYDTYYAE SVKG	RFTISRDNNAKNTVYLQMN SLKPEDTALYSCAK	KLFWDMDPKSTGFSS	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 11C08/81	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAASGRT LS	SYGLG	WFRQAPGKER EFVA	AIGWSGSSTYYAD SVKG	RFTVSRVDNAKNTVYLQMN SLEPEDTAVYYCAA	KVRNFNSDWDLLTSYNY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 11C11/82	EVQLVESGGGLVQA GGSRLMLSCAASGRA LS	SYAIG	WFRQAPGRER EFVA	RISWSGANTYYAD SVKG	RFTISRGNNAKNTVYLQMN SLKPEDTAAYYCAA	QTTSKYDNYDARAYGY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 11D09/83	EVQLVESGGGLVQA GGSRLMLSCAASGRA LS	SYAIG	WFRQAPGRER EFVA	RISWSGANTYYAD SVKG	RFTISRGNNAKNTVYLQMN SLKPEDTAAYYCAA	QTTSKYDNYDARAYGY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 11E04/84	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAASGRT FS	SYAMG	WFRQAPGKER EFVA	TISQSGYSTYYAD SVKG	RFTISRDNNAKNTVNLQMN SLKPEDTAVYYCAA	DPFYSYSGSPSPYRY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 11E05/85	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAASGRL FS	FSAMG	WFRQAPGKER EFVA	AFKWSGSTYYAD YVKG	RFTISTDNNAKNI LFLQMN SLKPEDTAYYCAV	DRFYTGRIYSSDEYDY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 11F10/86	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAASTSI YS	ITVMA	WFRQAPGKER EFVA	AITWSAF33YYAD SVKG	RFTISRDNNAKNTVYLQVN SLKPEDSAIYYCAA	DRFKGRSIVTRSDYRY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 11F12/87	EVQLVESGGGLVQS GGSRLRLSCAASGRS FS	SLAMG	WFRQVPKDR EFVA	SISQSGITTSYAD SVKS	RFTISRDSNAKNTVYLQMN LLKPEDTAVYYCAT	SVFYSTALTREPVDYRY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 11G09/88	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAASTSI YS	ITVMA	WFRQAPGKER EFVA	AITWSAPTTSYAD SVKG	RFTISRDNNAKNTVYLQMN SLKPEDSAIYYCAA	DRFKGRSIVTRSDYRY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 12A07/89	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCSVTGRT FN	KYVMG	WFRQAPGNDR EFVA	AITSRDGPYYAD SVKG	RFTISGDNTKNKIFLQMN SLMPEDTAVYYCAI	DEDLYHYSYHFTVRDLY HY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 12B01/90	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLCAASGFT LS	SSWMY	WVRQAPGKGL EWSV	RISPGGLFTYYVD SVKG	RFSVSTDNANNTLYLQMN SLKPEDTALYSCAK	GGAPNYTP	RGRGTQVT VSS
VEGFBII 12C04/91	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAASGSI VR	SDVMG	WYRQAPGKQR ELVA	FIRSLGSTYYAGS VKG	RFTISRDNNAANTVYLQMN NLKPEDTAVYYCNA	RFSGESY	WGQGTPTVT VSS
VEGFBII 12E10/92	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCTASGRT FN	NYVMG	WFRQAPGNER EFVA	AITSTNGPTYAD SVKG	RFTISGDNTKNKVFELQMD SLRPEDTAVYYCAI	DEDLYHYSYHYTRVALY HY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 12G04/93	EVQLVESGGGLVQS GDSRLRLSCAVSGNT FG	LYAMG	WFRQAPGRER EFVS	AITWSAGDTQYAD SVKG	RFTISRDNARNTVNLQMN GLKPEDTAVYYCAG	RQWGGTTYHHGSYAW	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 16C03/94	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAASGRT FS	TDDVG	WFRQAPGKER EFVA	VIRWSTGGTYTSD SVKG	RFTLSRDNAKNTMYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	RSRPLGAGAWYTGENYYN Y	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 16F11/95	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAASGRT SS	GYDMG	WFRQAPGKER EFVT	AITWSGGSTYSPD SVKG	RFTISRDNNAKNTVYLQMN NLTPEDTAVYYCAS	GRIWRSRDYDSEKYYDI	WGHGTQVT VSS
VEGFBII 36C08/96	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAASGRT FS	AYDMG	WFRQAPGKER EFVA	VISWTNSMTYYAD SVKG	RFTISRDNNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAV	DRRRTYSRWRYTGVNDY DY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 37F09/97	EVQLVESGGGLVQT GGSRLRLSCAASGRT FS	AYDMG	WFRQAPGKER EFVA	VISWSGGMTYYAD SVQG	RFTISRDNNAKNTVYLQMN SPKPEDTAVYYCAV	DRRRAYSRWRYTGVNDY EF	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 38A06/98	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAASGRT FS	AYDMG	WFRQAPGKER EFVA	VISWSGGMTYYAD SVKG	RFTISRDNNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAV	DRRRLYSRWRYTGVNDY DY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 39H11/99	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAASGRT FS	AYDMG	WFRQAPGKER EFVA	VISWTGGMTYYAD SVKG	RFTISRDKAKNTVSLQMN SLKPEDTAVYYCAV	DRRRTYSRWRYTGVNEY EY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 41B06/ 100	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAASGRT FS	AYDMG	WFRQAPGKER EFVA	VISWTGDMTYAD SVKG	RFTISRDKAKNTVSLQMN SLKPEDTAVYYCAA	DRRRTYSRWRYTGVNEY EY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 41C05/ 101	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAASGRT FS	VYTMG	WFRQAPGKER EFVA	TISRTGDRTSYAN SVKG	RFTISRENAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYSCAA	GPIAPSPRPREYDY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 41D11/ 102	EVQLMESGGGLVQA GGSRLRLSCAASGRT FS	AYDMG	WFRQAPGKER EFVA	VISWTGGMTYYAD SVKG	RFTISRDKAKNTVSLQMN SLKPEDTAVYYCAV	DRRRTYSRWRYTGVNEY EY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 42F10/ 103	EVQLVESGGGLVQA GGSRLRLSCAASGRT FS	AYDMG	WFRQAPGKER EFVA	VISWSGGMTDYAD SVKG	RFTISRENAKNTQFLQMN SLKPEDTAVYYCAV	GRRRAYSRWRYTGVNEY DY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 86C11/ 104	EVQLVESGGGLVQA GDSRLRLSCTASGRT FN	SYAMG	WFRQAPGKER ESVA	HINRSGSSTYYAD SVKG	RFTISRDNNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	GRYYSSDGVPSASFNY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 86F11/ 105	EVQLVESGGGLVQA GDSRLRLSCFTSART FD	TWAMA	WFRQAPGKER EFIS	AISWSGSMYYTD SVKG	RFTISRDNNAQNTLFLQMN NTAPEDTAVYYCAA	KTVDYDCSAYECYARLEYD	WGRGAQVT VSS
VEGFBII 86G08/ 106	EVQLVESGGGLMQT GDSRLRLSCAASGLR FT	STNMG	WFRQGPGRER EFVA	AITLSGTTYAAEA VKG	RFTISRDNKNKNTVALQMN SLKPEDTAVYYCCA	DPSYYTSRYTKATEYDY	WGQGTQVT VSS

VEGFBII 86G10/ 107	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FN	TYTMG	WFRQTPGTER EFVA	AIRWTVNITYYAD SVKG	RFTISRDKNTKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	QTSAPRSLIRMSNEYFY	WGQGTQVTVS
VEGFBII 86G11/ 108	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGLT FS	LYTVG	WFRQAPGKER EFVA	YISRSNRYYYVD SVKG	RFTLSRDNAKNTVDLQMN SLKPEDTAVYYCAA	TSRGLSSLAGYNY	WGRGTQVTVS
VEGFBII 86H09/ 109	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCTASGSA FK	SYRMG	WFRRTPGKED EFVA	SISWTYGSTFYAD SVKG	RFTMSRDKAKNAGYLQMN SLKPEDTALYYCAA	GAQSDRYNIRSYDY	WGQGTQVTVS
VEGFBII 87B07/ 110	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCTASGFT FS	TSWMH	WVRQAPGKGL EWVS	SIPPVGHFANYAP SVKG	RFTISRDNKNTLFLQMN SLKSEDTAVYYCAK	DSAGRT	KGQGTQVTVS
VEGFBII 88A01/ 111	KVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASERT FS	NYAMD	WFRQAPGKER EFVA	AITRSGGGTYAD SVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	TRSSITVVGVGMEY	WGKGTLVTVS
VEGFBII 88A02/ 112	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGFT FG	DYDIG	WFRQAPGNER EGVS	CITTDVGTYYAD SVKG	RFTISSDNKNTVYLQIN DLKPEDTAIYYCAV	DTQDLGLDIFCRGNGPFD G	WGQGTQVTVS
VEGFBII 88B02/ 113	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCTASGLN LD	DYAIG	WFRQAPGKER EGVS	CISSYDSVYYAD HVKG	RFTISRDSAKNTLYLQMN SLSIEDTGVIYYCAA	EREQLRRRESPHDELLRL CFYGMRY	SGKGTLVTVS
VEGFBII 88E02/ 114	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCVASGFR LD	DYAIG	WFRQAPGKER EAVS	CISSSDTSIDYTN SVKG	RFTFSRDNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	AFRCSGYELRGFPPT	WGQGTQVTVS
VEGFBII 88G03/ 115	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGGT FS	SLAVG	WFRQAPGKER EFVA	RITWSGATTYYAD AVKD	RFTISRDNKNTMYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	DRSPNIINVVTAYEYDY	WGQGTQVTVS
VEGFBII 88G05/ 116	EVQLVESGGGLVQP GASLRLSCAASGDG FT	LYNMG	WFRQAPGKER EFVA	AITSSPMSTYYAD SVKG	RFSISINNDKTTGFLQMN VLKPEDTGVIYCAA	PEGSFRRQYADRAMYDY	WGQGTQVTVS
VEGFBII 88G11/ 117	EVQLVESGGGLAQA GGSLRLSCAASGRT FS	GSDMG	WFRQSPGKER EIVA	AIRLSGSITYYPD SVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	RSTYSYYLALADRGGYDY	WGQGTQVTVS
VEGFBII 88H01/ 118	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCVASGFT LG	TYAIG	WFRQAPGKER EAVS	CMSAGDSIPWYTA SVKG	RFTTSTDNARNTVYLQMN SLKPEDTAHYYYCAA	ARYHGDYCYEGEYYPF	WGQGTQVTVS
VEGFBII 89B04/ 119	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASTSI SS	TNFMG	WYRQAPGKQR ELVA	TITSSSITNYVDS VKG	RFTISRDNKNTVYLQMT SLKPEDTAVYYCHA	RWRWSDVEY	WGKGTLVTVS
VEGFBII 89B08/ 120	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGTT SS	IFAMR	WYRQAPGKQR ELVA	SITRSSITYYADS VKG	RFTPSRDNAKNTVSLQMN SLKPEDTAVYYCNA	AIRPELYSVVNDY	WGQGTQVTVS
VEGFBII 89D04/ 121	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCATSGLT FS	DYNLG	WFRQAPGKER QFVA	VISWRDSFAYYAE PVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	DRVSSRLVLPNTSPDFGS	WGQGTQVTVS
VEGFBII 89F09/ 122	EVQLVESGGGLVQA GDSLRLSCAASGRT FN	NAIMG	WFRQAPGQER EFVA	AMNWRGGPTYAD SVKG	RFTISGDNTKNTVFLQMN FLKPEDTAVYYCAA	DEDLYHYSSYHYSRVDLY HY	WGQGTQVTVS
VEGFBII 89G09/ 123	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGTT SS	IFAMR	WYRQAPGKQR ELVA	SITRSSITYYADS VKG	RFTLSRDNAKNTVSLQMN SLKPEDTAVYYCNA	AIRPELYSVVNDY	WGQGTQVTVS
VEGFBII 89H08/ 124	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGGS FS	SYAPG	WFRQAPGKER EFVA	AFTRSSNIPYYKD SVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN LKPEDTAIYYCAV	NLGSTWSRDQRTYDY	WGQGTQVTVS

Таблица 3. ID последовательностей и АК-последовательности одновалентных блокирующих рецептор анти-VEGF VHH (FR, каркасный участок; CDR, гипервариабельный участок) (SEQ ID NO: 9-46)

VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII 22A10/9	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKEREF VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLT PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 22A11/10	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMA	WFRQAQGKEREF VV	AISSSGGFIYDAV SLEG	RFTISRDNKNTVYLT PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 22B06/11	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAASG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKEREF VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLT PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 22B07/12	EVQLVESGGGLVQ AGDSLRLSCAASG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKEREF VV	AISSSGNYKYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLT NSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLGDTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 22E04/13	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCVASG RTSS	SYSMG	WFRQAQGKEREF VV	AISSSGGSIYDSV SLQG	RFTISRDNKNTVYLT PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYASSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 23A03/14	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCVASG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKEREF VV	AISSSGGYIYDSV SLQG	RFTISRDNKNTVYLT PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 23A06/15	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKEREF VV	AISSSGGFIYDAV SLEG	RFTISRDNKNTVYLT PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 23A08/16	EVQLVESGGGLVQ TGDSLRLSCVASG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKEREF VV	AISNGGYKYDSV SLEG	RFTISRDNKNTVYLT NSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 23A09/17	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFG	SYSMG	WFRQAQGKEREF VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLT PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLPDYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 23B04/18	EVQLVESGGGLVQ TGDSLRLSCEVSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKEREF VV	AISKGGYKYDSV SLEG	RFTISKDNKNTVYLT NSLKPEDTAVYYCAS	SRAYGSSRLRLADTYE Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 23D11/19	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCAFSG RTFS	SYSMA	WFRQAQGKEREF VV	AISSSGGFIYDAV SLEG	RFTISRDNKNTVYLT PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S

VEGFBII 23E05/ 20	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCVAFSG RTSS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGGYIDSV SLQG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 23F02/ 21	EMQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGGYIDSV VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 23F05/ 22	EVQLVESGGGLVQ AGDSLRLSCAASG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGNYKYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ I NSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLGDTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 23F11/ 23	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGGYIDSV VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 23G03/ 24	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFG	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGGYIDSV VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLPGTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 24C04/ 25	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCVAFSG RTSS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGGYIDSV SLQG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 27D08/ 26	EVQLVESGGGLVQ TGDSLRLSCAASG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGYKYDSV SLEG	RFTISRDNKNTVYLQ I NSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 27G07/ 27	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCVAFSG RTSS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGGYIDSV SLQG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 30C09/ 28	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCIASG RTSS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGGYIDSV SLQG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 30E07/ 29	EVQLVESGGGLVQ AGDSLRLSCAASG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGNYKYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ I NSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLGDTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 31C07/ 30	EVQLVESGGGLVQ TGDSLRLSCAASG GTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGGYIDSV VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 39E02/ 31	EVQLVESGGGLVQ PGDPLKLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGGYIDSV VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 39G04/ 32	EVPLVESGGGLVQ AGDSLRLSCAASG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGNYKYDS ASLEG	RFTISRDNKNTVYLQ I NSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLGDTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 40F02/ 33	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMA	WFRQAQGKERE VV	AISGGFIYDAV SLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEGTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 40G07/ 34	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGGYIDSV VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 40H10/ 35	EVQLMESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGGYIDSV VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 41B05/ 36	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGFIYDAV SLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 41G03/ 37	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMA	WFRQAQGKERE VV	AISGGFIYDAV SLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 42A05/ 38	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGGYIDSV VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ M PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 42D05/ 39	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGGYIDSV VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 42F11/ 40	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCVAFSG RTSS	SYSVG	WFRQAQGKERE VV	AISGGGYIDSV SLQG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 56E11/ 41	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGGYIDSV VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDAADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 60A09/ 42	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGGYIDSV VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 61A01/ 43	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGYKYDAV SLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYASSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 62A09/ 44	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAASG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGGYIDSV VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 62D10/ 45	EVQLVESGGGLVQ AGDSLRLSCAASG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGNYKYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ I NSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLGDTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBII 62F02/ 46	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGKERE VV	AISGGYIYDAV SLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S

Скорости диссоциации ингибирующих VHH анализировали с помощью Biacore-анализа (устройство Biacore T100, фирма GE Healthcare). Буфер HBS-EP+ применяли в качестве подвижного буфера и эксперименты проводили при 25°C. Рекombинантный человеческий VEGF165 необратимо иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 посредством аминного сочетания (используя EDC и NHS) до достижения требуемого уровня +/- 1500RU. После иммобилизации поверхности дезактивировали с помощью 10-минутной инъекции 1M этаноламина, pH 8,5. Референс-поверхность активировали и дезактивировали с помощью EDC/NHS и этаноламина соответственно. Периплазматические экстракты, содержащие VHH, инъецировали в виде 10-кратного разведения в подвижном буфере в течение 2 мин со скоростью потока 45 мкл/мин и давали пройти реакции диссоциации в течение 10 или 15 мин. Между введениями различных образцов поверхности регенерировали с помощью буфера для регенерации. Данные соотносили с двумя референс-вариантами путем вычитания кривых, соответствующих референс-каналу, и соответствующих "пустому" варианту, для создания которого осуществляли инъекцию только подвижного буфера. Обработанные кривые оценивали путем подгонки с использованием модели двухфазного расщепления с помощью программного обеспечения Biacore T100 Evaluation v2.0.1. Величины k_d для быстрой фазы и k_d для медленной фазы и % быстрой фазы приведены в табл. 4.

Таблица 4. Скорости диссоциации блокирующих рецептор анти-VEGF VHH, определенные с помощью Biacore-анализа

В-клеточная линия дифференцировки	Уникальный вариант последовательности	ID репрезентативных VHH	k _d (быстрая фаза)	k _d (медленная фаза)	% быстрой фазы	Уровень связывания (RU)
1	1	VEGFBII22B07	1,50E-02	7,80E-05	31	328
1	2	VEGFBII23A08	1,30E-02	5,00E-05	19	502
1	3	VEGFBII23B04	8,80E-03	4,00E-05	12	768
1	4	VEGFBII27D08	2,40E-02	8,10E-05	13	225
1	5	VEGFBII24C04	1,30E-02	3,40E-05	17	456
1	6	VEGFBII27G07	1,30E-02	3,80E-05	18	471
1	7	VEGFBII22E04	1,80E-02	1,10E-04	14	520
1	8	VEGFBII23A03	1,50E-02	3,20E-05	15	487
1	9	VEGFBII22B06	3,80E-02	9,00E-05	23	168
1	10	VEGFBII23A09	2,70E-02	4,60E-05	20	247
1	11	VEGFBII23G03	2,80E-02	8,60E-05	28	141
1	12	VEGFBII22A11	2,20E-02	4,70E-05	12	461
1	13	VEGFBII23A06	1,70E-02	3,70E-05	13	547
1	14	VEGFBII23F11	2,70E-02	1,30E-04	22	134
1	15	VEGFBII22A10	3,70E-02	4,00E-05	19	229
1	16	VEGFBII23F05	1,60E-02	1,30E-04	29	198
1	17	VEGFBII23D11	1,90E-02	5,80E-05	13	510
1	18	VEGFBII23F02	N/d	n/d	n/d	n/d
1	19	VEGFBII23E05	1,50E-02	6,90E-05	18	275
1	20	VEGFBII31C07	3,70E-02	1,50E-04	25	77
1	21	VEGFBII30C09	1,50E-02	7,60E-05	19	264
1	22	VEGFBII30E07	1,70E-02	1,30E-04	29	226
1	23	VEGFBII39G04	1,40E-02	7,40E-04	40	210
1	24	VEGFBII41G03	1,20E-02	2,70E-04	20	332
1	25	VEGFBII41B05	1,90E-02	1,20E-04	16	324
1	26	VEGFBII40F02	1,20E-02	9,80E-05	20	258
1	27	VEGFBII39E02	1,90E-02	2,40E-04	13	181
1	28	VEGFBII42D05	3,30E-02	1,50E-04	26	77
1	29	VEGFBII40G07	1,80E-02	3,20E-04	19	139
1	30	VEGFBII42A05	1,60E-02	3,40E-04	25	118
1	31	VEGFBII42F11	9,10E-03	5,00E-04	46	100
1	32	VEGFBII40H10	1,40E-02	2,90E-04	17	200
1	33	VEGFBII62A09	4,10E-02	1,10E-04	23	84
1	34	VEGFBII60A09	3,70E-02	9,30E-05	20	106
1	35	VEGFBII62F02	1,40E-02	8,50E-05	21	205
1	36	VEGFBII62D10	1,90E-02	1,60E-04	40	94
1	37	VEGFBII61A01	7,40E-03	1,70E-04	21	275
1	38	VEGFBII56E11	3,30E-02	1,40E-04	24	76

n/d, не определяли.

Пример 5.

Характеризация очищенных анти-VEGF VHH Три обладающих ингибирующим действием анти-VEGF VHH VEGFBII23B04, VEGFBII24C4 и VEGFBII23A6 отбирали для дополнительной характеристики в виде очищенных белков. Эти VHH экспрессировали в клетках E. coli TG1 в виде меченных с-тус, His6 белков. Экспрессию индуцировали путем добавления 1 mM ИПТГ и давали осуществляться в течение 4 ч при 37°C. После центрифугирования клеточных культур получали периплазматические экстракты путем замораживания-оттаивания дебриса. Эти экстракты использовали в качестве исходного материала для очистки VHH с помощью ИМАХ (хроматография на иммобилизованном металле) и гель-фильтрации (ГФ). Конечные VHH-препараты имели чистоту 95% по данным анализа методом ДСН-ПААГ.

5.1. Оценка способности VHH блокировать взаимодействие: человеческий VEGF165/VEGFR2 с помощью ELISA, предназначенного для определения блокирующего действия в отношении взаимодейст-

вия: человеческий VEGF165/человеческий VEGFR2-Fc.

Блокирующую способность VHH оценивали с помощью ELISA, предназначенного для определения блокирующего действия в отношении взаимодействия: человеческого VEGF165/человеческий VEGFR2-Fc. В целом, метод состоял в следующем: содержащую VEGFR2-Fc химеру (1 мкг/мл) (фирма R&D Systems, Миннеаполис, шт. Миннесота, США) применяли для сенсibilизации 96-луночного планшета MaxiSorp (фирма Nunc, Висбаден, Германия). Серии разведений (в диапазоне концентраций от 1 мМ до 64 пМ) очищенных VHH в 3ФП-буфере, содержащем 0,1% казеина и 0,05% Твин 20 (фирма Sigma), инкубировали в присутствии 4 нМ биотинилированного VEGF165. Остаточное связывание bio-VEGF165 с VEGFR2 выявляли с помощью конъюгированного с пероксидазой из хрена (HRP) экстравидина (фирма Sigma, Сент-Луис, шт. Миссури, США) и ТМБ в качестве субстрата. В качестве контролей применяли параллельно бевацизумаб (Avastin®) и ранибизумаб (Lucentis®). Кривые зависимости ингибирования от дозы представлены на фиг. 1, соответствующие значения IC_{50} и величины процента ингибирования обобщены в табл. 5.

Таблица 5. Значения IC_{50} (нМ) и % ингибирования для одновалентных VHH, установленные с помощью конкурентного ELISA, характеризующие способность ингибировать взаимодействие hVEGF165/hVEGFR2-Fc

VHH ID	IC_{50} (нМ)	% ингибирования
VEGFBII23B04	2,1	100
VEGFBII23A06	3,0	100
VEGFBII24C04	2,5	100
ранибизумаб	1,6	100
бевацизумаб	1,7	100

5.2. Оценка способности VHH блокировать взаимодействие: человеческого VEGF165/VEGFR1 с помощью ELISA, предназначенного для определения блокирующего действия в отношении взаимодействия: человеческого VEGF165/человеческий VEGFR1-Fc.

VHH оценивали также с помощью ELISA, предназначенного для определения блокирующего действия в отношении взаимодействия: человеческого VEGF165/человеческий VEGFR1-Fc. В целом, метод состоял в следующем: содержащую VEGFR1-Fc химеру (2 мкг/мл) (фирма R&D Systems, Миннеаполис, шт. Миннесота, США) применяли для сенсibilизации 96-луночного планшета MaxiSorp (фирма Nunc, Висбаден, Германия). Серии разведений (в диапазоне концентраций от 1 мМ до 64 пМ) очищенных VHH в 3ФП-буфере, содержащем 0,1% казеина и 0,05% Твин 20 (фирма Sigma), инкубировали в присутствии 0,5 нМ биотинилированного VEGF165. Остаточное связывание bio-VEGF165 с VEGFR1 выявляли с помощью конъюгированного с пероксидазой из хрена (HRP) экстравидина (фирма Sigma, Сент-Луис, шт. Миссури, США) и ТМБ в качестве субстрата. В качестве контролей во всех случаях применяли бевацизумаб, ранибизумаб и несоответствующий VHH (2Е6). Кривые зависимости ингибирования от дозы представлены на фиг. 2; соответствующие значения IC_{50} и % ингибирования обобщены в табл. 6.

Таблица 6. Значения IC_{50} (нМ) и % ингибирования для одновалентных VHH, установленные с помощью конкурентного ELISA, характеризующие способность ингибировать взаимодействие: hVEGF165/hVEGFR1-Fc

VHH ID	IC_{50} (нМ)	% ингибирования
VEGFBII23B04	0,5	64
VEGFBII23A06	0,9	55
VEGFBII24C04	0,8	71
ранибизумаб	1,2	91
бевацизумаб	1,5	96

5.3 Оценка анти-VEGF165 VHH с помощью AlphaScreen-анализа, предназначенного для определения способности блокировать взаимодействие: человеческого VEGF165/человеческий VEGFR2-Fc.

Блокирующую способность VHH оценивали также с помощью AlphaScreen-анализа, предназначенного для оценки блокирующего действия в отношении взаимодействия: человеческого VEGF165/человеческий VEGFR2-Fc. В целом, метод состоял в следующем: серийные разведения очищенных VHH (в диапазоне концентраций от 200 нМ до 0,7 пМ) в 3ФП-буфере, содержащем 0,03% Твин 20 (фирма Sigma), добавляли к 4 пМ bio-VEGF165 и инкубировали в течение 15 мин. Затем добавляли VEGFR2-Fc (0,4 нМ) и сенсibilизированные анти-Fc VHH акцепторные гранулы (20 мкг/мл) и указанную смесь инкубировали в течение 1 ч в темноте. И, наконец, добавляли покрытые стрептавидином донорские гранулы (20 мкг/мл) и после инкубации в течение 1 ч в темноте измеряли флуоресценцию с помощью ридера для микропланшетов типа Envision. Кривые дозовой зависимости представлены на фиг. 3. Значения IC_{50} , характеризующие способность VHH блокировать взаимодействие человеческого VEGF165-человеческий VEGFR2-Fc, обобщены в табл. 7.

Таблица 7. Значения IC_{50} (нМ) и % ингибирования для VHH, установленные с помощью конкурентного AlphaScreen, характеризующие способность ингибировать взаимодействие: hVEGF165/hVEGFR2-Fc

VHH ID	IC_{50} (нМ)	% ингибирования
VEGFBII23B04	160	100
VEGFBII23A06	250	100
VEGFBII24C04	250	100
Ранибизумаб	860	100

5.4. Оценка анти-VEGF165 VHH с помощью AlphaScreen-анализа, предназначенного для определения способности блокировать взаимодействие: человеческий VEGF165/человеческий VEGFR1-Fc.

Блокирующую способность VHH оценивали также с помощью AlphaScreen-анализа, предназначенного для оценки блокирующего действия в отношении взаимодействия: человеческий VEGF165/человеческий VEGFR1-Fc. В целом, метод состоял в следующем: серийные разведения очищенных VHH (в диапазоне концентраций от 500 нМ до 1,8 нМ) в 3ФР-буфере, содержащем 0,03% Твин 20 (фирма Sigma), добавляли к 4 нМ bio-VEGF165 и инкубировали в течение 15 мин. Затем добавляли VEGFR1-Fc (1нМ) и сенсibilизированные анти-Fc VHH акцепторные гранулы (20 мкг/мл) и указанную смесь инкубировали в течение 1 ч в темноте. И, наконец, добавляли покрытые стрептавидином донорские гранулы (20 мкг/мл) и после инкубации в течение 1 ч в темноте измеряли флуоресценцию с помощью ридера для микропланшетов типа Envision. Кривые дозовой зависимости представлены на фиг. 4. Значения IC_{50} , характеризующие способность VHH блокировать взаимодействие: человеческий VEGF165-человеческий VEGFR1-Fc, и величины % ингибирования обобщены в табл. 8.

Таблица 8. Значения IC_{50} (нМ) и % ингибирования для VHH, установленные с помощью конкурентного AlphaScreen, характеризующие способность ингибировать взаимодействие: hVEGF165/hVEGFR1-Fc

VHH ID	IC_{50} (нМ)	% ингибирования
VEGFBII23B04	0,9	41
VEGFBII23A06	0,4	46
VEGFBII24C04	0,2	53
ранибизумаб	3,3	79

5.5. Определение аффинности взаимодействия: человеческий VEGF165-VHH.

Кинетические характеристики связывания VHH VEGFBII23B4 с hVEGF165 анализировали с помощью SPR с использованием устройства Biacore T100. Рекombинантный человеческий VEGF165 иммобилизовали непосредственно на CM5-чипе путем аминного сочетания (с использованием EDC и NHS). VHH анализировали в различных концентрациях, находящихся в пределах от 10 до 360 нМ. Образцы инъецировали в течение 2 мин и давали пройти реакции диссоциации в течение вплоть до 20 мин при скорости потока 45 мкл/мин. Между инъекциями образцов поверхность чипа регенерировали с помощью 100мМ HCl. HBS-EP+ (Нерес-буфер, pH 7,4 + ЭДТК) применяли в качестве подвижного буфера. Кривые связывания аппроксимировали с помощью модели реакции между двумя состояниями с использованием программного обеспечения Biacore T100 Evaluation v2.0.1. Данные о рассчитанных величинах аффинности анти-VEGF VHH представлены в табл. 9.

Таблица 9. Аффинность K_D (нМ) очищенных VHH к рекombинантному человеческому VEGF165

VHH ID	VEGF165						
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{a1} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{a2} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	k_{d1} (s^{-1})	k_{d2} (s^{-1})	K_D (нМ)
VEGFBII23B04 ^(a)	-	2,1E+05	1,4E-02	-	8,6E-03	2,4E-04	0.7
VEGFBII23A06 ^(a)	-	4,2E+05	2,0E-02	-	5,7E-02	1,0E-04	0.7
VEGFBII24C04 ^(a)	-	3,2E+05	1,8E-02	-	2,6E-02	9,6E-05	0.4

(a) гетерогенная кривая связывания приводила к невозможности осуществления аппроксимации с использованием модели 1:1, кривые аппроксимировали на основе модели реакции с двумя состояниями с использованием программного обеспечения Biacore T100 Evaluation v2.0.1.

5.6. Связывание с мышинным VEGF164.

Перекрестную реактивность с мышинным VEGF164 определяли с помощью предназначенного для оценки связывания ELISA. В целом, метод состоял в следующем: рекombинантный мышинный VEGF164 (фирма R&D Systems, Миннеаполис, шт. Миннесота, США) (1 мкг/мл) применяли для сенсibilизации в течение ночи при 4°C 96-луночного планшета MaxiSorp (фирма Nunc, Висбаден, Германия). Лунки блокировали раствором казеина (1% в 3ФР). VHH вносили в виде серийных разведений (диапазон концентраций: 500 нМ - 32 нМ) в 3ФР-буфере, содержащем 0,1% казеина и 0,05% Твин 20 (фирма Sigma), и связывание оценивали с помощью мышинового антитела к тус (фирма Roche) и антимышиного антитела, конъюгированного с HRP (фирма DAKO), и последующей ферментативной реакции в присутствии субстрата TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) (фирма Pierce, Рокфорд, шт. Иллинойс, США) (фиг. 5). МАт, вступающее в реакцию с мышинным VEGF164, применяли в качестве положительного контроля. В каче-

стве эталона оценивали также связывание с человеческим VEGF165. Значения EC_{50} обобщены в табл. 10.

