

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191893** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.12.02

(22) Дата подачи заявки
2020.01.08

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) **МОЛЕКУЛЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ РЕЦЕПТОР ТРАНСФЕРРИНА, ИХ КОНЬЮГАТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 19305031.7

(32) 2019.01.09

(33) EP

(86) PCT/EP2020/050318

(87) WO 2020/144233 2020.07.16

(71) Заявитель:

**ВЕКТ-ОРУС; ЮНИВЕРСИТЕ ДЕ' Э-
МАРСЕЙ; САНТР НАСЪОНАЛЬ ДЕ
ЛЯ РЕШЕРШ СЪЕНТИФИК (FR)**

(72) Изобретатель:

**Коэн Роми, Давид Марион,
Хрещатиский Мишель (FR)**

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к молекулам переменного домена только тяжелой цепи верблюжьего иммуноглобулина (VHH), которые связывают TfR, и к их применению, например, для транспортировки молекул, представляющих фармацевтический или диагностический интерес, в клетки и в органы при патологических состояниях, включая рак.

202191893
A1

202191893

A1

МОЛЕКУЛЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ РЕЦЕПТОР ТРАНСФЕРРИНА, ИХ КОНЬЮГАТЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Изобретение относится к молекулам, связывающим рецептор трансферрина (TfR), и к их применению. Изобретение, в частности, относится к молекулам переменного домена только тяжелых цепей верблюжьего иммуноглобулина (V_HH), которые связывают TfR на поверхности клеточных мембран, таких как мембраны гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), и к их применению, например, для транспорта молекул, представляющих интерес для фармацевтики или диагностики, к клеткам центральной нервной системы, или тканям или органам, экспрессирующим TfR, таким как рак.

Предшествующий уровень техники

По данным *Global Industry Analysts*, мировой рынок препаратов для лечения патологий центральной нервной системы (ЦНС, головного и спинного мозга) в 2015 году составил около 100 миллиардов долларов, из которых около 9 миллиардов долларов представляют продукты, полученные с помощью технологий доставки лекарств (*Jain, 2008, Jain PharmaBiotech Report, Drug Delivery in CNS disorders*). Таким образом, неврология сегодня входит в тройку крупнейших терапевтических направлений наряду с сердечно-сосудистой медициной и онкологией. Хотя количество людей, страдающих расстройствами и заболеваниями ЦНС во всем мире, превышает количество людей с сердечно-сосудистыми заболеваниями или раком, неврология остается недостаточно развитым рынком. Это объясняется тем, что 98% потенциальных средств для лечения патологий ЦНС не проникают через ГЭБ (*Pardridge, 2003, Mol. Interv., 3, 90-105*).

Действительно, мозг защищен от потенциально токсичных веществ наличием двух основных физиологических барьерных систем: ГЭБ и гематоликворного барьера (ГЛБ). ГЭБ считается основным путем поглощения лигандов плазмы. Его площадь примерно в 5000 раз больше, чем у ГЛБ. Общая длина составляющих кровеносных сосудов ГЭБ равна примерно 600 км. Каждый см³ коры головного мозга содержит эквивалент 1 км кровеносных сосудов. Общая площадь поверхности ГЭБ оценивается в 20 м² (*De Boer et al., 2007, Clin. Pharmacokinet., 46(7), 553-576*). Таким образом, церебральный эндотелий, составляющий ГЭБ, представляет собой большую поверхность потенциального обмена между кровью и нервной тканью. Однако этот церебральный эндотелий из-за своих специфических свойств также является серьезным препятствием для использования лекарственных средств с целью лечения расстройств ЦНС.

Действительно, ГЭБ состоит из эндотелиальных клеток капилляров головного мозга (ВСЕС), которые обладают уникальными свойствами, не обнаруженными у

фенестрированных эндотелиальных клеток, составляющих сосудистую систему других органов. ВСЕС образуют плотные контакты, они окружены базальной пластиной, нервными окончаниями астроцитов, перичеситами, микроглиальными и нейрональными клетками, которые вместе составляют высокоизбирательный барьер, который контролирует молекулярный обмен между кровью и мозгом, поддерживает гомеостаз мозга и очень эффективно защищает мозг от токсинов и патогенов. Недостатком является то, что ГЭБ также непроницаем для большинства молекул, включая лекарства и агенты визуализации. Как правило, лишь немногие небольшие липофильные молекулы размером приблизительно от 450 до 600 Дальтон могут проходить через ГЭБ (только 2% от всех потенциальных лекарств), а большинство, если не все молекулы с более высокой молекулярной массой, такие как терапевтические пептиды, белки, антитела, которые показывают многообещающие результаты в исследованиях *in vitro* и на животных для лечения расстройств ЦНС, не проходят через ГЭБ.

Таким образом, ГЭБ рассматривается как главное препятствие, которое необходимо преодолеть при разработке новых методов лечения расстройств ЦНС (*Neuwelt et al., 2008, Lancet Neurol., 7, 84-96*). Одним из приоритетных направлений исследований, связанных с открытием молекул для лечения, диагностики или визуализации патологий ЦНС, является разработка стратегий, которые обеспечат/ увеличат прохождение активных веществ через ГЭБ.

Одним из подходов для пересечения ГЭБ является введение лекарств путем прямой инъекции в ЦНС (например, внутривентрикулярной, интрацеребральной или интратекальной) или разрушение ГЭБ. Однако такие высокоинвазивные подходы имеют недостатки (такие как стоимость, кратковременный эффект) и потенциальные риски.

Рассмотрены фармакологические стратегии, основанные на добавлении липидных или липофильных групп к активным веществам (трансцеллюлярная липофильная диффузия, ТЛД) или на использовании липосом (*Zhou et al., 1992, J. Control. Release, 19, 459-486*). Однако добавление липидных или липофильных групп или использование липосом часто приводит к большим и неспецифическим комплексам выше оптимального предела в 450 Дальтон, которые относительно неэффективны для пересечения ГЭБ (*Levin, 1980, J. Med. Chem., 23, 682-684; Schackert et al., 1989, Selective Cancer Ther., 5, 73-79*).

Среди стратегий, оцениваемых для доставки белковых терапевтических средств в мозг, «захват» клеточного аппарата, участвующего в транспортировке естественных питательных веществ и эндогенных лигандов через ГЭБ, представляется наиболее безопасным и эффективным (*Fang et al., 2017; Jones and Shusta, 2007; Pardridge et al., 1992*). Транспортировку макромолекул через ГЭБ может облегчить рецептор-

опосредованный трансцитоз (POT), физиологический процесс, включающий связывание лиганда с его рецептором, экспрессируемым ВСЕС, интернализацию посредством эндоцитоза, внутриклеточный перенос и диссоциацию от рецептора в сортирующих эндосомах с последующим его высвобождением на аблюминальной поверхности ГЭБ (*Tuma and Hubbard, 2003; Xiao and Gan, 2013*). В связи с этим WO2010/046588 и WO2011/131896 раскрывают различные пептиды с высокой аффинностью к рецептору ЛПНП, который способен транспортировать лекарственные средства или другие молекулы через ГЭБ.

Другой рецептор, изучаемый для транспортировки лекарств через ГЭБ, - это рецептор трансферрина (TfR), который участвует в транспорте железа в головной мозг с помощью своего лиганда трансферрина (Tf) (*Fishman et al., 1987*). Было показано, что этот рецептор высоко экспрессируется в эндотелии головного мозга (*Jefferies et al., 1984; Pardridge et al., 1987*), хотя он также широко распространен в клетках крови и легких (*Chan and Gerhardt, 1992*). Хотя использование Tf в качестве переносчика было изучено (*Chang et al., 2009; Jain et al., 2011; Yan et al., 2013*), транспортный механизм этой молекулы является насыщаемым и конкурирует с эндогенным Tf. Моноклональные антитела против TfR были изучены как векторы для доставки в головной мозг, включая антитело OX26, которое нацелено на TfR крысы (*Moos and Morgan, 2001; Pardridge et al., 1991; Ulbrich et al., 2009*) или 8D3 (*Pardridge, 2015; Zhang and Pardridge, 2005; Zhou et al., 2010*) и антитела R17-217 (*Lee et al., 2000; Pardridge, 2015; Ulbrich et al., 2009*), которые нацелены на TfR мыши (см. также WO2012075037, WO2013177062, WO201275037, WO2016077840, WO2016208695). Однако к недостаткам этих антител можно отнести отсутствие перекрестно-видовой реактивности и особенно отсутствие связывания с человеческим TfR, что исключает доклинические или клинические исследования. Кроме того, способность таких антител эффективно переносить лекарства через ГЭБ все еще остается предметом дискуссий.

Соответственно, несмотря на прогресс в данной области техники, существует потребность в дополнительных эффективных способах и агентах, способных улучшить доступ лекарств к ЦНС.

Изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает новые связывающие молекулы, которые можно использовать для эффективного переноса молекул через ГЭБ. Более конкретно, изобретение раскрывает молекулы VHH, которые связывают как человеческий, так и нечеловеческий TfR, и которые могут доставлять лекарства в ЦНС посредством трансцитоза. Изобретение демонстрирует, что молекулы VHH по изобретению могут

эффективно мигрировать через ЦНС и доставлять конъюгированные лекарственные средства или агенты визуализации *in vivo*. Таким образом, такие VHH представляют собой ценные молекулы для использования в терапевтических или диагностических подходах.

Таким образом, объект изобретения относится к молекулам VHH, которые связывают человеческий и не-человеческий TfR.

Еще один объект изобретения относится к молекулам VHH, которые связывают как человеческий, так и не-человеческий TfR (например, TfR грызунов, таких как мыши или крысы) по существу с одинаковой аффинностью.

Еще одним объектом изобретения является молекула VHH, которая связывает человеческий и не-человеческий TfR, и может преодолевать гематоэнцефалический барьер человека («ГЭБ»).

Предпочтительные VHH по изобретению связываются как с человеческим, так и с мышинным TfR, могут пересекать человеческий ГЭБ, и имеют аффинность к TfR (Kd) ниже 10 мкМ, предпочтительно от 0,1 нМ до 10 мкМ.

Изобретение также относится к химерным агентам (также взаимозаменяемо называемым в настоящей заявке «конъюгатами»), включающим один или несколько VHH, как определено выше, конъюгированных по меньшей мере с одной молекулой или каркасом. Молекула, конъюгированная с VHH, может быть, например, любым активным соединением, используемым в медицине, таким как лекарство, вирус, диагностический агент, индикатор и т.д. Химерный агент может также содержать, в дополнение к указанному активному соединению или вместо него, стабилизирующую группу. (например, Fc или IgG) для увеличения периода полужизни в плазме VHH или конъюгата. Конкретные химерные агенты по изобретению, таким образом, содержат по меньшей мере один VHH, стабилизирующую группу и активное соединение в любом порядке (например, конъюгат VHH-Fc-терапевтический агент).

Изобретение также относится к фармацевтическим или диагностическим композициям, содержащим химерный агент, как определено выше, и при необходимости, подходящее вспомогательное вещество.

Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, векторам и клеткам-хозяевам, кодирующим VHH или химерный агент, как определено выше.

В изобретении также предложены способы получения VHH или химерного агента, включающие культивирование клетки-хозяина, как определено выше, в условиях, обеспечивающих экспрессию нуклеиновой кислоты.

Изобретение также относится к способам получения химерного агента, включающим конъюгацию одного или нескольких VHH, как определено выше, с

молекулой, агентом или каркасом, ковалентно или нековалентно.

Другой объект изобретения относится к молекуле VHH или химерному агенту, как определено выше, для использования в качестве лекарственного средства или диагностического агента.

Другой объект изобретения относится к применению молекулы VHH, как определено выше, для увеличения биологической активности и/или доставки в ЦНС интересующего вещества.

Другой объект изобретения относится к способу улучшения или обеспечения прохождения молекулы через ГЭБ, включающему связывание указанной молекулы с VHH, как определено выше.

Другим объектом изобретения является способ лечения патологии у субъекта, включающий применение у субъекта конъюгата, как определено выше.

Другим объектом изобретения является способ визуализации конкретного типа клеток, ткани-мишени или органа у субъекта, включающий введение субъекту конъюгата, как определено выше.

Другим объектом изобретения является усовершенствованный способ лечения патологии у субъекта с помощью лекарственного средства, где усовершенствование заключается в связывании указанного лекарственного средства с молекулой VHH, как определено выше.

Изобретение может быть использовано у любого млекопитающего, в частности, у человека.

Подписи к чертежам

Фиг. 1. Экспрессия TfR на ГЭБ. Вестерн-блоттинг выполняли на мембранной фракции микрососудов головного мозга (BMV) и эндотелиальных клетках микрососудов головного мозга (BMES) от мышей, крыс, свиней и приматов (NHP; макака-резус). Количество загруженного белка указано под изображением. n-d: нерасщепленный; dig-: расщепленный.

Фиг. 2. Оценка клеточных линий CHO, экспрессирующих TfR человека или мыши. (A) Карта плазмидной конструкции, используемой для создания клеточной линии CHO-hTfR-EGFP. (B) Типичные конфокальные микрофотографии клеток CHO-hTfR-EGFP (зеленый), инкубированных в течение 1 часа при 37°C с Tf-Alexa647 (250 мкг/мл, красный). Ядра клеток метили красителем Hoechst # 33342 в концентрации 0,5 мкг/мл (синий). Совместная маркировка отображена желтым цветом на объединенном изображении. (C) Вестерн-блоттинг, выполненный на препаратах клеточных мембран клеток CHO, экспрессирующих hTfR-EGFP и mTfR-EGFP, по сравнению с CHO WT

(дикого типа), с использованием кроличьих анти-TfR антител (1/1000) или мышинных антител против GFP (зеленого флуоресцентного белка) (1/1000) с последующим введением конъюгированных с пероксидазой хрена вторичных антител против иммуноглобулинов кролика или мыши (1/10000).

Фиг. 3. Связывание с клеточной поверхностью и эндоцитоз VHH A и VHH Z на клетках CHO, экспрессирующих hTfR и mTfR. Типичные конфокальные микрофотографии клеток CHO-hTfR-EGFP и CHO-mTfR-EGFP (зеленый), инкубированных в течение 1 часа при 37°C с VHH A (A, B) и с контрольным VHH Z (C, D) при 20 мкг/мл, с детекцией после фиксации ПФА (параформальдегидом) с последующей пермеабиллизацией или без пермеабиллизацией клеточных мембран тритоном X-100, с мышинным анти-cMyc (1/1000) и конъюгированным с Alexa594 вторичным антителом против иммуноглобулинов мыши (1/800, красный). Ядра клеток метили Hoechst # 33342 в концентрации 0,5 мкг/мл (синий). Совместная маркировка отображается желтым/оранжевым цветом на объединенных изображениях.

Фиг. 4. Определение кажущейся Kd VHH на линиях клеток CHO, экспрессирующих hTfR и mTfR. (A) Клетки CHO-hTfR-EGFP и CHO-mTfR-EGFP инкубировали 1 час при 4°C с различными концентрациями VHH, с детекцией мышинным анти-6His (1/1000) и вторичным анти-мышинным антителом, конъюгированным с Alexa647 (1/200 или 1/400). Измерения проводили с помощью проточной цитометрии. Отношение интенсивности флуоресценции для каждой точки было нормализовано с соответствующим сигналом EGFP (усиленного зеленого флуоресцентного белка) (экспрессия рецептора) и дало начало произвольной единице. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для 3 независимых экспериментов. (B) Характеристики выбранных VHH: молекулярная масса (Да); Теоретическое значение pI; Кажущаяся Kd на человеческом TfR (нМ); Кажущаяся Kd на TfR мыши (нМ). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для 3 независимых экспериментов. NB: нет связывания.

Фиг. 5. Анализы конкуренции между VHH и Tf. (A) Принцип конкурентного анализа. На первом этапе клетки CHO-hTfR-EGFP инкубировали 1 час при 4°C с конкурентом в серии разведений. На втором этапе добавляли метку на ЕС90 и инкубировали в течение 1 часа при 4°C. Затем выявляли метку с помощью соответствующей системы детекции. Измерения проводили с помощью проточной цитометрии. Отношение интенсивности флуоресценции для каждой точки было нормализовано с соответствующим сигналом EGFP (экспрессия рецептора) и дало начало произвольной единице. (B) Клетки CHO-hTfR-EGFP инкубировали с конкурентом (Tf).

Затем добавляли метки (VНН) на ЕС90 и определяли их с помощью мышинных антител против сМус (1/50) и конъюгированных с Alexa647 вторичных анти-мышинных антител (1/200). (С) Клетки CHO-hTfR-EGFP инкубировали с конкурентами (VНН). Затем добавляли метку (Tf-Alexa647) на ЕС90 и выявляли напрямую. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для 3 независимых экспериментов.

Фиг. 6. Стратегии конъюгации VНН. Используя химическую конъюгацию или рекомбинантную гибридизацию, VНН можно применять для векторизации всех видов молекул, включая пептиды, мРНК, красители, наночастицы (НЧ), липосомы, агенты визуализации и антитела, но не ограничиваясь ими. Более того, VНН можно использовать для векторизации молекулы в виде одновалентного (VНН) или поливалентного (VНН_n) конъюгата.

Фиг. 7. Связывание с клеточной поверхностью и эндоцитоз гибридных белков VНН А-Fc и VНН Z-Fc на клетках CHO, экспрессирующих hTfR и mTfR. Типичные конфокальные микрофотографии клеток CHO-hTfR-EGFP и CHO-mTfR-EGFP (зеленый), инкубированных 1 час при 37°C с 50 нМ VНН А-Fc (А, В) и с контролем VНН Z-Fc (С, D), с детекцией после фиксации ПФА и последующей пермеабиллизации или без пермеабиллизации клеточных мембран тритоном X-100, с помощью конъюгированного с Alexa594 антитела против hFc (1/1000, красный). Ядра клеток метили Hoechst # 33342 в концентрации 0,5 мкг/мл (синий). Совместная маркировка на объединенных изображениях показана желтым/оранжевым цветом.

Фиг. 8. Определение кажущейся Kd VНН-Fc и Fc-VНН на линиях клеток CHO, экспрессирующих hTfR и mTfR. (А) Клетки CHO-hTfR-EGFP и CHO-mTfR-EGFP инкубировали 1 час при 4°C с различными концентрациями VНН-Fc или Fc-VНН, с детекцией с помощью конъюгированных с Alexa647 антител против hFc (1/400). Измерения проводили с помощью проточной цитометрии. Отношение интенсивности флуоресценции для каждой точки было нормализовано с соответствующим сигналом EGFP (экспрессия рецептора) и дало начало произвольной единице. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для 3 независимых экспериментов. (В) Характеристики выбранных VНН-Fcs и Fc-VНН: молекулярная масса (Да); Кажущаяся Kd на человеческом TfR (нМ); Кажущаяся Kd на TfR мыши (нМ). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для 3 независимых экспериментов. NB: нет связывания с контрольным VНН (VНН Z).

Фиг. 9. Поглощение и транспорт гибридных белков VНН А-Fc и VНН В-Fc на модели ГЭБ *in vitro*. (А) Типичные микрофотографии монослоев эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга крысы (rBMES), исследованных на поглощение 500 нМ

VНН А-Fc и VНН В-Fc, инкубированных совместно с Tf-Alexa647 при 200 нМ (красный) в течение 2 часов на живых клетках, с детекцией после фиксации ПФА и пермеабиллизации клеточных мембран тритоном X-100 с помощью конъюгированного с Alexa488 антитела против hFc (1/50, зеленый). Ядра клеток метили Hoechst # 33342 в концентрации 0,5 мкг/мл (синий). Совместная маркировка отображается желтым на объединенных изображениях. (В) Схематическое изображение модели ГЭБ *in vitro*, системы совместного культивирования с первичными гВМЕС, размещенными на фильтре, покрытом коллагеном IV типа/фибронектином, в верхнем компартменте (1) и первичными астроцитами в нижнем компартменте (2). (С, D) Транспорт гибридных белков VНН А-Fc, VНН В-Fc и VНН Z-Fc через монослой гВМЕС из люминального (сверху) в аблюминальный (внизу) компартмент. (С) VНН А-Fc, VНН В-Fc и VНН Z-Fc инкубировали при 10 нМ в люминальном компартменте в течение 24 часов и оценивали перенос в аблюминальный компартмент (обозначенный как 24 часа). Затем вкладыши, содержащие растворы VНН-Fc, переносили в другой 96-луночный планшет, содержащий свежий транспортный буфер, на другой интервал транспортировки 48 часов (обозначенный как +48 часов) в аблюминальный компартмент. (D) Кинетическая презентация эксперимента, описанного в (С) (72-часовой перенос представляет собой сумму 24-часового и 48-часового интервалов переноса). Содержание Fc-фрагмента в аблюминальном компартменте количественно определяли с использованием собственного анти-Fc ИФА-анализа. Единицы поглощения были преобразованы в фемтомоли на вкладыш (площадь поверхности 0,143 см² для вкладышей 96-луночного планшета). Для каждого конъюгата было проведено три независимых эксперимента по меньшей мере с 12 вкладышами. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (***) $p \leq 0,001$).