Таблица 10. Значения EC_{50} (пМ), характеризующие связывание VHH с рекомбинантным человеческим VEGF165 и мышинным VEGF164, установленные с помощью ELISA

	RhVEGF165	RmVEGF164
VHH ID	EC_{50} (пМ)	EC_{50} (пМ)
VEGFBII23B04	297	NB
VEGFBII24C04	453	NB
VEGFBII23A06	531	NB

NB - отсутствие связывания.

5.7. Связывание с VEGF121.

Связывание с рекомбинантным человеческим VEGF121 определяли с помощью ELISA, предназначенного для оценки связывания на твердой фазе. В целом, метод состоял в следующем: рекомбинантный человеческий VEGF121 (фирма R&D Systems, Миннеаполис, шт. Миннесота, США) (1 мкг/мл) применяли для сенсibilизации в течение ночи при 4°C 96-луночного планшета MaxiSorp (фирма Nunc, Висбаден, Германия). Лунки блокировали раствором казеина (1% в 3ФР). VHH вносили в виде серийных разведений (диапазон концентраций: 500 нМ - 32 пМ) в 3ФР-буфере, содержащем 0,1% казеина и 0,05% Твин 20 (фирма Sigma), и связывание оценивали с помощью мышинового антитела к тус (фирма Roche) и антимышиного антитела, конъюгированного с HRP (фирма DAKO), и последующей ферментативной реакции в присутствии субстрата ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) (фирма Pierce, Рокфорд, шт. Иллинойс, США) (фиг. 6). В качестве положительного контроля во всех случаях использовали серийные разведения VEGFR2. Значения EC_{50} обобщены в табл. 11.

Таблица 11. Значения EC_{50} (пМ), характеризующие связывание одновалентных VHH с рекомбинантным человеческим VEGF121, установленные с помощью ELISA

VHH ID	EC_{50} (пМ)
VEGFBII23B04	510
VEGFBII24C04	792
VEGFBII23A06	928

5.8 Связывание с представителями семейства VEGF VEGFB, VEGFC, VEGFD и P1GF.

Связывание с VEGFB, VEGFC, VEGFD и P1GF определяли с помощью ELISA, предназначенного для оценки связывания на твердой фазе. В целом, метод состоял в следующем: VEGFB, VEGFC, VEGFD и P1GF (фирма R&D Systems, Миннеаполис, шт. Миннесота, США) (1 мкг/мл) применяли для сенсibilизации в течение ночи при 4°C 96-луночного планшета MaxiSorp (фирма Nunc, Висбаден, Германия). Лунки блокировали раствором казеина (1% в 3ФР). VHH вносили в виде серийных разведений (диапазон концентраций: 500 нМ - 32 пМ) и связывание оценивали с помощью мышинового антитела к тус (фирма Roche) и антимышиного антитела, конъюгированного с AP (фирма Sigma, Сент-Луис, шт. Миссури, США). В качестве положительных контролей параллельно использовали серийные разведения соответствующих рецепторов и для обнаружения применяли конъюгированное с пероксидазой из хрена (HRP) козье антитело к человеческому IgG, Fc-специфическое (фирма Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Вест-Гров, шт. Пенсильвания, США), и последующую ферментативную реакцию в присутствии субстрата ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) (Pierce, Рокфорд, шт. Иллинойс, США). Кривые дозовой зависимости для VHH и контролей представлены на фиг. 7. Результаты свидетельствуют об отсутствии выявляемого связывания выбранных VHH с VEGFB, VEGFC, VEGFD или P1GF.

5.9. Группировка эпитопов.

Основанные на Вiasoge-анализе эксперименты по группировке эпитопов осуществляли с целью решения вопроса о том, какие связывающие VEGF агенты связываются с эпитопами, которые являются сходными или перекрывающимися с эпитопами VEGFBII23B04. Для этой цели VEGFBII23B04 иммобилизовали на сенсорном чипе CM5. Для каждого образца человеческий VEGF165 пропускали по поверхности чипа и обратимо иммобилизовали с помощью VEGFBII23B4. Затем очищенные VHH (100 нМ) или периплазматические экстракты (разведение 1/10) инъецировали так, чтобы время контакта с поверхностью составляло 240 с при скорости потока 10 мкл/мин. Между экспериментами с использованием различных образцов поверхность регенерировали с помощью буфера для регенерации (100 мМ HCl). Образованные кривые оценивали с использованием программного обеспечения Вiasoge T100. Установлено, что VHH можно разделить на две группы: первая группа, для которой характерно дополнительное связывание с "захваченным" с помощью VEGFBII23B04 VEGF165, и вторая группа, для которой не обнаружена способность одновременно связываться с "захваченным" с помощью VEGFBII23B04 VEGF165. В табл. 12-А обобщены данные о группировке эпитопов оцененных VHH.

Такой же анализ применяли для решения вопроса о том, могут ли VEGFR1, VEGFR2, ранибизумаб и бевацизумаб связываться с человеческим VEGF-165 одновременно с VEGFBII23B04. В табл. 12-Б представлены данные о дополнительном связывании с "захваченным" с помощью VEGFBII23B04 VEGF165. Только VEGFR2 не обладал способностью связываться с "захваченным" с помощью

VEGFBII23B04 VEGF165, что подчеркивает блокирующее действие VEGFBII23B04 в отношении взаимодействия VEGF-VEGFR2. Кроме того, указанные данные демонстрируют, что распознаваемый VEGFBII23B04 эпитоп не соответствует эпитопу, распознаваемому бевацизумабом и ранибизумабом.

Таблица 12-А. Группировка эпитопов анти-VEGF VHN - одновременное связывание с VEGFBII23B04

Дополнительное	1C02	1E07	4B08	8E07	8F07	12A07	12B01	86C11	86F11	86G08
связывание отсутствует или имеет место низкое дополнительное связывание с «захваченным» с помощью 23B04 VEGF165*	86G10	86G11	87B07	88A01	88A02	88B02	88E02	88G03	88G05	88G11
	88H01	89B04	89D04	89F09	89G09	89H08	24C04	23A6	27G07	23B04
Имеет место дополнительное связывание с «захваченным» с помощью 23B04 VEGF165	3D12	5B02	5B03	5B05	6G02	7D08	8D09	8F06	10C07	10E07
	10G04	10G05	11C08	11D09	11E04	11E05	11F12	86H09	41C05	

* свидетельствует о наличии таких же или перекрывающихся эпитопов.

Таблица 12-Б. Группировка эпитопов VEGFBII23B04 - связывание эталонных (benchmark) ингибиторов или когнатных рецепторов с "захваченным" с помощью VEGFBII23B04 VEGF165

Стадия инъекции	Связывающий агент	Концентрация образца	Уровень связывания (RU)
1	VEGF165	100нМ	1727
2	VEGFBII23B04	100нМ	-
3	ранибизумаб	100нМ	763
4	бевацизумаб	100нМ	1349
5	VEGFR1	100нМ	1011
6	VEGFR2	100нМ	-

5.10. Характеризация анти-VEGF VHN с помощью анализа пролиферации клеток HUVEC.

Эффективность отобранных VHN оценивали с помощью анализа пролиферации. В целом, метод состоял в следующем: прежде всего HUVEC-клетки (фирма Technoclone) выращивали в минимальной среде в течение ночи и затем высевали в четырех повторностях по 4000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты для культуры ткани. Клетки стимулировали в течение 5 мин с помощью 33 нг/мл VEGF в отсутствии или в присутствии VHN. Уровни пролиферации измеряли по включению [³H]-тимидина в день 4. Результаты анализа пролиферации HUVEC, представленные в табл. 13.

Таблица 13. Значения IC₅₀ (нМ) и % ингибирования для одновалентных VEGFBII23B04, VEGFBII23A06 и VEGFBII24C04, установленные в анализе индуцируемой VEGF пролиферации клеток HUVEC

VHN ID	IC ₅₀ (нМ)	% ингибирования
VEGFBII23B04	0,36	91
бевацизумаб	0,21	92

VHN ID	IC ₅₀ (нМ)	% ингибирования
VEGFBII23A06	4,29	73
VEGFBII24C04	3,8	79
бевацизумаб	0,78	78

5.11. Характеризация анти-VEGF VHN с помощью анализа фосфорилирования Erk в клетках HUVEC.

Эффективность отобранных VHN оценивали с помощью анализа фосфорилирования Erk в клетках HUVEC. В целом, метод состоял в следующем: прежде всего HUVEC-клетки выращивали в минимальной среде в течение ночи, затем стимулировали с помощью 10 нг/мл VEGF в течение 5 мин в отсутствии или в присутствии VHN. Клетки фиксировали 4% формальдегида в 3ФР и уровни фосфорилирования ERK оценивали с помощью ELISA, используя специфические для фосфо ERK антитела (антитело к фосфоМАР-киназе pERK1/2, M8159, фирма Sigma) и поликлональное кроличье антитело к мышиному иммуноглобулину, конъюгированное с HRP (PO161, фирма Dako). Как видно из табл. 14, VEGFBII23B4 и бевацизумаб ингибировали индуцируемое VEGF фосфорилирование Erk по меньшей мере на 90%, что характеризовалось значениями IC₅₀ <1 нМ.

Панель из 40 двухвалентных VHH тестировали в отношении способности блокировать VEGFR2 и VEGFR1 с помощью AlphaScreen-анализа, описанного в примерах 5.3 и 5.4 соответственно. На основе эффективности и максимального уровня ингибирования выбирали пять самых перспективных двухвалентных VHH (VEGFBII021, VEGFBII022, VEGFBII023, VEGFBII024 и VEGFBII025) для дополнительной характеристики. Обзор результатов скрининга пяти отобранных двухвалентных VHH, проведенного с помощью конкурентного AlphaScreen-анализа в отношении VEGFR2 и VEGFR1, представлен в таблице 16.

Таблица 16. Сила и эффективность пяти отобранных двухвалентных VHH в отношении взаимодействия: VEGF/VEGFR1 и VEGF/VEGFR2, установленные с помощью конкурентного AlphaScreen-анализа

VHH ID	VEGFR2	VEGFR1	
	IC ₅₀ (пМ)	IC ₅₀ (пМ)	% ингибирования
VEGFBII021	9	16	100
VEGFBII022	7	8	100
VEGFBII023	38	44	91
VEGFBII024	12	46	100
VEGFBII025	51	39	82

Пример 7. Характеризация форматированных анти-VEGF VHH.

VHH VEGFBII010, VEGFBII021, VEGFBII022, VEGFBII023, VEGFBII024 и VEGFBII025 сравнивали в параллельных опытах в отношении блокирования VEGFR2 и VEGFR1 с помощью ELISA (фиг. 8 и 9, табл. 17 и 18 соответственно) и AlphaScreen-анализа (фиг. 10 и 11, табл. 19 и 20) согласно методам, описанным в примерах 5.1, 5.2, 5.3 и 5.4 соответственно.

Таблица 17. Значения IC₅₀ (пМ) и % ингибирования для форматированных VHH, установленные с помощью конкурентного ELISA, характеризующие способность ингибировать взаимодействие:

hVEGF165/hVEGFR2-Fc

VHH ID	IC ₅₀ (пМ)	% ингибирования
VEGFBII010	49	100
VEGFBII021	204	100
VEGFBII022	164	100
VEGFBII023	213	100
VEGFBII024	292	100
VEGFBII025	577	100
бевацизумаб	315	100
ранибизумаб	349	100

Таблица 18. Значения IC₅₀ (пМ) и % ингибирования для форматированных VHH, установленные с помощью конкурентного ELISA, характеризующие способность ингибировать взаимодействие

hVEGF165/hVEGFR1-Fc

VHH ID	IC ₅₀ (пМ)	% ингибирования
VEGFBII010	73,5	67
VEGFBII021	254	97
VEGFBII022	225	89
VEGFBII023	279	91
VEGFBII024	326	92
VEGFBII025	735	91
бевацизумаб	484	91
ранибизумаб	594	96

Таблица 19. Значения IC₅₀ (пМ) и % ингибирования для форматированных VHH, установленные с помощью конкурентного AlphaScreen-анализа, характеризующие способность ингибировать взаимодействие: hVEGF 165/hVEGFR2-Fc

VHH ID	IC ₅₀ (пМ)	% ингибирования
VEGFBII010	16	100
VEGFBII021	7	100
VEGFBII022	7	100
VEGFBII023	46	100
VEGFBII024	50	100
VEGFBII025	51	100
ранибизумаб	600	100

Таблица 20. Значения IC_{50} (пМ) и % ингибирования для форматованных VHH, установленные с помощью конкурентного AlphaScreen-анализа, характеризующие способность ингибировать взаимодействие: hVEGF165/hVEGFR1-Fc

VHH ID	IC_{50} (пМ)	% ингибирования
VEGFBII010	21	70
VEGFBII021	12	100
VEGFBII022	9	98
VEGFBII023	48	87
VEGFBII024	69	98
VEGFBII025	71	82
ранибизумаб	1300	87

Кроме того, оценивали способность форматованных VHH блокировать взаимодействие mVEGF164/mVEGFR2-huFc. В целом, метод состоял в следующем; серийные разведения очищенных VHH (диапазон концентраций: 4 мкМ-14,5 пМ) в ЗФР-буфере, содержащем 0,03% Твин 20 (фирма Sigma), добавляли к 0,1 нМ биотинилированному mVEGF164 и инкубировали в течение 15 мин. Затем добавляли комплекс мышиный VEGFR2-huFc (0,1 нМ) и сенсibilизированные анти-huFc VHH акцепторные гранулы (20 мкг/мл) и указанную смесь инкубировали в течение 1 ч. И, наконец, добавляли покрытые стрептавидином донорские гранулы (20 мкг/мл) и после инкубации в течение 1 ч оценивали флуоресценцию с помощью ридера для микропланшетов типа Envision. Кривые дозовой зависимости представлены на фиг. 12. Данные о значениях IC_{50} , характеризующие способность VHH блокировать взаимодействие мышиный VEGF164/VEGFR2-huFc, обобщены в табл. 21.

Таблица 21. Значения IC_{50} (пМ) и % ингибирования для форматованных анти-VEGF VHH, установленные с помощью конкурентного AlphaScreen-анализа, характеризующие способность ингибировать взаимодействие mVEGF164/m VEGFR2-hFc

VHH ID	IC_{50} (пМ)	% ингибирования
VEGFBII022	108	100
VEGFBII024	-	-
mVEGF164	0,05	100
ранибизумаб	-	-

Оценивали также с помощью ELISA способность форматованных VHH связываться с mVEGF164 и rhVEGF165 (пример 5.6; фиг. 13; табл. 22), VEGF121 (пример 5.7; фиг. 15; табл. 23) и с представителями семейства VEGF VEGFB, VEGFC, VEGFD и P1GF (пример 5.8; фиг. 14). Кинетические характеристики связывания с человеческим VEGF 165 анализировали согласно методу, изложенному в примере 5.5. Величины K_D представлены в табл. 24.

Таблица 22. Значения EC_{50} (пМ) для форматованных VHH, характеризующие связывание с рекомбинантным человеческим VEGF165 и мышиным VEGF164, установленные с помощью ELISA

	rhVEGF165	rmVEGF164
VHH ID	EC_{50} (пМ)	EC_{50} (пМ)
VEGFBII010	428	-
VEGFBII021	334	502
VEGFBII022	224	464
VEGFBII023	221	-
VEGFBII024	320	-
VEGFBII025	668	-

Таблица 23. Значения IC_{50} (пМ) для форматованных VHH, характеризующие связывание с рекомбинантным человеческим VEGF121, установленные с помощью ELISA

	rhVEGF121
VHH ID	EC_{50} (пМ)
VEGFBII010	920
VEGFBII022	540
VEGFBII024	325
VEGFBII025	475

Таблица 24. Аффинность K_D (нМ) очищенных форматованных VHH к рекомбинантному человеческому VEGF165

VHH ID	k_{a1} (1/Мс)	k_{d1} (1/с)	k_{a2} (1/с)	k_{d2} (1/с)	K_D (нМ) ^(а)
VEGFBII010 ^(б)	4,5E+05	1,7E-02	2,9E-02	1,3E-04	0,16
VEGFBII021 ^(б)	1,2E+06	1,1E-02	2,3E-02	1,9E-04	0,07
VEGFBII022 ^(б)	1,2E+06	9,1E-03	1,4E-02	2,6E-04	0,14
VEGFBII023 ^(б)	3,0E+05	1,8E-02	2,4E-02	2,7E-04	0,69
VEGFBII024 ^(б)	3,0E+05	1,3E-02	2,6E-02	2,8E-04	0,47
VEGFBII025 ^(б)	3,3E+05	1,7E-02	1,8E-02	3,7E-04	1,1

(а) $K_D = k_{d1}/k_{a1} \cdot (k_{d2}/(k_{d2}+k_{a2}))$;

(б) аппроксимацию кривых осуществляли на основе модели реакции с двумя состояниями с использованием программного обеспечения Biacore T100 Evaluation v2.0.1.

VHH VEGFBII010, VEGFBII022, VEGFBII024 и VEGFBII025 оценивали также в отношении опосредуемой VEGF пролиферации клеток HUVEC и фосфорилирования Erk.

Эффективность отобранных форматованных VHH оценивали с помощью анализа пролиферации. В целом, метод состоял в следующем: первичные клетки HUVEC (фирма Technoclone) выращивали в минимальной среде в течение ночи и затем по 4000 клеток/лунку высевали в четырех повторностях в 96-луночные планшеты для культуры ткани. Клетки стимулировали с использованием 33 нг/мл VEGF в отсутствие или в присутствии VHH. Уровни пролиферации измеряли по включению [³H]-тимидина в день 4. Результаты, представленные в табл. 25, продемонстрировали, что форматованные VHH и бевацизумаб ингибировали индуцируемую VEGF пролиферацию HUVEC более чем на 90%, при этом значения IC_{50} составляли <1нМ.

Таблица 25. Значения IC_{50} (нМ) и % ингибирования для форматованных VHH, установленные с помощью анализа индуцируемой VEGF пролиферации клеток HUVEC

VHH ID	IC_{50} (нМ)	% ингибирования
VEGFBII010	0,22	95
VEGFBII021	0,40	98
VEGFBII022	0,34	100
VEGFBII023	0,52	98
VEGFBII024	0,38	96
VEGFBII025	0,41	104
бевацизумаб	0,21	92

Эффективность отобранных форматованных VHH оценивали также с помощью анализа фосфорилирования Erk в клетках HUVEC. В целом, метод состоял в следующем: первичные HUVEC-клетки выращивали в минимальной среде в течение ночи, затем стимулировали с помощью 10 нг/мл VEGF в течение 5 мин в отсутствие или в присутствии VHH. Клетки фиксировали 4% формальдегида в ЗФР и уровни фосфорилирования ERK оценивали с помощью ELISA, используя специфические для фосфо ERK антитела (антитело к фосфоМАР-киназе pERK1&2, M8159, фирма Sigma) и поликлональное кроличье антитело к мышинному иммуноглобулину, конъюгированное с HRP (PO161, фирма Dako). Как видно из табл. 26, форматованные VHH и бевацизумаб ингибировали индуцируемое VEGF фосфорилирование Erk более чем на 90%, что характеризовалось значениями IC_{50} <1нМ.

Таблица 26. Значения IC_{50} (нМ) и % ингибирования для форматованных VHH, установленные при анализе индуцируемого VEGF фосфорилирования Erk в клетках HUVEC

VHH ID	IC_{50} (нМ)	% ингибирования
VEGFBII010	0,19	92
VEGFBII021	0,21	103
VEGFBII022	0,18	94
VEGFBII023	0,25	100
VEGFBII024	0,23	94
VEGFBII025	0,23	99
бевацизумаб	0,63	98

Пример 8. Оптимизация последовательностей.

8.1. Оптимизация последовательности VEGFBII23B04.

Осуществляли сравнительный анализ аминокислотных последовательностей VEGFBII23B04 и последовательности человеческой зародышевой линии VH3-23/JH5, см. фиг. 16 (SEQ ID NO: 179).

Сравнительный анализ продемонстрировал, что VEGFBII23B04 содержит 19 мутаций в каркасных

участках относительно референс-последовательности зародышевой линии. Нечеловеческие остатки в положениях 14, 16, 23, 24, 41, 71, 82, 83 и 108 отбирали для замены на их копии из человеческой зародышевой линии. Создавали набор, включающий 8 вариантов VEGFBII23B04, несущих различные комбинации человеческих остатков в этих положениях (АК-последовательности представлены в табл. 27). Конструировали один дополнительный вариант, в котором удаляли потенциальный сайт изомеризации в положении D59S60 (CDR2-участок, см. фиг. 16, остатки обозначены выделенным жирным шрифтом курсивом) путем интродукции мутации S60A.

Таблица 27. АК-последовательность вариантов VHH VEGFBII23B04 с оптимизированной последовательностью (FR, каркасный участок; CDR, гипервариабельный участок)

ID VHH/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII 111D05/47	EVQLVESGGGL VQTGGSLRLSC EASGRTFS	SYSMG	WFRQAPGKEREFV V	AISKGGYK YDSVSLEG	RFTISRDNAKNTVYLQINS LRPEDTAVYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTLLTVS S
VEGFBII 111G06/48	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGRTFS	SYSMG	WFRQAPGKEREFV V	AISKGGYK YDSVSLEG	RFTISRDNAKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTLLTVS S
VEGFBII 112D11/49	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC EASGRTFS	SYSMG	WFRQAPGKEREFV V	AISKGGYK YDSVSLEG	RFTISRDNAKNTVYLQINS LRPEDTAVYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTLLTVS S
VEGFBII 113A08/50	EVQLVESGGGL VQTGGSLRLSC EVSRTFS	SYSMG	WFRQAPGKEREFV V	AISKGGYK YDSVSLEG	RFTISKDNAKNTVYLQINS LRPEDTAVYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTLLTVS S
VEGFBII 113E03/51	EVQLVESGGGL VQTGDSLRLSC EVSRTFS	SYSMG	WFRQAQGKEREFV V	AISKGGYK YDSVSLEG	RFTISKDNAKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTLLTVS S
VEGFBII 114C09/52	EVQLVESGGGL VQPGDSLRLSC EVSRTFS	SYSMG	WFRQAPGKEREFV V	AISKGGYK YDSVSLEG	RFTISKDNAKNTVYLQINS LRPEDTAVYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTLLTVS S
VEGFBII 114D02/53	EVQLVESGGGL VQTGGSLRLSC EVSRTFS	SYSMG	WFRQAPGKEREFV V	AISKGGYK YDSVSLEG	RFTISRDNAKNTVYLQINS LRPEDTAVYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTLLTVS S
VEGFBII 114D03/54	EVQLVESGGGL VQTGDSLRLSC AVSRTFS	SYSMG	WFRQAQGKEREFV V	AISKGGYK YDSVSLEG	RFTISKDNAKNTVYLQINS LRPEDTAVYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTLLTVS S
VEGFBII 118E10/55	EVQLVESGGGL VQTGDSLRLSC EVSRTFS	SYSMG	WFRQAQGKEREFV V	AISKGGYK YDAVSLEG	RFTISKDNAKNTVYLQINS LKPEDTAVYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTQTVS S

Эти варианты характеризовали в виде очищенных белков в отношении взаимодействия VEGF165/VEGFR2 с помощью AlphaScreen-анализа (пример 5.3, фиг. 17). Определяли температуру плавления ($T_{пл}$) для каждого клона с помощью анализа термального сдвига, который основан на оценке увеличения сигнала флуоресценции при включении реагента Sypro Orange (фирма Invitrogen) (Ericsson и др., Anal. Biochem. 357, 2006, сс. 289-298). Для всех вариантов характерны сопоставимые значения IC_{50} при сравнении с VEGFBII23B04, и значения $T_{пл}$, превышающие или близкие к значениям $T_{пл}$ для родительского клона VEGFBII23B04. в табл.28 обобщены данные о значениях IC_{50} изученных 9 клонов и значениях $T_{пл}$ при pH 7.

Таблица 28. Значения IC_{50} (нМ), % ингибирования и температура плавления (pH 7) для вариантов с оптимизированной последовательностью VEGFBII23B04

VHH ID	IC_{50} (нМ)	% ингибирования	$T_{пл}$, pH 7 (°C)
VEGFBII23B04 (wt)	169	100	63
VEGFBII111D05	209	100	68
VEGFBII111G06	366	100	71
VEGFBII112D11	221	100	70
VEGFBII113A08	253	100	69
VEGFBII113E03	290	100	68
VEGFBII114C09	215	100	71
VEGFBII114D02	199	100	74
VEGFBII114D03	227	100	64
VEGFBII118E10	189	100	62

Во втором цикле объединяли приемлемые мутации, полученные в процессе гуманизации (VEGFBII111G06), и мутации, позволяющие избежать возможной пост-трансляционной модификации выбранных сайтов (D16G, замена S60A и мутация E1D), получая клон с оптимизированной последовательностью, выведенный из VEGFBII23B04, а именно, VEGFBII0037. Специально был создан один вариант с оптимизированной последовательностью (VEGFBII0038), который содержал все замены, указанные для VEGFBII0037, за исключением мутации I82M, поскольку эта мутация может быть ассоциирована с небольшим снижением эффективности. Последовательности обоих клонов с оптимизированными последовательностями представлены в табл. 29.

VEGFBII0037 и VEGFBII0038 характеризовали в отношении блокады взаимодействия VEGF165/VEGFR2 с помощью AlphaScreen-анализа (пример 5.3, фиг. 18), температуру плавления определяли с помощью описанного выше анализа термального сдвига, а аффинность связывания с VEGF165 опреде-

ляли с помощью BioSage-анализа (пример 5.5). Обобщение характеристик двух VHH с оптимизированными последовательностями представлено в табл. 30.

Таблица 29. АК-последовательности вариантов с оптимизированной последовательностью VHH VEGFBII23B04

VHH ID/ SEQ ID NO:	FR 1	CDR 1	FR2	CDR 2	FR3	CDR 3	FR 4
VEGFBII037 56	DVQLV ESGGG LVQPG GSLRL SCAAS GRTFS	SYSMG	WFRQ APGKE REFVV	AISKGG YKYDA VSLEG	RFTISRD NAKNTV YLQMNS LRPEDTA VYYCAS	SRAYGS SRLRLA DTYEY	WGQGT LVTVSS
VEGFBII038 57	DVQLV ESGGG LVQPG GSLRL SCAAS GRTFS	SYSMG	WFRQ APGKE REFVV	AISKGG YKYDA VSLEG	RFTISRD NAKNTV YLQINSL RPEDTAV YYCAS	SRAYGS SRLRLA DTYEY	WGQGT LVTVSS

Таблица 30. Значения IC₅₀ (пМ), % ингибирования, температура плавления (pH 7) и аффинность (пМ) для клонов с оптимизированной последовательностью VEGFBII037 и VEGFBII038

VHH ID	IC ₅₀ (пМ)	% ингибирования	T _{пл} (°C), pH 7	K _D (пМ)
VEGFBII23B04	152	100	63	560
VEGFBII037	300	100	72	270
VEGFBII038	143	100	71	360

8.2 Оптимизация последовательности VEGFBII5B05 Осуществляли выравнивание аминокислотных последовательностей VEGFBII23B05 и последовательности человеческой зародышевой линии VH3-23/JH5, см. фиг. 19 (SEQ ID NO: 179). Сравнительный анализ продемонстрировал, что VEGFBII23B05 содержал 15 мутаций в каркасных участках относительно референс-последовательности зародышевой линии. Нечеловеческие остатки в положениях 23, 60, 83, 105, 108 выбирали для замены на их копии из человеческой зародышевой линии, в то время как гистидин в положении 44 выбирали для замены на глутамин. Создавали один гуманизированный вариант, несущий 6 описанных мутаций (АК-последовательности представлены в табл. 31).

Таблица 31. АК-последовательности вариантов с оптимизированной последовательностью VHH VEGFBII5B05 (FR, каркасный участок; CDR, гипервариабельный участок)

VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII119G11/ 125	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAASGI RFM	SMA	WYRQA PGKQRE LVA	RISSG GTTAY ADSVK G	RFTISRD NSKNTV YLQMNS LRAEDTA VYYCNT	FSSRP NP	WGQ GTLV TVSS
VEGFBII120E10/ 126	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCVASGI RFI	SMA	WYRQA PGKHRE LVA	RISSG GTTAY VDSVK G	RFTISRD NSKNTV YLQMNS LKAEDTA VYYCNT	FSSRP NP	WGA GTQV TVSS

Конструировали один дополнительный вариант, в котором потенциальный сайт окисления в положении M30 (CDR1-участок, см. фиг. 19, остаток выделен жирным шрифтом и курсивом) удаляли путем интродукции мутации M30I. Оценивали способность обоих вариантов связываться с hVEGF165 с помощью системы ProteOn. В целом, метод состоял в следующем: сенсорный чип GLC ProteOn сенсibilизировали человеческим VEGF165. Периплазматические экстракты вариантов разводили в соотношении 1/10 и инъецировали на чип, сенсibilизированный человеческим VEGF165. Рассчитывали скорости реакции диссоциации и сравнивали со скоростями реакции диссоциации родительского VEGFBII5B05. Скорости реакции диссоциации двух вариантов оказались такими же, что и скорости реакции диссоциации родительского VEGFBII5B05, это свидетельствует о приемлемости всех мутаций (табл. 32).

Таблица 32. Скорости реакции диссоциации вариантов VEGFBII5B05 с оптимизированной последовательностью

VHH ID	Уровень связывания (RU)	k _d (1/с)
VEGFBII5B05	242	6,15 ^E -02
VEGFBII119G11	234	7,75 ^E -02
VEGFBII120E10	257	4,68 ^E -02

Во втором цикле объединяли мутации, полученные в процессе гуманизации, и замену M30I, получая клон с оптимизированной последовательностью, выведенный из VEGFBII23B05, обозначенный как

VEGFBII032. Последовательность представлена в табл. 33. Аффинность VEGFBII032 определяли с помощью Висоге-анализа (см. пример 5.5), а температуру плавления определяли с помощью описанного выше анализа термального сдвига. Обобщение характеристик VHH VEGFBII032 с оптимизированной последовательностью представлено в табл. 34.

Таблица 33. АК-последовательность клона с оптимизированной последовательностью VEGFBII032 (FR, каркасный участок; CDR, гипервариабельный участок)

VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII032/ 127	EVQLVE SGGGLV QPGGSL RLSCAA SGIRFI	SMA	WYRQA PGKQRE LVA	RISSG GTTA YADS VKG	RFTISRDNK NTVYLQMNS LRAEDTAVY YCNT	FSSRP NP	WGQGT LTVSS

Таблица 34. Температура плавления (pH 7) и аффинность (нМ) клона с оптимизированной последовательностью VEGFBII032

VHH ID	T _{пл} (°C), pH 7	K _D (нМ)
VEGFBII5B05(wt)	69	32
VEGFBII0032	71	44

Эффективность клонов с оптимизированной последовательностью VEGFBII037 и VEGFBII038 оценивали с помощью анализа пролиферации. В целом, метод состоял в следующем: первичные клетки HUVEC (фирма Technoclone) выращивали в минимальной среде в течение ночи и затем по 4000 клеток/лунку высевали в четырех повторностях в 96-луночные планшеты для культуры ткани. Клетки стимулировали с использованием 33 нг/мл VEGF в отсутствии или в присутствии VHH. Уровни пролиферации оценивали по включению [³H]-тимидина в день 4. Результаты, представленные в табл. 35, демонстрируют что активность (эффективность и степень ингибирования) родительского VHH VEGFBII23B04 полностью соответствовала активности клона с оптимизированной последовательностью VEGFBII038.

Таблица 35. Значения IC₅₀ (нМ) и % ингибирования для клонов с оптимизированной последовательностью VEGFBII037 и VEGFBII038, установленные в анализе индуцируемой VEGF пролиферации клеток HUVEC

VHH ID	IC ₅₀ (нМ)	% ингибирования
VEGFBII23B04	0,68	92
VEGFBII037	1,54	78
VEGFBII038	0,60	92
бевацизумаб	0,29	94

Пример 9. Конструирование, получение и характеристика двухвалентных VHH, мишенью которых является Ang2.

Осуществляли генетическое слияние VHH 1D01 (SEQ ID NO: 214), 11B07, 00908 и 00027 (SEQ ID NO: 216) с 1D01 (SEQ ID NO: 214), 11B07, 00908 и 00027 (SEQ ID NO: 216) соответственно с получением гомодимерных VHH. Двухвалентные VHH соединяли через гибкий линкер 9-GlySer или 40-GlySer. Кодировующие последовательности форматированных VHH клонировали в экспрессионном векторе pAX172. VHH экспрессировали в *Pichia pastoris* в виде белков, меченных на С-конце с помощью тус - His6. В целом, метод состоял в следующем: начинали создание культуры BGCM с индивидуальной колонии, полученной посевом штрихом, которую инкубировали в течение выходных дней при 30°C (250 об/мин). После замены среды на BMCM культуры инкубировали до вечера при 30°C (250 об/мин) и осуществляли последующую индукцию с использованием 100% метанола. На следующий день культуры индуцировали еще трижды (утром, днем и вечером). На следующий день культуры центрифугировали в течение 20 мин при 4°C (1500xg). Меченные с помощью His6 VHH, присутствующие в супернатанте, очищали с помощью хроматографии на иммобилизованном металле (ИМАХ) с последующим обессоливанием (DS) и, наконец, гель-фильтрации (ГФ) для удаления любых эндотоксинов/примесей. Обзор форматов и последовательностей всех двухвалентных VHH представлен на фиг. 20 и в табл. 36-А (линкерные последовательности подчеркнуты), SEQ ID NO: 180-185. Уровни экспрессии представлены табл. 36-Б.

Для исследования блокирующих свойства антител к Ang2 в сравнении с одновалентными конструктивными элементами двухвалентные VHH анализировали в отношении блокады взаимодействий: человеческого Ang2/hTie2 (фиг. 21-1), мышинный Ang2/mTie2 (фиг. 21-2), Ang2 обезьяны циномолгус (супо) /сTie2 (фиг. 21-3) и человеческого Ang1/hTie2 (фиг. 22) с помощью конкурентного ELISA. Обобщение данных о значениях IC₅₀ представлено в табл. 37.

Таблица 36-А

Последовательности двухвалентных VHH, мишенью которых является Ang2	
VHH ID	AK-последовательность
ANGBII00001	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREGVSCIRCS DGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 180)
ANGBII00002	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREGVSCIRCS DGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 181)
ANGBII00003	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREGVSCIRCS DGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 182)
ANGBII00004	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREGVSCIRCS DGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 183)
ANGBII00005	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREGVSCIRCS DGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 184)
ANGBII00006	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREGVSCIRCS DGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 185)

Таблица 36-Б

VHH ID	Формат	Уровень экспрессии (мг/л)
ANGBII00001		31
ANGBII00002		37
ANGBII00003		28
ANGBII00004		651
ANGBII00005		203
ANGBII00006		3

Таблица 37. Значения IC₅₀ (нМ), характеризующие блокаду взаимодействий: человеческий Ang2/человеческий Tie2, мышиный Ang2/мышиный Tie2, супо Ang2/супо Tie2 и hAng1/hTie2, полученные с помощью конкурентного ELISA

		hAng2	mAng2	cAng2	Соотношение hAng1/hAng2
VHH ID	Формат	IC ₅₀ (нМ)	IC ₅₀ (нМ)	IC ₅₀ (нМ)	
1D01		6973	10455	9,484	>10800
ANGBII00001		11	18	27	n.d.
ANGBII00002		20	32	n.d.	n.d.
11B07		15205	10000	16400	> 8570
ANGBII00003		24	47	35	n.d.
00027		541	1785	568	>14878
ANGBII00004		17	33	34	n.d.
ANGBII00005		13	32	n.d.	n.d.
00908		52	85	79	>192014
ANGBII00006		19	28	25	6052631
AMG386		4	3	10	5600

n.d., не определяли.

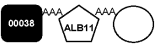
Пример 10. Конструирование, получение и характеристика трехвалентных VHH, мишенью которых являются VEGF и Ang2, созданных с использованием антитела к сывороточному альбумину для удлинения времени полужизни.

Анти-VEGF VHH VEGFBII00038 (US 2011/0172398 A1) и анти-Ang2 VHH 00027 (SEQ ID NO: 216) применяли в качестве конструктивных элементов для создания биспецифических VHH VEGFANGBII00001-00004. Генетическое слияние со связывающим сывороточный альбумин VHH применяли в качестве методологии удлинения времени полужизни. Конструктивные элементы соединяли через гибкий линкер, содержащий три Ala или 9 Gly-Ser. VHH получали и очищали согласно методу, описанному в примере 9. Обзор форматов и последовательностей всех четырех биспецифических VHH представлен на фиг. 23 и в табл. 38-А (линкерные последовательности подчеркнуты), SEQ ID NO: 186-189. Уровни экспрессии представлены табл. 38-Б.

Таблица 38-А

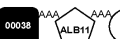
Последовательности биспецифических VHH, мишенью которых являются VEGF и Ang2	
VHH ID	АК-последовательность
VEGFANGBII00001	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDY AIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 186)
VEGFANGBII00002	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDY AIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSGGGGSGGGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 187)
VEGFANGBII00003	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDY AIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVLEGRFTISRDNANTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 188)
VEGFANGBII00004	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLLTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSAAAEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDY AIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYY
Последовательности биспецифических VHH, мишенью которых являются VEGF и Ang2	
VHH ID	АК-последовательность
	ADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 189)

Таблица 38-Б

VHH ID	Формат	Уровень экспрессии (мг/л)
VEGFANGBII00001		13,3
VEGFANGBII00002		11,3
VEGFANGBII00003		15,4
VEGFANGBII00004		19,2

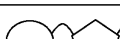
Для исследования блокирующих свойства антител к VEGF в сравнении с одновалентным конструктивным элементом VEGFBII00038 все четыре биспецифических VHH анализировали в отношении блокады взаимодействия VEGF/VEGFR2-Fc (фиг. 22) с помощью конкурентного AlphaScreen. В анализ для его адаптации к рассматриваемому случаю были внесены небольшие изменения по сравнению с анализом, изложенным в примере 12.3 в патенте US 2011/0172398 A1. Как человеческий VEGF165, так и человеческий VEGFR2-Fc добавляли в концентрации 0,05нМ. Этот анализ в условиях конкуренции осуществляли также после предварительной инкубации VHH с 25мкМ человеческим сывороточным альбумином (ЧСА). Обобщенные данные о значениях IC₅₀ и % ингибирования представлены в табл. 39.

Таблица 39. Значения IC_{50} (нМ), характеризующие способность ингибировать взаимодействие: человеческого VEGF165/человеческий VEGFR2, полученные с помощью конкурентного AlphaScreen

VHH ID	Формат	ЧСА	IC_{50} (нМ)	% ингибирования
VEGFBII00038		-	0,5	100
		+	0,5	100
VEGFANGBII00001		-	0,4	100
		+	0,6	100
VEGFANGBII00002		-	0,7	100
		+	1,2	100
VEGFANGBII00003		-	0,6	100
		+	1,3	100
VEGFANGBII00004		-	0,5	100
		+	0,7	100
ранибизумаб		-	0,8	100
		+	1,1	100

Для исследования блокирующих свойств антител к Ang2 в сравнении с одновалентным конструктивным элементом 00027 (SEQ ID NO: 216) все четыре биспецифических VHH анализировали в отношении блокады взаимодействия человеческого Ang2/hTie2-Fc (фиг. 25) с помощью конкурентного ELISA. Этот анализ осуществляли также после инкубации VHH с 0,5мкМ человеческим сывороточным альбумином. Обобщенные данные о значениях IC_{50} представлены в табл. 40.

Таблица 40. Значения IC_{50} (пМ), характеризующие способность ингибировать взаимодействие: человеческого Ang2/человеческий Tie2, полученные с помощью конкурентного ELISA

VHH ID	Формат	ЧСА	IC_{50} (пМ)
00027		-	516
		+	n.d.
VEGFANGBII00001		-	240
		+	179
VEGFANGBII00002		-	463
		+	330
VHH ID	Формат	ЧСА	IC_{50} (пМ)
VEGFANGBII00003		-	273
		+	154
VEGFANGBII00004		-	111
		+	92
AMG386		-	2
		+	n.d.

n.d., не определяли.

Пример 11. Конструирование, получение и характеристика трехвалентных и четырехвалентных VHH, мишенью которых являются VEGF и Ang2, созданных с использованием антитела к сывороточному альбумину для удлинения времени полужизни.

Создавали десять биспецифических VHH, мишенью которых является VEGF и Ang2 (VEGFANGBII00005-00015). В эти конструкции включали одновалентные и двухвалентные конструктивные элементы 1D01 (SEQ ID NO: 214), одновалентные и двухвалентные конструктивные элементы 7G08 (SEQ ID NO: 215) и двухвалентный конструктивный элемент 00027 (SEQ ID NO: 216) анти-Ang2. Генетическое слияние со связывающим сывороточный альбумин VHH применяли в качестве методологии удлинения времени полужизни. Конструктивные элементы соединяли через гибкий линкер 9 Gly-Ser. VHH получали и очищали согласно методу, описанному в примере 8. Обзор форматов и последовательностей всех десяти биспецифических VHH представлен на фиг. 26 и в табл. 41-А (линкерные последовательности подчеркнуты), SEQ ID NO: 190-199. Уровни экспрессии представлены табл. 41-Б.

Таблица 41-А

Последовательности биспецифических VHH, мишенью которых являются VEGF и Ang2	
VHH ID	АК-последовательность
VEGFANGBII00005	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGGTGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFALDYAIGWFRQVPGKEREGVSCISSSDGITYYVDSVKGRFTI SRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCATDSGGYIDYDCMGLGYDYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTTLYLMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGTGLTVSS (SEQ ID NO: 190)
VEGFANGBII00006	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAI
	SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGGTGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI SRDNAKNTTLYLMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGTGLTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYAIGWFRQVPGKEREG VSCISSSDGITYYVDSVKGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAVYYCAT DSGGYIDYDCMGLGYDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 191)
VEGFANGBII00007	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGGTGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFALDYAIGWFRQVPGKEREGVSCISSSDGITYYVDSVKGRFTI SRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCATDSGGYIDYDCMGLGYDYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTTLYLMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGTGLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFALDYAIGWFRQVPGKEREGVSCISSSDGITYYVDSVK GRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAVYYCATDSGGYIDYDCMGLGYDY WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 192)
VEGFANGBII00008	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGGTGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSL RLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTI SSDNDKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAW GGTGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDD YAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGGTGLTVTVSSGG GGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGK GLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTTLYLMNSLKPEDTAVY YCTIGGSLRSSQGTGLTVSS (SEQ ID NO: 193)
VEGFANGBII00009	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGGTGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI SRDNAKNTTLYLMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGTGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREG VSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAA VPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGGTGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYY ADSVKGRFTISSDNDKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQW YPLYEYDAWGGTGLTVTVSS (SEQ ID NO: 194)
VEGFANGBII00010	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGGTGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSL RLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTI SSDNDKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAW GGTGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSS FGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTTLYLQ MNSLKPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGTGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYY ADSVKGRFTISSDNDKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQW YPLYEYDAWGGTGLTVTVSS (SEQ ID NO: 195)
VEGFANGBII00011	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGGTGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSL RLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREGVSCIRSDGSTYYADSVKGRFTI SSDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGGTGLV TVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGW

	RQAAGKEREVSCIRSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGTTLTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 196)
VEGFANGBII00012	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTTLTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREVSCIRSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 197)
VEGFANGBII00013	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTTLTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREVSCIRSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGTTLTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREVSCIRSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 198)
VEGFANGBII00014	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTTLTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREVSCIRSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 199)

Таблица 41-Б

VHH ID	Формат	Уровень экспрессии (мг/л)
VEGFANGBII00005		1,3
VEGFANGBII00006		1,3
VEGFANGBII00007		0,3
VEGFANGBII00008		30,0
VEGFANGBII00009		71,4
VEGFANGBII00010		25,0

VHH ID	Формат	Уровень экспрессии (мг/л)
VEGFANGBII00011		4,0
VEGFANGBII00012		6,6
VEGFANGBII00013		2,9
VEGFANGBII00014		45,6

Для исследования блокирующих свойства антител к VEGF в сравнении с одновалентным конструктивным элементом VEGFBII00038 все десять биспецифических VHH анализировали в отношении блокады взаимодействия: VEGF/VEGFR2-FC (пример 10, фиг. 27-1) и VEGF/VEGFR1 (фиг. 27-2) с помощью конкурентного AlphaScreen. Анализ для VEGFR1 слегка адаптировали по сравнению с анализом, изложенным в примере 12.4 в патенте US 2011/0172398 A1. Как человеческий VEGF165, так и человеческий VEGFR2-Fc добавляли в концентрации 0,05нМ. Эти анализы в условиях конкуренции осуществляли также после предварительной инкубации VHH с 25 мкМ человеческим сывороточным альбумином. Обобщенные данные о значениях IC₅₀ представлены в табл. 42.

Таблица 42. Значения IC_{50} (нМ), характеризующие способность ингибировать взаимодействия: человеческий VEGF165/человеческий VEGFR2 и человеческий VEGF165/человеческий VEGFR1, полученные с помощью конкурентного AlphaScreen

VHH ID	Формат	ЧС А	VEGFR1		VEGFR2	
			IC_{50} (нМ)	% ингибирован ия	IC_{50} (нМ)	% ингибирован ия
VEGFBII00038		-	0,6	67	0,5	100
		+	0,6	64	0,5	100
VEGFANGBII00005		-				
		+				
VEGFANGBII00006		-	0,8	64	1,0	100
		+	1,0	71	1,4	100
VEGFANGBII00007		-				
		+				
VEGFANGBII00008		-	0,6	77	0,3	100
		+	0,7	73	0,4	100
VEGFANGBII00009		-	0,8	71	0,4	100
		+	1,5	72	0,7	100
VEGFANGBII00010		-	0,5	72	0,3	100
		+	1,1	78	0,7	100
VHH ID	Формат	ЧС А	IC_{50} (нМ)	% ингибирован ия	IC_{50} (нМ)	% ингибирован ия
VEGFANGBII00001		-	0,6	68	0,4	100
		+	0,8	76	0,6	100
VEGFANGBII00011		-	0,8	74	0,9	100
		+	2,5	81	0,8	100
VEGFANGBII00012		-	1,0	74	0,4	100
		+	1,5	80	0,7	100
VEGFANGBII00013		-				
		+				
VEGFANGBII00014		-	0,8	69	0,4	100
		+	1,0	80	0,7	100
Ранибизумаб		-	2,5	92	1,2	100
		+	5,3	86	1,1	100

n.d., не определяли.

Для исследования блокирующих свойства антител к Ang2 в сравнении с соответствующим одновалентным конструктивным элементом 7G08 (SEQ ID NO: 215), 1D01 (SEQ ID NO: 214) и 00027 (SEQ ID NO: 216) все десять биспецифических VHH анализировали в отношении блокады взаимодействий: человеческий Ang2/hTie2-Fc (см. пример 5.1, фиг. 28-1), мышинный Ang2/mTie2-Fc (см. пример 5.2; фиг. 28-2) и супо Ang2/cTie2-Fc (см. пример 5.2; фиг. 28-3) с помощью конкурентного ELISA. Этот анализ осуществляли также после инкубации VHH с 0,5мкМ человеческим сывороточным альбумином. Дополнительно осуществляли анализ опосредуемой hAng2 выживаемости клеток HUVEC (см. пример 5.5; фиг. 29). Обобщенные данные о значениях IC_{50} и % ингибирования представлены в табл. 43.

Таблица 43. Значения IC_{50} (пМ) и % ингибирования, характеризующие способность ингибировать взаимодействия: человеческий Ang2/человеческий Tie2, мышинный Ang2/мышинный Tie2 и супо Ang2/супо Tie2, полученные с помощью конкурентного ELISA, и значения IC_{50} (нМ) и % ингибирования, полученные при анализе опосредуемой hAng2 выживаемости клеток HUVEC

VHH ID	Формат	ЧСА	hAng2		mAng2		cAng2		Выживаемость клеток HUVEC	
			IC_{50} (пМ)	% инг.	IC_{50} (пМ)	% инг.	IC_{50} (пМ)	% инг.	IC_{50} (нМ)	% инг.
7G08		+	110	100					1,5	100
		-								
VEGFANGBII00005		-								
		+								
VEGFANGBII00006		-	560	100					4,9	100
		+	400	100						
VEGFANGBII00007		-								
		+								
AMG386		-	5	100					1,2	100
		+	4	100						
00027		-	540	100	1,800	100	570	100	2,0	100
		+								
VEGFANGBII00001		-	360	100	1,300	100	390	100	5,7	100
		+	290	100						
VEGFANGBII00008		-	47	100	71	100	79	100	5,6	100
		+	52	100						
VEGFANGBII00009		-	33	100	36	100	46	100	3,6	100
		+	39	100						
VEGFANGBII00010		-	32	100	78	100	59	100		
		+	49	100						
AMG386		-	5	100	4	100	3	100	1,3	100
		+	4	100						
1D01		-	7,000	100	10,000	100	9,500	100	7,8	100
		+								

VHH ID	Формат	ЧСА	IC ₅₀ (нМ)	% инг.	IC ₅₀ (нМ)	% инг.	IC ₅₀ (нМ)	% инг.	IC ₅₀ (нМ)	% инг.
VEGFANGBII00011		-	31	100	56	100	95	100	3,7	100
VEGFANGBII00012		-	40	100	68	100	100	100	3,6	100
VEGFANGBII00013		-								
VEGFANGBII00014		-	710	100	1,000	100	1,100	100		
AMG386		-	4	100	4	100	10	100	1,3	

n.d., не определяли.

Определяли аффинность к человеческому сывороточному альбумину, результаты представлены в табл.44. В целом, метод состоял в следующем: человеческий сывороточный альбумин (фирма Sigma, Сент-Луис, шт. Миссури, США) иммобилизовали на CM5-чипе путем аминного сочетания. Использовали подход, основанный на применении нескольких циклов кинетического анализа: инъецировали VHH в возрастающих концентрациях (2-8-31-125-500нМ) и давали пройти реакции ассоциации в течение 2 мин и диссоциации в течение 10 мин при скорости потока 100 мкл/мин. Между инъекциями VHH поверхности регенерировали с использованием импульсного внесения в течение 10 с 10мМ глицина-HCl, pH 1,5 и 60-секундного периода стабилизации. Результаты ассоциации/диссоциации оценивали путем аппроксимации с использованием модели взаимодействия 1:1 (связывание по Лэнгмюру) или модели на основе гетерогенных лигандов. Константу аффинности K_D рассчитывали на основе констант скорости ассоциации и диссоциации (k_a) и (k_d) (табл. 44).

Таблица 44. Аффинность (K_D) очищенных VHH к человеческому (ЧСА), обезьян цинолгус (ЦСА) и мышинному сывороточному альбумину (МСА)

	ЧСА			ЦСА			МСА		
	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (нМ)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (нМ)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (нМ)
ALB11	4,5E+05	1,8E-03	4	4,3E+05	1,6E-03	4	6,6E+05	3,2E-02	49
VEGFANGBII00001	2,3E+05	4,8E-03	22	1,8E+05	4,3E-03	24			
VEGFANGBII00005									
VEGFANGBII00006	2,0E+05	4,6E-03	22	1,5E+05	4,5E-03	30	1,7E+05	6,0E-02	360
VEGFANGBII00007									
VEGFANGBII00008	1,3E+05	4,3E-03	34						
VEGFANGBII00009	1,5E+05	4,6E-03	30	1,1E+05	4,2E-03	39	1,2E+05	4,0E-02	340
VEGFANGBII00010									
VEGFANGBII00011	1,3E+05	4,0E-03	31						
VEGFANGBII00012	1,5E+05	4,3E-03	31	1,2E+05	4,2E-03	24	1,0E+05	2,5E-02	240
VEGFANGBII00013									
VEGFANGBII00014									

n.d. - не определяли.

Пример 12. Конструирование, получение и характеристика биспецифических VHH с оптимизированной последовательностью и созревшей аффинностью, мишенью которых являются VEGF и Ang2, созданных с использованием связывания с антителом к сывороточному альбумину для удлинения времени полужизни.

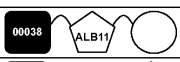
Создавали 14 биспецифических VHH, мишенью которых является VEGF и Ang2 (VEGFANGBII00015-00028). В эти конструкции в качестве анти-Ang2 конструктивных элементов включили двухвалентный 00921 (вариант 1D01 с оптимизированной последовательностью) (SEQ ID NO: 220), одновалентные VHH 00908 - 00932 - 00933 - 00934 - 00935 - 00936 - 00937 - 00938 (варианты 28D10 с оптимизированной последовательностью /с созревшей аффинностью) (SEQ ID NO: 222), двухвалентный 00956 (SEQ ID NO: 223) (вариант 28D10 с оптимизированной последовательностью) и одновалентный 00928 (SEQ ID NO: 221) (вариант 37F02 с оптимизированной последовательностью). Генетическое слияние со связывающим сывороточный альбумин VHH применяли в качестве методологии удлинения времени полужизни. Конструктивные элементы соединяли через гибкий линкер 9 Gly-Ser. Обзор форматов и последовательностей всех 14 биспецифических VHH представлен на фиг. 30 и в табл.45-А (линкерные последовательности подчеркнуты), SEQ ID NO: 200-213. Уровни экспрессии представлены в табл.45-Б.

Таблица 45-А

Последовательности биспецифических VHH, мишенью которых являются VEGF и Ang2	
VHH ID	АК-последовательность
VEGFANGBII00015	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRYGEQWYPIYEYDAWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 200)
VEGFANGBII00016	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRYGEQWYPIYEYDAWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 201)
VHH ID	АК-последовательность
VEGFANGBII00017	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSAIRDNGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRYGEQWYPIYEYDAWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 202)
VEGFANGBII00018	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSAIRESGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRYGEQWYPIYEYDAWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 203)
VEGFANGBII00019	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSAIRSSGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRYGEQWYPIYEYDAWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 204)
VEGFANGBII00020	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSAIRDNGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRYGEQWYPIYEYDAWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 205)
VEGFANGBII00021	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSAIRESGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRYGEQWYPIYEYDAWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 206)
VEGFANGBII00022	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSAIRSSGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRYGEQWYPIYEYDAWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 207)

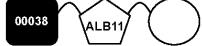
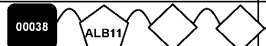
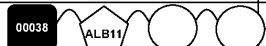
VHH ID	AK-последовательность
VEGFANGBII00023	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTTLYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDY AIGWFRQAPGKEREGVSAIRDNGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNLSRPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDY AIGWFRQAPGKEREGVSAIRDNGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNLSRPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTLLTVSS SEQ ID NO: 208)
VEGFANGBII00024	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDY AIGWFRQAPGKEREGVSAIRDNGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNLSRPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDY AIGWFRQAPGKEREGVSAIRDNGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNLSRPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTTLYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSS SEQ ID NO: 209)
VEGFANGBII00025	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTTLYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAPGKEREGVSCIRCSGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNLSRPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAPGKEREGVSCIRCSGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNLSRPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGTLLTVSS SEQ ID NO: 210)
VEGFANGBII00026	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAPGKEREGVSCIRCSGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNLSRPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAPGKEREGVSCIRCSGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSS SEQ ID NO: 211)
VEGFANGBII00027	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTTLYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDY AIGWFRQAPGKEREGVSCISSGGITYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSRPEDTAVYYCATDSGGYIDYDCSGLGYDYWGQGTLLTVSS SEQ ID NO: 212)
VHH ID	AK-последовательность
VEGFANGBII00028	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTTLYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDY AIGWFRQAPGKEREGVSAIRSSGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNLSRPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDY AIGWFRQAPGKEREGVSAIRSSGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNLSRPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTLLTVSS SEQ ID NO: 213)

Таблица 45-Б

VHH ID	Формат	Уровень экспрессии (мг/л)
VEGFANGBII00022		
VEGFANGBII00025		
VEGFANGBII00028		

Для исследования блокирующих свойства антител к VEGF в сравнении с одновалентным конструктивным элементом VEGFBII00038 биспецифические VHH анализировали в отношении блокады взаимодействия VEGF/VEGFR2-Fc (пример 10, фиг. 31-1) и VEGF/VEGFR1 (пример 11, фиг. 31-2) с помощью конкурентного AlphaScreen. Эти анализы в условиях конкуренции осуществляли также после предварительной инкубации VHH с 25 мкМ человеческим сывороточным альбумином. Обобщенные данные о значениях IC₅₀ представлены в табл. 46-А.

Таблица 46-А. Значения IC_{50} (нМ), характеризующие способность ингибировать взаимодействия: человеческий VEGF165/человеческий VEGFR2 и человеческий VEGF165/человеческий VEGFR1, полученные с помощью конкурентного AlphaScreen

VHH ID	Формат	ЧС А	VEGFR1		VEGFR2	
			IC_{50} (нМ)	% ингибирован ия	IC_{50} (нМ)	% ингибирован ия
VEGFBII00038		-	0,4	57	0,2	100
		+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII00022		-	0,4	64	0,2	100
		+	0,6	75	0,3	100
VHH ID	Формат	ЧС А	IC_{50} (нМ)	% ингибирован ия	IC_{50} (нМ)	% ингибирован ия
VEGFANGBII00025		-	0,6	68	0,2	100
		+	0,9	75	0,3	100
VEGFANGBII00028		-	0,5	64	0,2	100
		+	0,5	64	0,2	100
ранибизумаб		-	3,2	97	0,7	100
		+			0,9	100

n.d., не определяли.

Кинетические характеристики связывания биспецифических VHH с человеческим VEGF165 анализировали с помощью SPR с использованием устройства Biacore T100 (см. пример 12.5 в патенте US 2011/0172398 A1). Одновалентное Nanobody VEGFBII00038 применяли одновременно в качестве стандарта (табл. 46-Б).

Таблица 46-Б. Обобщение данных о кинетических параметрах, полученных с помощью Biacore-анализа с использованием hVEGF165

	k_{a1} (1/Мс)	k_{d1} (1/с)	k_{a2} (1/с)	k_{d2} (1/с)	K_D1 (М)
VEGFBII00038	2,6E+05	1,3E-02	1,3E-02	1,9E-04	7,5E-10
VEGFANGBII00022	1,6E+05	1,4E-02	1,4E-02	2,2E-04	1,4E-09
VEGFANGBII00025	1,1E+05	1,4E-02	1,4E-02	2,1E-04	1,9E-09
VEGFANGBII00028	1,7E+05	1,3E-02	1,3E-02	2,1E-04	1,1E-09

Способность VHH связываться с изоформой человеческого VEGF121 определяли с помощью ELISA, предназначенного для оценки связывания. Связывание серий разведений VHH с человеческим VEGF121 (фирма R&D), который в концентрации 1 мкг/мл применяли для непосредственной сенсibilизации планшетов (человеческий VEGF165 применяли в качестве стандарта), определяли с использованием биотинилированного антитела к VHH 1A4, а затем экстравидина-HRP. 1A4 представляет собой антитело к VHH в виде VHH (созданное в лаборатории фирмы Ablynx NV). Эталонное средство авастин служило в качестве положительного контроля и для его выявления использовали конъюгированное с HRP антитело к человеческому Fc. "Несоответствующий" VHH служил в качестве отрицательного контроля. Репрезентативные кривые, описывающие связывание с VEGF165 и VEGF121, представлены на фиг. 46, соответствующие значения EC_{50} обобщены в табл.46-В.

Таблица 46-В. Обобщенные данные о значениях EC_{50} , характеризующих связывание с hVEGF165 и hVEGF121, полученные с помощью ELISA

	hVEGF165	hVEGF121
	EC_{50} (М)	EC_{50} (М)
VEGFANGBII00022	1,4E-09	2,3 ^E -09
VEGFANGBII00025	1,5E-09	2,5 ^E -09
VEGFANGBII00028	1,2E-09	2,1 ^E -09

Связывание с крысиным и мышиным VEGF164 оценивали с помощью ELISA, предназначенного для оценки связывания. Связывание VHH с мышиным или крысиным VEGF164 (фирма R&D), который в концентрации 1 мкг/мл применяли для непосредственной сенсibilизации планшетов, оценивали с использованием биотинилированного антитела к VHH1A4, а затем экстравидина-HRP. В качестве положительного контроля титровали мышиное/крысиное обладающее перекрестной реактивностью моноклональное антитело B20-4.1 (фирма Genentech) и выявляли с помощью конъюгированного с HRP антитела к человеческому Fc. "Несоответствующий" VHH служил в качестве отрицательного контроля. Результаты представлены на фиг. 33. Все три биспецифических VHH не давали перекрестную реакцию с мышиным и крысиным VEGF.

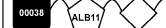
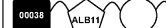
Связывание с человеческими VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и PlGF оценивали с помощью ELISA,

предназначенного для оценки связывания. Связывание VHH с VEGF-B (фирма R&D), VEGF-C (фирма R&D), VEGF-D (фирма R&D) и PlGF (фирма R&D), которые в концентрации 1 мкг/мл применяли для непосредственной сенсibilизации планшетов, оценивали с использованием биотинилированного антитела к VHH 1A4, а затем экстравидина-HRP. В качестве положительного контроля применяли параллельно серии разведений соответствующих рецепторов (hVEGFR1-Fc для hVEGF-B и hPlGF, hVEGFR2-Fc для hVEGF-C, MAT к hVEGF-D (фирма R&D) для hVEGF-D). "Несоответствующий" VHH служил в качестве отрицательного контроля.

Результаты представлены на фиг. 34. Все три биспецифических VHH не связывались с представителями семейства VEGF.

Для исследования блокирующих свойства антител к Ang2 в сравнении с соответствующим одновалентным конструктивным элементом 00921 (SEQ ID NO: 220) и 00938 (SEQ ID NO: 222) все три биспецифических VHH анализировали в отношении блокады взаимодействий человеческий Ang2/hTie2-Fc (см. пример 5.1, фиг. 35-1), мышинный Ang2/mTie2-Fc (см. пример 5.2; фиг. 35-2) и супо Ang2/cTie2-Fc (см. пример 5.2; фиг. 35-3) с помощью конкурентного ELISA. Анализ с человеческими компонентами осуществляли также после инкубации VHH с 0,5мкМ человеческим сывороточным альбумином. Кроме того, биспецифические VHH тестировали в отношении взаимодействия hAng1/hTie2 с помощью конкурентного ELISA (см. пример 5.3; фиг. 36) и осуществляли анализ опосредуемой hAng2 выживаемости клеток HUVEC (см. пример 5.5; фиг. 37). Обобщенные данные о значениях IC₅₀ и % ингибирования представлены в табл. 47-А.