Фиг. 10. Распределение гибридных белков VНН-Fc у мышей WT C57Bl/6 через 2 и 24 часа после инъекции (п/и). Гибридные формы VНН А-Fc, VНН А-Fc-Agly и VНН Z-Fc вводили в хвостовую вену в дозе 5 мг/кг, и проводили перфузию физиологическим раствором через 2 или 24 часа п/и, после сбора плазмы. Промежуточные образцы плазмы также собирали с использованием ретроорбитального отбора образцов через 15 минут и 6 часов п/и. Мозг обрабатывали, чтобы отделить паренхиму мозга от капилляров. Количество VНН-Fc в каждой ткани оценивали с помощью собственного анализа анти-Fc ИФА. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для концентраций VНН-Fc в плазме (А), паренхиме (В) и микрососудах (С) или как среднее значение \pm SEM для отношения паренхимы к плазме (D) и отношения микрососудов к плазме (E). (4 < n < 12 на группу на момент времени; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Фиг. 11. Определение кажущейся K_d для VHH A1 - A9 на клеточных линиях CHO, стабильно экспрессирующих hTfR и mTfR. (А) Клетки CHO-hTfR-EGFP и CHO-mTfR-EGFP инкубировали 1 час при 4°C с различными концентрациями VHH, с детекцией мышинным анти-6His (1/1000) и вторичным анти-мышинным антителом, конъюгированным с Alexa647 (1/400). Измерения проводили с помощью проточной цитометрии. Отношение интенсивности флуоресценции для каждой точки было нормализовано с соответствующим сигналом EGFP (экспрессия рецептора) и дало начало произвольной единице. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для 3 независимых экспериментов. (В) Характеристики VHH: молекулярная масса (Да); Теоретическая pI ; Кажущаяся K_d на человеческом TfR (нМ); Кажущаяся K_d на TfR мыши (нМ). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для 3 независимых экспериментов. NB: нет связывания, LB: низкое связывание.

Фиг. 12. Определение кажущейся K_d для VHH A10 - A19 на клеточных линиях CHO, стабильно экспрессирующих hTfR и mTfR. (А) Клетки CHO-hTfR-EGFP и CHO-mTfR-EGFP инкубировали 1 час при 4°C с различными концентрациями VHH, с детекцией мышинным анти-6His (1/1000) и вторичным анти-мышинным антителом, конъюгированным с Alexa647 (1/400). Измерения проводили с помощью проточной цитометрии. Отношение интенсивности флуоресценции для каждой точки было нормализовано с соответствующим сигналом EGFP (экспрессия рецептора) и дало начало произвольной единице. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для 3 независимых экспериментов. (В) Характеристики VHH: молекулярная масса (Да); Теоретическая pI ; Кажущаяся K_d на человеческом TfR (нМ); Кажущаяся K_d на TfR мыши (нМ). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для 3 независимых экспериментов. NB: нет связывания.

Фиг. 13. Определение кажущейся K_d гибридов 13C3-НС-VHH на клеточных линиях CHO, экспрессирующих hTfR и mTfR. (А) Клетки CHO-hTfR-EGFP и CHO-mTfR-EGFP инкубировали 1 час при 4°C с различными концентрациями гибридов 13C3 и выявляли с помощью конъюгированного с Alexa647 анти-мышинного антитела (1/400). Измерения проводили с помощью проточной цитометрии. Отношение интенсивности флуоресценции для каждой точки было нормализовано с соответствующим сигналом EGFP (экспрессия рецептора) и дало начало произвольной единице. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для 3 независимых экспериментов. (В) Характеристики гибридов 13C3: молекулярная масса (Да); Кажущаяся K_d на человеческом TfR (нМ); Кажущаяся K_d на TfR мыши (нМ). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для 3 независимых экспериментов. NB:

нет связывания, LB: низкое связывание.

Фиг. 14. Распределение моноклональных антител 13С3 и гибридов 13С3-НС-VНН у мышей WT C57Bl/6 через 2 и 6 часов после инъекции (п/и). 13С3, 13С3-НС-VНН А и 13С3-НС-VНН А1 вводили в хвостовую вену в дозе 35 нмоль/кг, проводили перфузию физиологическим раствором через 2 или 6 часов п/и. Мозг обрабатывали, чтобы отделить паренхиму мозга от капилляров. Количества 13С3 и 13С3-НС-VНН А/А1 в каждой ткани/компарменте оценивали с помощью квалифицированного иммуноанализа Meso Scale Discovery (MSD) прямого покрытия (Abeta) (% КВ <20% и извлечение \pm 30%). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для концентрации 13С3 и 13С3-НС-VНН А/А1 в общей ткани мозга (А) и паренхиме (В) ($1 < n < 4$ на группу в момент времени; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Фиг. 15. Активность биоконъюгатов VНН-siGFPst1 для сайленсинга гена *in vitro*. (А) Биоконъюгаты VНН А-siGFPst1 и VНН В-siGFPst1 связывают hTfR. Клетки CHO-hTfR-EGFP инкубировали 1 час при 4°C с различными концентрациями указанных соединений. Детекцию VНН выполняли с использованием первичного мышинового анти-6His (1/1000) и вторичного анти-мышинового антитела, конъюгированного с Alexa647 (1/400). Измерения сигнала клеточной поверхности, ассоциированного с VНН, проводили с помощью проточной цитометрии. Результаты выражены как отношение интенсивности флуоресценции тестируемых соединений, связанной с Alexa647, к интенсивности фоновой флуоресценции. (В) Биоконъюгат VНН А-siGFPst1 демонстрирует эффективность сайленсинга гена. Клетки CHO-hTfR-EGFP трансфицировали указанным соединением в концентрации 25 нМ с использованием Dharmafect 1 (Dharmacon) в течение 72 часов при 37°C. Общую флуоресценцию, связанную с белком EGFP, затем количественно анализировали с помощью проточной цитометрии и определяли отношение к флуоресценции необработанных (контрольных) клеток (принятой за 100%), *** $p < 0,001$. (С) Биоконъюгат VНН А-siGFPst1 проявляет собственную активность сайленсинга гена в пикомолярном диапазоне при прямой доставке в цитозоль. Клетки CHO-hTfR-EGFP трансфицировали различными концентрациями биоконъюгата VНН А-siGFPst1 с использованием Dharmafect 1 (Dharmacon) в течение 120 часов при 37°C. Затем общую флуоресценцию, связанную с белком EGFP, количественно оценивали с помощью проточной цитометрии и рационализировали до флуоресценции необработанных (контрольных) клеток (принятой за 100%). Данные были подогнаны с использованием нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism® (сплошная линия) для оценки IC50 (концентрации, позволяющей снизить уровень белка GFP на 50%) и максимального эффекта (нижнее плато). (D) Биоконъюгат VНН А-siGFPst1

запускает специфический и эффективный сайленсинг гена, опосредованный TfR. Клетки CHO-hTfR-EGFP инкубировали с указанными соединениями при 1 мкМ в течение 120 часов при 37°C. Данные были обработаны и проанализированы, как описано в (B). *** $p < 0,001$ по сравнению с необработанными клетками. (E) hTfR-опосредованное связывание и захват биоконъюгата VHH A-siGFPst1 обеспечивает доставку в цитозоль и последующий сайленсинг гена при наномолярных концентрациях. Клетки CHO-hTfR-EGFP инкубировали с различными концентрациями биоконъюгата VHH A-siGFPst1 в течение 120 часов при 37°C. Затем общую флуоресценцию, связанную с белком EGFP, количественно оценивали с помощью проточной цитометрии и рационализировали до флуоресценции необработанных (контрольных) клеток (принятой за 100%). Данные обрабатывали и анализировали, как описано в (C). (F) Эффект сайленсинга генов биоконъюгата VHH A-siGFPst1 ингибируется совместной инкубацией с избытком свободных TfR-связывающих VHH A и B, но не с нерелевантным VHH Z. Клетки CHO-hTfR-EGFP инкубировали с VHH A-siGFPst1 по отдельности в концентрации 30 нМ или в присутствии 100-кратного избытка свободных VHH A, B или Z в течение 120 часов при 37°C. Данные были обработаны и проанализированы, как описано в (C). (G) Воздействие на клетки биоконъюгата VHH A-siGFPst1 во время короткого 6-часового импульса достаточно для запуска эффективного сайленсинга гена. Клетки CHO-hTfR-EGFP инкубировали с различными концентрациями биоконъюгата VHH A-siGFPst1 в течение короткого 6-часового импульса с последующим метаболическим вытеснением до 120 часов в среде, не содержащей лиганда. Данные были обработаны и проанализированы, как описано в (B). (H) Эффект сайленсинга гена биоконъюгата VHH B-siGFPst1 был аналогичен эффекту, наблюдаемому с VHH A-siGFPst1. Клетки CHO-hTfR-EGFP инкубировали с VHH A-siGFPst1 или VHH B-siGFPst1 при 30 нМ (насыщающая концентрация на основе IC50, полученного с помощью VHH A-siGFPst1) в течение 120 часов при 37°C. Данные обрабатывали и анализировали, как описано в (C).

Фиг. 16. ПЭТ-визуализация биоконъюгата VHH A-68Ga на мышинной модели подкожной опухоли глиобластомы. (A) Биоконъюгаты VHH A-NODAGA и VHH A-68Ga связывают hTfR так же эффективно, как и неконъюгированное соединение VHH A. Клетки CHO-hTfR-EGFP инкубировали 1 час при 4°C с различными концентрациями указанных соединений. Детекцию VHH выполняли с использованием первичного мышинового анти-6His (1/1000) и вторичного анти-мышинового антитела, конъюгированного с Alexa647 (1/400). Измерения сигнала клеточной поверхности, связанного с VHH, проводили с помощью проточной цитометрии. Результаты выражены как отношение интенсивности флуоресценции тестируемых соединений, связанной с Alexa647, к

интенсивности фоновой флуоресценции. (В) ПЭТ-визуализация у мышей, которым вводили VNH A-68Ga на 28 день после имплантации клеток U87-MG (через 2 часа после инъекции). Опухоль глиобластомы обозначена кружком в сагиттальной проекции.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к новым агентам, связывающим TfR, которые можно использовать для транспортировки молекул, таких как терапевтические агенты, агенты для визуализации или диагностики, через ГЭБ. Более конкретно, изобретение раскрывает усовершенствованные молекулы VNH, которые связывают TfR, и их применение.

TfR участвует во включении железа, транспортируемого его лигандом трансферрином, и в регуляции роста клеток (Neckers and Trepel 1986, Ponka and Lok 1999). Существует два типа рецепторов трансферрина: рецептор TfR1 и гомологичный рецептор TfR2, экспрессируемый главным образом в печени. В контексте изобретения термин TfR используют для обозначения гомолога TfR1.

TfR представляет собой гомодимерный трансмембранный гликопротеин типа II, состоящий из двух идентичных субъединиц 90 кДа, связанных двумя дисульфидными мостиками (Jing and Trowbridge 1987, McClelland et al., 1984). Каждый мономер имеет короткий цитоплазматический N-концевой домен из 61 аминокислоты, содержащий мотив интернализации YTRF (тирозин-треонин-аргинин-фенилаланин), единственный гидрофобный трансмембранный сегмент из 27 аминокислот и широкий C-концевой внеклеточный домен из 670 аминокислот, содержащий сайт расщепления трипсином и сайт связывания трансферрина (Aisen, 2004). Каждая субъединица способна связывать молекулу трансферрина. Внеклеточный домен имеет один сайт O-гликозилирования и три сайта N-гликозилирования, причем последние особенно важны для правильной укладки и транспорта рецептора на поверхности клетки (Hayes et al., 1997). Есть также сайты пальмитилирования в интрамембранном домене, которые предположительно закрепляют рецептор и обеспечивают его эндоцитоз (Alvarez et al., 1990, Omary and Trowbridge, 1981). Кроме того, присутствует сайт внутриклеточного фосфорилирования, функции которого неизвестны и который не играет роли в эндоцитозе (Rothenberger et al., 1987).

Рецептор TfR экспрессируется на высоком уровне высокопролиферирующими клетками, здоровыми или неопластическими (Gatter et al., 1983). Многие исследования показали высокий уровень экспрессии TfR в раковых клетках по сравнению со здоровыми клетками. Таким образом, такие патологии, как рак молочной железы (Yang et al., 2001), глиомы (Prior et al., 1990), аденокарцинома легких (Kondo et al., 1990), хронический лимфолейкоз (Das Gupta and Shah, 1990) или не-ходжкинская лимфома (Habeshaw et al.,

1983) демонстрируют повышенную экспрессию TfR, коррелирующую со степенью опухоли и стадией заболевания или прогнозом.

Таким образом, лекарства, направленные на TfR, могут быть подходящими для лечения рака, а также для пересечения ГЭБ.

Используя очищенные препараты мембран из клеток, экспрессирующих высокие уровни hTfR и mTfR, мы создали и отобрали молекулы VHH, которые связывают как человеческий, так и не-человеческий TfR. Мы показали, что при слиянии с Fc-областью человеческого IgG1 или лекарственным средством (таким как антитело, миРНК) или визуализирующим агентом эти молекулы VHH сохраняют способность связывания TfR, переносятся через модель ГЭБ *in vitro* и демонстрируют свойства направленной доставки в головной мозг *in vivo*. Мы также показали, что при слиянии с миРНК или каркасом NODAGA эти молекулы VHH сохраняют способность связывания с TfR и эффективную доставку в клетки и органы *in vivo*. Молекулы VHH проявляют подходящие уровни аффинности и специфичности для надлежащего эндоцитоза после связывания с TfR. Таким образом, изобретение обеспечивает новые TfR-связывающие молекулы, которые представляют собой ценные агенты для направленной доставки лекарств.

Таким образом, объект изобретения относится к молекулам VHH, которые связывают TfR как человека, так и не относящегося к человеку вида (например, грызунов, таких как крысы или мыши). Предпочтительно VHH может пересекать ГЭБ человека или связываться с тканями, экспрессирующими TfR, такими как раковые опухоли. Изобретение также относится к химерным агентам, содержащим такие VHH, их получению, композициям, содержащим их, и к их применению.

Молекулы VHH

Молекулы VHH соответствуют вариабельной области тяжелых цепей только верблюжьих антител, которые в природе лишены легких цепей. VHH имеют очень маленький размер около 15 кДа. Они содержат одноцепочечную молекулу, которая может связывать свой когнатный антиген с помощью одного домена. Антигенсвязывающие поверхности VHH обычно являются более выпуклыми (или выступающими), чем поверхности обычных антител, которые обычно являются плоскими или вогнутыми. Более конкретно, VHH состоят из 4 каркасных областей (или FR), последовательности и структуры которых определены как консервативные, и трех областей, определяющих комплементарность (или CDR), демонстрирующих высокую вариабельность как по содержанию последовательности, так и по конформации структуры, которые участвуют в связывании антигена и обеспечивают антигенную специфичность. По сравнению с обычным VH человеческого антитела, несколько аминокислот заменены в области FR2 и

гипервариабельных областях (CDR) VHH. Например, высококонсервативные гидрофобные аминокислоты (такие как Val47, Gly49, Leu50 и/или Trp52) в области FR2 часто заменяются гидрофильными аминокислотами (Phe42, Glu49, Arg50, Gly52), что делает общую структуру более гидрофильной и способствует высокой стабильности, растворимости и устойчивости к агрегации.

Молекулы VHH согласно настоящему изобретению представляют собой полипептиды, содержащие антигенсвязывающий домен антитела, содержащего только тяжелую цепь (HcAb) (или состоящие, или по существу состоящие из него).

Чтобы получить молекулы VHH, обладающие подходящими свойствами, авторы изобретения протестировали более 700 Tfr-связывающих VHH из библиотеки VHH, полученной иммунизацией ламы иммуногеном Tfr. После анализа указанных клонов на связывание и специфичность авторы изобретения дополнительно отобрали около 100 клонов, которые обладали требуемой аффинностью, специфичностью и перекрестно-видовым связыванием. Все указанные клоны секвенировали, их структуру анализировали и сравнивали. Дальнейшие VHH с контролируемыми/улучшенными связывающими свойствами получали мутагенезом. Последовательности соответствующих доменов и предпочтительных VHH представлены в экспериментальном разделе и списке последовательностей. Свойства VHH и его конъюгатов также проиллюстрированы в экспериментальном разделе.

Молекулы VHH по изобретению обычно содержат или состоят из формулы:

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,

где FRn обозначает каркасные области, а CDRn обозначает гипервариабельные области.

В конкретном варианте осуществления молекулы VHH по изобретению содержат домен CDR1, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 19, 67 или 69, или её вариантов, имеющих по меньшей мере 75% аминокислотной идентичности с любой из указанных последовательностей по всей ее длине, предпочтительно по меньшей мере 85%, где указанные варианты сохраняют способность связывания Tfr. Предпочтительные молекулы VHH по изобретению содержат домен CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 19, 67 или 69, или её варианты, имеющие максимум 1 аминокислотную модификацию.

«Процент идентичности» между последовательностями аминокислот (или нуклеиновых кислот) можно определить методами, известными в данной области техники. Обычно % идентичности между двумя последовательностями нуклеиновых

кислот или аминокислот определяют с помощью компьютерных программ, таких как GAP, предоставленных в пакете программ GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1996, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин, США 53711) (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453). Процент идентичности между двумя последовательностями обозначает идентичность по всей длине указанных последовательностей.

Конкретные примеры молекул VHH по настоящему изобретению включают последовательность CDR1, содержащую или состоящую в основном из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 19, 67 или 69.

В другом конкретном варианте осуществления молекулы VHH по изобретению содержат домен CDR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 21, 23, 71, 73 или 75, или её вариантов, имеющих по меньшей мере 70% аминокислотной идентичности с любой из указанных последовательностей по всей ее длине, предпочтительно по меньшей мере 85%, причем указанные варианты сохраняют способность связывания с TfR. Предпочтительные молекулы VHH по изобретению содержат домен CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 21, 23, 71, 73 или 75, или её вариантов, имеющих максимум 1 аминокислотную модификацию.

Конкретные примеры молекул VHH по изобретению содержат последовательность CDR2, содержащую или состоящую в основном из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 21, 23, 71, 73 или 75.

В другом конкретном варианте осуществления молекулы VHH по изобретению содержат домен CDR3, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 25, 27, 29, 31, 33, 77, 79, 81, 83 или 85, или её вариантов, имеющих по меньшей мере 60% аминокислотной идентичности с любой из указанных последовательностей по всей ее длине, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, где указанные варианты сохраняют способность связывания с TfR. Предпочтительные молекулы VHH по изобретению содержат домен CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 25, 27, 29, 31, 33, 77, 79, 81, 83 или 85 или её вариантов, имеющих максимум 1 аминокислотную модификацию.

Конкретные примеры молекул VHH по изобретению включают последовательность CDR3, содержащую или состоящую в основном из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 25, 27, 29, 31, 33, 77, 79, 81, 83 или 85.

В другом конкретном варианте осуществления молекулы VHH по настоящему

изобретению включают:

- домен CDR1, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 19, 67 или 69, или её вариантов, имеющих по меньшей мере 75% аминокислотной идентичности с любой из указанных последовательностей по всей её длине, предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 95%; и

- домен CDR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 21, 23, 71, 73 или 75, или её вариантов, имеющих по меньшей мере 70% аминокислотной идентичности с любой из указанных последовательности по всей длине, предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 95%; и

- домен CDR3, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 25, 27, 29, 31, 33, 77, 79, 81, 83 или 85, или её вариантов, имеющих аминокислотную идентичность по меньшей мере 60% с любой из указанных последовательностей по всей её длине, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 95%,

где указанный VHH обладает способностью связывать TfR.

В предпочтительном варианте осуществления молекулы VHH по изобретению включают:

- домен CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 19, 67 или 69, или её варианты, имеющие максимум 1 аминокислотную модификацию; и

- домен CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 21, 23, 71, 73 или 75, или её варианты, имеющие максимум 1 аминокислотную модификацию; и

- домен CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 25, 27, 29, 31, 33, 77, 79, 81, 83 или 85, или её варианты, содержащие максимум 1 аминокислотную модификацию.

В более предпочтительном варианте осуществления молекулы VHH по изобретению включают CDR1, CDR2 и CDR3, где указанные домены CDR1, CDR2 и CDR3 содержат или состоят, соответственно, из:

- SEQ ID NO: 1, 2 и 3; или

- SEQ ID NO: 17, 2 и 3; или

- SEQ ID NO: 19, 2 и 3; или

- SEQ ID NO: 67, 2 и 3; или

- SEQ ID NO: 69, 2 и 3; или
- SEQ ID NO: 1, 21 и 3; или
- SEQ ID NO: 1, 23 и 3; или
- SEQ ID NO: 1, 71 и 3; или
- SEQ ID NO: 1, 73 и 3; или
- SEQ ID NO: 1, 75 и 3; или
- SEQ ID NO: 1, 2 и 25; или
- SEQ ID NO: 1, 2 и 27; или
- SEQ ID NO: 1, 2 и 29; или
- SEQ ID NO: 1, 2 и 31; или
- SEQ ID NO: 1, 2 и 33; или
- SEQ ID NO: 1, 2 и 77; или
- SEQ ID NO: 1, 2 и 79; или
- SEQ ID NO: 1, 2 и 81; или
- SEQ ID NO: 1, 2 и 83; или
- SEQ ID NO: 1, 2 и 85; или
- SEQ ID NO: 5, 6 и 7; или
- SEQ ID NO: 9, 10 и 11; или
- SEQ ID NO: 13, 14 и 15; или

их вариантов, как определено выше.

Предпочтительные молекулы VHH по изобретению содержат домены FR, как определено ниже.

В конкретном варианте осуществления домен FR1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 35, как представлено ниже, или ее вариантов, имеющих по меньшей мере 85% аминокислотной идентичности с этой последовательностью по всей ее длине, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%:

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS (SEQ ID NO: 35).

Более предпочтительно присутствуют аминокислотные остатки, выделенные жирным шрифтом, и вариабельность проявляется только в других положениях.

В конкретном варианте осуществления E в положении 1 может быть заменен на Q.

В конкретном варианте осуществления V в положении 5 может быть заменен на Q.

В конкретном варианте осуществления E в положении 6 может быть заменен на Q.

В конкретном варианте осуществления G в положении 10 может быть заменен на K или A.

В конкретном варианте осуществления L в положении 11 может быть заменен на V

или E.

В конкретном варианте осуществления A в положении 23 может быть заменен на V или T.

Более предпочтительно, FR1 содержит не более 4 аминокислотных модификаций со ссылкой на эту последовательность, еще более предпочтительно, не более 3, еще более предпочтительно, не более 2 аминокислотных модификаций в аминокислотных остатках, не выделенных жирным шрифтом.

В дополнительном конкретном варианте осуществления FR1 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей, перечисленных ниже:

EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSVAS (SEQ ID NO: 36)

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSAAAS (SEQ ID NO: 37)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS (SEQ ID NO: 38)

EVQLVESGGGEVQPGGSLKLSVAS (SEQ ID NO: 39).

В конкретном варианте осуществления молекулы VHH по изобретению включают домен FR2, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 40, как представлено ниже, или его варианты, имеющие по меньшей мере 85% аминокислотной идентичности с этой последовательностью по всей ее длине, предпочтительно по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%:

MRWYRQAPGKQRELVAT (SEQ ID NO: 40).

Более предпочтительно присутствуют аминокислотные остатки, выделенные жирным шрифтом, и вариабельность проявляется только в других положениях.

В конкретном варианте осуществления M в положении 1 может быть заменен на I или V.

В конкретном варианте осуществления R в положении 2 может быть заменен на G.

В конкретном варианте осуществления Y в положении 4 может быть заменен на F.

В конкретном варианте осуществления Q в положении 6 может быть заменен на R.

В конкретном варианте осуществления A в положении 7 может быть заменен на R.

В конкретном варианте осуществления Q в положении 11 может быть заменен на E.

В конкретном варианте осуществления L в положении 14 может быть заменен на F или W.

В конкретном варианте осуществления T в положении 17 может быть заменен на G или S.

Более предпочтительно, FR2 содержит не более 6 модификаций аминокислот со

ссылкой на эту последовательность, еще более предпочтительно не более 5, не более 3, еще более предпочтительно не более 2 аминокислотных модификаций в аминокислотных остатках, не выделенных жирным шрифтом.

В конкретном варианте осуществления молекулы VHH по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну из следующих аминокислот в домене FR2: Phe42, Glu49, Arg50 или Gly52.

В другом конкретном варианте осуществления FR2 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей, перечисленных ниже:

IRWYRQAPGKQREFVAG (SEQ ID NO: 41)

MRWYRQAPGKQREWVAG (SEQ ID NO: 42)

MGWFRRAPGKERELVAS (SEQ ID NO: 43)

VRWYRQRPGKQREWVAG (SEQ ID NO: 44)

В конкретном варианте осуществления молекулы VHH по изобретению включают домен FR3, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 45, как представлено ниже, или ее варианты, имеющие по меньшей мере 85% аминокислотной идентичности с этой последовательностью по всей ее длине, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%:

YYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYC (SEQ ID NO: 45).

Более предпочтительно присутствуют аминокислотные остатки, выделенные жирным шрифтом, и вариабельность проявляется только в других положениях.

В конкретном варианте осуществления Y в положении 1 может быть заменен на N.

В конкретном варианте осуществления Y в положении 2 может быть заменен на A.

В конкретном варианте осуществления A в положении 3 может быть заменен на R или I.

В конкретном варианте осуществления D в положении 4 может быть заменен на S.

Более предпочтительно, FR3 содержит не более 7 аминокислотных модификаций со ссылкой на эту последовательность, еще более предпочтительно не более 6, не более 3, еще более предпочтительно не более 2 аминокислотных модификаций в аминокислотных остатках, не выделенных жирным шрифтом.

В другом конкретном варианте осуществления FR3 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей, перечисленных ниже:

NYADSMKGRFTISRDNKNTKNAVYQLQIDSLKPEDTAVYYC (SEQ ID NO: 46)

NYPDSAKGRFTISRDNKNTVYLQIDSLKPEDTAVYYC (SEQ ID NO: 47)

YAISSVKGRFTISRDN AENTVFLQMNSLKPDDTAVYYC (SEQ ID NO: 48)

NYPDSMKGRFTISRDN AKNTVYLQINSLKSEDTAVYYC (SEQ ID NO: 49).

В конкретном варианте осуществления молекулы VHH по изобретению включают домен FR4, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 50, как представлено ниже, или ее варианты, имеющие по меньшей мере 85% аминокислотной идентичности с этой последовательностью по всей ее длине, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%:

WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 50).

Более предпочтительно присутствуют аминокислотные остатки, выделенные жирным шрифтом, и вариабельность проявляется только в других положениях.

Более предпочтительно, FR4 содержит не более 4 аминокислотных модификаций со ссылкой на эту последовательность, еще более предпочтительно не более 3, еще более предпочтительно не более 2 аминокислотных модификаций в аминокислотных остатках, не выделенных жирным шрифтом.

Конкретным иллюстративным примером последовательности FR4 является SEQ ID NO: 50.

Конкретными примерами TfR-связывающих молекул VHH по изобретению являются молекулы, содержащие или состоящие из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 4 (VHH A), 8 (VHH B), 12 (VHH C), 16 (VHH D), 18 (VHH A1), 20 (VHH A2), 22 (VHH A3), 24 (VHH A4), 26 (VHH A5), 28 (VHH A6), 30 (VHH A7), 32 (VHH A8), 34 (VHH A9), 68 (VHH A10), 70 (VHH A11), 72 (VHH A12), 74 (VHH A13), 76 (VHH A14), 78 (VHH A15), 80 (VHH A16), 82 (VHH A17), 84 (VHH A18), 86 (VHH A19), 87 (VHH A20), 88 (VHH A21), 89 (VHH A22), 90 (VHH A23), 91 (VHH A24) и 92 (VHH A25), где x равен 0.

В конкретном варианте осуществления VHH по настоящему изобретению являются гуманизированными.

Для гуманизации один или несколько доменов FR и/или CDR могут быть (дополнительно) модифицированы одной или несколькими аминокислотными заменами.

В этом отношении в конкретном варианте осуществления VHH гуманизируют путем модификации (например, аминокислотной замены) домена FR1. Типичное гуманизованное положение в FR1 выбрано из 19R и 23A или обоих (например, со ссылкой на любую из SEQ ID NO: 35-39 или их варианты). Таким образом, конкретный пример такого гуманизованного FR1 включает SEQ ID NO: 36, где K19 и/или V23, соответственно, модифицированы в 19R и 23A.

В другом конкретном варианте осуществления VHH гуманизируют путем

модификации домена CDR1. Типичным гуманизированным положением в CDR1 (например, со ссылкой на любую из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 19, 67 или 69 или их варианты) является 8A.

В другом конкретном варианте осуществления VHH гуманизируют путем модификации домена FR2. Типичное гуманизированное положение в FR2 выбрано из 1M, 2S или 2H, 4V, 11G, 12L, 14W или их комбинаций (например, со ссылкой на любую из SEQ ID NO: 40-44 или их варианты). Конкретный пример такого гуманизированного FR2, таким образом, включает SEQ ID NO: 41, где один или несколько, или все из I1, R2, Y4, Q11, R12 и F14, соответственно, модифицированы на 1M, 2S или 2H, 4V, 11G, 12L и 14W.

В другом конкретном варианте осуществления VHH гуманизируют путем модификации домена CDR2. Типичным гуманизированным положением в CDR2 (например, со ссылкой на любую из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 21, 23, 71, 73, 75 или их варианты) является 1I.

В другом конкретном варианте осуществления VHH гуманизируют путем модификации домена FR3. Типичное гуманизированное положение в FR3 выбрано из 6V, 17A, 20T, 21L, 25M, 26N, 29R или их комбинаций (например, со ссылкой на любую из SEQ ID NO: 45-49 или их варианты). Конкретный пример такого гуманизированного FR3, таким образом, включает SEQ ID NO: 46, где один или несколько, или все из M6, T17, A20, V21, I25, D26 и K29 соответственно модифицированы в 6V, 17A, 20T, 21L, 25M, 26N и 29R.

В другом конкретном варианте осуществления VHH гуманизируют путем модификации домена CDR3. Типичное гуманизированное положение в CDR3 (со ссылкой, например, на любую из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 25, 27, 29, 31, 33, 77, 79, 81, 83, 85 или их варианты) является 1A или 2R, или оба.

В другом конкретном варианте осуществления домены FR1, и/или FR2, и/или FR3, и/или CDR1, и/или CDR2, и/или CDR3 являются гуманизированными.

Конкретными примерами гуманизированных TfR-связывающих молекул VHH по изобретению являются молекулы, содержащие или состоящие из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 87 (VHH A20), 88 (VHH A21), 89 (VHH A22), 90 (VHH A23), 91 (VHH A24) и 92 (VHH A25), где x равен 0.

В другом конкретном варианте осуществления молекулы VHH могут дополнительно содержать одну или несколько меток, подходящих, например, для очистки, связывания и т.д. Примеры таких меток включают метку His (например, His6), Q-метку (LQR) или маркер тус (EQKLISEEDL). Обычно одна или несколько маркеров расположены на С-конце VHH.

В качестве иллюстрации VHH может содержать на С-конце следующую дополнительную последовательность AAAEQKLISEEDLNGAААААААААААHGS (SEQ ID NO: 51), где простое подчеркивание - это маркер тус, а двойное подчеркивание - это маркер His (остальные остатки являются линкерами или в получены результате клонирования).

Конкретными примерами таких меченных Tfr-связывающих молекул VHH по изобретению являются молекулы, содержащие или состоящие из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 4 (VHH A), 8 (VHH B), 12 (VHH C), 16 (VHH D), 18 (VHH A1), 20 (VHH A2), 22 (VHH A3), 24 (VHH A4), 26 (VHH A5), 28 (VHH A6), 30 (VHH A7), 32 (VHH A8), 34 (VHH A9), 68 (VHH A10), 70 (VHH A11), 72 (VHH A12), 74 (VHH A13), 76 (VHH A14), 78 (VHH A15), 80 (VHH A16), 82 (VHH A17), 84 (VHH A18), 86 (VHH A19), 87 (VHH A20), 88 (VHH A21), 89 (VHH A22), 90 (VHH A23), 91 (VHH A24) и 92 (VHH A25), где x равен 1.

В качестве другой иллюстрации, VHH по изобретению может содержать Q-маркер последовательности LQR, предпочтительно расположенный на С-конце VHH.

В качестве дополнительной иллюстрации, VHH по изобретению может содержать линкер Gly, предпочтительно расположенный на С-конце VHH. Линкер Gly может содержать повтор Gly, например, из 2-7 остатков Gly, например, от 3 до 6. Конкретные примеры линкеров Gly включают Gly3, Gly4, Gly5 или SerGlySerGly5.

В конкретном варианте осуществления VHH по настоящему изобретению может содержать линкер Gly и Q-метку, предпочтительно расположенную на С-конце. Более конкретные примеры таких VHH содержат следующую структуру: VHH-Gly-линкер-Q - метка, где Gly-линкер содержит 2-6 остатков Gly, а метка Q содержит или состоит из LQR.

В качестве иллюстрации VHH может содержать на С-конце следующую дополнительную последовательность **GGGLQR**, в которой подчеркивание означает Q-маркер, а жирный шрифт - линкер Gly.

В другом конкретном варианте осуществления VHH по изобретению может содержать линкер Ala, метку His, линкер Gly и Q-метку. Предпочтительно линкеры и метки расположены на С-конце VHH. В других вариантах осуществления Q-метка, по меньшей мере, может быть расположена на N-концевой стороне VHH. Более конкретные примеры таких VHH включают следующую структуру: VHH-Ala-линкер-His-метка-Gly-линкер-Q-метка, где Ala-линкер содержит 3 остатка, His-метка содержит 2-7 остатков His, Gly-линкер содержит 2-6 остатков Gly, а Q-метка содержит или состоит из LQR.

В качестве иллюстрации VHH может содержать на С-конце следующую дополнительную последовательность **AAАААААААА**GGGLQR, где подчеркивание означает Q-метку, жирным шрифтом обозначены линкеры Ala и Gly, двойное

подчеркивание означает His-метку.

Другими конкретными примерами TfR-связывающих молекул VHH по изобретению являются молекулы VHH, которые конкурентно ингибируют связывание VHH, как определено выше, с человеческим и не-человеческим TfR. Термин «конкурентно ингибирует» указывает на то, что VHH может снижать, подавлять или замещать связывание указанного эталонного VHH с TfR *in vitro* или *in vivo*. Конкурентные анализы можно проводить с использованием стандартных методик, таких как, например, конкурентный ИФА или другие анализы связывания. Обычно конкурентный анализ связывания включает рекомбинантный клеточный или мембранный препарат, экспрессирующий TfR, при необходимости связанный с твердым субстратом, немеченый тестовый VHH (или фаг, экспрессирующий его) и меченый эталонный VHH (или фаг, экспрессирующий его). Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества связанного меченого VHH в присутствии тестового VHH. Обычно тестовый VHH присутствует в избытке, например, примерно в 5-500 раз больше эталонного VHH. Обычно для ИФА теста VHH присутствует в 100-кратном избытке. Когда тестовый VHH, присутствующий в избытке, ингибирует или замещает по меньшей мере 70% связывания эталонного VHH с TfR, это рассматривается как конкурентное ингибирование указанного эталонного VHH. Предпочтительные конкурирующие VHH связывают эпитопы, которые имеют общие аминокислотные остатки.

Как показано в экспериментальном разделе, молекулы VHH способны связывать TfR *in vitro* и *in vivo*. Они демонстрируют адекватную аффинность с кажущейся K_d от 0,1 нМ до 10 мкМ, в частности, от 1 мкМ до 1 нМ. Кроме того, все эти молекулы связывают TfR человека и мыши. Более того, связывание указанного VHH по изобретению с рецептором TfR человека не конкурирует со связыванием трансферрина, эндогенного лиганда TfR, и, таким образом, не влияет на регулярные функции указанного лиганда. Было также показано, что конъюгаты, полученные с такими молекулами VHH, связывают TfR *in vitro* и транспортируются через ГЭБ в ЦНС *in vivo*, демонстрируя транцитоз. Таким образом, такие VHH представляют собой мощные агенты для доставки или нацеливания лекарств.

VHH по изобретению можно синтезировать любым способом, известным специалистам в данной области техники (химическим, биологическим или генетическим синтезом и т.д.). Они могут быть сохранены как таковые, или могут быть приготовлены в присутствии представляющего интерес вещества или любого приемлемого вспомогательного вещества.

Для химического синтеза применяют коммерческие аппараты, которые могут

включать как натуральные, так и ненатуральные аминокислоты, такие как D-энантиомеры и остатки с боковыми цепями с гидрофобностью и стерическими затруднениями, отличными от таковых у их природных гомологов (так называемые экзотические, т.е. неcodируемые аминокислоты), или последовательность VHH, содержащую одну или несколько пептидомиметических связей, которые могут включать, в частности, интеркаляцию метиленовой (-CH₂-) или фосфатной (-PO₂-) группы, вторичного амина (-NH-) или кислорода (-O-) или N-алкилпептида.

Во время синтеза можно вводить различные химические модификации, такие как, например, встраивание в N-концевое или C-концевое положение или в боковую цепь производного липида (или фосфолипиды) или компонента липосомы или наночастицы, для того, чтобы иметь возможность включения VHH по изобретению в липидную мембрану, такую как липосома, состоящая из одного или нескольких липидных слоев или бислоев, или наночастица.

VHH по изобретению также может быть получен из нуклеиновокислотной последовательности, кодирующей его, как описано ниже.

Конъюгаты

Другой объект изобретения относится к конъюгатам (также взаимозаменяемо называемым в настоящей заявке «химерными агентами»), содержащим одну или несколько молекул VHH, как определено выше, конъюгированных по меньшей мере с одной молекулой или каркасом, представляющим интерес.

Представляющей интерес молекулой может быть любая молекула, такая как медикамент или лекарство, диагностический агент, молекула визуализации, индикатор и т.д. Примеры конъюгированных молекул, представляющих интерес, включают любое химическое соединение, такое как, например, небольшие химические молекулы (такие как антибиотик, противовирусное средство, иммуномодулятор, противоопухолевое средство, противовоспалительное средство, адъювант и т.д.); пептиды, полипептиды и белки (такие как фермент, гормон, нейротрофический фактор, нейропептид, цитокин, аполипептопротеин, фактор роста, антиген, антитело или часть антитела, адъювант и т.д.); нуклеиновые кислоты (такие как РНК или ДНК человеческого, вирусного, животного, эукариотического или прокариотического, растительного или синтетического происхождения и т.д., включая, например, кодирующие гены, ингибирующие нуклеиновые кислоты, такие как рибозимы, антисмысловые нуклеиновые кислоты, интерферирующие нуклеиновые кислоты, полные геномы или части из них, плазмиды и т.д.); липиды, вирусы, маркеры или индикаторы, но не ограничиваясь ими. Обычно «представляющая интерес молекула» может быть любым активным фармацевтическим

ингредиентом, будь то химическое, биохимическое, природное или синтетическое соединение. Обычно выражение «малая химическая молекула» обозначает молекулу, представляющую фармацевтический интерес, с максимальной молекулярной массой 1000 Дальтон, обычно от 300 до 700 Дальтон.

Конъюгированное соединение обычно представляет собой лекарственное средство (такое как небольшое лекарство, нуклеиновая кислота или полипептид, например, антитело или его фрагмент) или агент визуализации, подходящий для лечения или детекции неврологических, инфекционных или раковых патологий, предпочтительно ЦНС, таких как головной мозг.

Химерный агент может также содержать, в дополнение к указанному интересующему соединению или вместо него, стабилизирующую группу для увеличения периода полужизни в плазме VHH или конъюгата. Таким образом, конкретные химерные агенты по изобретению содержат по меньшей мере один VHH, стабилизирующую группу и активное соединение в любом порядке.

Стабилизирующая группа может быть любой группой, о которой известно, что она имеет значительный период полужизни в плазме (например, по меньшей мере 1 час) и по существу не имеет неблагоприятной биологической активности. Примеры такой стабилизирующей группы включают, например, Fc-фрагмент иммуноглобулина или его варианты, большие человеческие белки сыворотки, такие как альбумин, ЧСА или молекулы IgG или ПЭГ. В конкретном варианте стабилизирующая группа представляет собой Fc-фрагмент человеческого IgG1. Более предпочтительно стабилизирующая группа представляет собой агликозилированный фрагмент Fc IgG1.

VHH может быть конъюгирован N-концом или C-концом со стабилизирующей группой, или обоими концами. Когда стабилизирующая группа представляет собой фрагмент Fc, конъюгацию обычно осуществляют путем генетической гибридизации. Полученный белок может оставаться в качестве мономерного агента или мультимеризоваться, в зависимости от природы стабилизирующей группы. В случае фрагмента Fc гибридный белок Fc-VHH или VHH-Fc обычно образует гомодимеры.

В конъюгированных соединениях по изобретению связывание можно осуществлять любыми приемлемыми способами связывания, принимая во внимание химическую природу, препятствие и количество конъюгированных объектов. Таким образом, связывание может быть осуществлено с помощью одной или нескольких ковалентных, ионных, водородных, гидрофобных или ван-дер-ваальсовых связей, расщепляемых или нерасщепляемых в физиологической среде или внутри клеток. Кроме того, связывание может быть осуществлено по различным реакционноспособным группам, особенно по

одной или несколькими концевым частям и/или по одной или нескольким внутренним или боковым реакционным группам. Связывание также может быть осуществлено с помощью генной инженерии.

Предпочтительно, чтобы взаимодействие было достаточно сильным, чтобы VHH не отделялся от активного вещества до того, как достигнет места своего действия. По этой причине предпочтительным связыванием по изобретению является ковалентное связывание, хотя можно также использовать нековалентное связывание. Представляющее интерес соединение может быть связано с VHH либо на одной из концевых частей (N-конце или C-конце), либо в боковой цепи одной из составляющих аминокислот последовательности (Majumdar and Siahaan, *Med Res Rev.*, в печати). Представляющее интерес соединение может быть связано напрямую с VHH или опосредовано с помощью линкера или спейсера. Средства ковалентного химического связывания, со спейсером или без него, включают, например, средства, выбранные из би- или многофункциональных агентов, содержащих алкильные, арильные или пептидные группы, со сложными эфирами, альдегидами, или алкильными или арильными кислотами, ангидридом, сульфгидрильными или карбоксильными группами, группами, полученными из цианогенбромида или хлорида, карбонилдиимидазола, сложных эфиров сукцинимида или сульфогалогенидов.