Таблица 47-А. Значения IC₅₀ (пМ), характеризующие способность ингибировать взаимодействия: человеческий Ang2/человеческий Tie2, мышинный Ang2/мышинный Tie2 и супо Ang2/супо Tie2, полученные с помощью конкурентного ELISA, hAng1-ELISA, и значения IC₅₀ (нМ), полученные при анализе опосредуемой hAng2 выживаемости клеток HUVEC

			ELISA							Выживаемость клеток HUVEC	
			Ang2		mAng2		cAng2		hAng1		
VHH ID	Формат	ЧСА	IC ₅₀ (nM)	% инг.	IC ₅₀ (nM)	% инг.	IC ₅₀ (nM)	% инг.	Отношение IC ₅₀ hAng1/hAng2	IC ₅₀ (нМ)	% инг.
00938		-	33	100	58	100	86	100	> 60,395	4,3	100
VEGFANGBII00022		-	50	100	56	100	101	100	> 39,902	1,9	100
		+	45	100	68	100	115	100	> 44,771		
AMG386		-	5	100	2	100	13	100	5,656	1,4	100
00921		-	15,940	100	27,990	100	43,500	100	> 125	18,8	100
VEGFANGBII00025		-	12	100	15	100	38	100	> 160,694	2,2	100
		+	15	100	17	100	37	100	> 133,660		
AMG386		-	5	100	2	100	15	100	5,632	1,2	100
00956		-	1,010	100	1,816	100	1,294	100	> 1,979	6,8	100
VEGFANGBII00028		-	30	100	72	100	65	100	> 66,222	3,7	100
		+	39	100	69	100	78	100	> 50,816		
AMG386		-	4	100	3	100	14	100	5,194	1,0	100

n.d. - не определяли

Определяли аффинность VEGFANGBII00022-25-28 к человеческому, мышинному, обезьяньему (циномолгус) и крысиному Ang2 (см. пример 5.4), данные представлены в табл. 47-Б.

Таблица 47-Б. Аффинность (K_D) очищенных VHH к рекомбинантному человеческому, супо, мышинному и крысиному Ang2

	человеческий Ang2-FLD			супо Ang2-FLD		
	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	K _D (М)	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	K _D (М)
VEGFANGBII00022	9,7E+05	1,5E-05	1,6E-11	1,5E+06	1,3E-05	8,1E-12
VEGFANGBII00025	2,7E+06	1,2E-02	4,5E-09	4,3E+06	1,1E-02	2,7E-09
VEGFANGBII00028	5,9E+05	9,6E-04	1,6E-09	8,4E+05	8,7E-04	1,0E-09
	мышинный Ang2-FLD			крысиный Ang2-FLD		
	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	K _D (М)	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	K _D (М)
VEGFANGBII00022	5,5E+05	2,8E-05	5,1E-11	3,9E+05	3,8E-05	9,9E-11
VEGFANGBII00025	1,3E+06	1,4E-02	1,1E-08	8,7E+05	2,9E-02	3,3E-08
VEGFANGBII00028	3,6E+05	2,0E-03	5,6E-09	2,5E+05	3,1E-03	1,2E-08

Определяли аффинность VEGFANGBII00022-25-28 к человеческому, мышинному и обезьяньему (циномолгус) сывороточному альбумину (пример 11), и результаты представлены в табл. 48. Константу аффинности (K_D) рассчитывали на основе констант скорости ассоциации и диссоциации (k_a) и (k_d) (табл. 48).

Таблица 48. Аффинность (K_D , нМ) очищенных VHH к рекомбинантному человеческому, мышинному и обезьяньему (циномолгус) сывороточному альбумину, определенная с использованием модели взаимодействия 1:1 (А) или модели на основе гетерогенных лигандов (Б)

(А)	ЧСА			ЦСА		
	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (нМ)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (нМ)
ALB11	5,6E+05	1,9E-03	4	4,5E+05	1,7E-03	4
VEGFANGBII00022	6,7E+05	6,0E-03	9	6,2E+05	5,4E-03	9
VEGFANGBII00025	5,6E+05	5,6E-03	12	4,3E+05	5,1E-03	12
VEGFANGBII00028	5,6E+05	5,8E-03	10	5,2E+05	5,3E-03	10

MCA			
	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (нМ)
ALB11	5,9E+05	3,0E-02	51
VEGFANGBII00022	5,2E+05	5,4E-03	150
VEGFANGBII00025	-	-	-
VEGFANGBII00028	-	-	-

(Б)	MCA					
	k_{a1} (1/Мс)	k_{d1} (1/с)	k_{a2} (1/с)	k_{d2} (1/с)	K_{D1} (нМ)	K_{D2} (нМ)
VEGFANGBII00025	6,2E+05	9,9E-02	4,7E+04	5,7E-04	160 *	12
VEGFANGBII00028	5,9E+04	6,9E-04	5,7E+05	9,4E-02	12	160 *

* описывает 70% или более взаимодействий.

Ang2-связывающие компоненты (табл. 49).

Таблица 49

(1D01 (SEQ ID NO: 214); 7G08 (SEQ ID NO: 215); 027 (SEQ ID NO: 216); 00042 (SEQ ID NO: 217); 00050 (SEQ ID NO: 218); 00045 (SEQ ID NO: 219); 00921 (SEQ ID NO: 220); 00928 (SEQ ID NO: 221); 00938 (SEQ ID NO: 222); 00956 (SEQ ID NO: 223))

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
1D01	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFD	DYALG	WFRQAAGKEREQVS	CIRCSGSGTYYADSVK
7G08	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALD	YYAIG	WFRQVPGKEREQVS	CISSSDGITYYVDSVK
027	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLD	DYAIG	WFRQAPGKEREQVS	CIRDSGSGTYYADSVK
	FR3	CDR3	FR4	
1D01	RFTISSDNAKNTVYVQLQMNSLRPEDTAVYYCAA	SIVPRSKLEPYEYDA	WGQGTQVTVSS	
7G08	RFTISRDNKNTVYVQLQMNSLRPEDTAVYYCAT	DSGGYIDYDCMGLGYDY	WGQGTQVTVSS	
027	RFTISSDNKNTVYVQLQMNSLRPEDTAVYYCAA	VPAGRLRFGEQWYPLYEYDA	WGQGTQVTVSS	
	FR1	CDR1	FR2	CDR2
00042	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLD	DYAIG	WFRQAPGKEREQVS	SIRDNDGSGTYYADSVKG
00050	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD	DYALG	WFRQAPGKEREQVS	CIRCSGSGTYYADSVKG
00045	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALD	YYAIG	WFRQAPGKEREQVS	CISSSDGITYYADSVKG
	FR3	CDR3	FR4	
00042	RFTISSDNSKNTVYVQLQMNSLRPEDTAVYYCAA	VPAGRLRFGEQWYPLYEYDA	WGQGTQVTVSS	
00050	RFTISSDNSKNTVYVQLQMNSLRPEDTAVYYCAA	SIVPRSKLEPYEYDA	WGQGTQVTVSS	
00045	RFTISRDNKNTVYVQLQMNSLRPEDTAVYYCAT	DSGGYIDYDCMGLGYDY	WGQGTQVTVSS	
	FR1	CDR1	FR2	CDR2
00921	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD	DYAL	G	CIRCSGGSGTYYADSVK
00928	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALD	YYAI	G	CISSSGGSGTYYADSVK
00938	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGITLD	DYAI	G	AIRSSGGSGTYYADSVK
00956	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLD	DYAI	G	AIRSSGGSGTYYADSVK
	FR3	CDR3	FR4	
00921	RFTISSDNSKNTVYVQLQMNSLRPEDTAVYYCAA	SIVPRSKLEPYEYDA	WGQGTQVTVSS	
00928	RFTISRDNKNTVYVQLQMNSLRPEDTAVYYCAT	DSGGYIDYDCMGLGYDY	WGQGTQVTVSS	
00938	RFTISSDNSKNTVYVQLQMNSLRPEDTAVYYCAA	VPAGRLRYGEQWYPIEYDA	WGQGTQVTVSS	
00956	RFTISSDNSKNTVYVQLQMNSLRPEDTAVYYCAA	VPAGRLRFGEQWYPLYEYDA	WGQGTQVTVSS	

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающая молекула, связывающаяся с VEGF и ANG2, которая имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 207, но в которой в качестве N-концевой аминокислоты отсутствует аспарагиновая кислота (D).

2. Связывающая молекула, связывающаяся с VEGF и ANG2, которая имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 210, но в которой в качестве N-концевой аминокислоты отсутствует аспарагиновая кислота (D).

3. Связывающая молекула, связывающаяся с VEGF и ANG2, которая имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 213, но в которой в качестве N-концевой аминокислоты отсутствует аспарагиновая кислота (D).

4. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая связывающую молекулу по п.1.

5. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая связывающую молекулу по п.2.

6. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая связывающую молекулу по п.3.

7. Экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.4-6.

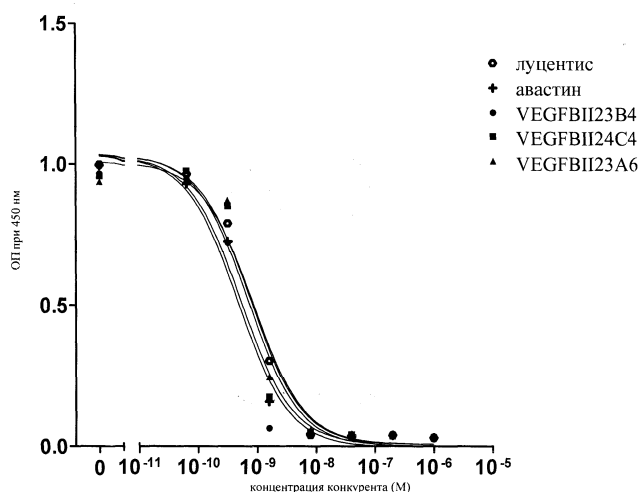
8. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.4-6 или вектор по п.7.

9. Фармацевтическая композиция, содержащая в качестве действующего вещества по меньшей мере одну связывающую молекулу по любому из пп.1-3, предназначенная для лечения заболевания, которое ассоциировано с опосредуемыми VEGF и/или опосредуемыми Ang2 воздействиями на ангиогенез.

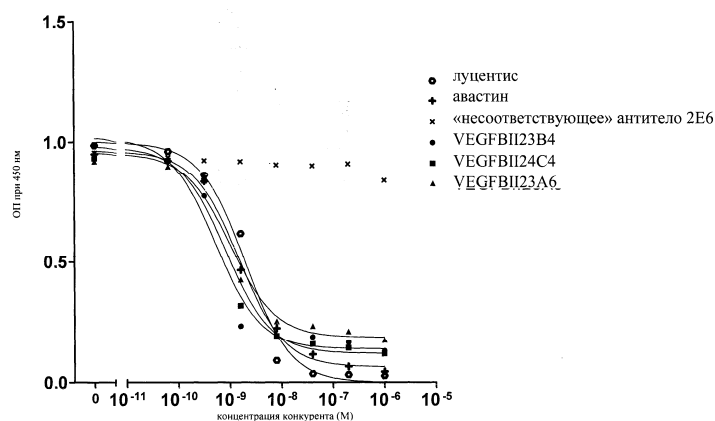
10. Фармацевтическая композиция по п.9, предназначенная для лечения рака.

11. Способ получения связывающей молекулы по любому из пп.1-3, включающий этапы культивирования клетки-хозяина по п.8, включающей молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.4-6 в условиях, обеспечивающих экспрессию указанной связывающей молекулы; и выделение или извлечение этой связывающей молекулы, которая экспрессируется этой клеткой-хозяином, из культуры.

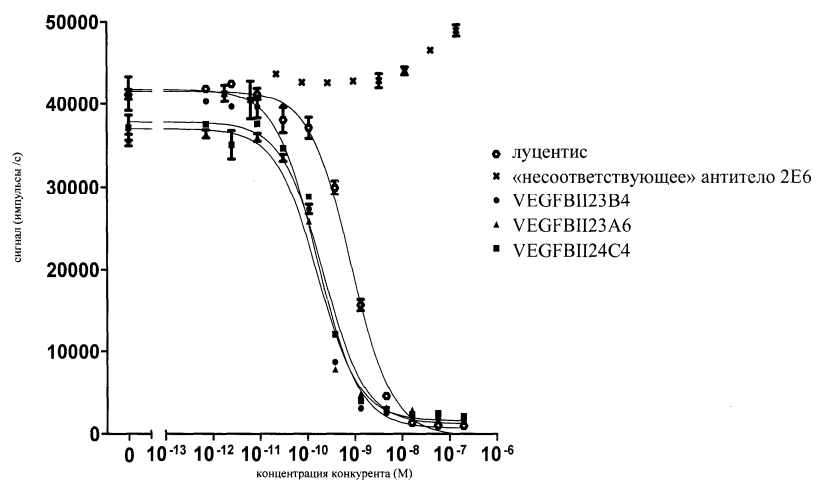
12. Способ по п.11, дополнительно включающий этап очистки этой связывающей молекулы.