Иллюстративные стратегии конъюгирования VHH по изобретению с молекулой или каркасом раскрыты на фиг. 6.

В конкретном варианте осуществления связывание (или конъюгацию) осуществляют путем генетической гибридизации. Такую стратегию можно использовать, когда связанная молекула представляет собой пептид или полипептид. В таком случае молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую VHH, гибридованной с молекулой, готовят и экспрессируют в любой подходящей системе экспрессии для получения конъюгата.

В другом конкретном варианте осуществления связывание (или конъюгацию) осуществляют посредством ферментативной реакции. В частности, сайт-специфическая конъюгация с VHH может быть выполнена с использованием фермента трансглутаминазы (ТГ-азы). ТГ-аза катализирует образование стабильной изопептидной связи между (i) боковой цепью остатка глутамина, вставленного в последовательность метки, специфически распознаваемой ТГ-азой (а именно, Q-метки), и (ii) аминокислотным донорным субстратом. В связи с этим изобретатели разработали конкретную последовательность метки (названную «Q-меткой»), которая распознается ТГ-азой и может использоваться для связывания VHH по настоящему изобретению с любой

интересующей молекулой, особенно с химическими лекарствами или агентами. Для этой цели VNH получают путем генетической гибридизации для добавления в тандеме (обычно к его C-концу) следующих меток: сначала необязательный триаланиновый линкер, затем необязательная His-метка, затем необязательный небольшой триглицидный линкер и, наконец, Q-метка. Триглицидный линкер позволяет разделить Q-метку, чтобы обеспечить лучшую доступность ТГ-азы к глутамину, в то время как His-метка направлена на облегчение очистки VNH и его дополнительных функционализированных версий.

Разработанная общая стратегия конъюгации представляет собой конвергентный синтез, основанный на процессе, включающем:

(1) введение в глутамин Q-метки VNH реактивного фрагмента для дальнейшей конъюгации с интересующей молекулой. С этой целью гетеробифункциональный линкер, имеющий два разных реакционных конца, может быть обработан ТГ-азой: одна подходящая первичная аминогруппа по направлению к ТГ-азе и одна ортогональная реактивная часть. Типичные примеры таких ортогональных и реакционноспособных групп включают азиды, связывающие алкины, такие как DBCO (добензоциклооктен) или BCN (бицикло[6.1.0]нонин), тетразины, TCO (транс-циклооктен), свободные или защищенные тиолы и т.д.;

(2) введение в интересующую молекулу реакционноспособного фрагмента, комплементарного фрагменту, встроенному в VNH Q-метку. Типичные примеры таких ортогональных и реакционноспособных групп включают азиды, связанные алкины, такие как DBCO или BCN, тетразины, TCO, свободные или защищенные тиолы и т.д.;

(3) конъюгацию функционализированного VNH и молекулы за счет их дополнительных реактивных групп.

Такая стратегия конъюгации представляет собой дополнительный объект настоящего изобретения. В частности, цель изобретения заключается в способе связывания двух молекул с использованием Q-метки, как определено выше, посредством реакции сочетания ТГ-азой. Еще одним объектом изобретения является VNH, содержащий Q-метку. Еще одним объектом изобретения является молекула VNH, содержащая линкер, такой как линкер Gly, и Q-метку. Предпочтительные VNH по изобретению имеют следующую структуру:

VNH-линкер-His_m-линкер-LQR,

где:

VNH представляет собой любую молекулу VNH;

линкер представляет собой любой молекулярный линкер, такой как линкер Ala или

Gly (предпочтительно, два линкера являются различными); и

m представляет собой целое число от 0 до 6.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату, содержащему VHH, ковалентно связанный с химическим соединением. Предпочтительные варианты таких конъюгатов содержат 1 VHH и 1 химическое соединение.

В другом конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату, содержащему VHH, ковалентно связанный с нуклеиновой кислотой. Нуклеиновая кислота может быть антисмысловым олигомером, рибозимом, аптамером, миРНК и т.д. Предпочтительные варианты таких конъюгатов содержат 1 молекулу VHH и 1 молекулу нуклеиновой кислоты.

В другом конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату, содержащему VHH, ковалентно связанный с пептидом. Пептид может быть активной молекулой, приманкой, меткой, лигандом и т.д. Предпочтительные варианты таких конъюгатов содержат 1 VHH и 1 пептид.

В другом варианте осуществления изобретение относится к конъюгату, содержащему VHH, ковалентно связанный с красителем.

В другом варианте осуществления изобретение относится к конъюгату, содержащему VHH, ковалентно связанный с наночастицей или липосомой. Наночастица или липосома могут быть загружены или функционализированы активными агентами. Предпочтительные варианты таких конъюгатов содержат несколько молекул VHH, связанных с каждой наночастицей или липосомой.

В другом варианте осуществления конъюгат содержит антитело или его фрагмент, с которым связаны одна или несколько молекул VHH. Обычно молекула VHH связана с С- или N-концом тяжелой или легкой цепи, или с обоими, или с С- или N-концом фрагмента Fc.

Изобретение также относится к способу получения конъюгированного соединения, такого как определено выше, включающему стадию связывания между VHH и молекулой или каркасом, предпочтительно химическим, биохимическим или ферментативным путем, или с помощью генной инженерии.

В химерном агенте по изобретению, когда присутствует несколько VHH, они могут иметь сходную или различную специфичность связывания.

Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева

Другой аспект изобретения относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей VHH, как определено выше, или его конъюгат (когда конъюгированный фрагмент представляет

собой аминокислотную последовательность). Нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной или двухцепочечной. Нуклеиновая кислота может быть ДНК (кДНК или геномной ДНК), РНК или их смесью. Она может быть в одноцепочечной форме, в двухцепочечной форме или в их смеси. Она может включать модифицированные нуклеотиды, содержащие, например, модифицированную связь, модифицированное пуриновое или пиримидиновое основание, или модифицированный сахар. Её можно получить любым способом, известным специалисту в данной области техники, включая химический синтез, рекомбинацию и/или мутагенез. Нуклеиновая кислота согласно изобретению может быть выведена из аминокислотной последовательности молекул VHH согласно изобретению, а использование кодонов может быть адаптировано в соответствии с клеткой-хозяином, в которой должна быть транскрибирована нуклеиновая кислота. Эти стадии могут быть выполнены способами, хорошо известными специалистам в данной области техники, некоторые из которых описаны в справочном руководстве Sambrook et al. (Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Third Edition Cold Spring Harbor).

Конкретные примеры таких нуклеиновокислотных последовательностей включают последовательности, содержащие любую из SEQ ID NO: 52-64 и 95-110, и комплементарную к ней последовательность, а также их фрагменты, лишённые необязательной части, кодирующей метку. Домены, кодирующие CDR1, CDR2 и CDR3, подчеркнуты. Части, кодирующие метку, выделены жирным шрифтом.

Изобретение также относится к вектору, содержащему такую нуклеиновую кислоту, при необходимости под контролем регуляторных последовательностей (например, промотора, терминатора и т.д.). Вектор может быть плазмидой, вирусом, космидой, фагмидой, искусственной хромосомой и т.д. В частности, вектор может содержать нуклеиновую кислоту по изобретению, функционально связанную с регуляторной областью, то есть областью, содержащей одну или несколько контрольных последовательностей. При необходимости вектор может содержать несколько нуклеиновых кислот по изобретению, функционально связанных с несколькими регуляторными областями.

Термин «контрольные последовательности» означает нуклеиновокислотные последовательности, необходимые для экспрессии кодирующей области. Контрольные последовательности могут быть эндогенными или гетерологичными. Хорошо известные контрольные последовательности, используемые в настоящее время специалистами в данной области техники, будут предпочтительными. Такие контрольные последовательности включают промотор, последовательность сигнального пептида и

терминатор транскрипции, но не ограничиваются ими.

Термин «функционально связанный» означает конфигурацию, в которой контрольную последовательность помещают в соответствующее положение относительно кодирующей последовательности таким образом, чтобы контрольная последовательность направляла экспрессию кодирующей области.

Настоящее изобретение также относится к применению нуклеиновой кислоты или вектора согласно изобретению для трансформации, трансфекции или трансдукции клетки-хозяина.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей одну или несколько нуклеиновых кислот по изобретению и/или один или несколько векторов по изобретению.

Термин «клетка-хозяин» также включает любое потомство родительской клетки-хозяина, которое не идентично родительской клетке-хозяину из-за мутаций, происходящих во время репликации. Подходящие клетки-хозяева могут быть прокариотическими (например, бактериями) или эукариотическими (например, клетками дрожжей, растений, насекомых или млекопитающих). Конкретные иллюстративные примеры таких клеток включают штаммы *E. coli*, клетки CHO, штаммы *Saccharomyces*, растительные клетки, клетки насекомых sf9 и т.д.

Применение

Молекулы VHH по настоящему изобретению могут связываться с TfR и, таким образом, направлять/ доставлять молекулы в клетки или органы, экспрессирующие TfR.

В контексте данного изобретения связывание предпочтительно является специфическим, так чтобы связывание с TfR происходило с более высокой аффинностью, чем связывание с любым другим антигеном того же вида. Предпочтительные молекулы VHH по изобретению связывают TfR1 человека и TfR мыши или крысы. Более предпочтительно, чтобы молекулы VHH связывались с человеческими и мышинными рецепторами практически с одинаковой аффинностью.

Таким образом, изобретение относится к способам нацеливания/ доставки соединения к экспрессирующей TfR клетку или органу или через них, включающим связывание указанного соединения по меньшей мере с одним VHH по настоящему изобретению.

Изобретение также относится к использованию VHH, такого как определено выше, в качестве вектора для транспорта соединения к TfR-экспрессирующей клетке или органу, или через них.

Изобретение также относится к применению VHH, такого как определено выше,

для приготовления лекарственного средства, способного проникать через ГЭБ.

Изобретение также относится к способу обеспечения или улучшения прохождения молекулы через ГЭБ, включающему связывание молекулы с VHH по изобретению.

VHH по изобретению можно использовать для транспортировки или доставки любого соединения, такого как небольшие лекарственные средства, белки, полипептиды, пептиды, аминокислоты, липиды, нуклеиновые кислоты, вирусы, липосомы и т.д.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один VHH или конъюгат VHH-лекарственное средство, такой как определено выше, и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

Изобретение также относится к диагностической композиции, содержащей VHH или конъюгат VHH и диагностического соединения или медицинского средства визуализации, как определено выше.

Конъюгат можно использовать в форме любой фармацевтически приемлемой соли. Выражение «фармацевтически приемлемые соли» относится, например, к фармацевтически приемлемым солям присоединения оснований или кислот, гидратам, сложным эфирам, сольватам, предшественникам, метаболитам или стереоизомерам, указанным векторам или конъюгатам, загруженным по меньшей мере одним веществом, представляющим интерес, но не ограничивается ими.

Выражение «фармацевтически приемлемые соли» относится к нетоксичным солям, которые обычно можно получить взаимодействием свободного основания с подходящей органической или неорганической кислотой. Эти соли сохраняют биологическую эффективность и свойства свободных оснований. Типичные примеры таких солей включают водорастворимые и нерастворимые в воде соли, такие как ацетаты, N-метилглюкамин аммоний, амсонаты (4,4-диаминостилбен-2,2'-дисульфаты), бензолсульфонаты, бензоаты, бикарбонаты, бисульфаты, битартраты, бораты, гидробромиды, бромиды, бутираты, камсилаты, карбонаты, гидрохлораты, хлориды, цитраты, клавуланаты, дихлоргидраты, дифосфаты, эдетаты, эдетаты кальция, эдисилаты, эстолаты, эзилаты, фумараты, глюцептаты, глюконаты, глутаматы, гликолиларсанилаты, гексафторфосфаты, гексилрезорцинаты, гидрабамины, гидроксинафтоаты, йодиды, изотионаты, лактаты, лактобионаты, лаураты, малаты, малеаты, миндаляты, мезилаты, метилбромиды, метилнитраты, метилсульфаты, мукаты, напсилаты, нитраты, 3-гидрокси-2-нафтоаты, олеаты, оксалаты, пальмитаты, памоаты (1,1-метилен-бис-2-гидрокси-3-нафтоаты или эмбоаты), пантотенаты, фосфаты, пикраты, полигалактуронаты, пропионаты, п-толуолсульфонаты, салицилаты, стеараты, субацетаты, сукцинаты,

сульфаты, сульфосалицилаты, сураматы, таннаты, тартраты, теоклаты, тозилаты, триэтиодиды, трифторацетаты и валерианаты.

Композиции по изобретению предпочтительно содержат фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Фармацевтически приемлемый носитель может быть выбран из носителей, обычно используемых в соответствии с каждым способом применения. В зависимости от предполагаемого способа применения соединения могут быть в твердой, полутвердой или жидкой форме. Для твердых композиций, таких как таблетки, пилюли, порошки или гранулы, которые являются свободными или включены в желатиновые капсулы, активное вещество может быть комбинировано с: (a) разбавителями, например, лактозой, декстрозой, сахарозой, маннитолом, сорбитолом, целлюлозой и/или глицином; (b) смазками, например диоксидом кремния, тальком, стеариновой кислотой, ее магниевой или кальциевой солью и/или полиэтиленгликолем; (c) связующими агентами, например, силикатом магния и алюминия, крахмальной пастой, желатином, трагакантом, метилцеллюлозой, карбоксиметилцеллюлозой натрия и/или поливинилпирролидоном; (d) дезинтегрантами, например крахмалом, агаром, альгиновой кислотой или ее натриевой солью, или шипучими смесями; и/или (e) абсорбентами, красителями, ароматизаторами и подсластителями. Вспомогательные вещества могут представлять собой, например, маннитол, лактозу, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, тальк, целлюлозу, глюкозу, сахарозу, карбонат магния и аналоги фармацевтического качества. Для полутвердых композиций, таких как суппозитории, вспомогательное вещество может, например, представлять собой эмульсию или масляную суспензию, или вещество на основе полиалкиленгликоля, такого как полипропиленгликоль. Жидкие композиции, в частности препараты для инъекций или те, которые включены в мягкую капсулу, могут быть приготовлены, например, путем растворения, диспергирования и т.д. активного вещества в фармацевтически чистом растворителе, таком как, например, вода, физиологический солевой раствор, водный раствор декстрозы, глицерин, этанол, масло и их аналоги.

Композиции или конъюгаты по изобретению можно применять любым подходящим путем и, без ограничения, парентеральным путем, таким как, например, в форме препаратов, которые можно вводить подкожным, внутривенным или внутримышечным путем; пероральным путем (или per os), например, в форме таблеток с покрытием или без покрытия, желатиновых капсул, порошков, гранул, суспензий или пероральных растворов (одна такая форма для перорального введения может быть либо с немедленным высвобождением, либо с пролонгированным или отсроченным высвобождением); ректальным путем, например, в форме суппозиториев; местным путем,

в частности трансдермальным путем, например, в форме пластырей, помад или гелей; интраназальным путем, например, в форме аэрозоля и спрея; перлингвальным путем; или внутриглазным путем.

Фармацевтические композиции обычно содержат эффективную дозу VNN или конъюгата по изобретению. «Терапевтически эффективная доза», как описано в настоящей заявке, относится к дозе, которая дает терапевтический эффект для данного состояния и схемы введения. Обычно это средняя доза активного вещества, которую необходимо ввести для заметного улучшения некоторых симптомов, связанных с заболеванием или патологическим состоянием. Например, при лечении злокачественной онкопатологии головного мозга или другой ткани, патологии, поражения или расстройства ЦНС доза активного вещества, которая снижает, предотвращает, задерживает, устраняет или останавливает одну из причин или симптомов заболевания или расстройства, будет терапевтически эффективной. «Терапевтически эффективная доза» активного вещества не обязательно излечивает заболевание или расстройство, но обеспечивает лечение этого заболевания или расстройства, так что его появление задерживается, замедляется или предотвращается, или его симптомы ослабляются, или его течение изменяется, или, например, становится менее тяжелым, или выздоровление пациента ускоряется.

Понятно, что «терапевтически эффективная доза», в частности, для человека будет зависеть от различных факторов, включая активность/эффективность активного вещества, время его введения, способ введения, его токсичность, скорость его выведения и его метаболизм, комбинации/взаимодействия лекарственных средств и тяжесть заболевания (или расстройства), которое лечат на профилактической или лечебной основе, а также возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и/или рацион пациента.

В зависимости от связанного вещества конъюгаты и композиции по настоящему изобретению можно использовать для лечения, профилактики, диагностики или визуализации многочисленных патологий, особенно патологий, поражающих ЦНС, инфекционных патологий или рака. VNN по изобретению обладают способностью направленной доставки в клетки, экспрессирующие TfR, в частности клетки, которые демонстрируют выраженную экспрессию указанного рецептора, например, в частности, раковые клетки, нервную или не-нервную ткань, и/или проникновения через клеточные мембраны, особенно физиологические барьеры ЦНС и, в частности, гемато-опухолевый барьер (ГОБ) злокачественной нервной ткани. TfR содержится в повышенном количестве в таких органах, как костный мозг, плацента и желудочно-кишечный тракт. TfR также высоко экспрессируется в эндотелиальных клетках головного мозга, но не в

эндотелиальных клетках, выстилающих сосуды в других тканях. Экспрессия TfR была подтверждена на плазматической мембране очищенных микрососудов головного мозга и культивируемых эндотелиальных клетках крыс, мышей, свиней и приматов, не являющихся человеком

В связи с этим изобретение относится к применению фармацевтических конъюгатов или композиций, как описано выше, для лечения или профилактики патологий или расстройств ЦНС, опухолей головного мозга или других раковых клеток, а также бактериальных, вирусных, паразитарных или грибковых инфекционных патологий головного мозга или других тканей.

Изобретение также относится к VHH, конъюгату или композициям, как описано выше, для использования для диагностики, визуализации, или лечения патологий или расстройств ЦНС, опухолей головного мозга или других раковых клеток, а также бактериальных, вирусных, паразитарных или грибковых инфекционных патологий головного мозга или других тканей.

Изобретение также относится к VHH, конъюгату или композициям, как описано выше, для применения с целью лечения, визуализации и/или диагностики опухоли головного мозга или других типов рака.

Изобретение относится к VHH, конъюгату или композиции, такой как определено выше, для применения с целью лечения, визуализации и/или диагностики нейродегенеративных патологий, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, инсульт, болезнь Крейтцфельда-Якоба, губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз и др., но не ограничиваясь ими.

Изобретение также относится к VHH, конъюгату или композиции, такой как определено выше, для использования с целью лечения, визуализации и/или диагностики неврологических патологий, таких как эпилепсия, мигрень, энцефалит, боль в ЦНС и т.д., но не ограничиваясь ими.

Изобретение также относится к VHH, конъюгату или композиции, такой как определено выше, для применения с целью лечения, визуализации и/или диагностики редких заболеваний, таких как лизосомные болезни накопления, болезнь Фарбера, болезнь Фабри, ганглиозидоз GM1 и GM2, болезнь Гоше, различные мукополисахаридозы и др., но не ограничиваясь ими.

Изобретение также относится к VHH, конъюгату или композиции, такой как определено выше, для применения с целью лечения, визуализации и/или диагностики психоневрологических патологий, таких как депрессия, аутизм, тревога, шизофрения и т.д., но не ограничиваясь ими.

Изобретение также относится к VHH, конъюгату или композиции, такой как определено выше, для применения с целью лечения, визуализации и/или диагностики рака, такого как глиобластома, рак поджелудочной железы, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак и т.д., но не ограничиваясь ими.

Изобретение также относится к VHH, конъюгату или композиции, такой как определено выше, где конъюгированный агент представляет собой вирус или вирусоподобную частицу, такую как рекомбинантный вирус. Настоящее изобретение действительно может быть использовано для увеличения доставки в мозг или опухоль, или любую ткань, обогащенную TfR, рекомбинантных (например, репликационно-дефектных или аттенуированных) вирусов, используемых в генной терапии, таких как аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, лентивирусы, ретровирусы и т.д., или вирусоподобных частицы. Связывание с вирусом или вирусоподобной частицей может быть выполнено, например, посредством связывания с капсидным белком вируса.

Изобретение также относится к способам лечения любого из вышеуказанных состояний или заболеваний путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, VHH, конъюгата или композиции по изобретению.

Изобретение также относится к применению VHH, конъюгата или композиции по изобретению для производства лекарственного средства для лечения любого из вышеуказанных состояний или заболеваний.

Другие аспекты и преимущества настоящего изобретения станут очевидными при рассмотрении нижеприведенных примеров, которые имеют только иллюстративный характер и не ограничивают объем настоящей заявки.

Примеры

Пример 1

Подтверждение экспрессии TfR на ГЭБ.

Мы проанализировали профиль экспрессии TfR на клеточной мембране в эндотелии головного мозга разных видов. Набор ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, Ла-Хойя, Калифорния, США) использовали для приготовления мембранных экстрактов расщепленных или нерасщепленных микрососудов головного мозга (BMV) и примокультур эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга (BMES) крыс, мышей, свиньей и приматов, не являющихся человеком (NHP; макака-резус) (фиг. 1).