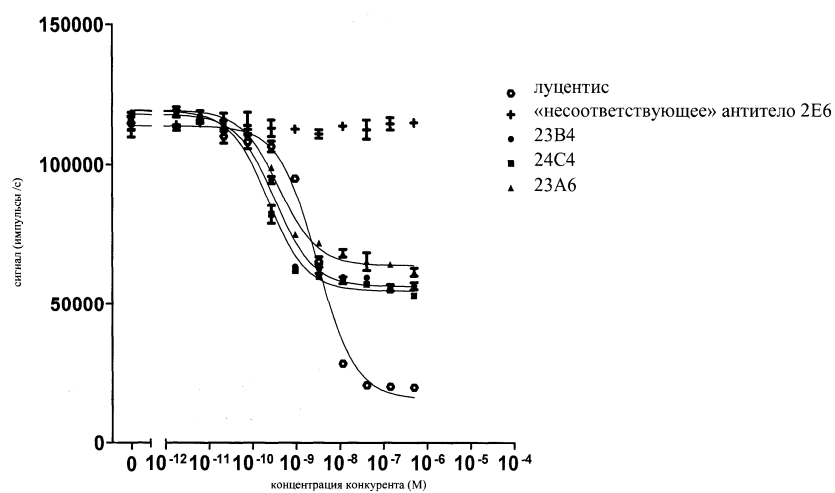
Фиг. 1



Фиг. 2

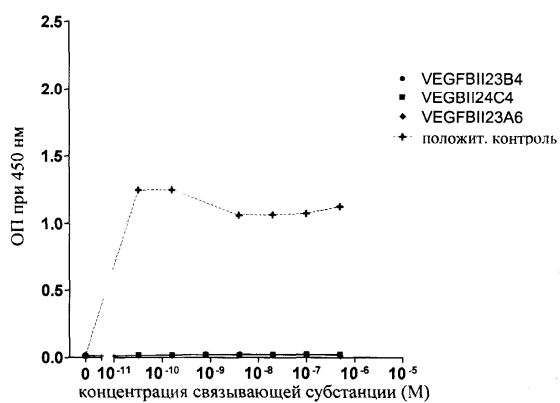


Фиг. 3

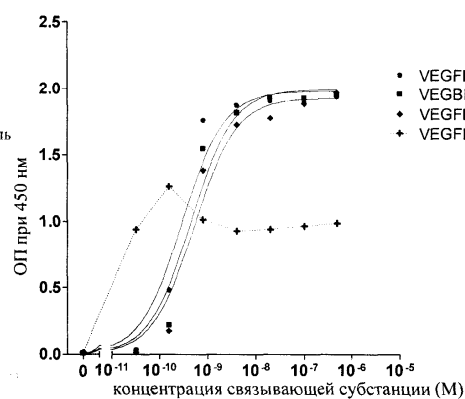


Фиг. 4

Связывание с mVEGF164

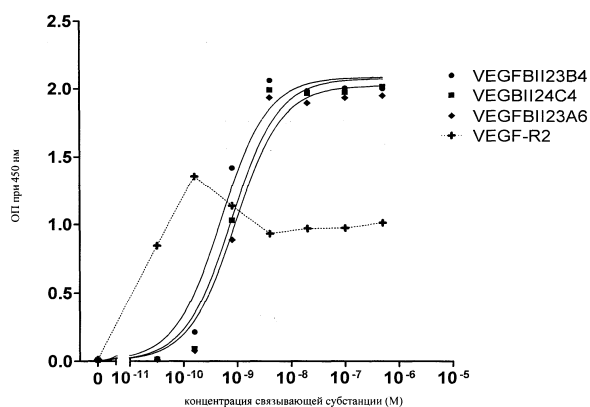


Связывание с hVEGF165

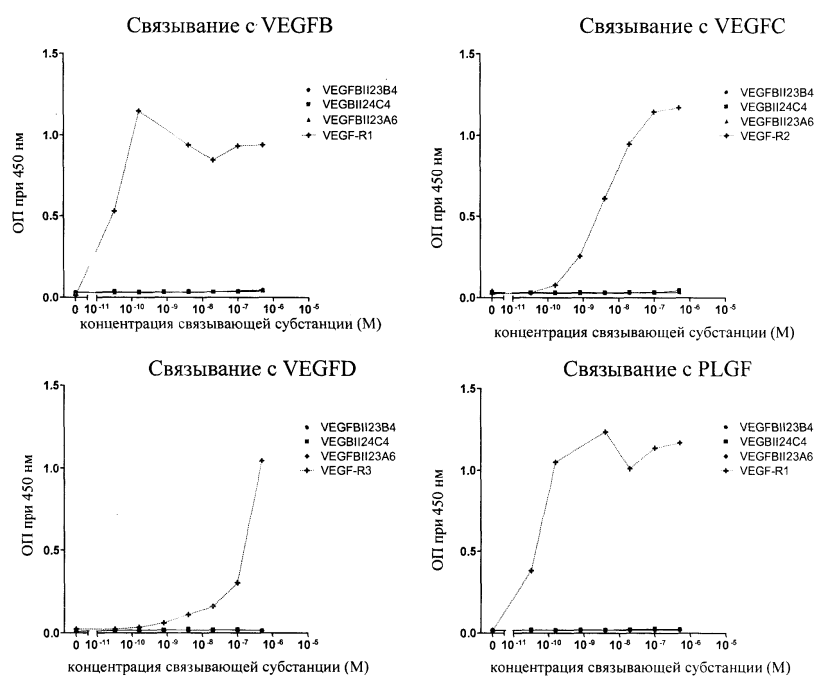


Фиг. 5

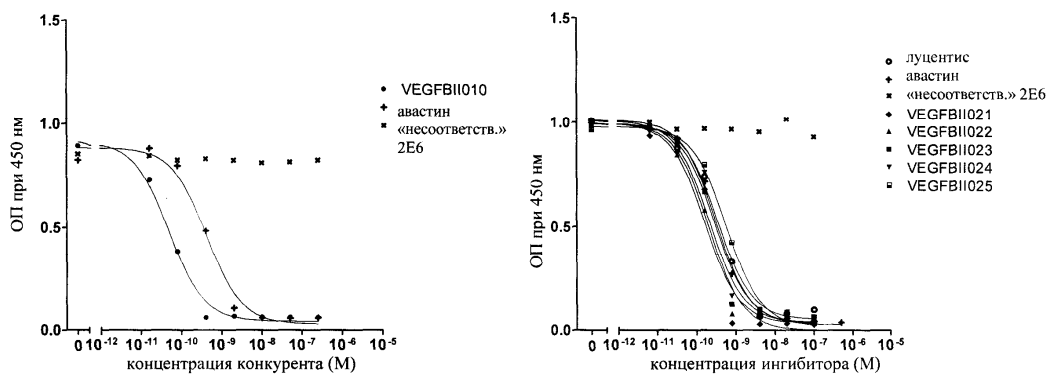
Связывание с hVEGF121



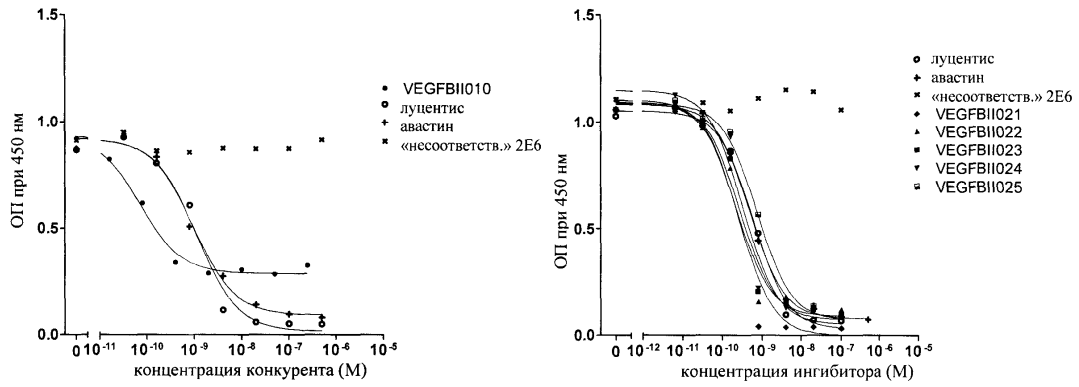
Фиг. 6



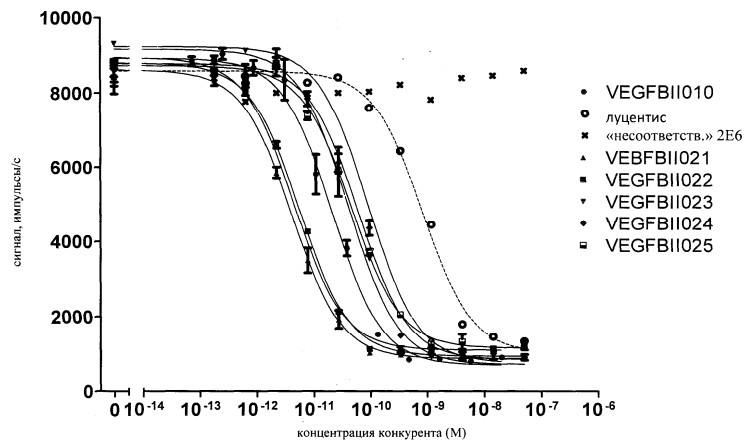
Фиг. 7



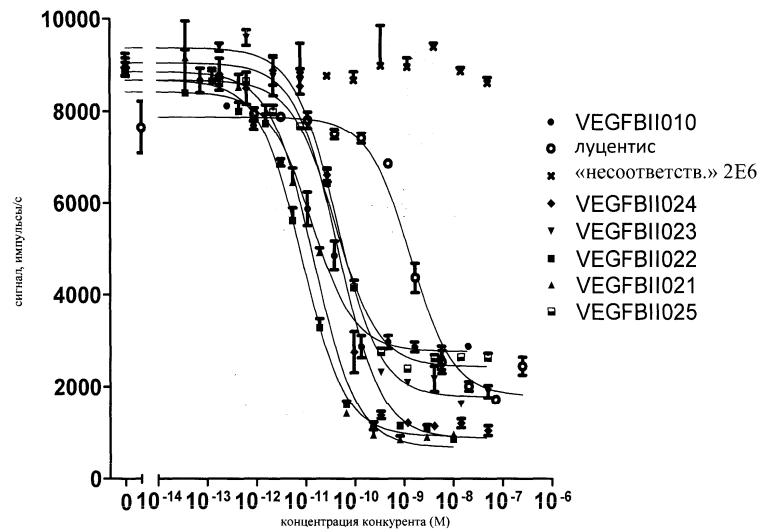
Фиг. 8



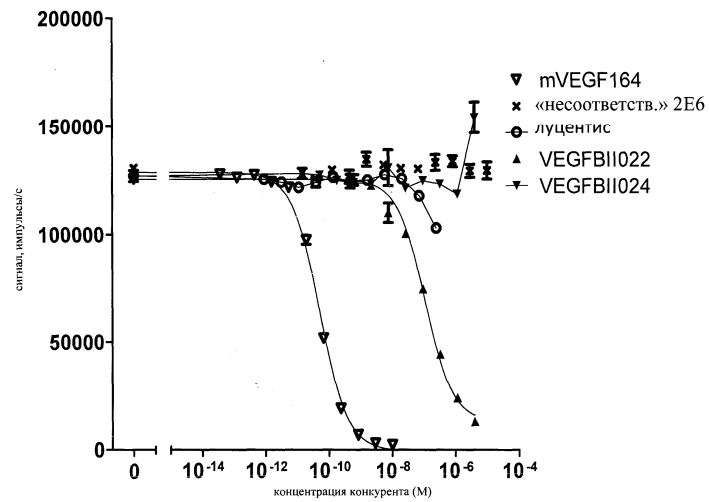
Фиг. 9



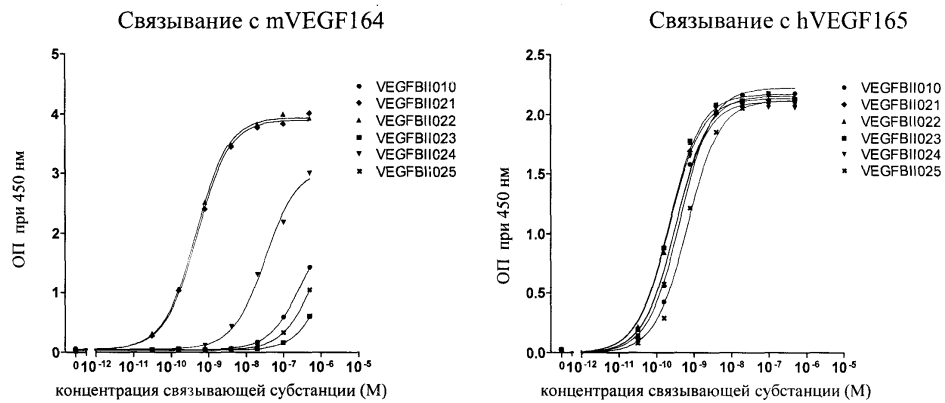
Фиг. 10



Фиг. 11



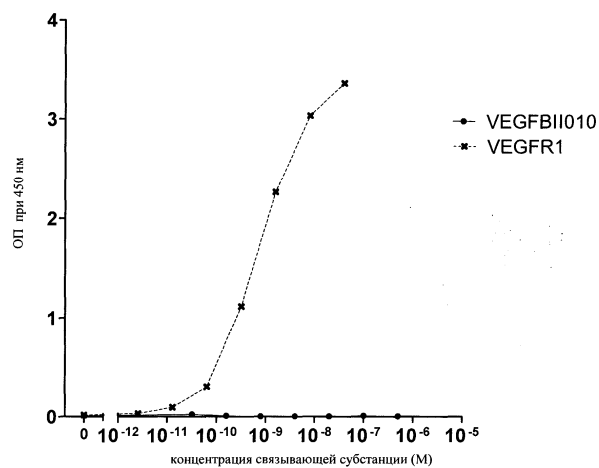
Фиг. 12



Фиг. 13

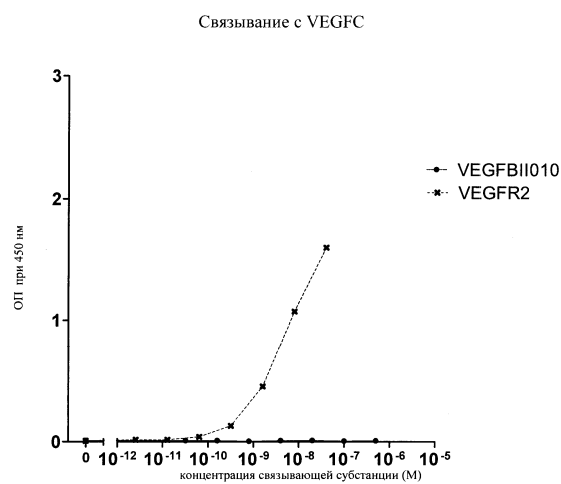
А

Связывание с VEGFB



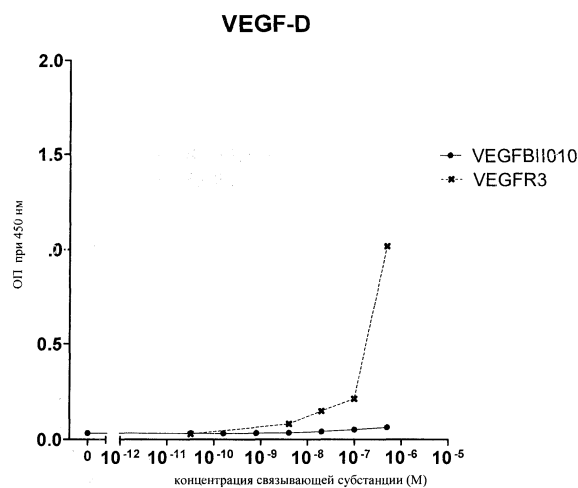
Фиг. 14-1

Б



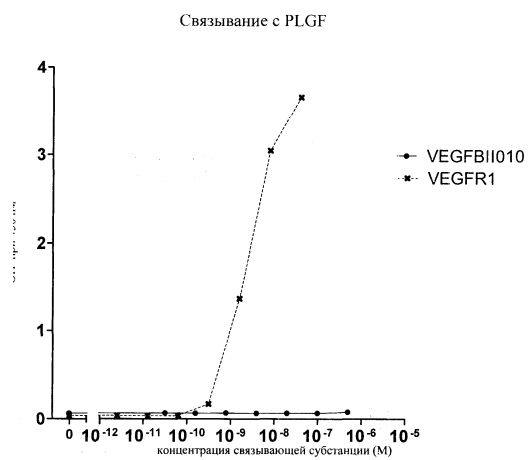
Фиг. 14-2

В



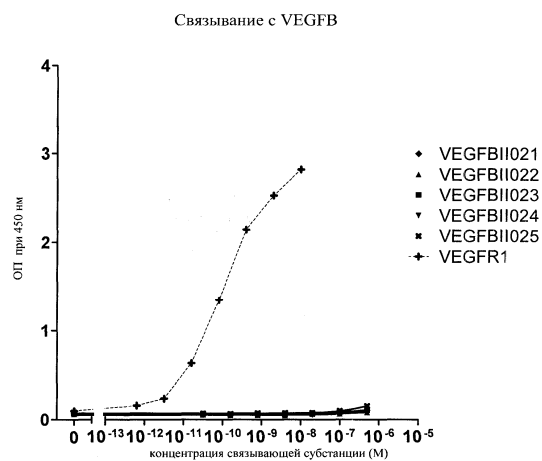
Фиг. 14-3

Г



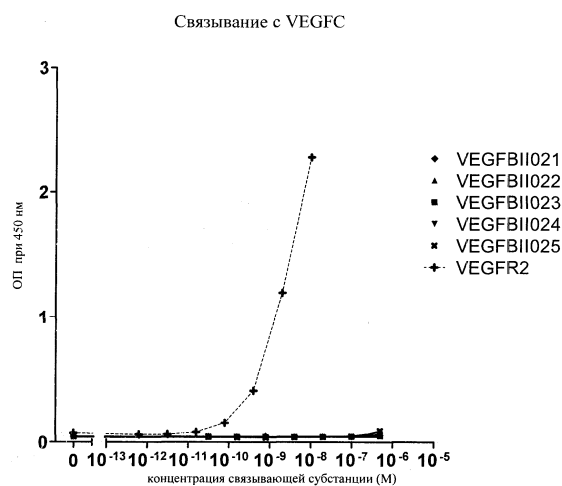
Фиг. 14-4

Д



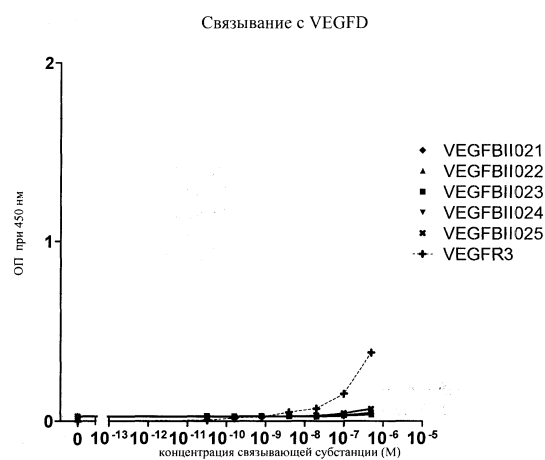
Фиг. 14-5

Е

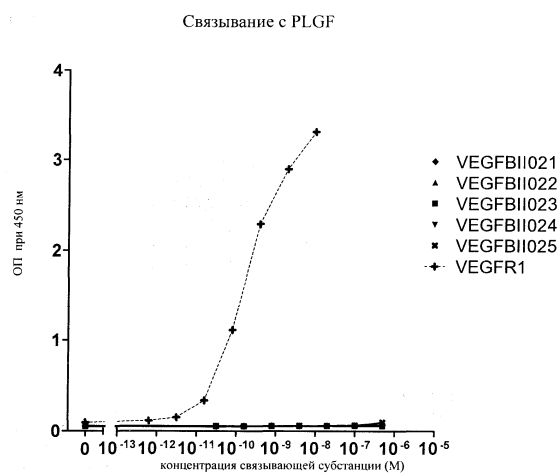


Фиг. 14-6

Ж

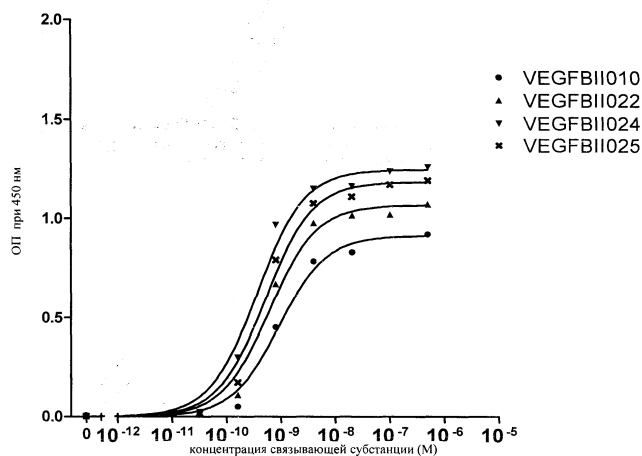


Фиг. 14-7



Фиг. 14-8

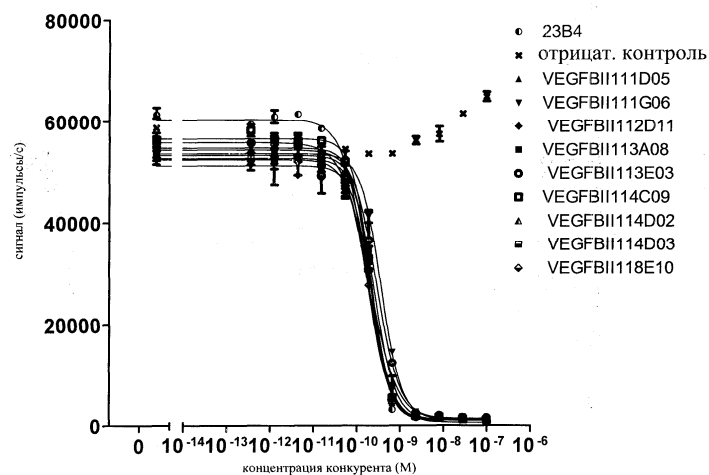
Связывание с rhVEGF121



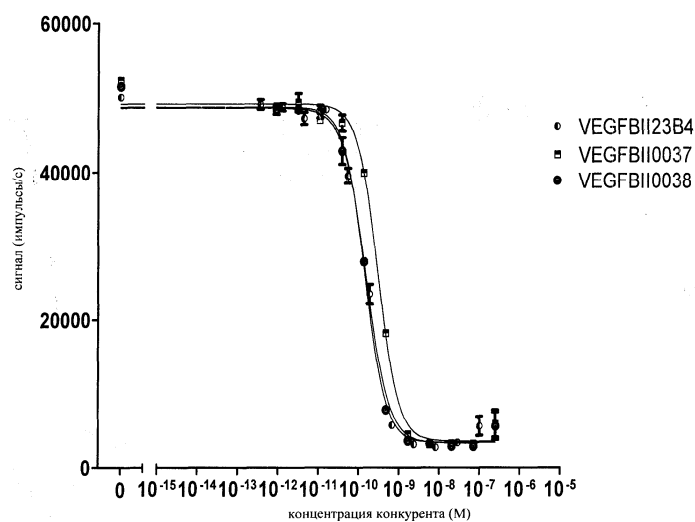
Фиг. 15

		10	20	30	40
Kabat#	:				
VH3-23/JH5	:	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA			
VEGFBII23B04	:	T.D.....EV.R.....S.G.F...			
		50	60	70	80
Kabat#	:	a.....			
VH3-23/JH5	:	PGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL			
VEGFBII23B04	:	Q..ER.F.V...-K..YK.DSV.LE.....K..A...V..			
		90	100	110	
Kabat#	:	..abc..... abcdefghi..... ...			
VH3-23/JH5	:	QMNSLR AEDTAVYYCAK-----WGQGTILVTVSS			
VEGFBII23B04	:	.I...KP.....SSRAYGSSRLRLADTYEY.....Q.....			

Фиг. 16



Фиг. 17



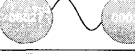
Фиг. 18

		10	20	30	40
Kabat#	:				
VH3-23/JH5	:	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSSYAMSWVRQA		
PVEGFBIIIPMP5B5	:	V	...IR.MSM.--.Y...		

		50	60	70	80
Kabat#	:				
VH3-23/JH5	:	PGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL			
PVEGFBIIIPMP5B5	:	...HR.L.AR...T.A.V			...V..

		90	101	110
Kabat#	:	..abc.....		
VH3-23/JH5	:	QMNSLRAEDTAVYYCAK-----WGQGLTLVTVSS		
PVEGFBIIIPMP5B5	:	KA.....NTFSSRPNP..A.Q		

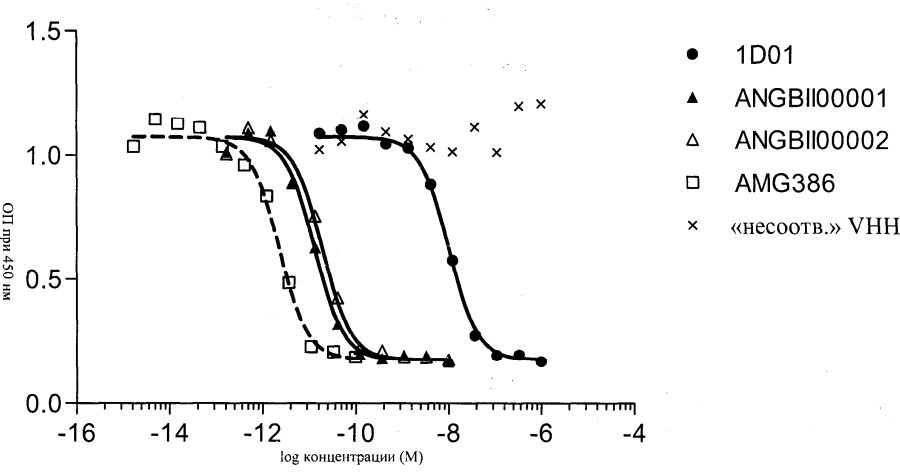
Фиг. 19

VHH ID	Формат	Описание
ANGBII00001		1D01-9gs-1D01
ANGBII00002		1D01-40gs-1D01
ANGBII00003		11B07-9gs-11B07
ANGBII00004		00027-9gs-00027
ANGBII00005		00027-40gs-00027
ANGBII00006		00908-9gs-00908

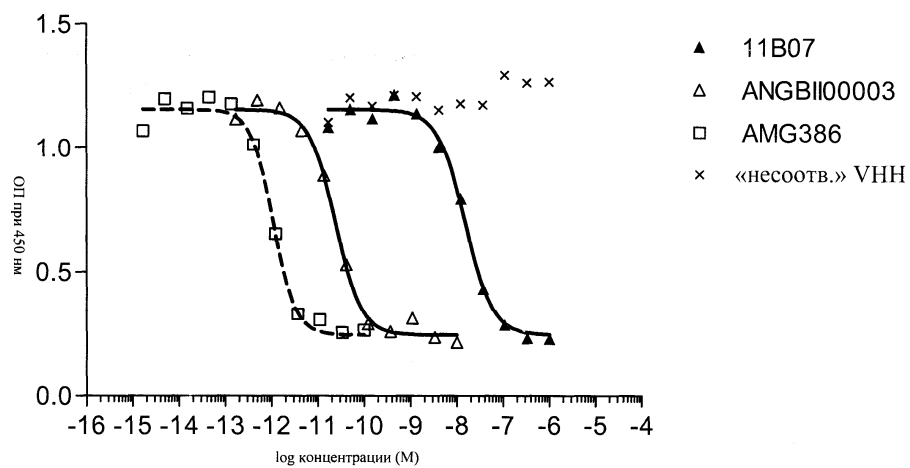
Обозначения:

	Описание
	1D01
	11B07
	00027
	00908
	линкер 9 GlySer
	линкер 40 GlySer

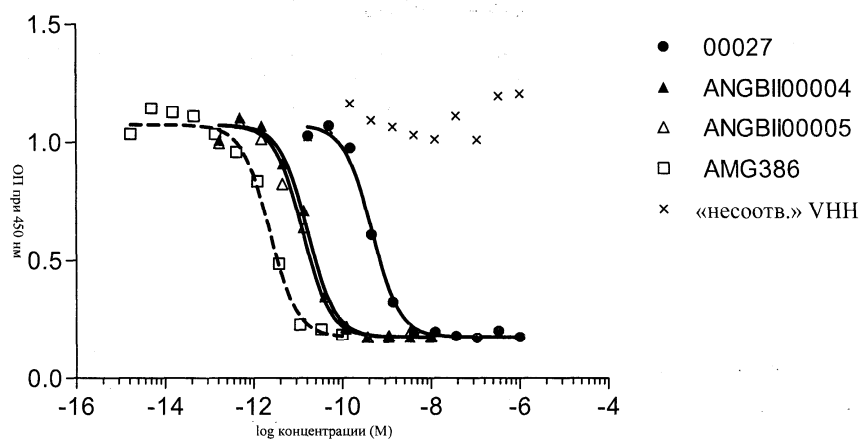
Фиг. 20



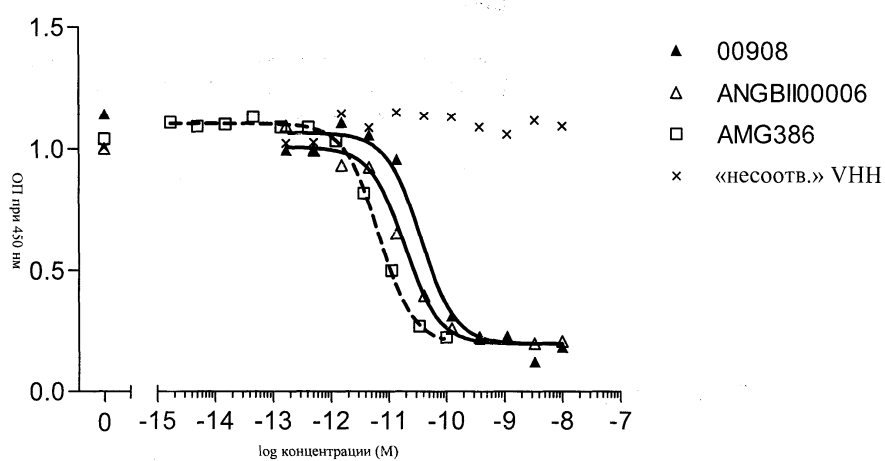
Фиг. 21-1A



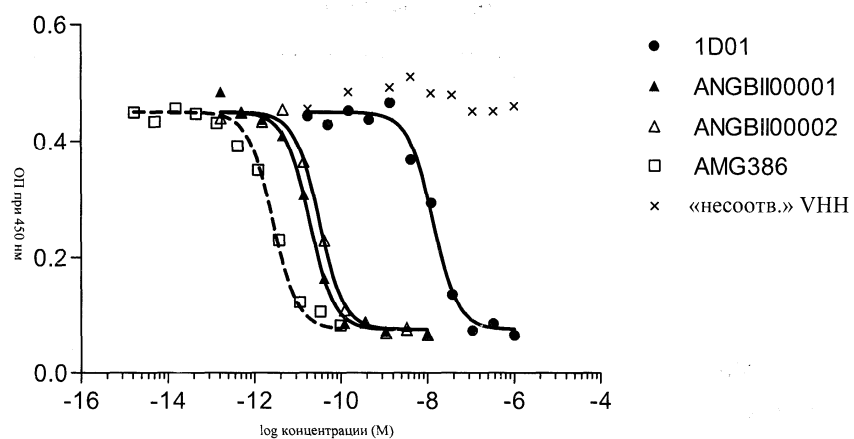
Фиг. 21-1Б



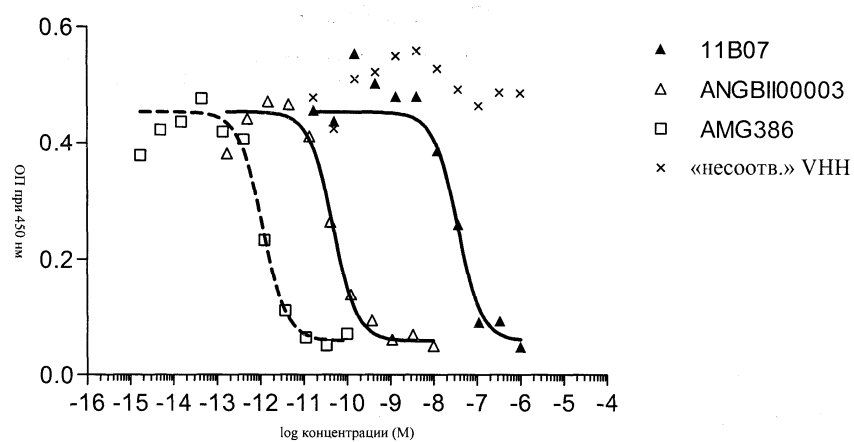
Фиг. 21-1В



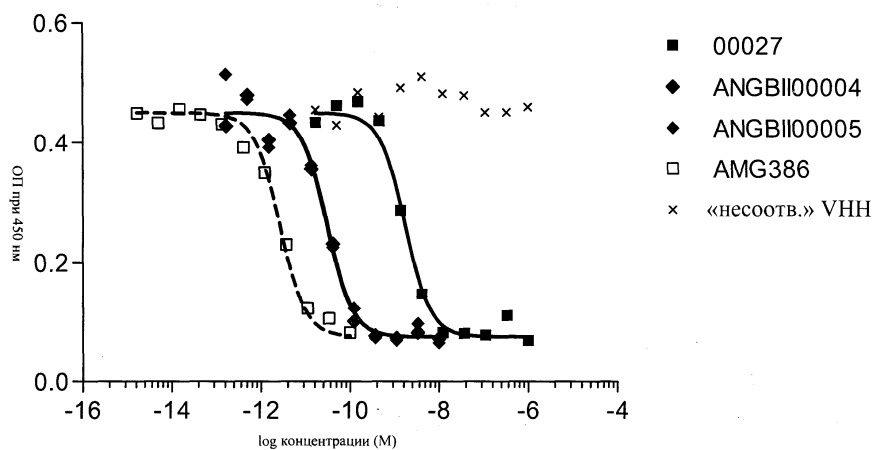
Фиг. 21-1Г



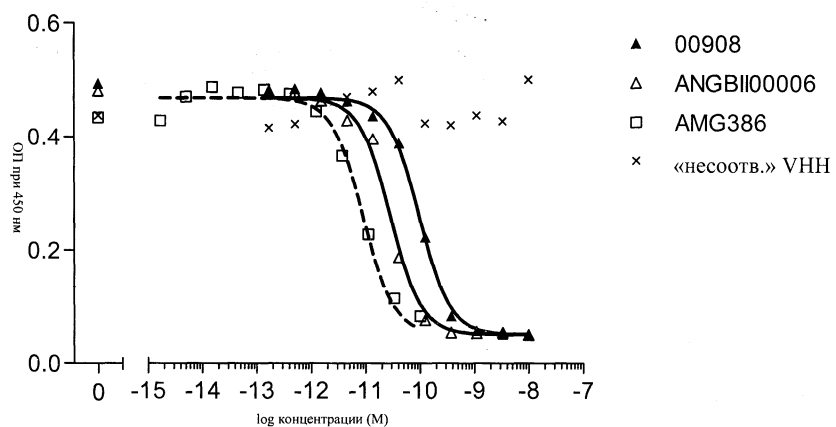
Фиг. 21-2А



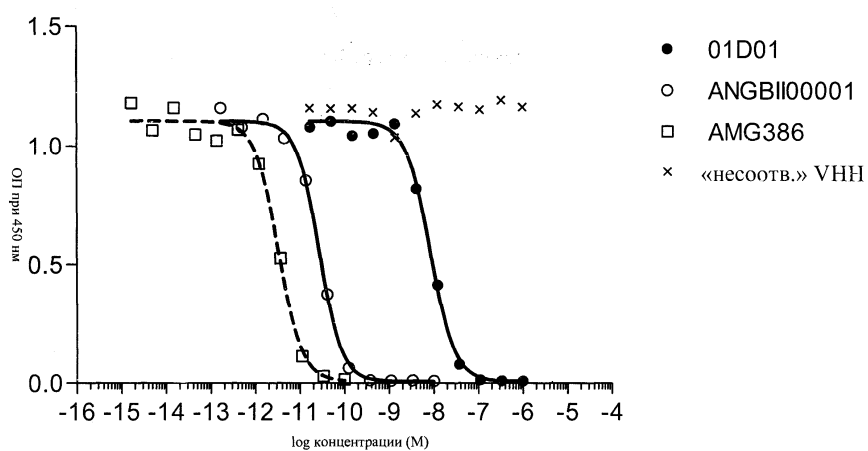
Фиг. 21-2Б



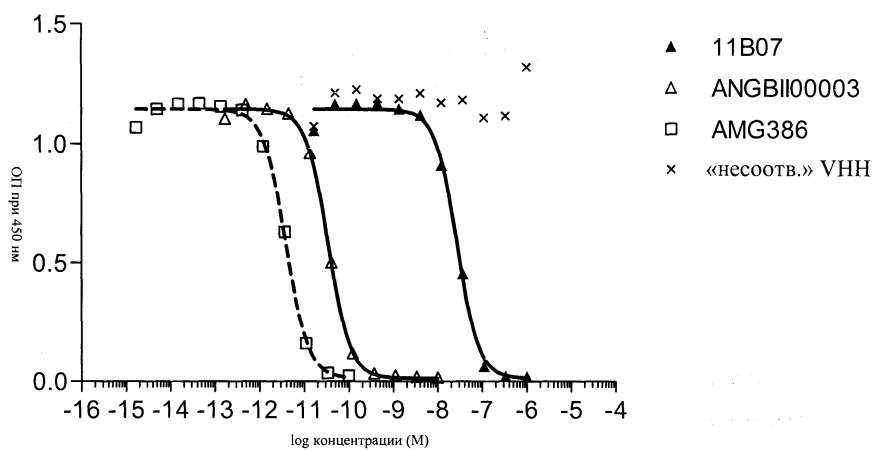
Фиг. 21-2В



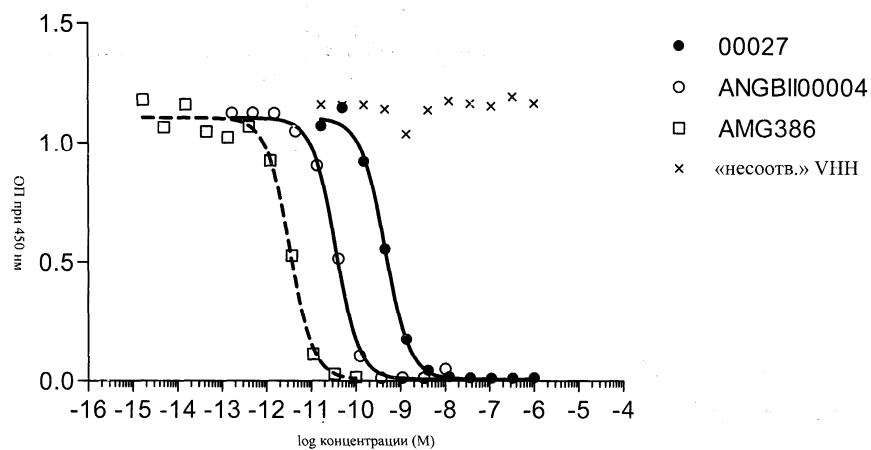
Фиг. 21-2Г



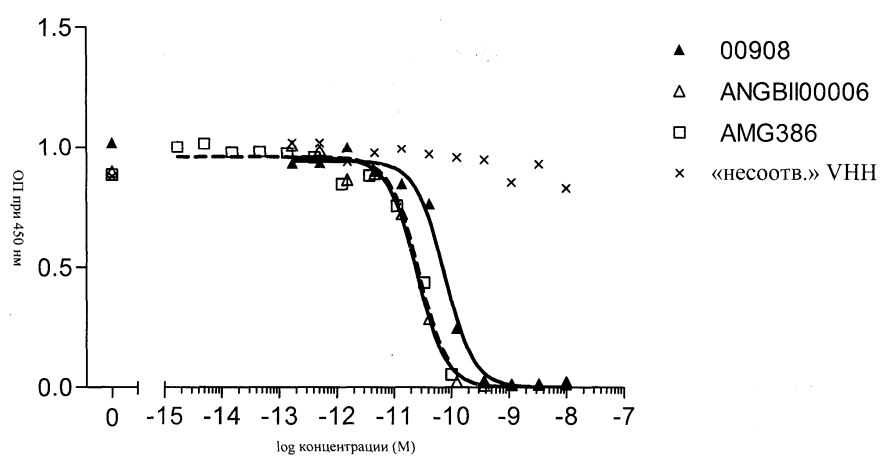
Фиг. 21-3А



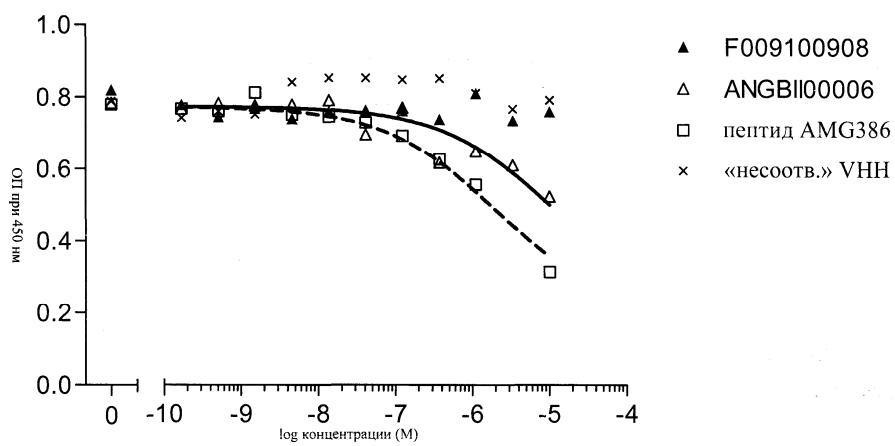
Фиг. 21-3Б



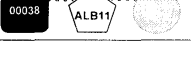
Фиг. 21-3В



Фиг. 21-3Г



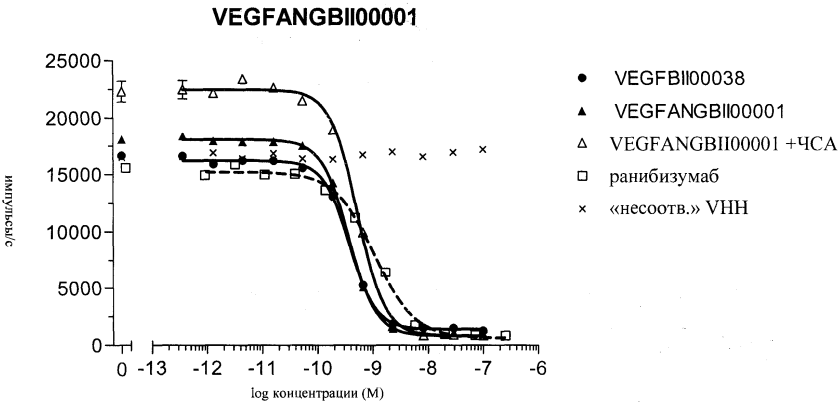
Фиг. 22

VHH ID	Формат	Описание
VEGFANGBII00001		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00027
VEGFANGBII00002		00027-9gs-ALB11-9gs-VEGFBII00038
VEGFANGBII00003		00027-9gs-VEGFBII00038-9gs-ALB11
VEGFANGBII00004		VEGFBII00038-AAA-ALB11-AAA-00027

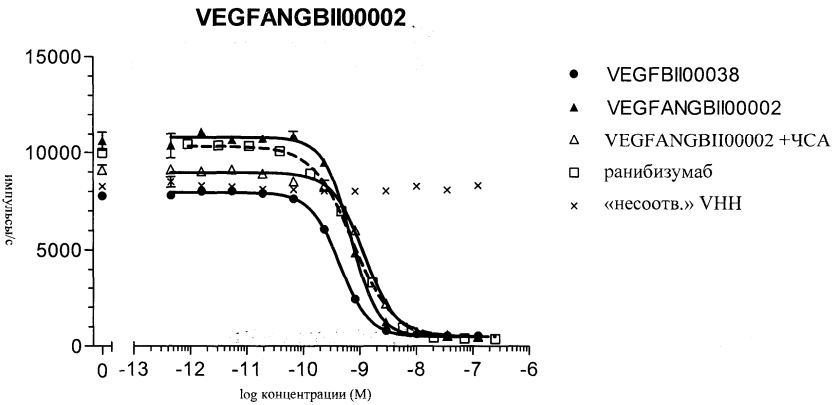
Обозначения:

	Описание
	VEGFBII00038
	00027
	ALB11
AAA	тройной <i>Ala</i> -линкер
	линкер <i>9 GlySer</i>

Фиг. 23

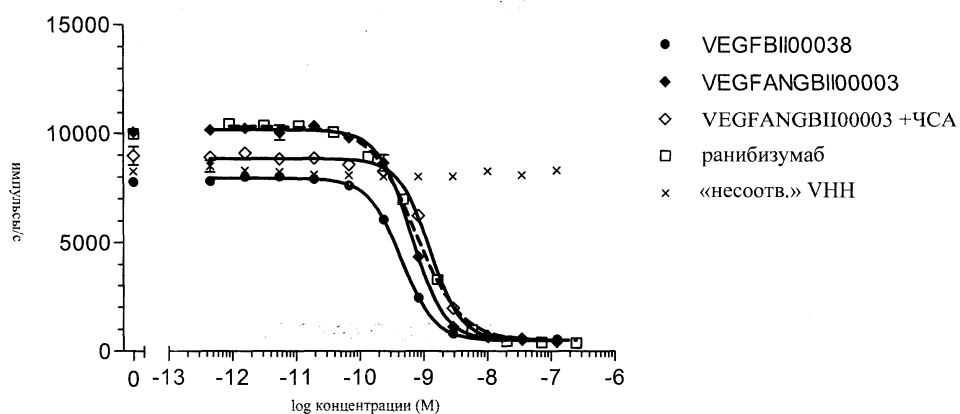


Фиг. 24А



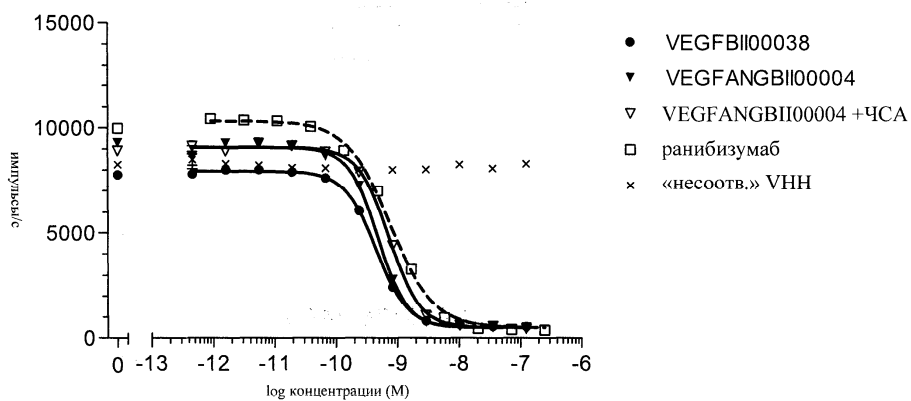
Фиг. 24Б

VEGFANGBII00003



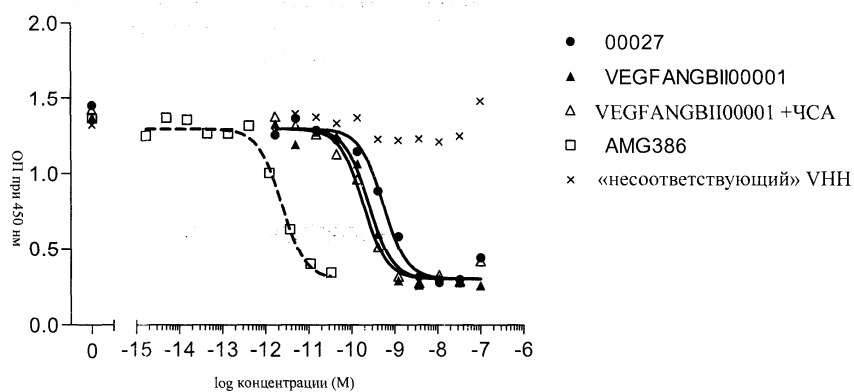
Фиг. 24В

VEGFANGBII00004



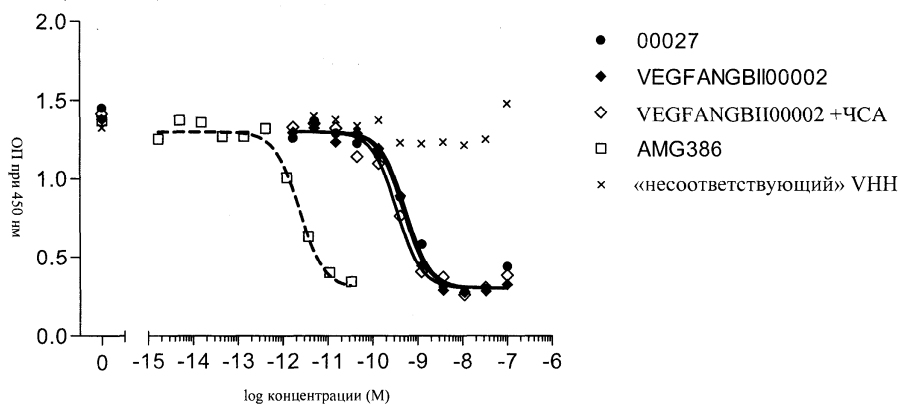
Фиг. 24Г

VEGFANGBII00001



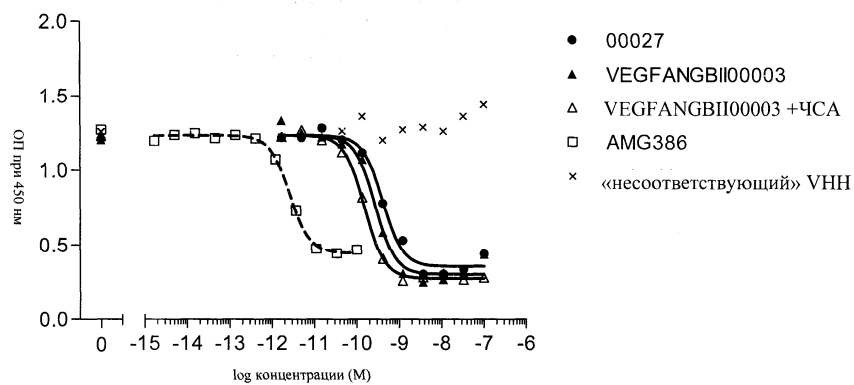
Фиг. 25А

VEGFANGBII00002



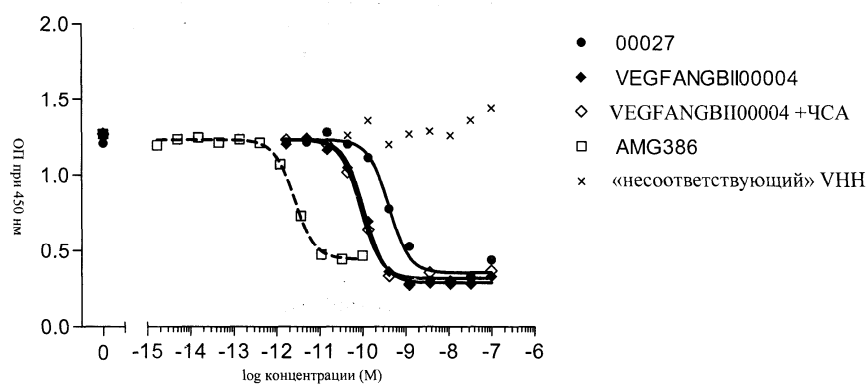
Фиг. 25Б

VEGFANGBII00003

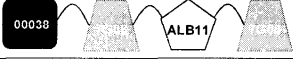
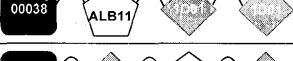


Фиг. 25В

VEGFANGBII00004



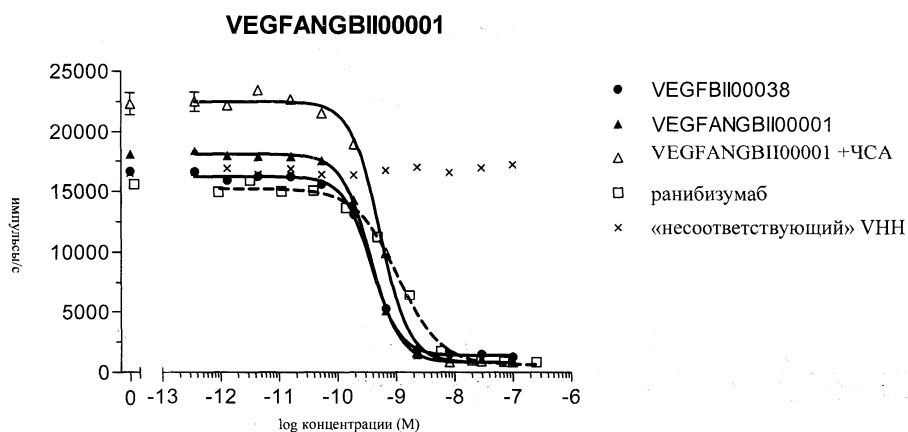
Фиг. 25Г

VHH ID	Формат	Описание
VEGFANGBII00005		VEGFBII00038-9gs-7G08-9gs-ALB11
VEGFANGBII00006		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-7G08
VEGFANGBII00007		VEGFBII00038-9gs-7G08-9gs-ALB11-9gs-7G08
VEGFANGBII00008		VEGFBII00038-9gs-00027-9gs-00027-9gs-ALB11
VEGFANGBII00009		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00027-9gs-00027
VEGFANGBII00010		VEGFBII00038-9gs-00027-9gs-ALB11-9gs-00027
VEGFANGBII00011		VEGFBII00038-9gs-1D01-9gs-1D01-9gs-ALB11
VEGFANGBII00012		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-1D01-9gs-1D01
VEGFANGBII00013		VEGFBII00038-9gs-1D01-9gs-ALB11-9gs-1D01
VEGFANGBII00014		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-1D01

Обозначения:

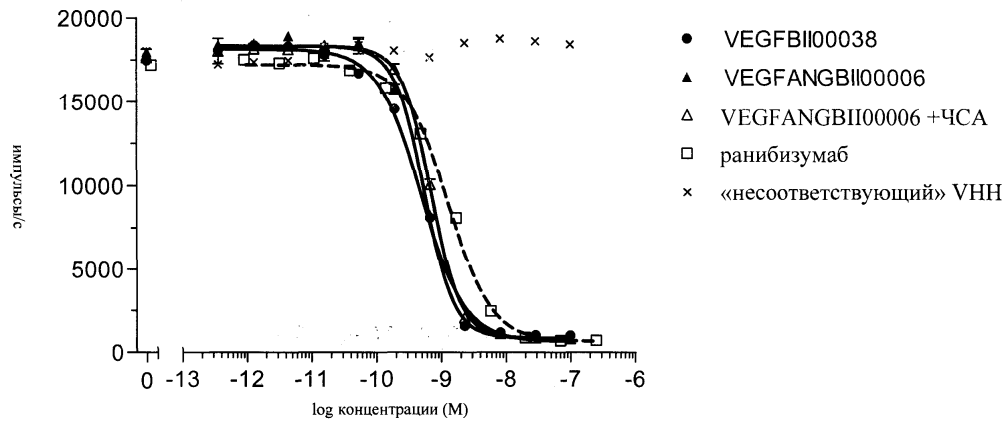
	Описание		Описание
	VEGFBII00038		ALB11
	00027	AAA	тройной Ala-линкер
	1D01		линкер 9 GlySer
	7G08		