Мембранные экстракты количественно оценивали с помощью анализа белка BioRad DC (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США) в соответствии с инструкциями производителя. Мембранные белки разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле с

додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ) на 4-12% полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозные мембраны (ThermoFisher Scientific). Белки исследовали с первичным антителом против TfR (Genetex GTX102596; 1/1000), а затем вторичным антителом осла против кроличьего IgG, конъюгированным с пероксидазой (Jackson ImmunoResearch), разведенным 1/10000. Наконец, белки выявляли с помощью хемилюминесценции.

Как показано на фиг. 1, TfR экспрессируется в расщепленных и нерасщепленных микрососудах мозга крыс, мышей, свиней и приматов, не являющихся человеком. TfR также экспрессируется в эндотелиальных клетках головного мозга крысы и свиньи (обращаем внимание, что только 1 мкг мембранных белков загружали на ДСН-ПААГ для эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга по сравнению с 10 мкг или 5 мкг для микрососудов головного мозга). Экспрессия TfR усиливается в расщепленных микрососудах головного мозга приматов, не являющихся человеком.

Эти данные демонстрируют, что TfR представляет собой подходящую мишень для создания молекул для приложений *in vivo*.

Пример II

Конструирование клеточных линий СНО, стабильно экспрессирующих TfR человека и мыши.

Предпосылкой для идентификации и характеристики TfR-связывающих VNN было создание в эукариотических клетках (клетках яичников китайского хомячка, СНО) стабильных клеточных линий, экспрессирующих hTfR и mTfR, конститутивно и на высоком уровне. Эти клеточные линии затем использовали: (i) для идентификации и характеристики агентов, связывающихся с рецептором, экспрессируемым на поверхности клетки, в его нативной конфигурации; и (ii) для проверки способности рецептора к интернализации таких агентов посредством эндоцитоза.

Для конструкции этих клеточных линий кДНК, кодирующую hTfR, клонировали с использованием информации о последовательностях, доступной в базах данных (номер доступа: NM_003234.3). Были выбраны праймеры, необходимые для амплификации кДНК с помощью ОТ-ПЦР (см. Таблицу ниже), содержащие на своем конце (выделенные жирным шрифтом) сайты рестрикции (EcoRI и Sall), необходимые для клонирования в векторе экспрессии pEGFP-C1 (Clontech) (фиг. 2-A).

Рецептор	Последовательности праймеров
hTfR	(F) ATATATGAATTTCGGCTCGGGACGGAGGACGC (SEQ ID NO: 65)
	(R) TTAATTGTCGACAGAACTCATTTGTCCCAACCGTCAC (SEQ ID NO: 66)

Тотальную РНК, полученную из головного мозга человека, использовали для амплификации фрагмента кДНК, кодирующего hTfR, с помощью ОТ-ПЦР. После

амплификации продукт ПЦР расщепляли рестрикционными ферментами EcoRI-SalI и лигировали в вектор экспрессии pEGFP-C1 (Clontech), расщепленный теми же рестрикционными ферментами. После трансфекции в эукариотические клетки этот вектор обеспечивает экспрессию под контролем промотора CMV hTfR, слитого с EGFP на его N-конце, то есть на конце его внутриклеточного домена. После трансформации компетентных бактерий *E. coli* DH5 α , получения изолированных колоний и получения плазмидной ДНК обе цепи конструкции были полностью секвенированы для проверки.

Плазмида, кодирующая mTfR, гибридный с EGFP (усиленным зеленым флуоресцентным белком), была приобретена у GeneCource (ссылка на плазмиду: EX-Mm05845-M29).

Были выполнены временные трансфекции в клетки CHO-K1, которые использовали для отбора стабильных трансфектантов путем лимитирующего разведения и устойчивости к антибиотику (G418). Эти клеточные линии были амплифицированы при сохранении селективного давления.

Конфокальные микрофотографии, сделанные после иммуоцитохимии на фиксированных (параформальдегидом) клеточных линиях с использованием трансферрина, конъюгированного с Alexa647 (Tf-Alexa647), подтверждают на фиг. 2-B совместную локализацию EGFP (зеленый) и Tf-Alexa647 (красный) и, следовательно, хорошую экспрессию и функциональное связывание рецептора.

Мембранную экспрессию рецепторов ожидаемого размера проверяли вестерн-блоттингом на клеточных мембранах, экстрагированных с помощью набора ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit. Антитела были направлены либо против GFP, либо против TfR. Белки, соответствующие объединенному размеру EGFP и h/mTfR (170 кДа), распознавали антителом против GFP и антителом против TfR (фиг. 2-C). Клеточную линию CHO K1 дикого типа (WT) использовали в качестве отрицательного контроля, и антитела не выявляли белков.

Эти данные подтверждают экспрессию функционального рецептора на клеточной поверхности линий клеток CHO.

Пример III

Получение VHH, которые связывают TfR.

Ламу (*Lama glama*) иммунизировали 4 раза подкожно препаратами мембран из стабильных клеточных линий CHO, экспрессирующих интересующие рецепторы человека и мыши. Конструирование библиотеки VHH выполняли, как описано ранее (Alvarez-Rueda et al., 2007, Behar et al., 2009). Вкратце, мРНК, кодирующие VHH, амплифицировали с помощью ОТ-ПЦР из общих РНК мононуклеарных клеток периферической крови,

выделенных на градиенте фиколла, и клонировали в фагмиду pHEN1. Повторный отбор позволил выделить фаги, представляющие VHH, проявляющие сильную аффинность к TfR, экспрессируемому на поверхности клетки.

В общей сложности более 700 клонов были проверены на их способность связывать TfR, и примерно 100 клонов были секвенированы.

Были получены VHH с улучшенным связыванием (как с мышинными, так и с человеческими клеточными линиями), проникновением в клетки и транспортными свойствами. Иллюстративными VHH являются VHH A, VHH B, VHH C, VHH D (см. также список последовательностей). Эти VHH не связываются с клетками контрольной линии клеток CHO.

Кроме того, TfR-связывающий VHH с соответствующими улучшенными связывающими свойствами был получен посредством сайт-направленного мутагенеза. Более конкретно, проводили сайт-направленный мутагенез для введения одиночных замен аланина в гипервариабельные области (CDR) VHH A 1, 2 и 3, в результате чего были получены VHH A1-A9. VHH A1 и A2 были мутированы в CDR1, VHH A3 и A4 были мутированы в CDR2, а VHH A5-A9 были мутированы в CDR3. Кроме того, однонаправленный мутагенез также выполняли путем замены некоторых аминокислот CDR на близкие по структуре аминокислоты. Были получены VHH A10-A19, где VHH A10 и A11 были мутированы в CDR1, VHH A12-A14 были мутированы в CDR2, а VHH A15-A19 были мутированы в CDR3.

Далее были созданы гуманизированные TfR-связывающие VHH для повышения эффективности *in vivo*, например, путем исключения иммуногенности, и они были обозначены как VHH A20-A25.

Кроме того, были получены меченые молекулы VHH для облегчения очистки и/или связывания.

Аминокислотные последовательности каждого из этих VHH представлены в Списке последовательностей.

Пример IV

Связывание и эндоцитоз очищенных VHH по изобретению

Чтобы подтвердить способность выбранных молекул VHH связывать TfR и подвергаться эндоцитозу, проводили иммуноцитохимические эксперименты, включающие инкубацию VHH на живых линиях клеток CHO, экспрессирующих TfR, гибридный с EGFP, с детекцией с использованием первичных антител мыши против cMyc (ThermoFisher), с последующим применением конъюгированных с Alexa594 ослиных вторичных антител против мыши (Jackson ImmunoResearch), и наблюдали с помощью

конфокального микроскопа. Результаты, полученные с VHH A, показаны в качестве примера.

Как показано на фиг. 3, VHH связывается с клеточными линиями CHO-hTfR-EGFP (фиг. 3-B) и CHO-mTfR-EGFP (фиг. 3-A) и включается посредством эндоцитоза до накопления в клетках, как показано с использованием пермеабиллизации тритоном, что не наблюдалось в случае контроля VHH (VHH Z) (фиг. 3-C, 3-D).

Пример V

Определение аффинности связывания

Связывающие свойства VHH с аффинностью к TfR тестировали с помощью проточной цитометрии и определяли кажущуюся аффинность ($K_{d \text{ app}}$). Все эксперименты проводили в 96-луночных планшетах с использованием $2-3 \times 10^5$ клеток/луночку при 4°C со встряхиванием. Линии клеток CHO, экспрессирующие TfR, гибридный с EGFP, или клетки CHO дикого типа насыщали раствором ФБР/2% БСА (фосфатным буферным раствором с 2% бычьим сывороточным альбумином) в течение 30 минут, чтобы избежать неспецифического связывания, с последующей инкубацией с очищенными VHH в концентрациях от 2 мкМ до 1 пМ в течение 1 часа. После одного промывания в ФБР/2% БСА клетки инкубировали в течение 1 часа с антителом против bHis метки (мышинным), дважды промывали ФБР/2% БСА и инкубировали в течение 45 минут с вторичным анти-мышинным антителом, конъюгированным с Alexa647. После двух последних промываний в ФБР/ 2% БСА клетки фиксировали в течение 15 мин с ФБР/ 2% ПФА или не фиксировали, один раз промывали ФБР и, наконец, ресуспендировали в ФБР. Уровни флуоресценции оценивали с помощью проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi) или проточного цитометра Attune NxT (Thermo Fisher Scientific).

В контрольных условиях, когда клетки инкубировали с контрольным VHH (VHH Z), неспецифического связывания с меткой не отмечено. Все протестированные VHH вызывали зависящий от концентрации сдвиг сигнала, подтверждая связывание с интересующим рецептором (фиг. 4-A). Не было обнаружено неспецифического связывания с меткой в контрольных клетках CHO WT со всеми протестированными VHH (не показано). Значение VHH $K_{d \text{ app}}$ было рассчитано с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (фиг. 4-B). $K_{d \text{ app}}$ находились в одном диапазоне для всех VHH: от 7,5 нМ (VHH B) до 56 нМ (VHH D) для mTfR и от 1,6 нМ (VHH B) до 2,7 нМ (VHH A) для hTfR.

Пример VI

Конкурентный анализ очищенных VHH с аффинностью к TfR и натурального лиганда.

Для оценки способности выбранных VHH конкурировать с трансферрином (Tf), природным лигандом TfR, за связывание с рецептором, проводили конкурентные анализы с использованием экспериментов с проточной цитометрией. На первом этапе конкуренты в серийных разведениях инкубировали на клетках CHO, экспрессирующих интересующий рецептор, гибридный с EGFP, в течение 1 часа при 4°C. Во-вторых, добавляли метки на ЕС90 и инкубировали еще 1 час, а затем проводили детекцию с помощью соответствующей системы выявления (фиг. 5).

TfR-связывающие VHH использовали в качестве индикаторов (фиг. 5-B) и конкурентов (фиг. 5-C). Во всех условиях не было конкуренции между VHH и лигандом Tf, что позволяет предположить, что VHH связываются с TfR на эпитопе, отличном от эпитопа Tf.

Пример VII

Определение аффинности связывания VHH A1-A19

Связывающие свойства VHH A1-A19 для TfR тестировали с помощью проточной цитометрии и определяли кажущуюся аффинность ($K_d \text{ app}$). Все эксперименты проводили в 96-луночных планшетах с использованием 2×10^5 клеток/лунку при 4°C со встряхиванием. Клеточные линии CHO, стабильно экспрессирующие hTfR или mTfR, гибридный с EGFP, или клетки CHO WT, насыщали раствором ФБР/2% БСА в течение 30 минут, чтобы избежать неспецифического связывания, с последующей инкубацией с очищенными VHH в концентрациях от 50 мкМ до 5 пМ в течение 1 часа. После одного промывания в ФБР/2% БСА клетки инкубировали в течение 1 часа с анти-бHis антителом (мышиним), дважды промывали раствором ФБР/2% БСА и инкубировали в течение 45 минут с вторичным анти-мышиним антителом, конъюгированным с Alexa647. После двух последних промываний ФБР/2% БСА клетки фиксировали инкубацией в течение 15 мин с ФБР/2% ПФА, один раз промывали ФБР и, наконец, ресуспендировали в ФБР и хранили при 4°C. Уровни флуоресценции оценивали с помощью проточного цитометра Attune NxT (Thermo Fisher Scientific).

Все VHH A1-A19 вызывали зависящий от концентрации сдвиг сигнала в обеих клеточных линиях (за исключением VHH A12), подтверждая их эффективное связывание с интересующим рецептором (фиг. 11; 12). В то время как VHH A, VHH A1-A4 и VHH A10-A15 показали сходное значение V_{max} (плато кривой) на линиях клеток, экспрессирующих как hTfR, так и на mTfR, VHH A6-A9 и VHH A16-A19 показали

снижение B_{max} от небольшого до резкого для обеих клеточных линий, а также сдвиг кривой от небольшого до сильного сдвига. Только VHH A12 показал более низкий сдвиг B_{max} и сильный сдвиг кривой на линии клеток, экспрессирующей hTfR, по сравнению с другим VHH Aх. Не было обнаружено мечения контрольных клеток CHO WT со всеми протестированными VHH (не показано).

Значение VHH $K_{d\ app}$ было рассчитано с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (фиг. 11-B; 12-B). Что касается связывания с человеческим TfR, VHH A, A1-A4, A6, A9-A11 и A13-A17 показали аналогичное значение $K_{d\ app}$ примерно 3-4 нМ. Напротив, VHH A5, A8, A18 и 19 показали несколько более низкую аффинность от 9,2 до 25 нМ, тогда как VHH A7 и A12 показали резко сниженную аффинность 255 нМ и 363 нМ, соответственно.

Что касается связывания с мышинным TfR, VHH A и A9 показали сходные значения $K_{d\ app}$ около 50 нМ. Все другие VHH Aх показали несколько более низкую аффинность от 131 до 259 нМ, за исключением VHH A5, A8 и A18, которые показали значительно сниженную аффинность 604 нМ, 427 нМ и 416 нМ, соответственно.

Пример VIII

Связывание и эндоцитоз очищенных гибридных молекул VHH-Fc с аффинностью к TfR, и определение аффинности.

Молекулы VHH против TfR по настоящему изобретению были гибридизованы с Fc-фрагментом IgG. Для получения гибридного белка фрагменты ДНК, кодирующие VHH (без метки), амплифицировали с помощью ПЦР и клонировали в вектор pINFUSE-IgG1-Fc2 (InvivoGen), чтобы кодировать фрагмент человеческого IgG1-Fc, охватывающий на его N-конце или С-конце VHH. Гибридные белки получали с использованием системы экспрессии Expi293 в соответствии с инструкциями производителя (Life Technologies). Через 72 часа после трансфекции надосадочную жидкость собирали и очищали с использованием колонок с протеином A GraviTrap (GE Healthcare). Очищенные гибридные белки количественно оценивали с использованием собственного анти-Fc ИФА.

Иммуноцитохимические эксперименты на клеточных линиях CHO, экспрессирующих TfR, гибридизованный с EGFP, включающие инкубацию гибридных белков VHH-Fc на живых клетках, с детекцией с помощью конъюгированного с Alexa594 антитела против hFc (Jackson ImmunoResearch), с получением фотографий с помощью конфокального микроскопа, были выполнены для подтверждения способности гибридных белков связываться с целевым рецептором, представляющим интерес.

Результаты демонстрируют, что конъюгаты по изобретению могут связываться и подвергаться эндоцитозу клетками (фиг. 7). Не наблюдалось связывания контрольного

конъюгата V_{HN}-Fc (V_{HN} Z-Fc) с клетками, что свидетельствует о специфичности взаимодействия.

Связывающие свойства гибридных белков V_{HN}-Fc и Fc-V_{HN} с аффинностью к T_fR тестировали в экспериментах с проточной цитометрией и определяли кажущуюся аффинность ($K_{d \text{ app}}$). Все эксперименты проводили в 96-луночных планшетах с использованием $2-3 \times 10^5$ клеток/лунку при 4°C со встряхиванием. Линии клеток CHO, экспрессирующие интересующие рецепторы, слитые с EGFP, или клетки CHO WT насыщали ФБР/2% БСА с последующей инкубацией с очищенными V_{HN}-Fc или Fc-V_{HN} в концентрациях от 350 нМ до 0,03 пМ в течение 1 часа. После промывания клетки инкубировали в течение 1 часа с анти-hFc антителом, конъюгированным с Alexa647 (Jackson ImmunoResearch). После трех последних промываний и ресуспендирования клеток в ФБР флуоресценцию немедленно измеряли с помощью проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi), а результаты анализировали с помощью программного обеспечения MACSQuant.

Все гибридные белки V_{HN}-Fc и Fc-V_{HN} индуцировали зависящий от концентрации сдвиг сигнала, подтверждающий связывание с интересующим рецептором. Значение $K_{d \text{ app}}$ V_{HN}-Fc и Fc-V_{HN} рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (фиг. 8-В). Значение $K_{d \text{ app}}$ почти всех V_{HN} было значительно улучшено за счет конъюгации с фрагментом Fc, при этом значение $K_{d \text{ app}}$ составило от 0,44 нМ до 51 нМ для T_fR-связывающих V_{HN}-Fc и Fc-V_{HN}.

Пример IX

Эндоцитоз и транспорт V_{HN} по изобретению на модели ГЭБ *in vitro*.

Мы использовали эндотелиальные клетки микрососудов головного мозга крысы или мыши (ВМЕС) и астроциты крысы или мыши для создания модели совместного культивирования. Этот тип модели ГЭБ *in vitro* используют для оценки пассивного прохождения или активного транспорта многочисленных молекул, особенно фармакологических агентов, через ВМЕС и, следовательно, путем экстраполяции, их способности достигать ткани ЦНС *in vivo*. Различные модели, разработанные на сегодняшний день (бычья, свиная, мышьяная, человеческая), обладают ультраструктурными свойствами, характерными для эндотелия головного мозга, особенно плотными контактами, отсутствием фенестрации, низкой проницаемостью для гидрофильных молекул и высоким электрическим сопротивлением. Более того, эти модели продемонстрировали устойчивую корреляцию с результатами измерений, проведенных на различных молекулах, оцениваемых *in vitro* и *in vivo* на предмет их способности проходить через ГЭБ. На сегодняшний день все полученные данные

показывают, что эти модели ГЭБ *in vitro* имитируют ситуацию *in vivo*, воспроизводя некоторые сложности клеточной среды, существующие *in vivo*, сохраняя при этом преимущества, связанные с экспериментированием с культурами клеток.

Например, модель ГЭБ крысы *in vitro* использует совместное культивирование ВМЕС и астроцитов (Molino et al., 2014, J. Vis. Exp. 88, e51278). Перед культивированием клеток мембранные вкладыши (Corning, Transwell с пористостью 1,0 мкм, для 96-луночных или 12-луночных планшетов) обрабатывали в верхней части коллагеном IV типа и фибронектином, чтобы обеспечить оптимальную адгезию ВМЕС и создать условия базальной пластинки. Первичные культуры смешанных астроцитов были получены из коры головного мозга новорожденных крыс. Вкратце, мозговые оболочки удаляли, а кортикальные части диссоциировали механически, а затем ферментативно в растворе трипсина. Диссоциированные клетки высевали во флаконы для культивирования клеток в среде для глиальных клеток (GCM), содержащей DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, а затем замораживали в жидком азоте для последующего использования. Первичные культуры ВМЕС получали от крыс линии Wistar в возрасте 5-6 недель. Вкратце, кортикальные части диссоциировали механически, а затем ферментативно в растворе коллагеназы/диспазы. Расщепленные ткани разделяли центрифугированием в градиенте плотности в 25% бычьей сывороточном альбумине. Осадок микрососудов высевали в культуральную колбу, предварительно покрытую коллагеном типа IV и фибронектином, в среду для эндотелиальных клеток (ECM), содержащую DMEM/F12 с добавлением 20% сыворотки, полученной из бедной тромбоцитами бычьей плазмы, и 2 нг/мл основного фактора роста фибробластов (bFGF). За пять дней до создания совместной культуры астроциты размораживали и высевали в 12-луночные или 96-луночные планшеты (аблюминальный компартмент). Затем ВМЕС распределяли на верхней поверхности фильтров (люминальный компартмент) в совместной культуре. В этих условиях модели *in vitro* дифференцируются, экспрессируют белки контактов в течение 3 дней и остаются оптимально дифференцированными еще в течение 3 дней.

Связывание/захват на ГЭБ VHH по изобретению, конъюгированных с человеческим Fc-фрагментом антитела IgG1 (VHH-Fc), проверяли на модели крыс *in vitro*, описанной выше (фиг. 9). VHH A-Fc или VHH B-Fc совместно инкубировали с Tf-Alexa647 в течение 2 часов на живых монослоях rВМЕС при 37°C (фиг. 9А). После этой совместной инкубации монослой клеток тщательно промывали и фиксировали 4% ПФА. Клеточный монослой подвергали пермеабиллизации раствором 0,1% тритона X-100. VHH-Fc выявляли с помощью иммуноокрашивания антителом против фрагмента Fc человека.