Фиг. 26



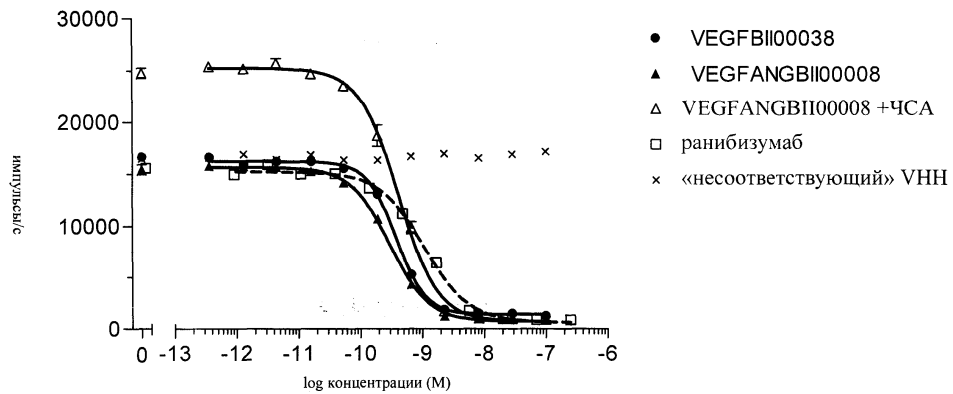
Фиг. 27-1А

VEGFANGBII00006



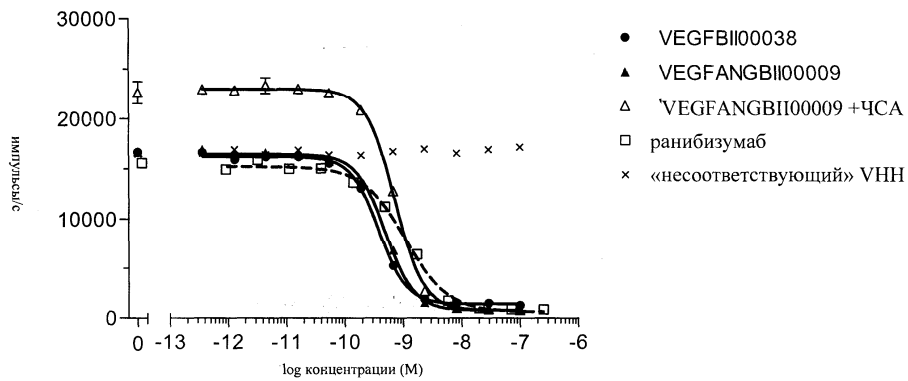
Фиг. 27-1Б

VEGFANGBII00008



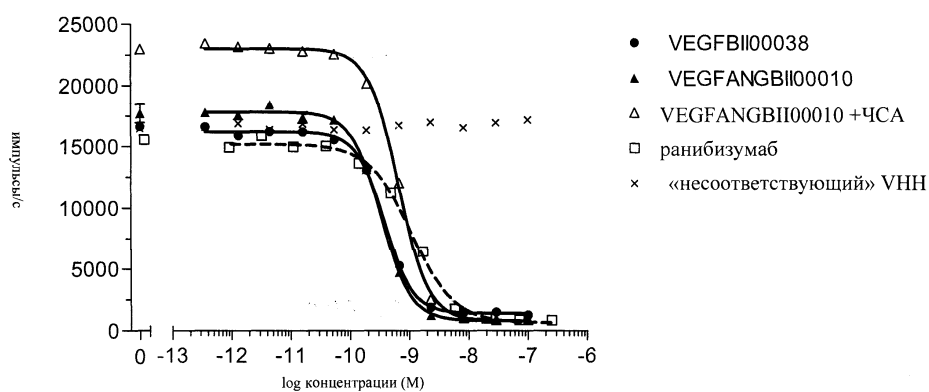
Фиг. 27-1В

VEGFANGBII00009



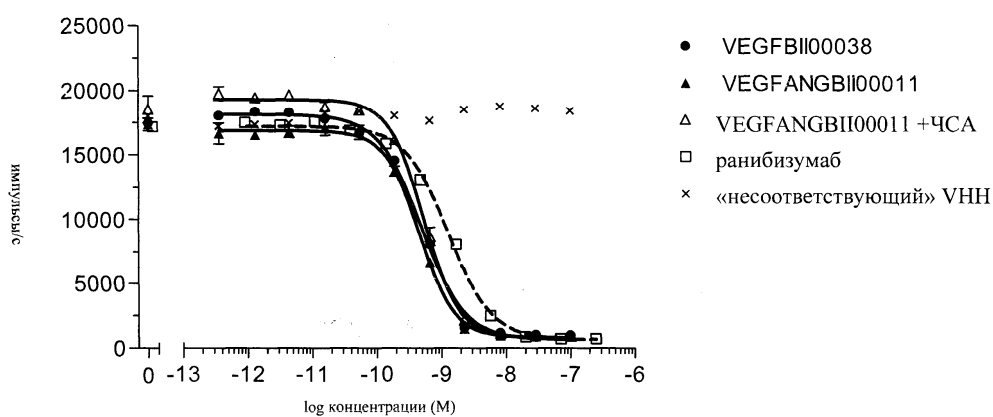
Фиг. 27-1Г

VEGFANGBII00010



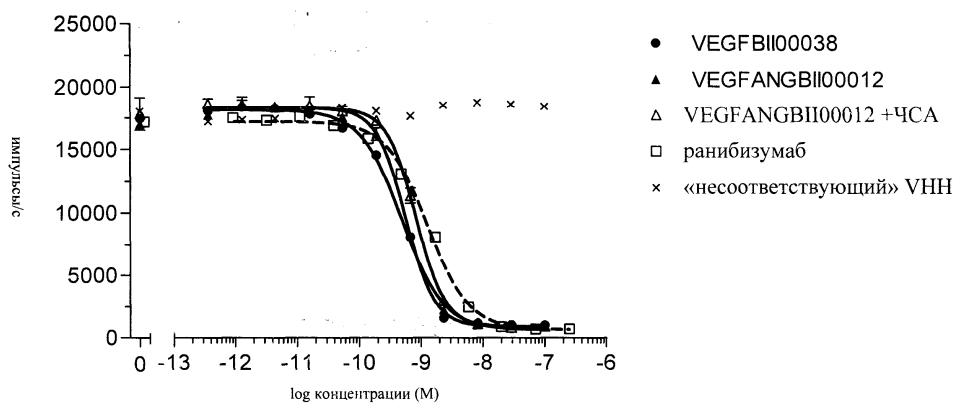
Фиг. 27-1Д

VEGFANGBII00011

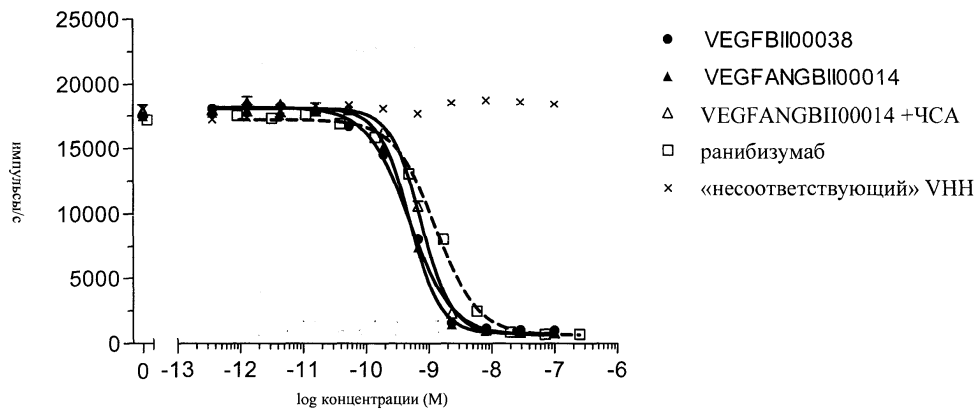


Фиг. 27-1Е

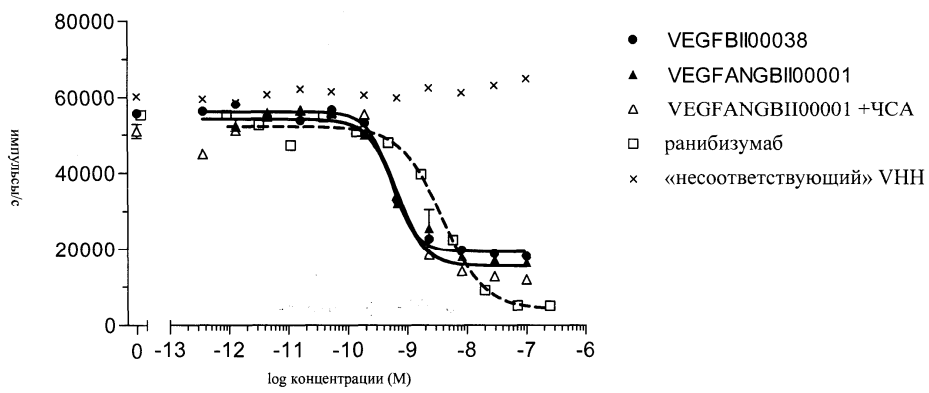
VEGFANGBII00012



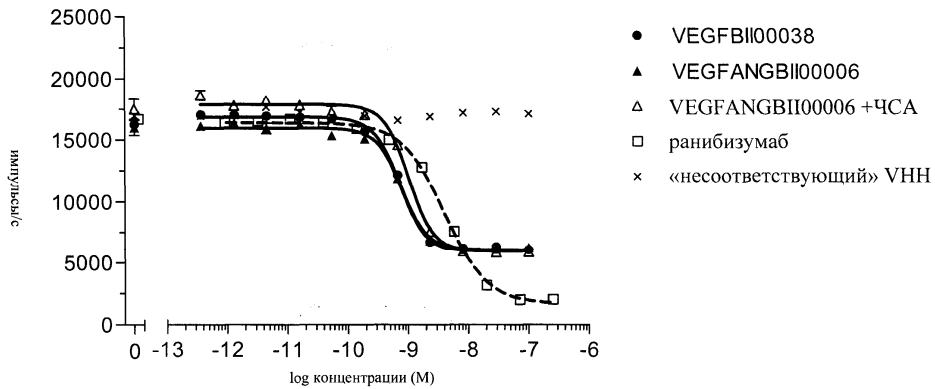
Фиг. 27-1Ж

VEGFANGBII00014

Фиг. 27-13

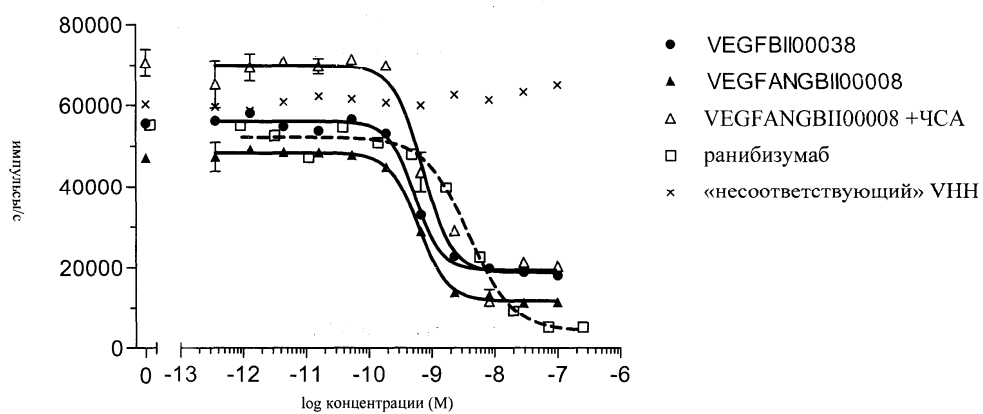
VEGFANGBII00001

Фиг. 27-2А

VEGFANGBII00006

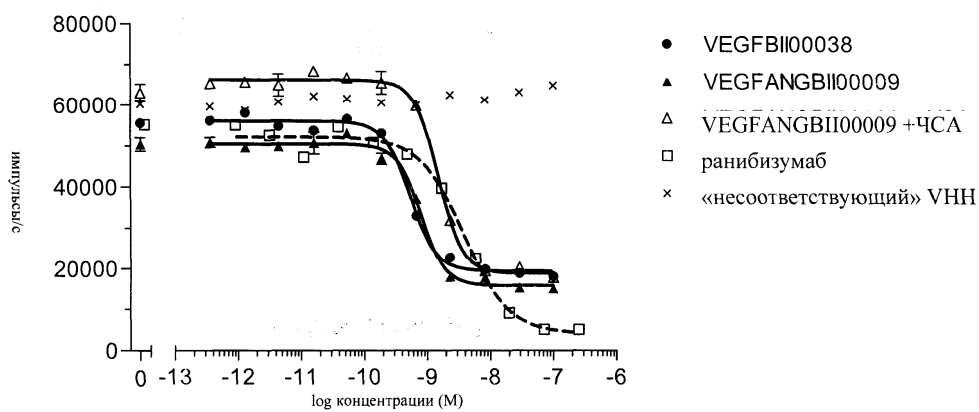
Фиг. 27-2Б

VEGFANGBII00008



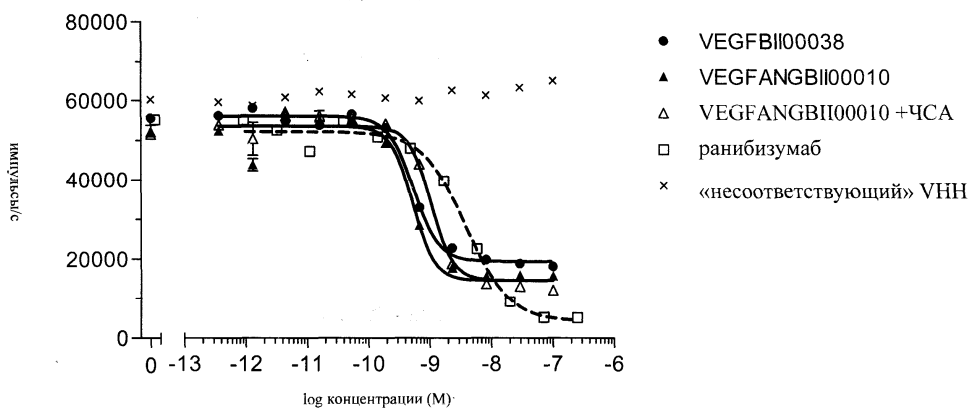
Фиг. 27-2В

VEGFANGBII00009



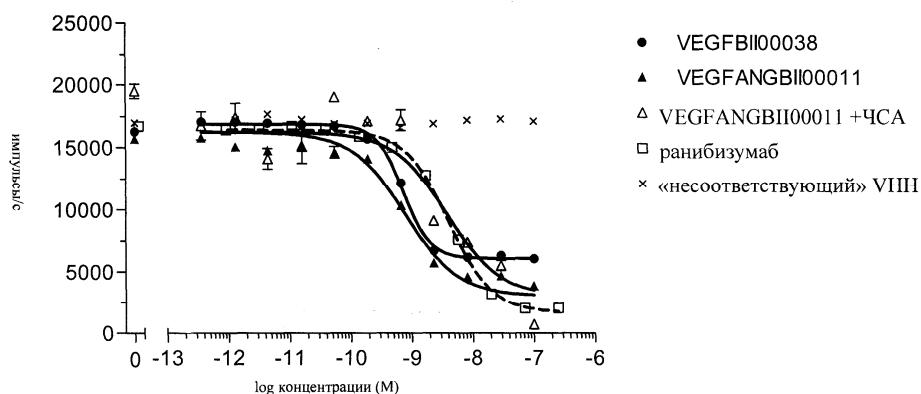
Фиг. 27-2Г

VEGFANGBII00010



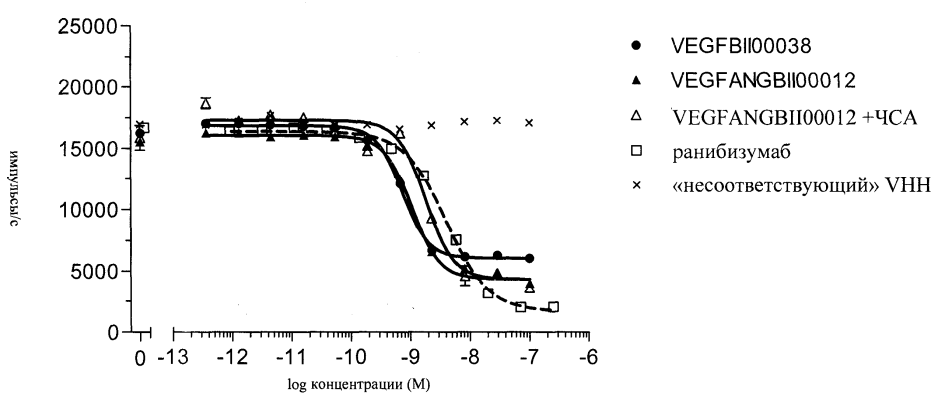
Фиг. 27-2Д

VEGFANGBII00011



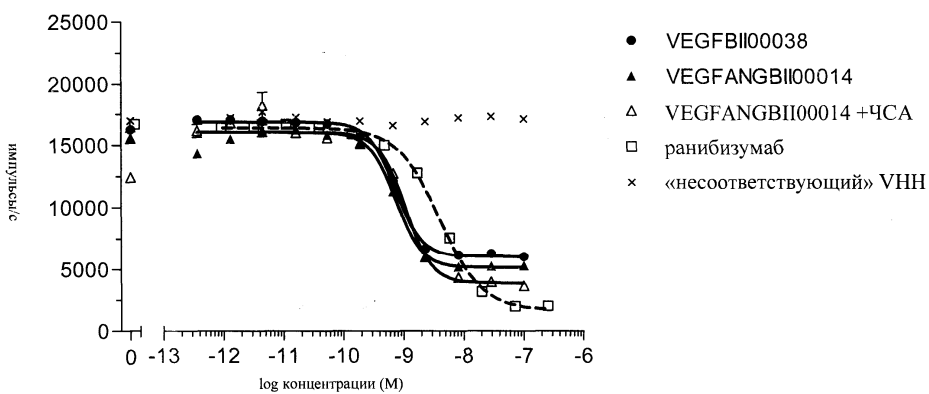
Фиг. 27-2Е

VEGFANGBII00012

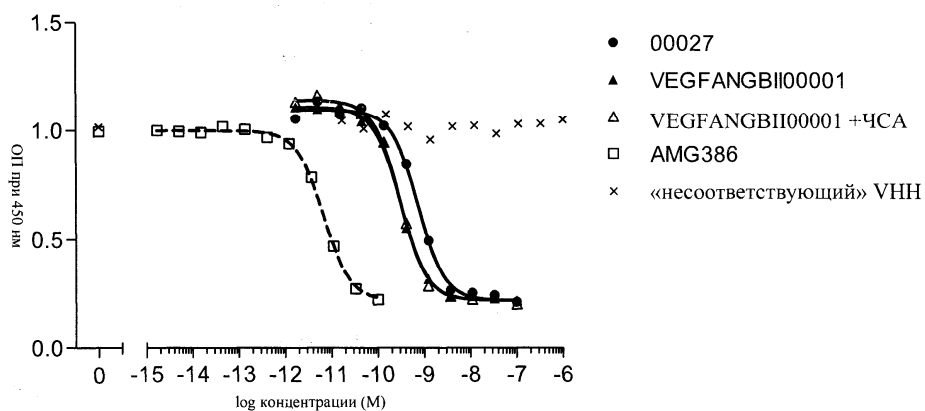


Фиг. 27-2Ж

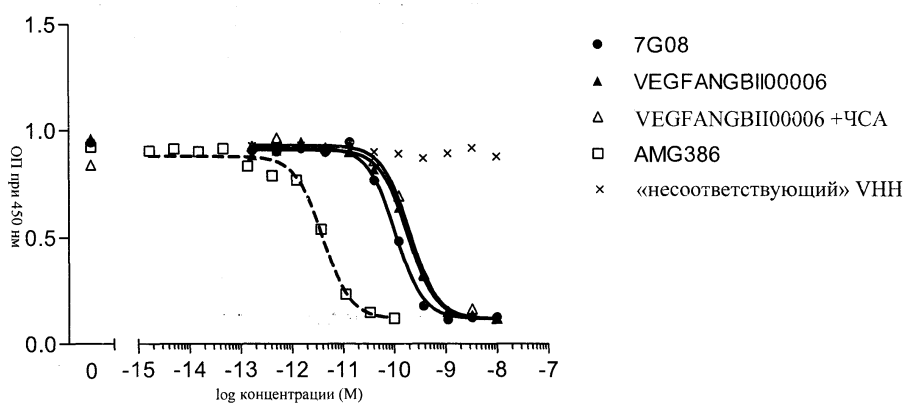
VEGFANGBII00014



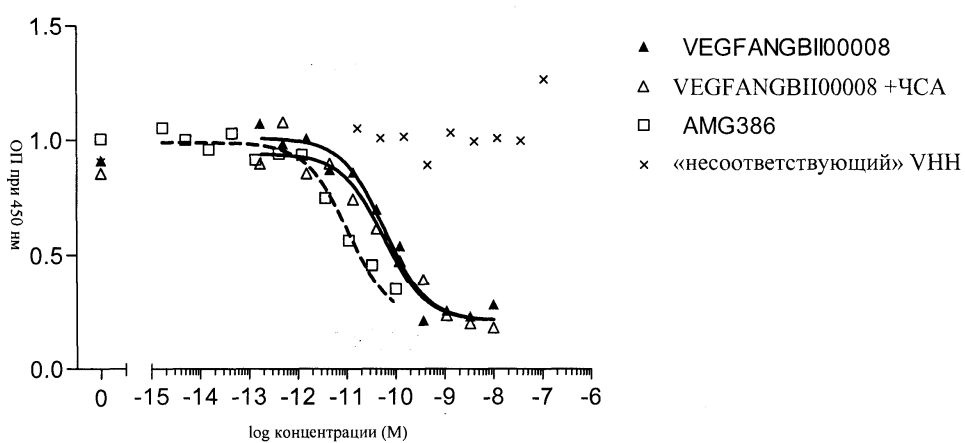
Фиг. 27-23

VEGFANGBII00001

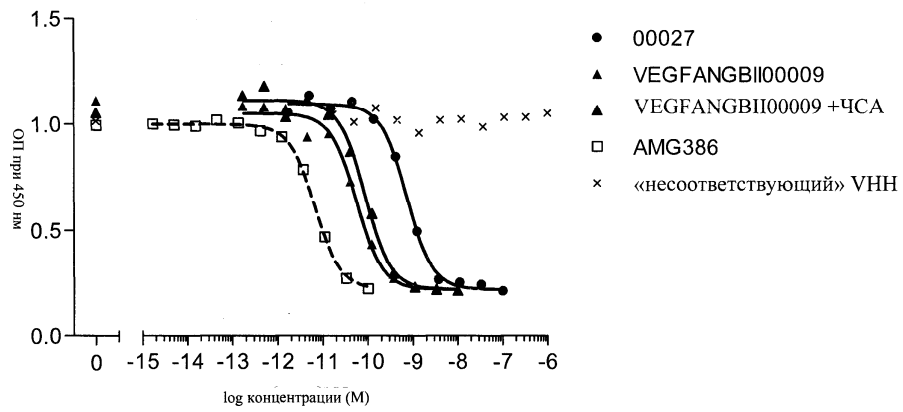
Фиг. 28-1А

VEGFANGBII00006

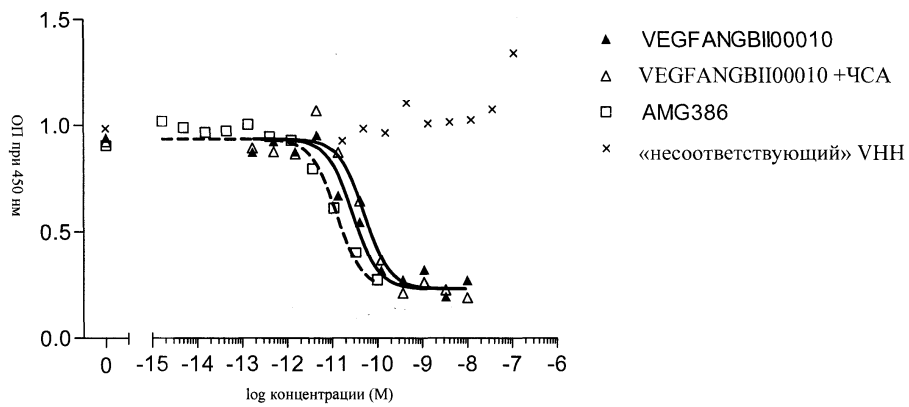
Фиг. 28-1Б

VEGFANGBII00008

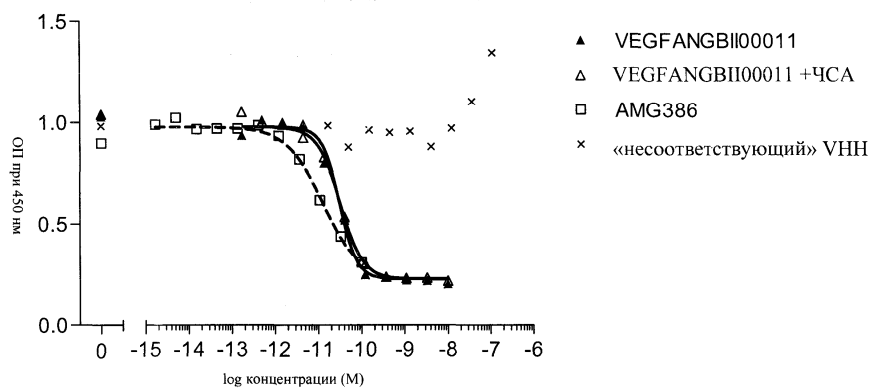
Фиг. 28-1В

VEGFANGBII00009

Фиг. 28-1Г

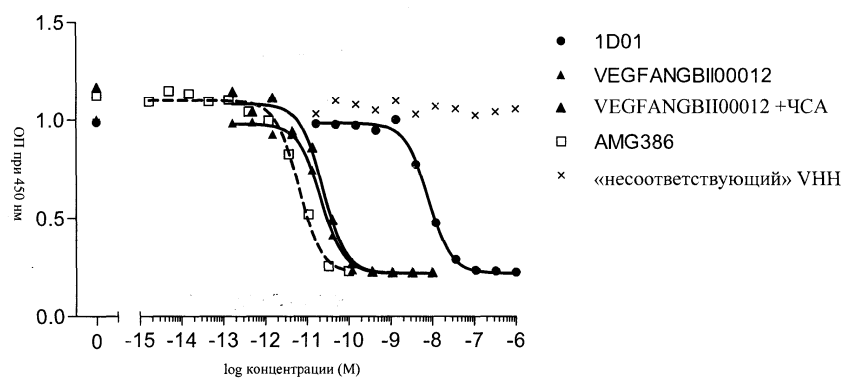
VEGFANGBII00010

Фиг. 28-1Д

VEGFANGBII00011

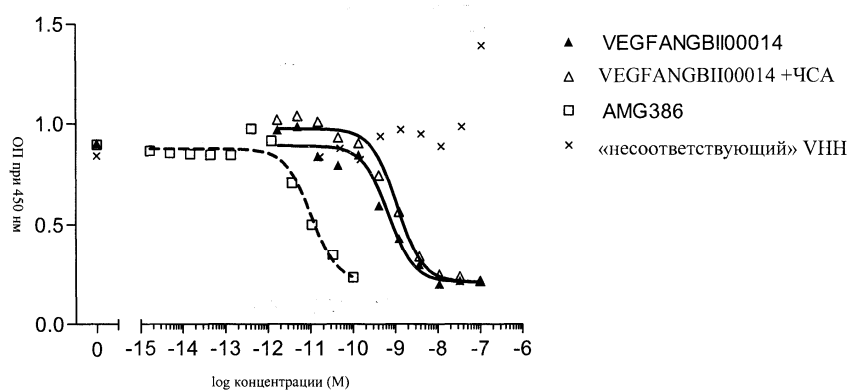
Фиг. 28-1Е

VEGFANGBII00012



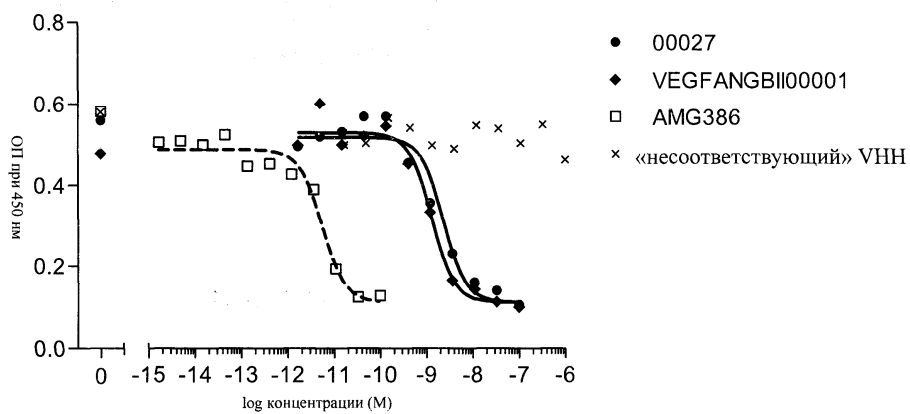
Фиг. 28-1Ж

VEGFANGBII00014



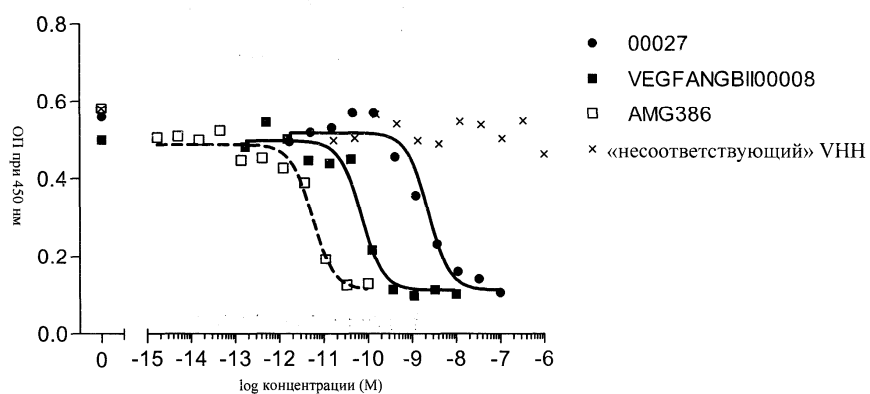
Фиг. 28-13

VEGFANGBII00001



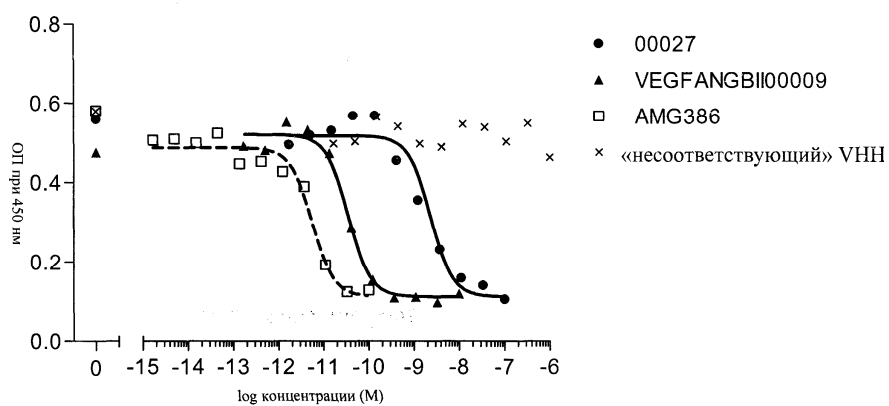
Фиг. 28-2А

VEGFANGBII00008



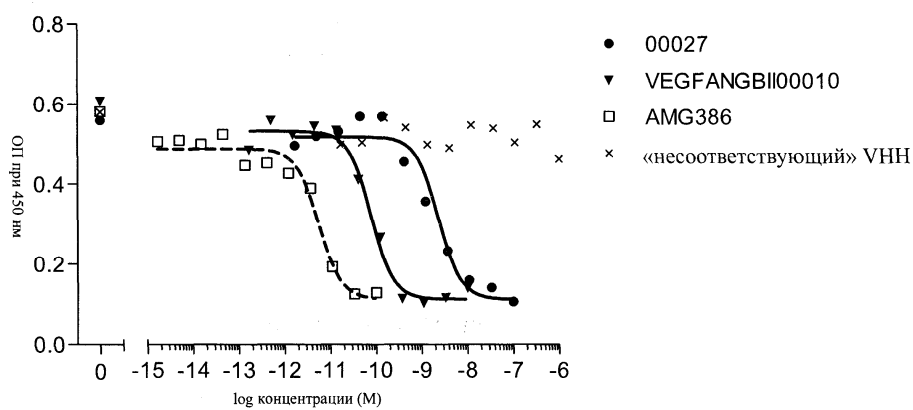
Фиг. 28-2Б

VEGFANGBII00009

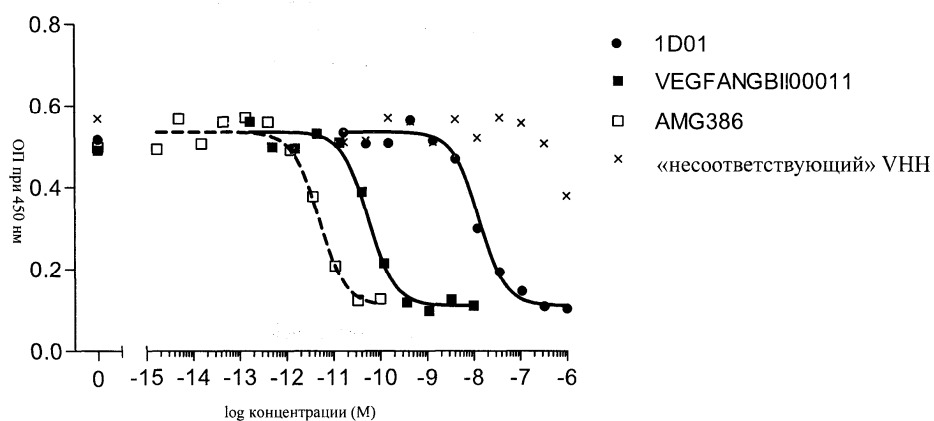


Фиг. 28-2В

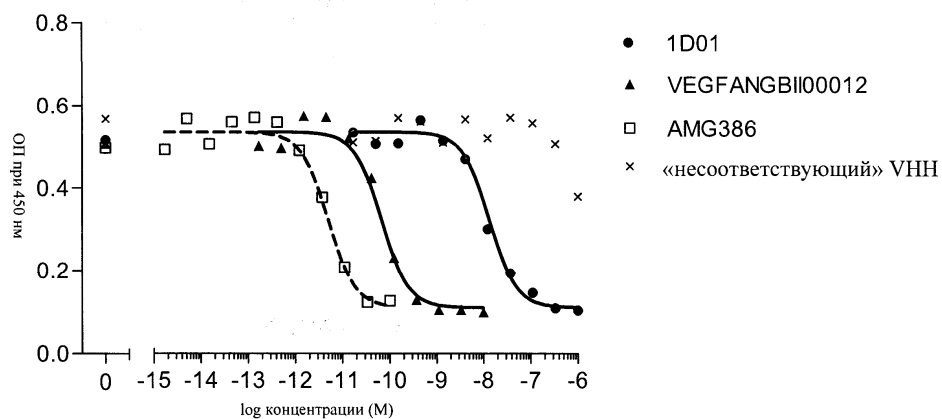
VEGFANGBII00010



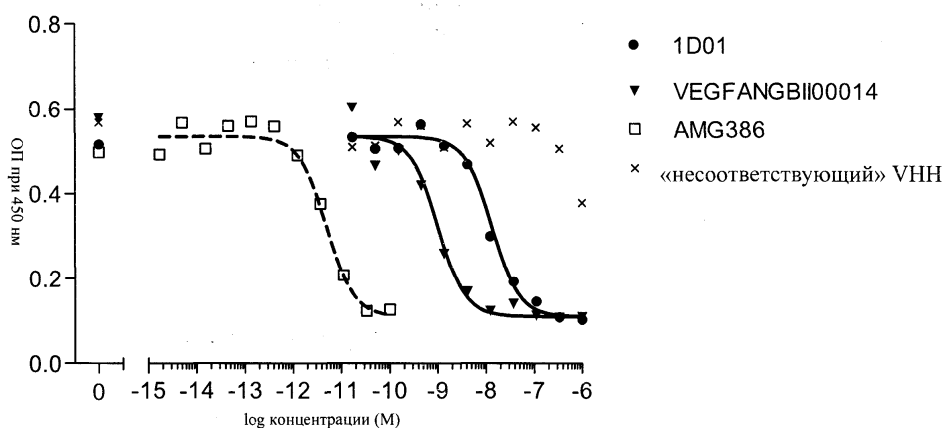
Фиг. 28-2Г

VEGFANGBII00011

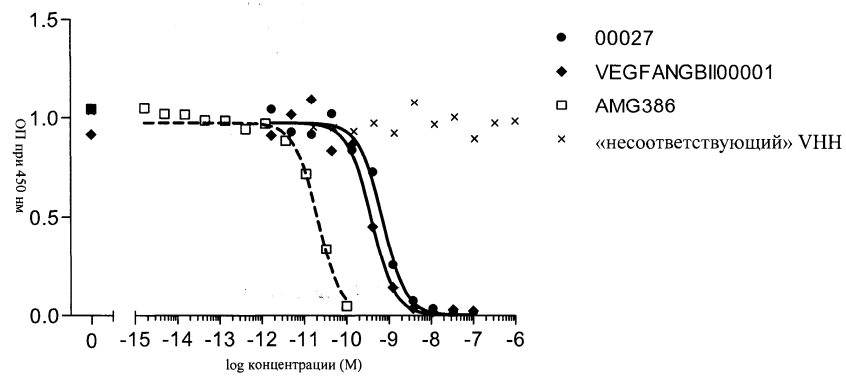
Фиг. 28-2Д

VEGFANGBII00012

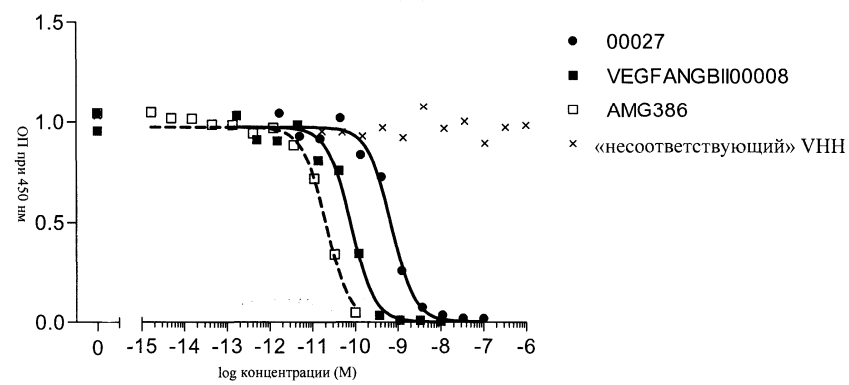
Фиг. 28-2Е

VEGFANGBII00014

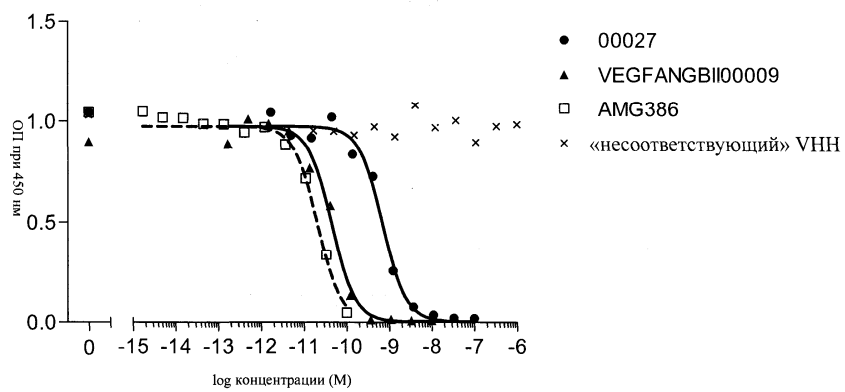
Фиг. 28-2Ж

VEGFANGBII00001

Фиг. 28-3А

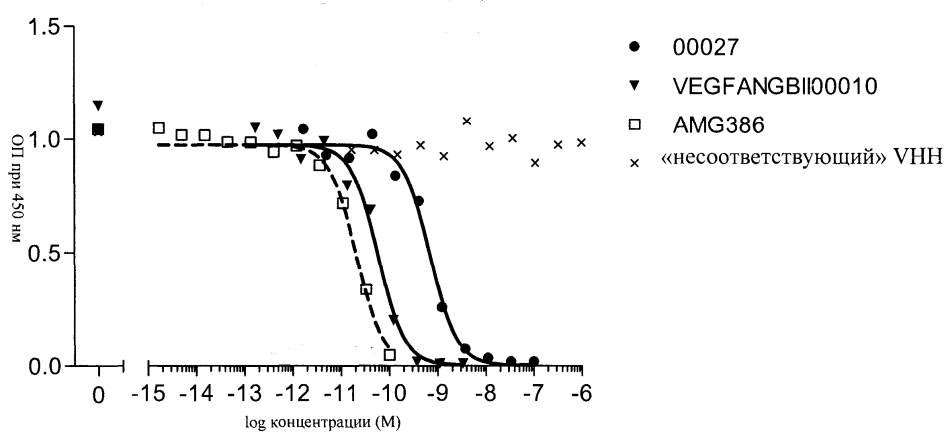
VEGFANGBII00008

Фиг. 28-3Б

VEGFANGBII00009

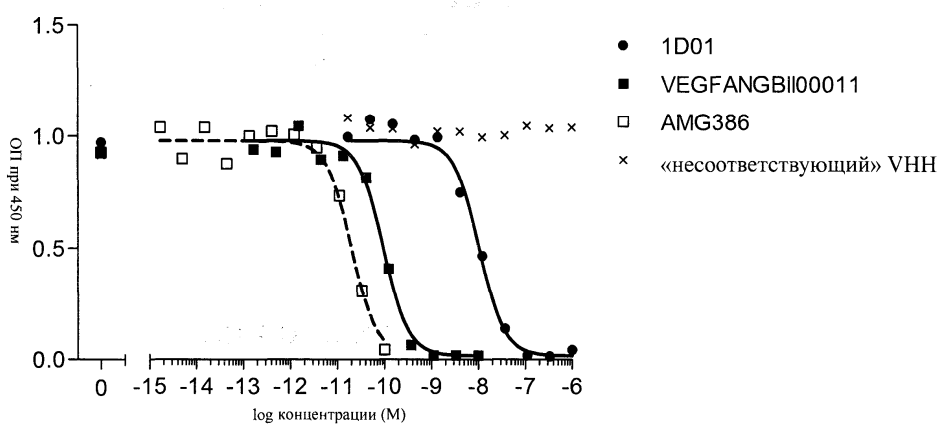
Фиг. 28-3В

VEGFANGBII00010



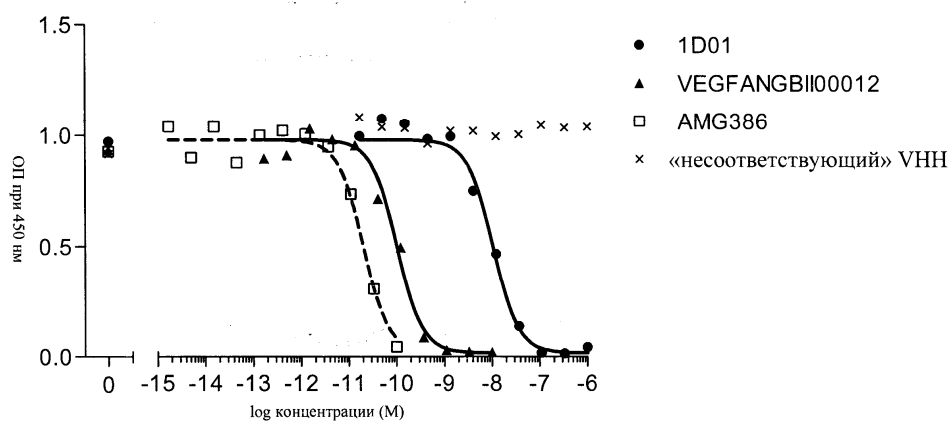
Фиг. 28-3Г

VEGFANGBII00011



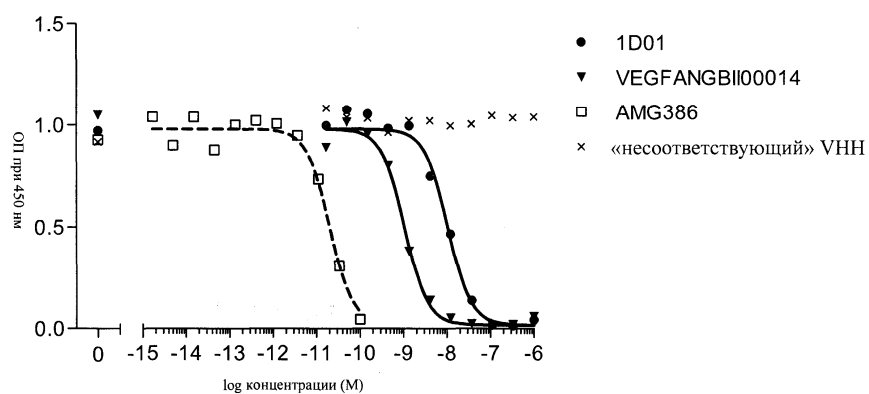
Фиг. 28-3Д

VEGFANGBII00012



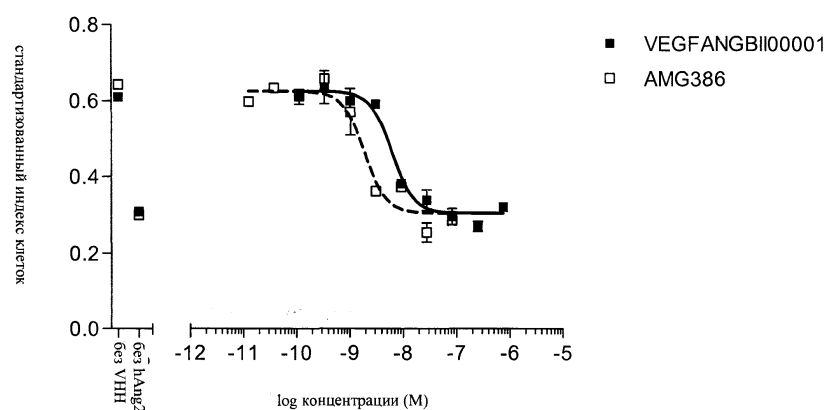
Фиг. 28-3Е

VEGFANGBII00014



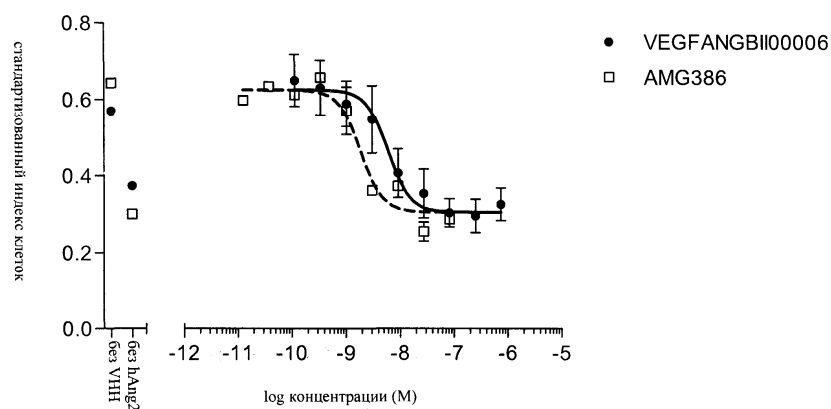
Фиг. 28-3Ж

VEGFANGBII00001



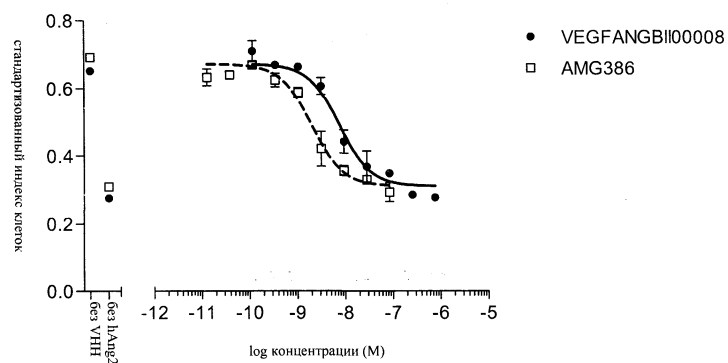
Фиг. 29А

VEGFANGBII00006



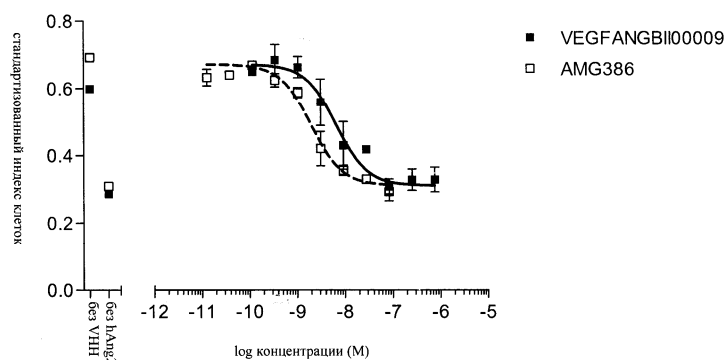
Фиг. 29Б

VEGFANGBII00008



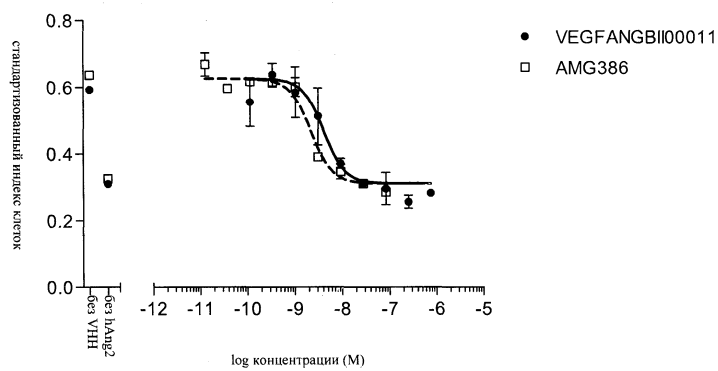
Фиг. 29В

VEGFANGBII00009



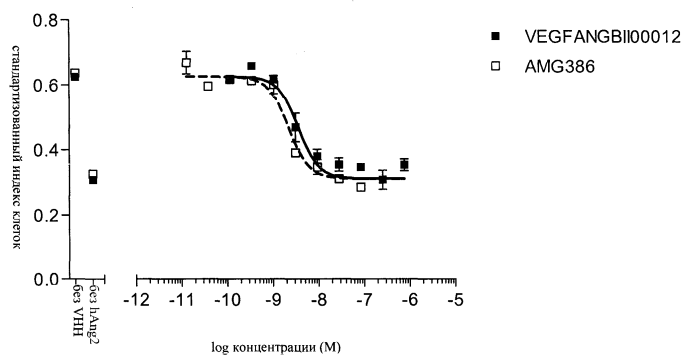
Фиг. 29Г

VEGFANGBII00011



Фиг. 29Д

VEGFANGBII00012



Фиг. 29Е

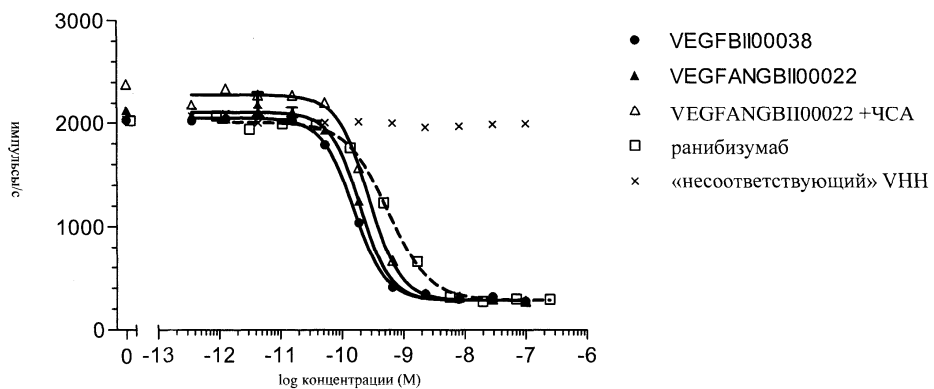
VHH ID	Формат	Описание
VEGFANGBII00015		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00908
VEGFANGBII00016		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00932
VEGFANGBII00017		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00933
VEGFANGBII00018		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00934
VEGFANGBII00019		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00935
VEGFANGBII00020		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00936
VEGFANGBII00021		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00937
VEGFANGBII00022		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00938
VEGFANGBII00023		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00919-9gs-00919
VEGFANGBII00024		VEGFBII00038-9gs-00919-9gs-00919-9gs-ALB11
VEGFANGBII00025		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00921-9gs-00921
VEGFANGBII00026		VEGFBII00038-9gs-00921-9gs-00921-9gs-ALB11
VEGFANGBII00027		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00928
VEGFANGBII00028		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00956-9gs-00956

Обозначения:

	Описание		Описание
	VEGFBII00038		00937
	00908		00938
	00919		00956
	00932		00921
	00933		00928
	00934		ALB11
	00935		линкер 9 GlySer
	00936		