Затем использовали конфокальную микроскопию для оценки совместной локализации сигнала флуоресценции VHH A-Fc или VHH B-Fc с Tf-A647 (фиг. 9A).

Результаты показывают, что после этой 2-часовой совместной инкубации VHH A-Fc и VHH B-Fc легко подвергались эндоцитозу и почти идеально совместно локализовались с Tf-Alexa647.

Этот анализ совместной локализации различных лигандов TfR (VHH A-Fc, VHH B-Fc и Tf-A647) подтвердил специфичность VHH по изобретению в отношении их рецептора-мишени.

Для транспорта через монослои гВМЕС в аблюминальный компартмент VHH-Fc инкубировали при 10 нМ в люминальном компартменте культуральной системы в течение от 24 часов до 72 часов (фиг. 9-C, 9-D). Перед экспериментом фильтрующие вкладыши, содержащие монослои гВМЕС, помещали в 96-луночные планшеты, содержащие свежий транспортный буфер (75 мкл в люминальном компартменте и 250 мкл в аблюминальном компартменте). Чтобы оценить целостность ГЭБ *in vitro* и отсутствие токсичности для эндотелиальных клеток, VHH-Fc совместно инкубировали с красителем люцифером желтым (LY), небольшой флуоресцентной молекулой, которая не пересекает ГЭБ. Через 24 часа после инкубации вкладыши переносили в другой 96-луночный планшет, содержащий свежий транспортный буфер, еще на 48 часов. В конце транспортировки LY, накопленный в аблюминальном компартменте, определяли количественно с помощью флуоресцентной спектрофотометрии, и результаты выражали как проницаемость эндотелиальной поверхности (или P_e) в 10^{-3} см/мин. Барьер *in vitro* считался «проницаемым» или «открытым», если значение P_e LY превышало $0,6 \times 10^{-3}$ см/мин. Трансэндотелиальное электрическое сопротивление (TEER), измеренное омметром и выраженное в Ом.см², также позволяет измерить целостность ГЭБ *in vitro* во время тестов прохождения через ГЭБ. Пороговое значение качества установлено на >400 Ом.см². Проведенные эксперименты показывают отсутствие токсичности VHH-Fc и отсутствие вредного воздействия на свойства проницаемости ГЭБ (не показано). Количественно определяли содержание Fc-фрагмента VHH-Fc по изобретению на входе (T0), в люминальных компартментах в конце транспортного эксперимента (T72 часа, извлечение продукта) и в аблюминальных компартментах (транспортные интервалы 24 часа и +48 часов) с использованием собственного анти-Fc ИФА-анализа с чувствительностью 0,5-50 фмоль. Единицы поглощения были преобразованы в фемтомоли на вкладыш (площадь поверхности $0,143$ см² для вкладышей 96-луночного планшета).

Наши результаты показывают, что конъюгаты VHH B-Fc и VHH A-Fc демонстрируют более высокий транспорт, чем VHH Z-Fc (отрицательный контроль),

примерно в 10 раз через 24 часа и в 5 раз через 72 часа. Этот транспорт достиг очевидного насыщения между 24 часами и 72 часами, что дополнительно указывает на участие специфического и насыщаемого рецептор-опосредованного процесса (фиг. 9-D).

Пример X

Фармакокинетика и поглощение органами конъюгатов VHH-Fc *in vivo*.

Чтобы оценить потенциал конъюгатов VHH-Fc по изобретению в отношении органов-мишеней, обогащенных интересующими рецепторами *in vivo*, конъюгаты VHH A-Fc, VHH A-Fc-Agly и VHH Z-Fc вводили в хвостовую вену мышей в дозе 5 мг/кг, и проводили перфузию физиологическим раствором в разное время. Были собраны образцы плазмы и головного мозга. Мозг обрабатывали методом истощения капилляров, чтобы изолировать паренхиму мозга от капилляров. Количество VHH-Fc в плазме, паренхиме головного мозга и микрососудах измеряли с помощью собственного анти-Fc ИФА. Результаты представлены в виде концентраций (нМ) или в отношении орган/плазма (фиг. 10).

TfR-связывающие конъюгаты VHH A-Fc и VHH A-Fc-Agly проявляют значительную направленную доставку в мозг через 2 часа после инъекции с концентрациями 0,25 и 0,32 нМ в паренхиме мозга для VHH A-Fc и VHH A-Fc-Agly соответственно, по сравнению с 0,07 нМ для контроля VHH Z-Fc (фиг. 10-B). При изучении отношения паренхима/плазма очевидное преимущество подтверждается, особенно через 24 часа после введения, когда VHH A-Fc-Agly все еще определяется в паренхиме мозга, тогда как в плазме присутствует только 8 нМ (фиг. 10-D). В микрососудах VHH A-Fc и VHH A-Fc-Agly накапливаются значительно больше, чем VHH Z-Fc через 2 часа после инъекции, с концентрациями в 9 и 5 раз выше, соответственно. Более того, концентрация VHH A-Fc в микрососудах все еще в 3 раза выше, чем VHH Z-Fc через 24 часа после инъекции (фиг. 10-C). Эти результаты были подтверждены при рассмотрении отношений микрососуды/плазма (фиг. 10-E). Эти результаты демонстрируют, что VHH, нацеленный на TfR, по настоящему изобретению можно использовать для эффективной доставки или улучшения фармакокинетических свойств агентов, особенно транспортируемых белков.

Пример XI

Разработка и производство терапевтических антител, гибридных с VHH

Анти-TfR VHH A, A1, A5, A6, A7 и A8 по изобретению (без метки) были гибридованы с моноклональным антителом IgG1 13C3 мыши с высокой специфической аффинностью к протофибрильной форме β -амилоидного пептида (WO2009/065054). Для получения гибридных белков 13C3-НС-VHH фрагмент ДНК, кодирующий выбранный

VНН, синтезировали и клонировали в вектор тяжелой цепи (HC) 13С3 для кодирования конъюгата 13С3-НС-VНН, содержащего на своем С-конце выбранную последовательность VНН, гибридованную с аминокислотным остатком С-конца тяжелой цепи антитела. В другой серии экспериментов фрагмент ДНК, кодирующий выбранный VНН, клонировали в вектор легкой цепи (LC) 13С3, чтобы кодировать конъюгат 13С3 LC, содержащий на своем С-конце выбранную последовательность VНН, гибридованную с аминокислотным остатком С-конца легкой цепи антитела.

Гибридные белки получали с использованием системы экспрессии Expi293™ в соответствии с инструкциями производителя (Life Technologies). Через 72 часа после трансфекции надсадочную жидкость собирали и очищали с использованием высокопроизводительных колонок HiTrap® Protein G (GE Healthcare). Очищенные гибридные белки количественно определяли путем измерения поглощения при 280 нм.

Аминокислотная последовательность конъюгата 13С3-НС-VННА представлена как SEQ ID NO: 93:

QVQLQQSGPELVKPGVSVKISCKGSGYTFDYAMHWVKQSHAKSLEWIGVISTKYGKTNYNQKFKGKATM
TVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARGDDGYSWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNMVTL
GCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSSETVTCNVAHPASSTKVDK
KIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQ
TQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTI SKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQM
AKDKVSLTCLMIDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTEFTCSVL
HEGLHNHNTKSLSHSPGGGGMAEVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGTDFSINFIRWYRQAPGKQRE
FVAGFTATGNTNYADSMKGRFTISRDNTKNAVYLLQIDSLKPEDTAVYYCYMLDKWGQGTQVTVSSAAA

Жирным шрифтом выделена последовательность переменной области тяжелой цепи 13С3; подчеркнута последовательность константной области тяжелой цепи 13С3; жирным шрифтом и подчеркиванием выделен линкер Gly; Остатки МА и С-концевой ААА с двойным подчеркиванием являются результатом клонирования и могут быть при необходимости удалены. Остальной частью является VНН.

Аминокислотная последовательность конъюгата 13С3-LC-VННА представлена как SEQ ID NO: 94:

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSGQSLVHSNGNTYLLHWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFSGVDPDRFSGS
GGSDFTLTKISRVEAEDLGVYFCSQNTFVFWTFGGGTKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFL
LNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTTSTSPI
VKSFNRNECSGSGGGGGMAEVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGTDFSINFIRWYRQAPGKQRE FVAGF
TATGNTNYADSMKGRFTISRDNTKNAVYLLQIDSLKPEDTAVYYCYMLDKWGQGTQVTVSSAAA

Жирным шрифтом выделена последовательность переменной каппа легкой цепи 13С3; FGGGTK представляет J-область; LEIKR представляет сайт множественного клонирования; подчеркиванием выделена 13С3 последовательность константной области легкой цепи каппа; жирным шрифтом и подчеркиванием выделен линкер Gly; остатки МА и С-концевые ААА с двойным подчеркиванием являются результатом клонирования и могут быть при необходимости удалены. Остальная часть представляет VНН.

Определение аффинности связывания

Связывающие свойства конъюгатов 13С3 по изобретению в отношении TfR тестировали с помощью проточной цитометрии и определяли кажущуюся аффинность ($K_{d \text{ app}}$). Все эксперименты проводили в тех же условиях, что и описанные в примере VII, с конструкциями 13С3, инкубированными при концентрациях в диапазоне от 15 мкМ до 7 пМ и выявленными с помощью конъюгированного с Alexa647 анти-мышинного антитела.

Все гибридные белки 13С3-НС-VНН индуцировали зависимый от концентрации сдвиг сигнала в линиях клеток, экспрессирующих hTfR и mTfR, подтверждая связывание с рецептором (фиг. 13). Все гибридные белки 13С3 показали одинаковый профиль связывания hTfR, за исключением гибрида VНН А7, который показал немного более низкое значение V_{max} . Все гибридные белки показали разные профили связывания на mTfR, причем гибрид 13С3-НС-VНН А1 показал V_{max} в 2 раза ниже, чем 13С3-НС-VНН А, в то время как гибриды А5 и А8 13С3 показали очень низкое значение V_{max} .

Значение $K_{d \text{ app}}$ для гибридов 13С3 рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (фиг. 13-В). Аффинность к hTfR была одинаковой для всех гибридов с $K_{d \text{ app}}$ около 10-20 нМ. Несмотря на различное значение V_{max} , гибриды VНН А, А1 и А6 13С3 НС показали сходную аффинность от 10 до 20 нМ, в то время как гибриды 13С3-НС-VНН А8 и 13С3-LC-VНН А показали более низкую аффинность 315 нМ и 106 нМ, соответственно.

Пример XII

Поглощение головным мозгом гибридов 13С3-НС-VНН и 13С3-LC-VНН *in vivo*

Для оценки способности VНН по изобретению стимулировать поглощение антител мозгом конъюгаты 13С3-НС-VНН А и 13С3-НС-VНН А1 или не-векторизованный 13С3 вводили в хвостовую вену мышей С57В16 в дозе 35 нмоль/кг. У мышей проводили перфузию физиологическим раствором в разное время. Мозг собирали через 2 часа и 6 часов после инъекции (п/и). Половину мозга мышей обрабатывали для выделения капиллярной сети из паренхимы головного мозга методом истощения капилляров, который заключается в центрифугировании ресуспендированного гомогената половины мозга и извлечении фракции паренхимы на 20% растворе декстрана (Sigma Aldrich). Вторую половину мозга мышей непосредственно обрабатывали (гомогенизировали и лизировали) для общей количественной оценки мозга. Количество конъюгата 13С3-НС-VНН в общем мозге и паренхиме головного мозга измеряли с помощью собственного иммуноанализа с прямым покрытием (Abeta), сертифицированного Meso Scale Discovery (MSD). (КВ <20% и извлечение \pm 30%). Результаты представлены в виде концентраций (нМ) (фиг. 14).

Результаты показывают, что TfR-связывающие конъюгаты 13С3-НС-VНН А и 13С3-НС-VНН А1 продемонстрировали значительное преимущество в захвате мозгом через 2 и 6 часов п/и по сравнению с контрольным не-векторизованным антителом 13С3 (фиг. 14-А). Общие концентрации в головном мозге 13С3-НС-VНН А и 13С3-НС-VНН А1 в 8 и 5 раз выше, чем концентрация не-векторизованного антитела 13С3 через 6 часов п/и, соответственно.

Пересечение ГЭБ 13С3-НС-VНН А и 13С3-НС-VНН А1 было подтверждено тем фактом, что через 6 часов после инъекции концентрации, измеренные в паренхиме мозга, лишенной микрокапиллярной сети, были в 10- и 9-раз выше, чем у не-векторизованного 13С3, соответственно (фиг. 14-В).

Дополнительные исследования поглощения мозгом также подтвердили, что 13С3-НС-VНН А и 13С3-ЛС-VНН А (векторизованная версия легкой цепи) продемонстрировали пересечение ГЭБ в дозе 70 нмоль/кг с накоплением в паренхиме в 6 и 5 раз выше, соответственно, чем для не-векторизованного антитела 13С3 через 4 часа после введения.

Пример XIII

Синтез конъюгатов VНН-миРНК

Анти-GFP миРНК, содержащую химические модификации для высокой устойчивости к нуклеазам, а именно siGFPst1, конъюгировали с меченым VНН А для получения биоконъюгата VНН А-siGFPst1. Та же самая стратегия конъюгации была использована для конъюгации siGFPst1 с нерелевантным VНН Z в качестве отрицательного контроля с той же структурой и размером, что и конъюгат VНН А-siGFPst1, но без способности к таргетингу TfR.

Стратегия конъюгации включает конвергентный синтез с параллельной модификацией: (i) VНН для сайт-специфического введения азидо-линкера; и (ii) siGFPst1 для введения ограниченной азидогруппы, комплементарной азидо функциональной группе. На заключительном этапе оба функционализированных предшественника VНН-азид и алкин-siGFPst1 связывают друг с другом с использованием клик-реакции при отсутствии меди.

Синтез VНН-азида

Сайт-специфическую конъюгацию с VНН выполняли с использованием стратегии лигирования на основе бактериальной транскламиназы (BTG). Фермент BTG катализирует образование изопептидной связи между остатком глутамина, встроенным в последовательность метки, специфически распознаваемой ферментом BTG (а именно, Q-метки), и аминокислотой, функционализированным субстратом. Введенный аминокислотой

функционализованный субстрат представлял собой гетеробифункциональный линкер, содержащий на одном конце амино-фрагмент, который, как мы доказали, является субстратом фермента VTG, а на другом конце - азидный фрагмент для конъюгации с siGFPst1 посредством клик-химии при отсутствии меди.

Протокол конъюгации VTG:

3-азидо-1-пропанамин (20 экв./Глн) растворяли в ФБР (1X) и добавляли к VNH с Q-меткой собственного производства. Затем в смесь вводили VTG (Zedira, Дармштадт, Германия) (0,1 ед./нмоль Глн), проводя реакцию при 37°C в течение ночи. Очистку сырой смеси проводили с помощью хроматографии на упакованной колонке Protino Ni-ida 1000 в соответствии с инструкциями производителя для выделения VNH-азида из избытка исходного материала, а также потенциальных побочных продуктов. Поглощение измеряли при 280 нм для расчета количества очищенной конструкции VNH-азида и, следовательно, выхода конъюгации (в диапазоне 70-80%).

Конечные VNH-азиды были охарактеризованы ЖХ-МС анализом для проверки их идентичности и чистоты.

Синтез алкин-siGFPst1

siGFPst1 был приобретен у Dharmascon с модификацией 3' амина на смысловой цепи (N6-siGFPst1) для обеспечения дальнейшей функционализации с помощью алкинового фрагмента, необходимого для клик-химической конъюгации с VNH-азидом.

Протокол функционализации siGFPst1

N6-siGFPst1 (1 экв.) растворяли в буфере для конъюгации NaB (0,09 M; pH 8,5) для получения конечной концентрации от 0,3 до 0,8 mM. Затем к этому раствору добавляли DBCO-NHS (20 экв., ДМСО). Реакционную смесь перемешивали 2 часа при комнатной температуре. Алкин-siGFPst1 очищали осаждением в холодном абсолютном этаноле. Поглощение определяли при 260 нм для расчета количества очищенной конструкции алкин-siGFPst1 и, таким образом, выхода конъюгации (в диапазоне 40-50%).

Конечный алкин-siGFPst1 был охарактеризован посредством аналитической ВЭЖХ для проверки его идентичности и чистоты.

Синтез VNH-siGFPst1

Предшественники VNH-азид и алкин-siGFPst1 были окончательно конъюгированы с помощью клик-химической реакции при отсутствии меди, с получением конечного конъюгата VNH-siGFPst1.

Протокол конъюгации VNH-siGFPst1:

Алкин-siGFPst1 (2 экв.) растворяли в ФБР (1X) и добавляли к VNH-азиду (1 экв., конечная концентрация в диапазоне 100 мкМ в ФБР (1X)). Реакционную смесь

перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Конечный конъюгат сначала очищали гель-фильтрационной хроматографией на колонке Superdex75, а затем концентрировали, используя фильтр для ультрацентрифугирования Amicon (10K). Поглощение измеряли при 260 нм для расчета количества очищенной конструкции VNH-siGFPst1 и, таким образом, выхода конъюгации (общий выход в диапазоне 30%).

Конечные VNH-siGFPst1 (VNH A-siGFPst1 и VNH Z-siGFPst1) были охарактеризованы с помощью аналитической эксклюзионной ВЭЖХ и электрофореза в агарозном геле для проверки их идентичности и чистоты.

Пример XIV

Активность биоконъюгата VNH-миРНК в отношении сайленсинга генов *in vitro*

Специфическое нацеливание на клетки и продуктивная внутриклеточная доставка терапевтических нуклеиновых кислот, особенно миРНК, олигонуклеотидов остаются серьезной проблемой. Структурные и физико-химические особенности этих молекул, являющихся многозарядными гидрофильными олигомерами, не позволяют им проникать в какие-либо субклеточные компартменты без посторонней помощи. VNH по изобретению использовали для транспортировки малой интерферирующей РНК (миРНК) через клеточные мембраны для доступа к цитозолю.

Сначала оценивали кажущуюся аффинность связывания hTfR ($K_{d \text{ app}}$) биоконъюгатов VNH A-siGFPst1 и VNH B-siGFPst1, как описано в Примере VII (Определение аффинности связывания VNH A1-A19), добавляя концентрации в диапазоне от 2 мкМ до 30 пМ в течение 1 часа при 4°C на тех же клетках CHO-hTfR-GFP. Количественную оценку молекул, связанных с клеточной поверхностью, выполняли с помощью иммуноцитохимии против bHis, и экспериментальные данные были подогнаны с помощью нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism®. Как было показано ранее со свободными VNH A и VNH B, биоконъюгаты VNH A-siGFPst1 и VNH B-siGFPst1 продемонстрировали зависимое от концентрации и насыщаемое связывание с целевым hTfR на клеточной поверхности со значениями $K_{d \text{ app}}$ в том же низком наномолярном диапазоне, что и неконъюгированные VNH A и VNH B (фиг. 15A). С контрольным VNH Z не наблюдалось значительного связывания. Это, в свою очередь, подтвердило, что связывание VNH A и VNH B с миРНК не изменяет их способность специфично и эффективно связываться с hTfR.

Во-вторых, собственную активность сайленсинга биоконъюгата VNH-siGFPst1 оценивали в живых клеточных линиях CHO, стабильно экспрессирующих TfR, гибридный с EGFP (клетки CHO-hTfR-EGFP), путем трансфекции конъюгата при 25 нМ с использованием Dharmafect 1 (Dharmacon) для прямой доставки в цитозоль.

Общее количество GFP в клетках определяли через 72 часа после трансфекции с помощью проточной цитометрии. Результаты демонстрируют, что конъюгат VHN A-siGFPst1 индуцировал примерно 85% снижение уровня белка GFP в том же диапазоне, что и у неконъюгированного siGFPst1 или контрольного конъюгата VHN Z-siGFPst1 (фиг. 15B). Это подтверждает, что связывание либо VHN A, либо Z не мешает мРНК подвергаться нагрузке РНК-индуцированного комплекса сайленсинга и проявлять ее активность сайленсинга. В другой серии экспериментов проводили трансфекцию конъюгата VHN A-siGFPst1 в клетки CHO-hTfR-EGFP в концентрациях от 10 нМ до 1 пМ, и общее количество GFP в клетках определяли через 120 часов после трансфекции с использованием проточной цитометрии. Это привело к зависимому от концентрации снижению уровней белка GFP с IC₅₀ 50,4 пМ и максимальной эффективностью сайленсинга в этих условиях -90,2% (фиг. 15C).

В-третьих, оценивали способность VHN A, конъюгированного с siGFPst1, запускать hTfR-опосредованный эндоцитоз и последующую доставку в цитозоль клеток-мишеней в фармакологических количествах. Биоконъюгаты VHN A-siGFPst1 или контрольный VHN Z-siGFPst1 инкубировали на клетках CHO-hTfR-GFP при 1 мкМ в течение 120 часов при 37°C, чтобы обеспечить свободное поглощение, доставку в цитозоль и сайленсинг гена на уровне транскрипта мРНК и белка. Это привело к значительному примерно -70% снижению уровней белка GFP с TfR-связывающим биоконъюгатом VHN A-siGFPst1, в то время как сайленсинг не наблюдался с контрольным биоконъюгатом VHN Z-siGFPst1 (фиг. 15D). Затем биоконъюгат VHN A-siGFPst1 инкубировали на клетках CHO-hTfR-GFP в концентрациях от 3 мкМ до 10 пМ в течение 120 часов. Это привело к зависимому от концентрации снижению уровней белка GFP с IC₅₀ 2,73 ± 0,23 нМ и максимальной эффективности сайленсинга в этих условиях - 61,6 ± 2,9% (фиг. 15E). Это демонстрирует, что связывание на клеточной поверхности с hTfR и последующий эндоцитоз биоконъюгата VHN A-siGFPst1 обеспечивает его доставку в цитозоль в фармакологических количествах с IC₅₀ в том же наномолярном диапазоне, что и аффинность связывания hTfR биоконъюгата.

В-четвертых, вовлечение hTfR в наблюдаемом эффекте сайленсинга биоконъюгата VHN A-siGFPst1 при свободном поглощении клетками CHO-hTfR-GFP подтверждали в конкурентном анализе. В этом эксперименте VHN A-siGFPst1 инкубировали в течение 120 часов при 37°C при насыщающей концентрации 30 нМ, как определено в предыдущем эксперименте, либо отдельно, либо в присутствии 100-кратного избытка свободных VHN A, B или Z. Результаты показали, что примерно 60% снижение уровней белка GFP было почти полностью отменено в присутствии свободных VHN A или VHN B (уровни белка

GFP поддерживались на уровне 85% и 96% от контрольных уровней, соответственно). Важно отметить, что при использовании избытка нерелевантного VNH Z конкуренции не наблюдалось (фиг. 15F). Это недвусмысленно подтвердило, что эффект сайленсинга биоконъюгата VNH A-siGFPst1 действительно был обусловлен hTfR-опосредованным поглощением клетками и последующей доставкой в цитоплазму клетки.

В-пятых, TfR-опосредованный эффект GFP-сайленсинга биоконъюгата VNH A-siGFPst1 оценивали с использованием анализа с метаболическим вытеснением метки. Клетки CHO-hTfR-GFP подвергали действию VNH A-siGFPst1 в концентрациях от 300 нМ до 1 пМ в течение короткого периода времени (6 часов) с последующей процедурой вытеснения в безлигандной среде до общей продолжительности 120 часов. Этот эксперимент позволил оценить вклад раннего клеточного поглощения в эффект сайленсинга, который ранее наблюдался при непрерывной инкубации в течение 120 часов. Как наблюдали при непрерывной инкубации, биоконъюгат VNH A-siGFPst1 снова индуцировал зависимое от концентрации снижение уровней белка GFP с аналогичным IC₅₀ 1,24 нМ и максимальной эффективностью сайленсинга -54,2% (фиг. 15G). Этот результат позволяет предположить, что большая часть эффекта, ранее наблюдавшегося при непрерывной инкубации в течение 120 часов, была обусловлена продуктивным TfR-опосредованным поглощением в течение первых 6 часов. Это открытие представляет особый интерес, поскольку *in vivo* фармакокинетический профиль таких биоконъюгатов в плазме обычно допускает воздействие на ткань на терапевтических уровнях в течение всего нескольких часов при введении путем внутривенной или подкожной болюсной инъекции. Следовательно, VNH, нацеленный на TfR, описанный в настоящей заявке, представляет собой жизнеспособный инструмент для целевого и эффективного сайленсинга гена *in vivo*.

Наконец, способность VNH B запускать hTfR-опосредованный эндоцитоз и последующий сайленсинг генов оценивали путем инкубации биоконъюгата VNH B-siGFPst1 на клетках CHO-hTfR-GFP при 30 нМ в течение 120 часов. Результат показал примерно -60% снижение уровней GFP, аналогичное тому, которое было получено с биоконъюгатом VNH A-siGFPst1, подтверждая, что эти VNH демонстрируют сходный потенциал нацеливания на TfR и внутриклеточной доставки (фиг. 15H).

Насколько нам известно, опосредованное рецептором поглощение гепатоцитами через асиалогликопротеиновый рецептор (ASGPR) с использованием GalNAc с тремя ответвлениями в качестве нацеливающего лиганда является единственной системой лиганд/рецептор, способной запускать специфический и эффективный сайленсинг гена при наномолярных концентрациях. Однако использование этой системы для

терапевтических применений *in vivo* с терапевтическими нуклеиновыми кислотами ограничено печеночными мишенями, поскольку ASGPR экспрессируется *in vivo* исключительно в гепатоцитах. Следовательно, настоящее изобретение обеспечивает новую систему лиганд/рецептор для нацеливания и внутрицитоплазматической доставки в наномолярных концентрациях терапевтических нуклеиновых кислот, таких как мРНК, во внепеченочные органы и ткани, экспрессирующие TfR.

Пример XV

Синтез конъюгатов VNH-NODAGA

Конструкция VNH A с Q-меткой

В данном примере фрагмент ДНК, кодирующий VNH A с Ала-линкером, Гис-меткой, Gly-линкером и Q-меткой (последовательностью AAA-Гис-метка-GGG-LQR), введенными на его С-конце, был синтезирован и клонирован в вектор pHEN1.

Препарат VNH A-азид на основе BTG:

3-азидо-1-пропанамин (20 экв. / Глн) растворяли в ФБР (1X) и добавляли к VNH A, меченному LQR, собственного производства. В смесь вводили BTG (Zedira, Дармштадт, Германия) (0,1 ед./нмоль Глн). Затем реакционную смесь оставляли для реакции при 37°C в течение ночи. Очистку неочищенной смеси проводили с помощью хроматографии на колонке с набивкой Protino Ni-ida 1000 в соответствии с инструкциями производителя для выделения VNH A-азиды из избытка исходного материала, а также потенциальных побочных продуктов. Поглощение измеряли при 280 нм для расчета количества очищенной конструкции VNH A-азиды и, следовательно, выхода конъюгации (в диапазоне 70-80%). Конечный VNH A-азид охарактеризовали с помощью ЖХ-МС анализа для проверки его идентичности и чистоты.

Реакция клик-химии для конъюгации VNH A-азиды с коммерческим алкин-NODAGA.

Проводили реакцию VNH A-азиды (1 экв.) с гетеробифункциональным NODAGA-BCN (5 экв.) (Chematech, Дижон, Франция) в ФБР при комнатной температуре. Мониторинг реакции осуществляли посредством ЖХ-МС. После завершения реакции конечный конъюгат очищали хроматографией на упакованной колонке Protino Ni-ida 1000 в соответствии с инструкциями производителя для выделения VNH A-азиды из избытка исходного материала, а также потенциальных побочных продуктов. Поглощение определяли при 280 нм для расчета количества очищенной конструкции VNH A-NODAGA и, следовательно, выхода конъюгации (в диапазоне 50-60%). Конечная конструкция VNH A-NODAGA была охарактеризована ЖХ-МС анализом для проверки ее идентичности и чистоты.

Пример XVI

ПЭТ-визуализация биоконъюгата VNH-68Ga на мышинной модели подкожного трансплантата опухоли глиобластомы

Глиобластома является наиболее распространенной первичной злокачественной опухолью головного мозга, а клеточная линия первичной глиобластомы человека U87, как известно, экспрессирует высокие уровни TfR. Для оценки нацеливания на глиобластому VNH по изобретению меченный радиоактивным изотопом VNH A-NODAGA биоконъюгат внутривенно вводили мышам, у которых ранее имплантировали клетки глиобластомы (модель ксенотрансплантата), и выполняли визуализацию с помощью ПЭТ-сканирования.

Радиомечение VNH A-NODAGA и проверка аффинности связывания

Сначала VNH A-NODAGA метили радиоактивной меткой с использованием хлорида 68Ga. Галлий был получен в форме 68Ga³⁺ с использованием промышленного генератора 68Ge/68Ga на основе TiO₂ (Обнинск). Реакцию радиоактивного мечения проводили путем взаимодействия 60 мкг VNH A-NODAGA с 74–148 МБк (2–4 мКи) 68Ga в 400 мкл буфера ацетата аммония (1M, pH 6) при 25°C в течение 10 минут. Полученная радиохимическая чистота (RPC) VNH A-68Ga составляла >95%.

После радиоактивного мечения кажущуюся аффинность связывания hTfR (K_d app) биоконъюгатов VNH A-NODAGA и VNH A-68Ga оценивали, как описано в Примере VII (Определение аффинности связывания VNH A1-19), добавляя концентрации в диапазоне от 2 мкМ до 30 пМ в течение 1 часа при 4°C на тех же клетках CHO-hTfR-GFP. Количественную оценку биоконъюгатов VNH A, связанных с клеточной поверхностью, проводили анти-6Гис-иммуноцитохимическим методом, и экспериментальные данные согласовывали с нелинейной регрессией с использованием программного обеспечения GraphPad Prism®. Биоконъюгаты VNH A-NODAGA и VNH A-68Ga продемонстрировали зависящее от концентрации и насыщаемое связывание с целевым рецептором hTfR на клеточной поверхности со значениями K_d app в том же низком наномолярном диапазоне, что и неконъюгированный VNH A (фиг. 16A). Не наблюдалось значительного связывания с контрольным VNH Z. Это подтвердило, что связывание VNH A с лигандом NODAGA и протокол радиоактивного мечения не изменил его способность к специфическому связыванию с hTfR.

ПЭТ-сканирование

Исследования на животных проводили в соответствии с протоколами, утвержденными Комитетом по этике Экс-Марсель (Comity 14). Четырехнедельные самки бестимусных мышей BALB/c были получены от Charles River Inc. Мышам (n = 6)

подкожно имплантировали между плечами клетки U87-MG (2×10^6) в 100 мкл полной среды, содержащей 50% матригеля (Corning). На 28 день после имплантации (когда опухоли достигли объема 300-700 мм³) животным вводили внутривенную однократную болюсную дозу 5 ± 1 МБк VNH A-68Ga. После введения биораспределение в ксенотрансплантате рака глиобластомы и других тканях оценивали с помощью ПЭТ-визуализации.

Сканы ПЭТ/КТ были получены в течение 2 часов для 3 мышей и через 2 часа после инъекции (п/и) для 3 других мышей. Исследования ПЭТ и ПЭТ/КТ проводили на сканере моделей грызунов микро-ПЭТ/микро-КТ (nanoPET/CT®, Mediso). Анестезию обеспечивали 5% изофлураном и поддерживали на уровне 1,5%. Чтобы улучшить качество изображения, для каждого статического сканирования излучения ПЭТ (энергетическое окно, 400-600 кэВ; время: 20 минут для одного поля зрения) было получено 20 миллионов совпадений на мыш. Для двойной модальности ПЭТ/КТ были получены изображения КТ (35 кВп, время экспозиции 350 нс и среднее увеличение), и анатомическая регистрация, а также ослабление коррекции были применены к соответствующим сканированным ПЭТ.

Визуализирующие изображения животных, которым вводили VNH A-68Ga, показали значительное накопление в месте опухоли (фиг. 16В, 1,46% ID/g) и хорошее соотношение опухоль/мышцы (4,0). Таким образом, эксперименты показали четкую и избирательную визуализацию и мечение рака глиобластомы с помощью VNH A-68Ga на 28 день, что согласуется с известными высокими уровнями экспрессии TfR.

Список последовательностей

sdAb	Аминокислотная последовательность	CDR1	CDR2	CDR3
A	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGTD <u>FSINFIRWYRQAPGKQREFVAGFTATGNT</u> NYADSMKGRFTISRDNKNAVYLQIDSLK PEDTAVYYCYMLDKWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS) _n SEQ 4	GTDFSINF SEQ 1	FTATGNT SEQ 2	YMLDK SEQ 3
B	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGEIF <u>SINFMRWYRQAPGKQREWVAGFTRDGST</u> NYPDSAKGRFTISRDNKNTVYLQIDSLK PEDTAVYYCYMLDTWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS) _n SEQ8	GEIFSINF SEQ5	FTRDGST SEQ6	YMLDT SEQ7
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGGPI <u>EQYPMGWFRRAPGKERELVASISRSGDGT</u> YYAISSVKGRFTISRDNKNAVFLQMNSL KPDDTAVYYCGAGINPTKIWGQGTQVTV SS(AAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS) _n SEQ12	GGPIEQY P SEQ9	ISRSGDGT Y SEQ10	GAGINP TKI SEQ11
D	EVQLVESGGGEVQPGGSLKLSCVASGTD <u>SINFVRWYRQRPQKQREWVAGFTANGDT</u> NYPDSMKGRFTISRDNKNTVYLQINSLK SEDTAVYYCYMLDNWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS) _n SEQ16	GTDFSINF SEQ13	FTANGDT SEQ14	YMLDN SEQ15
A1	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGAD <u>FSINFIRWYRQAPGKQREFVAGFTATGNT</u> NYADSMKGRFTISRDNKNAVYLQIDSLK PEDTAVYYCYMLDKWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS) _n SEQ18	GADFSIN F SEQ17	FTATGNT SEQ2	YMLDK SEQ3
A2	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGIA <u>FSINFIRWYRQAPGKQREFVAGFTATGNT</u> NYADSMKGRFTISRDNKNAVYLQIDSLK PEDTAVYYCYMLDKWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS) _n SEQ20	GTAFSINF SEQ19	FTATGNT SEQ2	YMLDK SEQ3
A3	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGTD <u>FSINFIRWYRQAPGKQREFVAGFTAAGNT</u> NYADSMKGRFTISRDNKNAVYLQIDSLK PEDTAVYYCYMLDKWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS) _n SEQ22	GTDFSINF SEQ1	FTAAGNT SEQ21	YMLDK SEQ3

A4	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGTD FSINFIRWYRQAPGKQREFVAGFTATGAT NYADSMKGRFTISRDN TKNA VYLQIDSLK PEDIAVYYCYMLDKWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHHGS); SEQ24	GTDFSINF SEQ1	FTATGAT SEQ23	YMLDK SEQ3
A5	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGTD FSINFIRWYRQAPGKQREFVAGFTATGNT NYADSMKGRFTISRDN TKNA VYLQIDSLK PEDIAVYYCAMLDKWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHHGS); SEQ26	GTDFSINF SEQ1	FTATGNT SEQ2	AMLDK SEQ25
A6	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGTD FSINFIRWYRQAPGKQREFVAGFTATGNT NYADSMKGRFTISRDN TKNA VYLQIDSLK PEDIAVYYCYALDKWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHHGS); SEQ28	GTDFSINF SEQ1	FTATGNT SEQ2	YALDK SEQ27
A7	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGTD FSINFIRWYRQAPGKQREFVAGFTATGNT NYADSMKGRFTISRDN TKNA VYLQIDSLK PEDIAVYYCYMADKWGQGTQVTVSS(A AAEQKLISEEDLNGAAHHHHHHHGS); SEQ30	GTDFSINF SEQ1	FTATGNT SEQ2	YMADK SEQ29
A8	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGTD FSINFIRWYRQAPGKQREFVAGFTATGNT NYADSMKGRFTISRDN TKNA VYLQIDSLK PEDIAVYYCYMLAKWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHHGS); SEQ32	GTDFSINF SEQ1	FTATGNT SEQ2	YMLAK SEQ31
A9	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGTD FSINFIRWYRQAPGKQREFVAGFTATGNT NYADSMKGRFTISRDN TKNA VYLQIDSLK PEDIAVYYCYMLDAWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHHGS); SEQ34	GTDFSINF SEQ1	FTATGNT SEQ2	YMLDA SEQ33
A10	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGTD FSLNFIRWYRQAPGKQREFVAGFTATGNT NYADSMKGRFTISRDN TKNA VYLQIDSLK PEDIAVYYCYMLDKWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHHGS)x SEQ68	GTDFSLN F SEQ67	FTATGNT SEQ2	YMLDK SEQ3
A11	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGID FSIN YIRWYRQAPGKQREFVAGFTATGNT NYADSMKGRFTISRDN TKNA VYLQIDSLK PEDIAVYYCYMLDKWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHHGS)x SEQ70	GTDFSIN Y SEQ69	FTATGNT SEQ2	YMLDK SEQ3
A12	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGTD FSINFIRWYRQAPGKQREFVAGITATGNT NYADSMKGRFTISRDN TKNA VYLQIDSLK PEDIAVYYCYMLDKWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHHGS)x SEQ72	GTDFSINF SEQ1	ITATGNT SEQ71	YMLDK SEQ3
A13	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGTD FSINFIRWYRQAPGKQREFVAGFSAITGNT NYADSMKGRFTISRDN TKNA VYLQIDSLK PEDIAVYYCYMLDKWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHHGS)x SEQ74	GTDFSINF SEQ1	FSAITGNT SEQ73	YMLDK SEQ3

A14	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGID <u>FSIN</u> FIRWYRQAPGKQREFVAG <u>F</u> TATGNS NYADSMKGRFTISRDN TKNA VYLQIDSLK PEDTAVYYCYMLDKWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS)x SEQ76	GTDFSINF SEQ1	FTATGNS SEQ75	YMLDK SEQ3
A15	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGID <u>FSIN</u> FIRWYRQAPGKQREFVAG <u>F</u> TATGNT NYADSMKGRFTISRDN TKNA VYLQIDSLK PEDTAVYYCFMLDKWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS)x SEQ78	GTDFSINF SEQ1	FTATGNT SEQ2	FMLDK SEQ77
A16	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGID <u>FSIN</u> FIRWYRQAPGKQREFVAG <u>F</u> TATGNT NYADSMKGRFTISRDN TKNA VYLQIDSLK PEDTAVYYCYILDKWGQGTQVTVSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS)x SEQ80	GTDFSINF SEQ1	FTATGNT SEQ2	YILDK SEQ79
A17	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGID <u>FSIN</u> FIRWYRQAPGKQREFVAG <u>F</u> TATGNT NYADSMKGRFTISRDN TKNA VYLQIDSLK PEDTAVYYCYMIDK WGQGTQVT VSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS)x SEQ82	GTDFSINF SEQ1	FTATGNT SEQ2	YMIDK SEQ81
A18	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGID <u>FSIN</u> FIRWYRQAPGKQREFVAG <u>F</u> TATGNT NYADSMKGRFTISRDN TKNA VYLQIDSLK PEDTAVYYCYMVDK WGQGTQVT VSS(A AAEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS)x SEQ84	GTDFSINF SEQ1	FTATGNT SEQ2	YMVDK SEQ83
A19	EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCVASGID <u>FSIN</u> FIRWYRQAPGKQREFVAG <u>F</u> TATGNT NYADSMKGRFTISRDN TKNA VYLQIDSLK PEDTAVYYCYMLEK WGQGTQVT VSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS)x SEQ86	GTDFSINF SEQ1	FTATGNT SEQ2	YMLEK SEQ85
A20	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDF <u>SIN</u> FMSWVRQAPGKGLEWVAG <u>F</u> TATGNT NYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCYMLDKWGQGTQVT VSS(A AAEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS)x SEQ87	GTDFSINF SEQ1	FTATGNT SEQ2	YMLDK SEQ3
A21	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDF <u>SIN</u> FIRWVRQAPGKQREFVAG <u>F</u> TATGNTN YADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRP EDTAVYYCYMLDKWGQGTQVT VSS(AA AEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS)x SEQ88	GTDFSINF SEQ1	FTATGNT SEQ2	YMLDK SEQ3
A22	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDF <u>SIN</u> FMSWVRQAPGKGLEWVAG <u>F</u> TATGNT NYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCYMLDKWGQGTQVT VSS(A AAEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS)x SEQ89	GTDFSINF SEQ1	FTATGNT SEQ2	YMLDK SEQ3
A23	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDF <u>SIN</u> FMSWVRQAPGKQREFVAG <u>F</u> TATGNT NYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCYMLDKWGQGTQVT VSS(A AAEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS)x SEQ90	GTDFSINF SEQ1	FTATGNT SEQ2	YMLDK SEQ3
A24	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDF <u>SIN</u> FIRWVRQAPGKGLEWVAG <u>F</u> TATGNT NYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCYMLDKWGQGTQVT VSS(A AAEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS)x SEQ91	GTDFSINF SEQ1	FTATGNT SEQ2	YMLDK SEQ3
A25	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGIDF <u>SIN</u> FIHWVRQAPGKGLEWVAG <u>F</u> TATGNT NYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCYMLDKWGQGTQVT VSS(A AAEQKLISEEDLNGAAHHHHHHGS)x SEQ92	GTDFSINF SEQ1	FTATGNT SEQ2	YMLDK SEQ3

sdAb	SEQ ID	Нуклеотидные последовательности (включая необязательные метки)
A	52	GAGGTGcAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTAAAACTCTC CTGCGTAGCCTCGGGAACGGACTTCAGTATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGCGAGTTCGTGCGAGGATTTACTGCGACTGGTAAACACAAACTATGCAGACTCC ATGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTACCGTCTCCTCAGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A1	53	GAGGTGcAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTAAAACTCTC CTGCGTAGCCTCGGGAACGGACTTCAGTATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGCGAGTTCGTGCGAGGATTTACTGCGACTGGTAAACACAAACTATGCAGACTCC ATGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTACCGTCTCCTCAGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A2	54	GAGGTGcAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTAAAACTCTC CTGCGTAGCCTCGGGAACGGCGTTTCAGTATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGCGAGTTCGTGCGAGGATTTACTGCGACTGGTAAACACAAACTATGCAGACTCC ATGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTACCGTCTCCTCAGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A3	55	GAGGTGcAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTAAAACTCTC CTGCGTAGCCTCGGGAACGGACTTCAGTATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGCGAGTTCGTGCGAGGATTTACTGCGGGGGTAAACACAAACTATGCAGACTCC ATGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTACCGTCTCCTCAGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A4	56	GAGGTGcAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTAAAACTCTC CTGCGTAGCCTCGGGAACGGACTTCAGTATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGCGAGTTCGTGCGAGGATTTACTGCGACTGGTGCAGACAAACTATGCAGACTCC ATGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTACCGTCTCCTCAGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A5	57	GAGGTGcAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTAAAACTCTC CTGCGTAGCCTCGGGAACGGACTTCAGTATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGCGAGTTCGTGCGAGGATTTACTGCGACTGGTAAACACAAACTATGCAGACTCC ATGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCGCGATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTACCGTCTCCTCAGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A6	58	GAGGTGcAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTAAAACTCTC CTGCGTAGCCTCGGGAACGGACTTCAGTATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGCGAGTTCGTGCGAGGATTTACTGCGACTGGTAAACACAAACTATGCAGACTCC ATGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATGCGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTACCGTCTCCTCAGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG