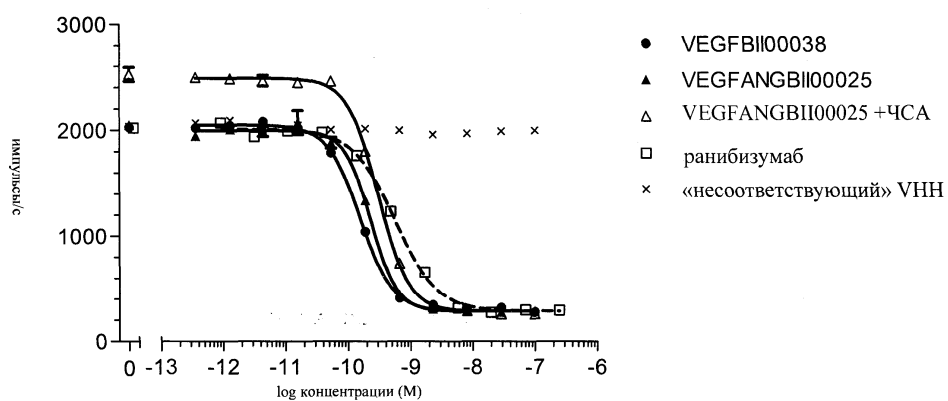
Фиг. 30

VEGFANGBII00022



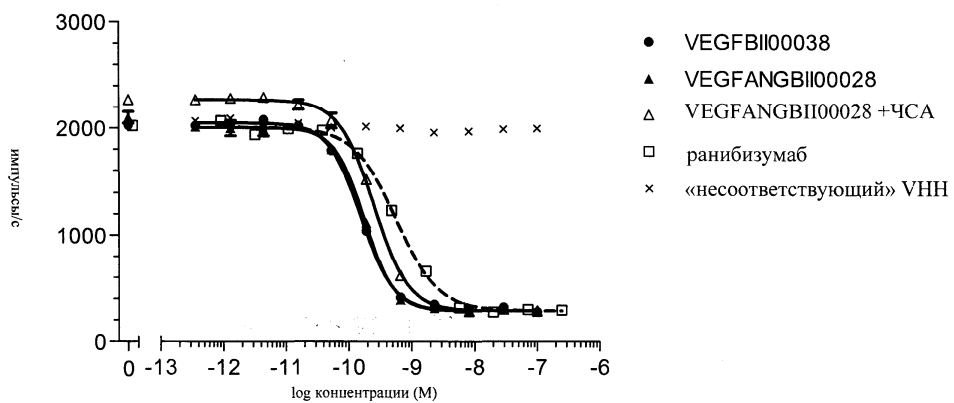
Фиг. 31-1А

VEGFANGBII00025



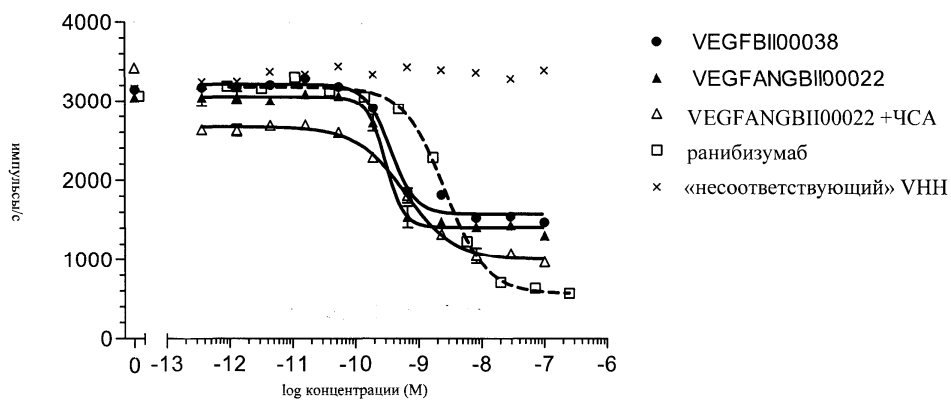
Фиг. 31-1Б

VEGFANGBII00028



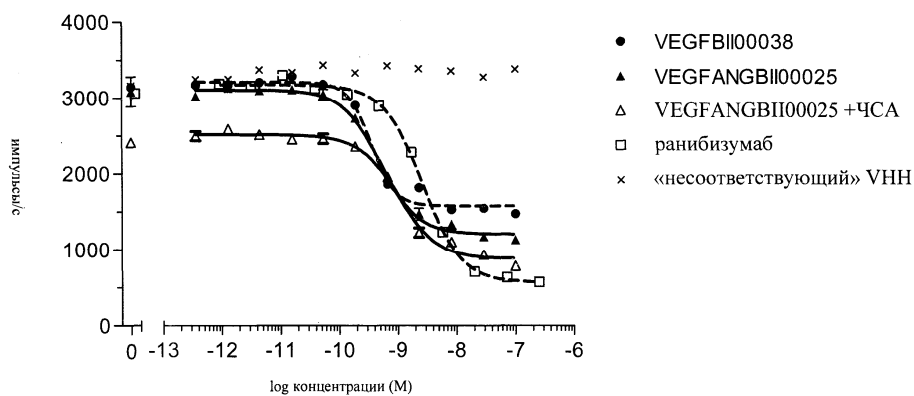
Фиг. 31-1В

VEGFANGBII00022



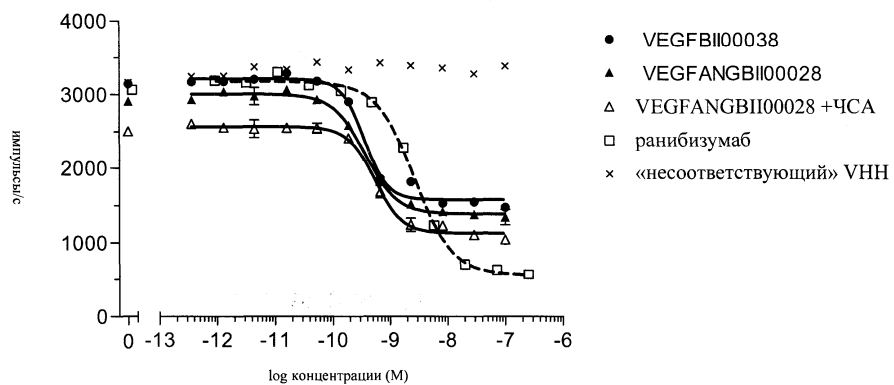
Фиг. 31-2А

VEGFANGBII00025



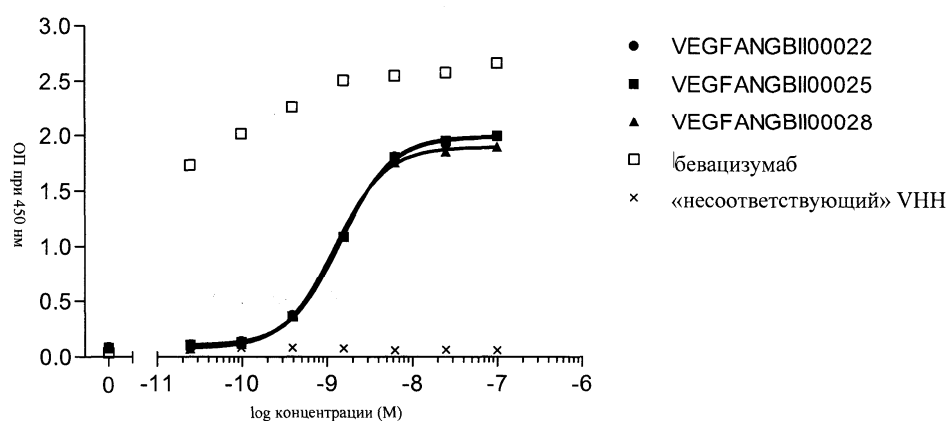
Фиг. 31-2Б

VEGFANGBII00028



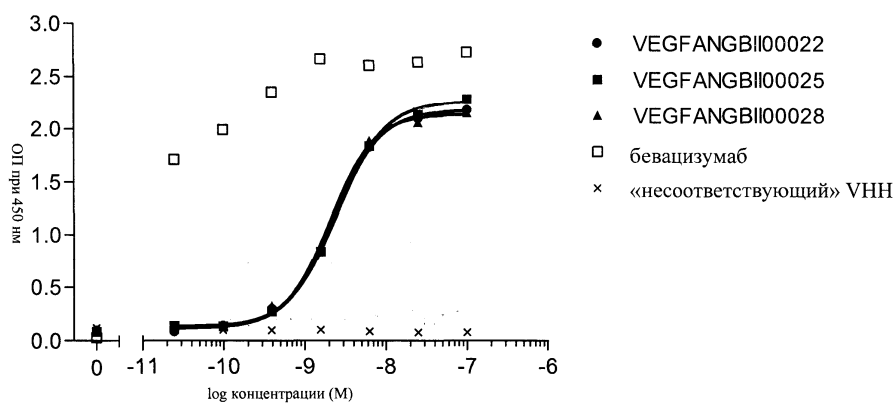
Фиг. 31-2В

Связывание с hVEGF165



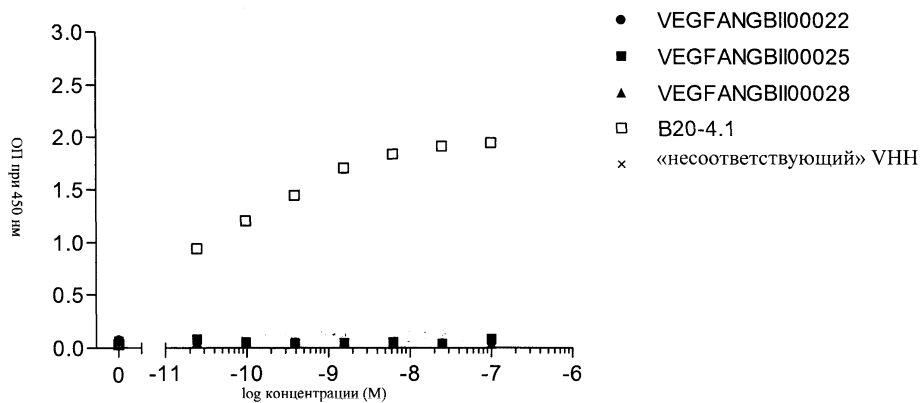
Фиг. 32А

Связывание с hVEGF121



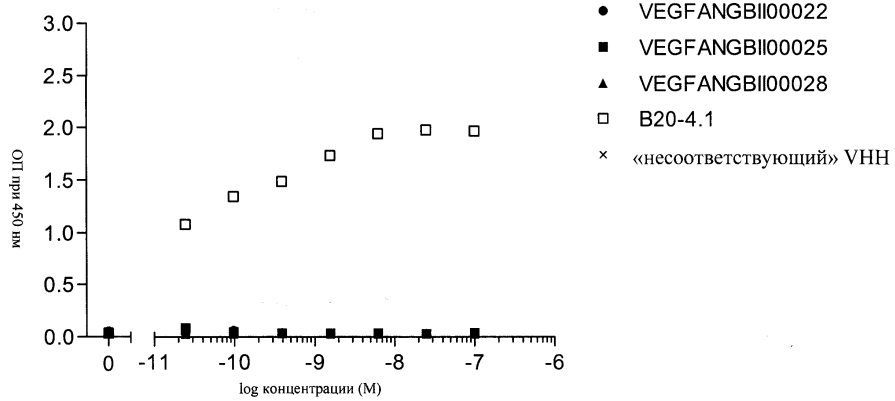
Фиг. 32Б

Связывание с mVEGF164



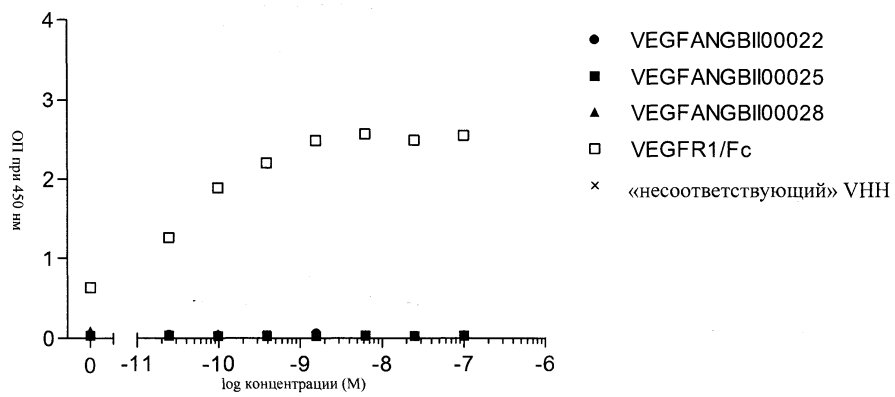
Фиг. 33А

Связывание с rVEGF164



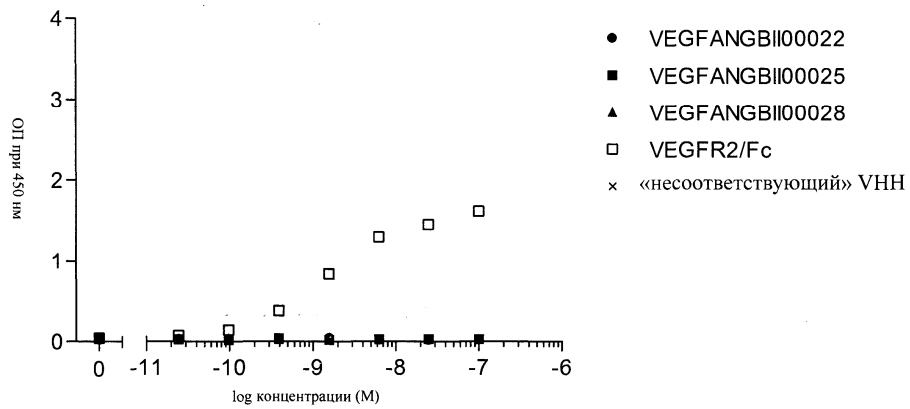
Фиг. 33Б

Связывание с hVEGF-B



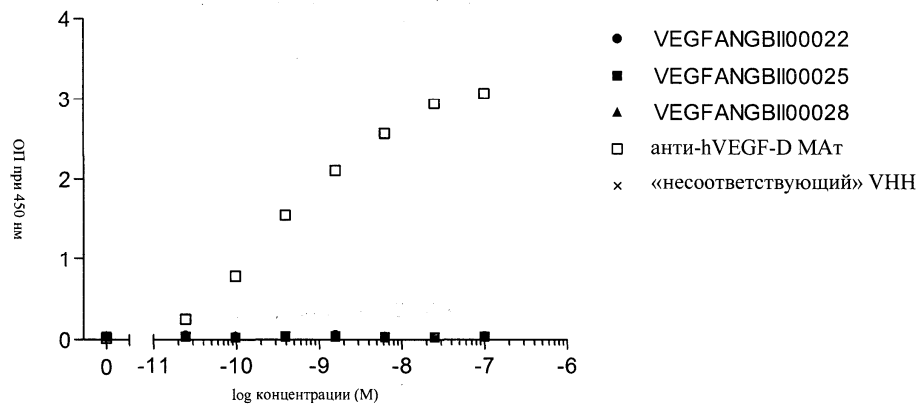
Фиг. 34А

Связывание с hVEGF-C



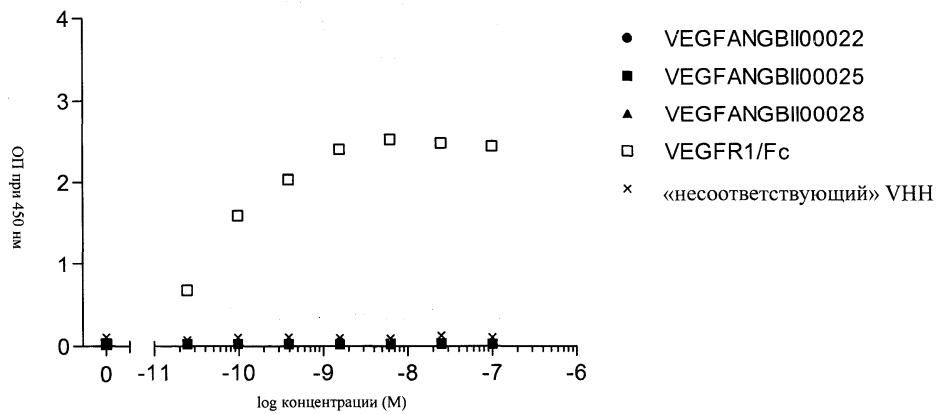
Фиг. 34Б

Связывание с hVEGF-D



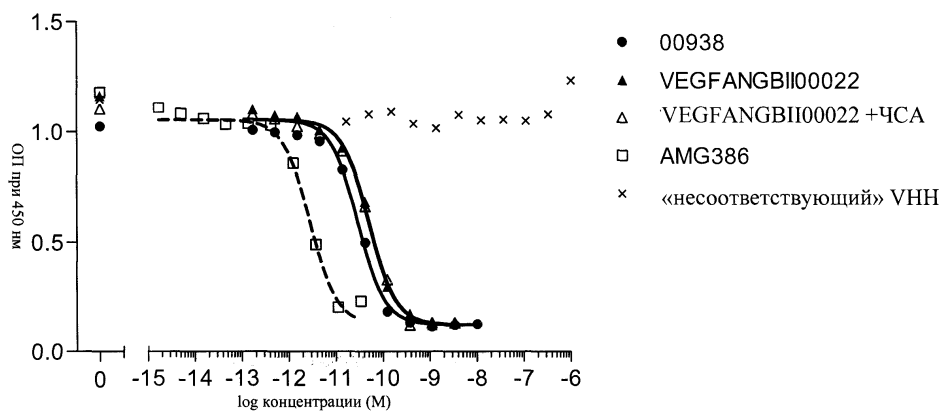
Фиг. 34В

Связывание с hPLGF



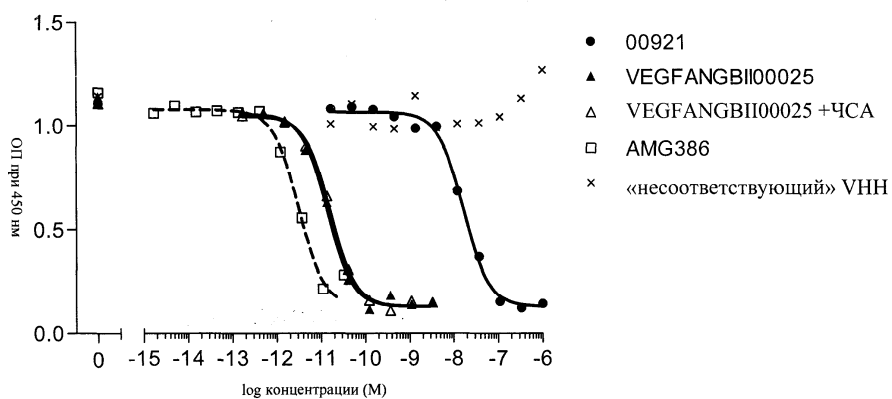
Фиг. 34Г

VEGFANGBII00022



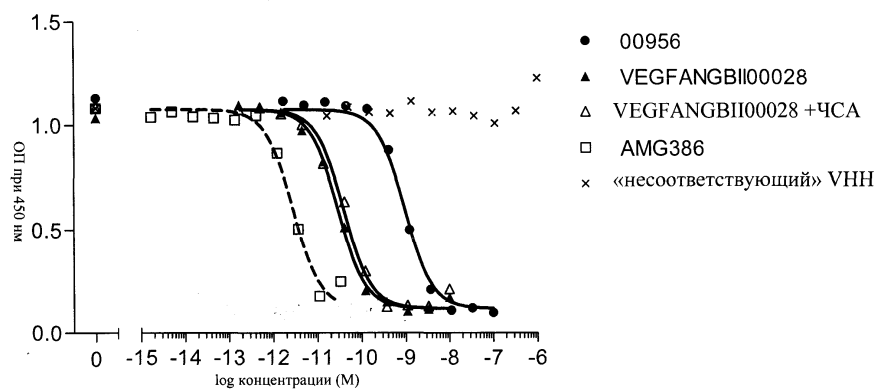
Фиг. 35-1А

VEGFANGBII00025



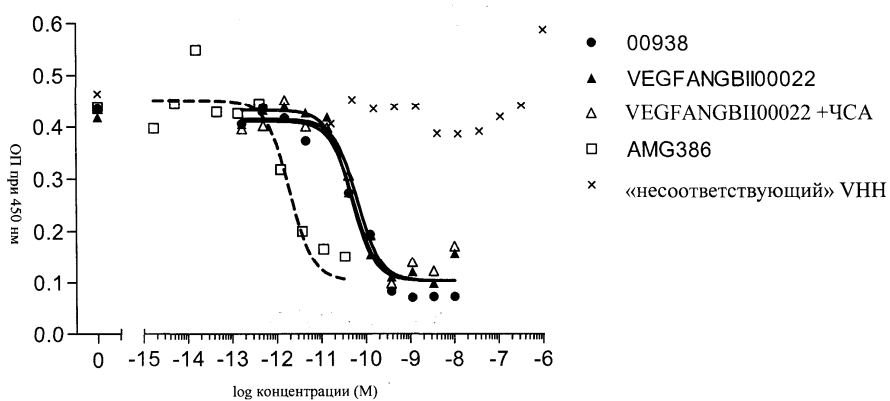
Фиг. 35-1Б

VEGFANGBII00028



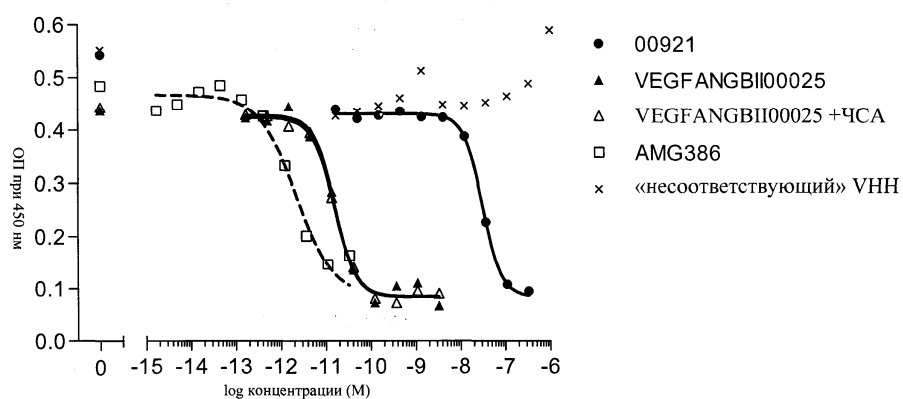
Фиг. 35-1В

VEGFANGBII00022



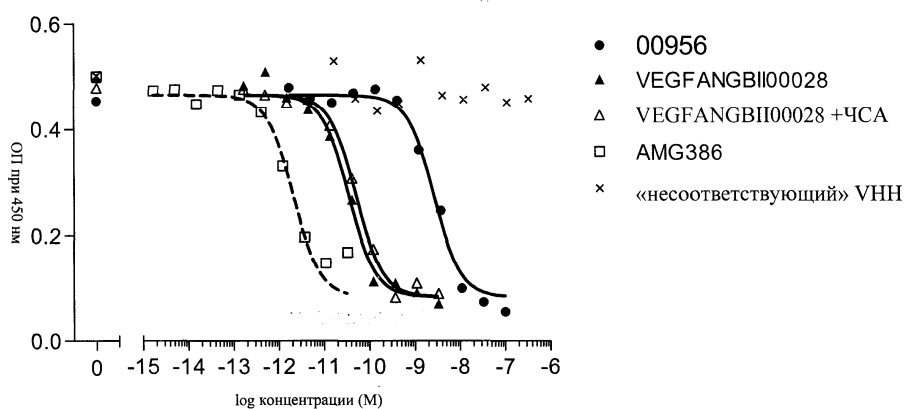
Фиг. 35-2А

VEGFANGBII00025



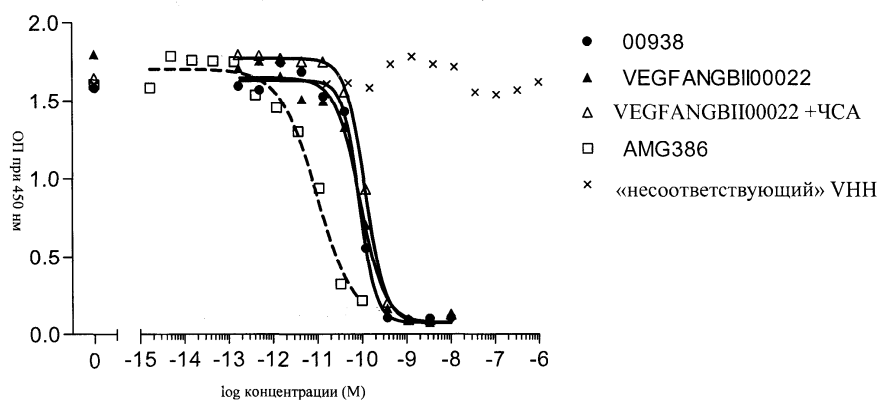
Фиг. 35-2Б

VEGFANGBII00028



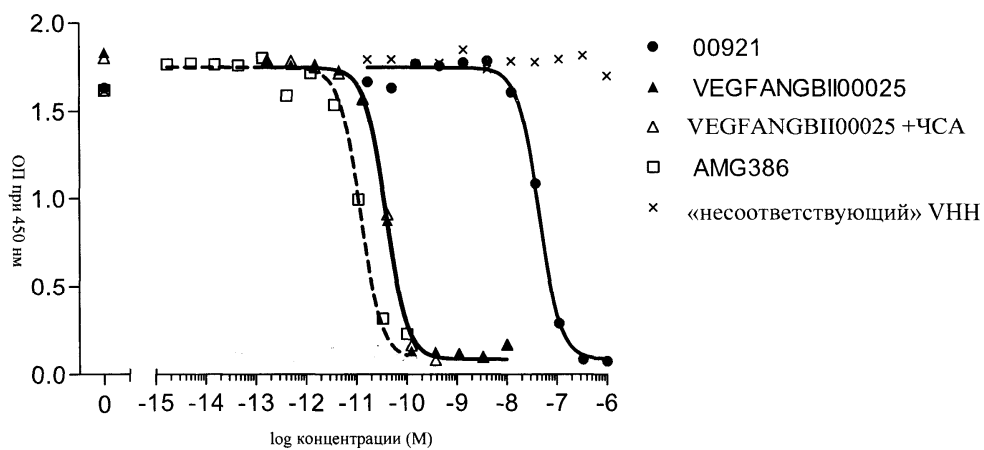
Фиг. 35-2В

VEGFANGBII00022



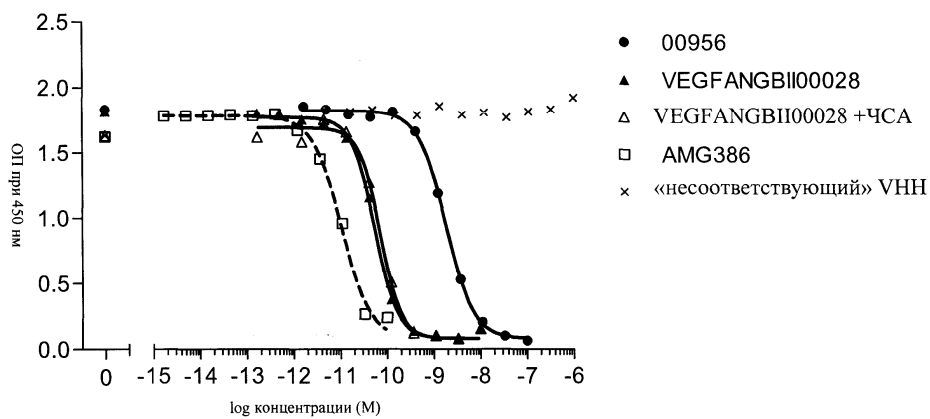
Фиг. 35-3А

VEGFANGBII00025



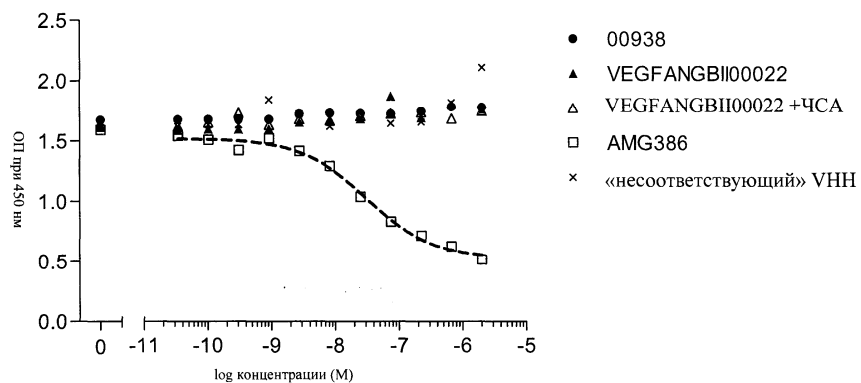
Фиг. 35-3Б

VEGFANGBII00028



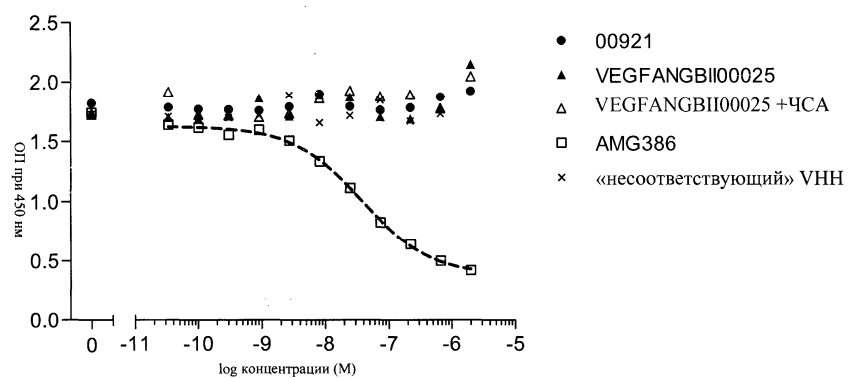
Фиг. 35-3В

VEGFANGBII00022



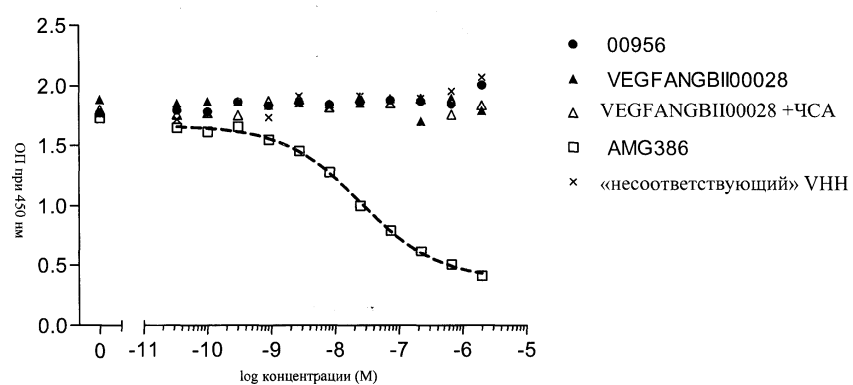
Фиг. 36А

VEGFANGBII00025



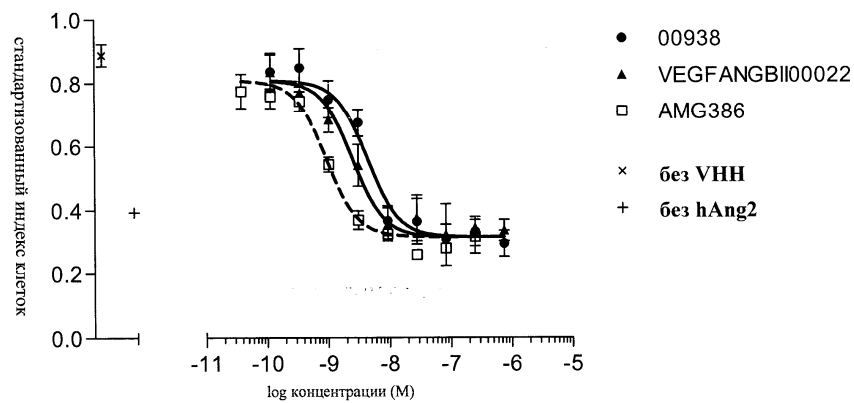
Фиг. 36Б

VEGFANGBII00028

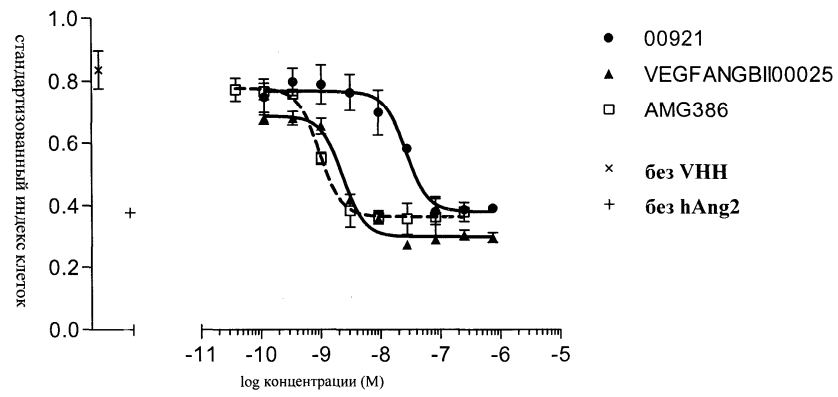


Фиг. 36В

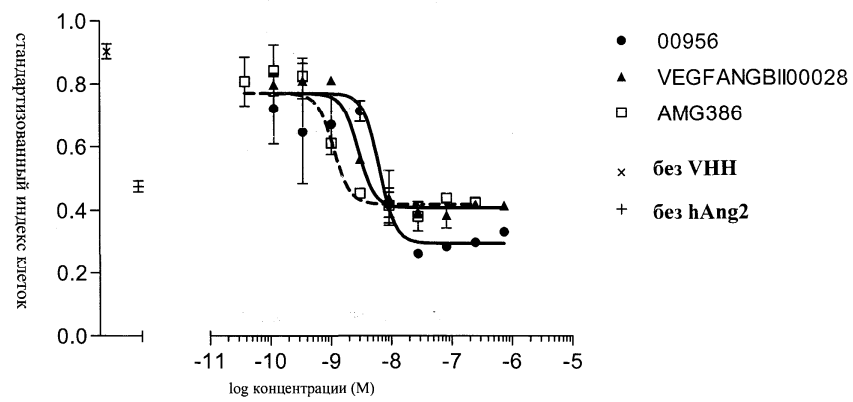
VEGFANGBII00022



Фиг. 37А

VEGFANGBII00025

Фиг. 37Б

VEGFANGBII00028

Фиг. 37В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2