A7	59	GAGGTGcAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTAAAACCTCTC CTGCGTAGCCTCGGGAACGGACTTCAGTATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGCGAGTTTCGTGCGAGGATTTACTGCGACTGGTAACACAAACTATGCAGACTCC ATGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGGCGGACAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A8	60	GAGGTGcAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTAAAACCTCTC CTGCGTAGCCTCGGGAACGGACTTCAGTATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGCGAGTTTCGTGCGAGGATTTACTGCGACTGGTAACACAAACTATGCAGACTCC ATGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGCGAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A9	61	GAGGTGcAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTAAAACCTCTC CTGCGTAGCCTCGGGAACGGACTTCAGTATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGCGAGTTTCGTGCGAGGATTTACTGCGACTGGTAACACAAACTATGCAGACTCC ATGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACGCGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
B	62	GAgGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGagGCGTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTC CTGTGCAGCCTCTGGAGAGATCTTCAGTATCAATTTTATGCGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGCGAGTGGGTGCGAGGTTTACTAGGGATGGAAGCACAAACTATCCAGACTCC GCGAAGGGCCGATTACCATCTCTAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTTATATGTTGGACACTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACTGTCTCCTCAGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
C	63	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGTCTCTGAGACTCTC CTGTACAGCCTCTGGAGGCCCATCGAGCAGTATCCCATGGGCTGGTTCGCGCCGGGCCCCAG GGAAGCAGCGCGAGTGGGTGCGAGGATTTACTGCGAATGGTGATACAAACTATCCAGACTCC ATGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCaAGAATACGGTGTATCTACAGATAAA CAGCCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTGTATTATTGCTATATGTTAgATAATTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG ATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
D	64	GAGGTGCAGCTGGTGGaGTCTGGGGGagCGAGGTGCAGCCTGgGGGGTCTCTGAAACTCTC CTGTGTAGCCTCTGGAACCGACTTCAGTATCAATTTTGTGCGCTGGTACCGTCAGCGTCCAG GGAAGCAGCGCGAGTGGGTGCGAGGATTTACTGCGAATGGTGATACAAACTATCCAGACTCC ATGAAGGGGCGATTACCATTTCCAGAGACAACGCCaAGAATACGGTGTATCTACAGATAAA CAGCCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTGTATTATTGCTATATGTTAgATAATTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A10	95	GagGTGCAGCTGGTGGagtCTGGGGgagGCGTGGTGCAGCctGGGGGGTCTCtAAAACCTCTC CTGCGtAGCCTCGGGAACGGACTTCagtctgAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGCGAGTTTCGTGCGAGGATTTACTGCGACTGgTAACACAAACTATGCAGACTCC AtgAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG

A11	96	GagGTGCAGCTGGTGGagtCTGGGGgaGgCGTGGTGCAGCctGGGGGTCTCtAAAACtCTC CTGCgtAGCCTCGGGAACGGACTTCagtATCAAttacATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGGAGTTTCGTCGCAGGATTTACTGCGACTGgTAACACAAACTATGCAGACTCC AtgAAGGGCGGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCAGAAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A12	97	GagGTGCAGCTGGTGGagtCTGGGGgaGgCGTGGTGCAGCctGGGGGTCTCtAAAACtCTC CTGCgtAGCCTCGGGAACGGACTTCagtATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGGAGTTTCGTCGCAGGAATTACTGCGACTGgTAACACAAACTATGCAGACTCC AtgAAGGGCGGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCAGAAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A13	98	GagGTGCAGCTGGTGGagtCTGGGGgaGgCGTGGTGCAGCctGGGGGTCTCtAAAACtCTC CTGCgtAGCCTCGGGAACGGACTTCagtATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGGAGTTTCGTCGCAGGATTTTACGCGACTGgTAACACAAACTATGCAGACTCC AtgAAGGGCGGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCAGAAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A14	99	GagGTGCAGCTGGTGGagtCTGGGGgaGgCGTGGTGCAGCctGGGGGTCTCtAAAACtCTC CTGCgtAGCCTCGGGAACGGACTTCagtATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGGAGTTTCGTCGCAGGATTTACTGCGACTGgTAACACAAACTATGCAGACTCC AtgAAGGGCGGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCAGAAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A15	100	GagGTGCAGCTGGTGGagtCTGGGGgaGgCGTGGTGCAGCctGGGGGTCTCtAAAACtCTC CTGCgtAGCCTCGGGAACGGACTTCagtATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGGAGTTTCGTCGCAGGATTTACTGCGACTGgTAACACAAACTATGCAGACTCC AtgAAGGGCGGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTTTATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCAGAAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A16	101	GagGTGCAGCTGGTGGagtCTGGGGgaGgCGTGGTGCAGCctGGGGGTCTCtAAAACtCTC CTGCgtAGCCTCGGGAACGGACTTCagtATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGGAGTTTCGTCGCAGGATTTACTGCGACTGgTAACACAAACTATGCAGACTCC AtgAAGGGCGGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCAGAAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A17	102	GagGTGCAGCTGGTGGagtCTGGGGgaGgCGTGGTGCAGCctGGGGGTCTCtAAAACtCTC CTGCgtAGCCTCGGGAACGGACTTCagtATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGGAGTTTCGTCGCAGGATTTACTGCGACTGgTAACACAAACTATGCAGACTCC AtgAAGGGCGGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGATTGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCAGAAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG

A18	103	GagGTGCAGCTGGTGGagtCTGGGGgaGgCGTGGTGCAGCctGGGGGTCTCtAAAACTCTC CTGCGtAGCCTCGGGAACGGACTTCagtATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGCGAGTTTCGTCCGAGGATTTACTGCGACTGgTAAACACAAACTATGCAGACTCC AtgAAGGGGCGATTCACCATCTCCAGAGACAACCCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCCGAGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A19	104	GagGTGCAGCTGGTGGagtCTGGGGgaGgCGTGGTGCAGCctGGGGGTCTCtAAAACTCTC CTGCGtAGCCTCGGGAACGGACTTCagtATCAATTTTATACGCTGGTACCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGCGAGTTTCGTCCGAGGATTTACTGCGACTGgTAAACACAAACTATGCAGACTCC AtgAAGGGGCGATTCACCATCTCCAGAGACAACCCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATAGA CAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGAAAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCCGAGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A20	105	GAGGTGcAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGGGTCTCTACGTCTCTC CTGCGCAGCCTCGGGAACGGACTTCAGTATCAATTTTATAGCTGGGTTCCGCCAGGCTCCAG GGAAGGCTCTGGAGTGGTTCGCAGGATTTACTGCGACTGGTAAACACAAACTATGCAGACTCC GTTAAGGGGCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCAAAGAACACCCTGTATCTGCAAATGAA TAGCCTGCGTCTCCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCCGAGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A21	106	GAGGTGcAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGGGTCTCTACGTCTCTC CTGCGCAGCCTCGGGAACGGACTTCAGTATCAATTTTATACGCTGGGTTCCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGCGAGTTTCGTCCGAGGATTTACTGCGACTGGTAAACACAAACTATGCAGACTCC GTTAAGGGGCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCAAAGAACACCCTGTATCTGCAAATGAA TAGCCTGCGTCTCCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCCGAGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A22	107	GAGGTGcAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGGGTCTCTACGTCTCTC CTGCGCAGCCTCGGGAACGGACTTCAGTATCAATTTTATGCAATGGGTTCCGCCAGGCTCCAG GGAAGGCTCTGGAGTGGTTCGCAGGATTTACTGCGACTGGTAAACACAAACTATGCAGACTCC GTTAAGGGGCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCAAAGAACACCCTGTATCTGCAAATGAA TAGCCTGCGTCTCCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCCGAGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A23	108	GAGGTGcAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGGGTCTCTACGTCTCTC CTGCGCAGCCTCGGGAACGGACTTCAGTATCAATTTTATAGCTGGGTTCCGCCAGGCTCCAG GGAAGCAGCGCGAGTTTCGTCCGAGGATTTACTGCGACTGGTAAACACAAACTATGCAGACTCC GTTAAGGGGCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCAAAGAACACCCTGTATCTGCAAATGAA TAGCCTGCGTCTCCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCCGAGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A24	109	GAGGTGcAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGGGTCTCTACGTCTCTC CTGCGCAGCCTCGGGAACGGACTTCAGTATCAATTTTATACGCTGGGTTCCGCCAGGCTCCAG GGAAGGCTCTGGAGTGGTTCGCAGGATTTACTGCGACTGGTAAACACAAACTATGCAGACTCC GTTAAGGGGCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCAAAGAACACCCTGTATCTGCAAATGAA TAGCCTGCGTCTCCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCCGAGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG
A25	110	GAGGTGcAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGGGTCTCTACGTCTCTC CTGCGCAGCCTCGGGAACGGACTTCAGTATCAATTTTATACATGGGTTCCGCCAGGCTCCAG GGAAGGCTCTGGAGTGGTTCGCAGGATTTACTGCGACTGGTAAACACAAACTATGCAGACTCC GTTAAGGGGCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCAAAGAACACCCTGTATCTGCAAATGAA TAGCCTGCGTCTCCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGCTATATGTTGGACAAGTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCCGAGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATGGGGCCGCACATCACCACCATCACCATGGGAGCTAG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула VHH формулы FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, где указанная молекула VHH связывает как человеческий TfR, так и TfR животных, не являющихся человеком, с аффинностью (Kd), составляющей от 0,1 нМ до 10 мкМ.

2. Молекула VHH по п. 1, где указанный VHH способен преодолевать гематоэнцефалический барьер.

3. Молекула VHH по пп. 1 или 2, где связывание указанной молекулы с человеческим TfR не конкурирует со связыванием трансферрина.

4. Молекула VHH по любому из пп. 1-3, которая связывает TfR1 как человека, так и грызунов.

5. Молекула VHH по п. 1, которая содержит:

- последовательность CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 19, 67 и 69, и/или

- последовательность CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 21, 23, 71, 73 и 75, и/или

- последовательность CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15, 25, 27, 29, 31, 33, 77, 79, 81, 83 и 85.

6. Молекула VHH по п. 1, которая содержит SEQ ID NO: 1, 2 и 3; или SEQ ID NO: 5, 6 и 7; или SEQ ID NO: 9, 10 и 11; или SEQ ID NO: 13, 14 и 15; SEQ ID NO: 17, 2 и 3; или SEQ ID NO: 19, 2 и 3; или SEQ ID NO: 1, 21 и 3; или SEQ ID NO: 1, 23 и 3; или SEQ ID NO: 1, 2 и 25; или SEQ ID NO: 1, 2 и 27; или SEQ ID NO: 1, 2 и 29; или SEQ ID NO: 1, 2 и 31; или SEQ ID NO: 1, 2 и 33.

7. Молекула VHH по п. 1, которая содержит SEQ ID NO: 67, 2 и 3; или SEQ ID NO: 69, 2 и 3; или SEQ ID NO: 1, 71 и 3; или SEQ ID NO: 1, 73 и 3; или SEQ ID NO: 1, 75 и 3; или SEQ ID NO: 1, 2 и 77; или SEQ ID NO: 1, 2 и 79; или SEQ ID NO: 1, 2 и 81; или SEQ ID NO: 1, 2 и 83; или SEQ ID NO: 1, 2 и 85.

8. Молекула VHH по любому из пп. 1-7, которая является гуманизированной.

9. Молекула VHH по пп. 5 или 6, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 и 34, или состоит из нее, где x равен 0 или 1.

10. Молекула VHH по п. 7, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 87, 88, 89, 90, 91 и 92, или состоит из нее, где x равен 0 или 1.

11. Молекула VHH по пп. 9 или 10, где x равен 0.

12. Молекула VHH по любому из предыдущих пунктов, которая дополнительно

содержит Q-метку последовательности LQR.

13. Молекула VHH по любому из предыдущих пунктов, которая дополнительно содержит Gly-линкер.

14. Молекула VHH по п. 1, которая конкурентно ингибирует связывание с человеческим и не-человеческим TfR из VHH по любому из пп. 6-10.

15. Молекула VHH по любому из предыдущих пунктов, которая связывается с человеческим рецептором TfR1 с аффинностью (K_d) в пределах от 1 нМ до 1 мкМ.

16. Нуклеиновая кислота, кодирующая VHH по любому из пп. 1-15.

17. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по пп. 16 или 27, предпочтительно функционально связанную с промотором.

18. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 16 или п. 27, или вектор по п. 17.

19. Молекула VHH по любому из пп. 1-15, которая конъюгирована по меньшей мере с одной молекулой.

20. Химерный агент, содержащий один или несколько VHH по любому из пп. 1-15, конъюгированных по меньшей мере с одной молекулой или каркасом.

21. Химерный агент по п. 20, где по меньшей мере одна молекула представляет собой активное соединение, предпочтительно терапевтический, диагностический или визуализирующий агент.

22. Химерный агент по п. 20, где по меньшей мере одна молекула представляет собой вирус или вирусоподобную частицу.

23. Химерный агент по пп. 20 или 21, где по меньшей мере одна молекула представляет собой стабилизирующую группу.

24. Химерный агент по любому из пп. 20-23, который содержит VHH, стабилизирующую группу и активное соединение в любом порядке.

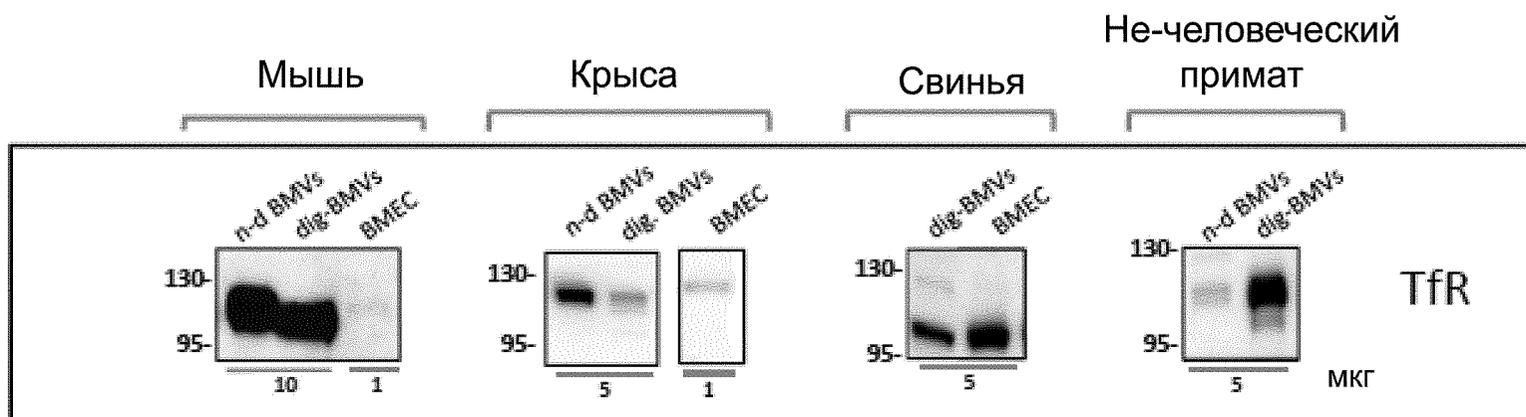
25. Фармацевтическая композиция, содержащая химерный агент по пп. 21 или 22.

26. Диагностическая композиция, содержащая химерный агент по п. 21.

27. Нуклеиновая кислота, кодирующая химерный агент по п. 20, где молекула содержит аминокислотную последовательность.

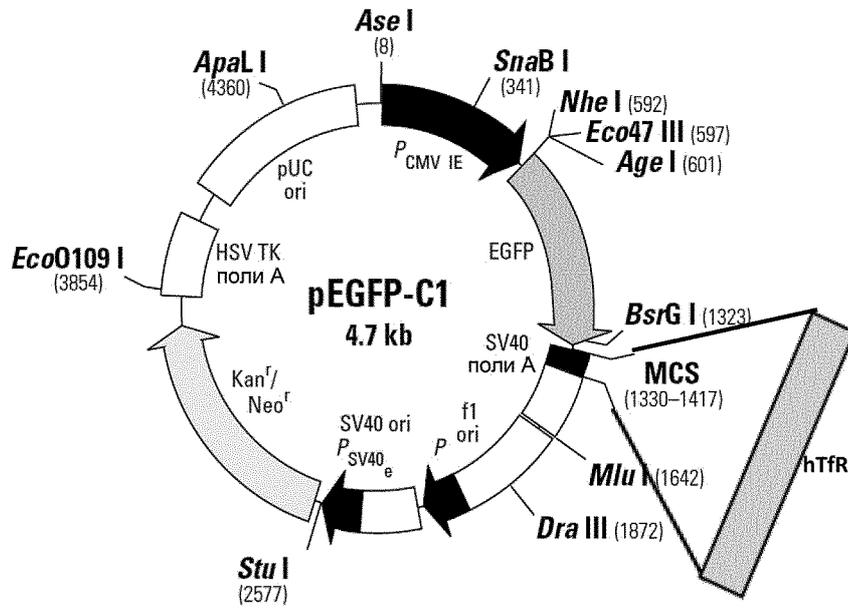
28. Способ получения VHH или его конъюгата, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 18 в условиях, обеспечивающих экспрессию нуклеиновой кислоты.

29. Способ получения химерного агента по п. 20, включающий конъюгацию одного или нескольких VHH по любому из пп. 1-15 по меньшей мере с одной молекулой, ковалентно или нековалентно.

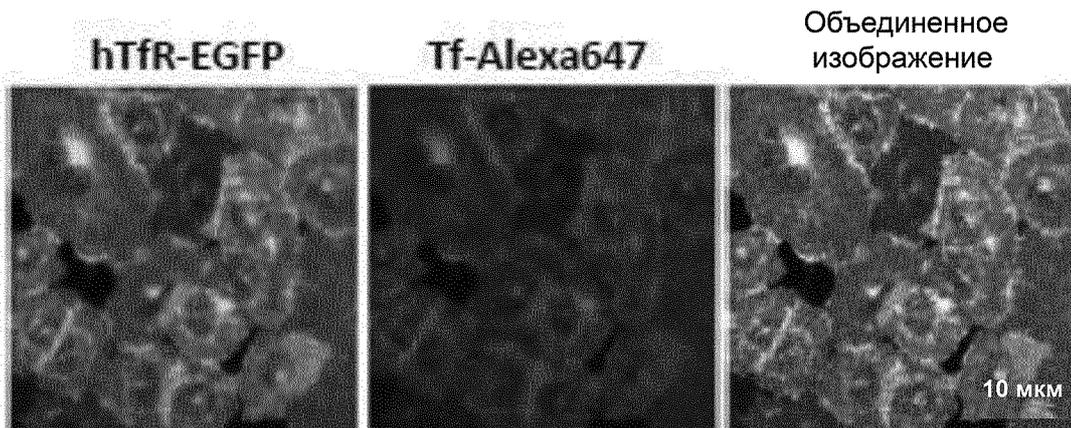


Фиг. 1

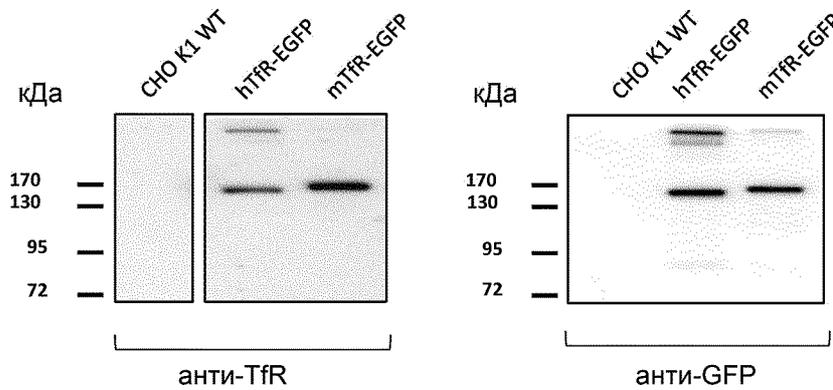
A



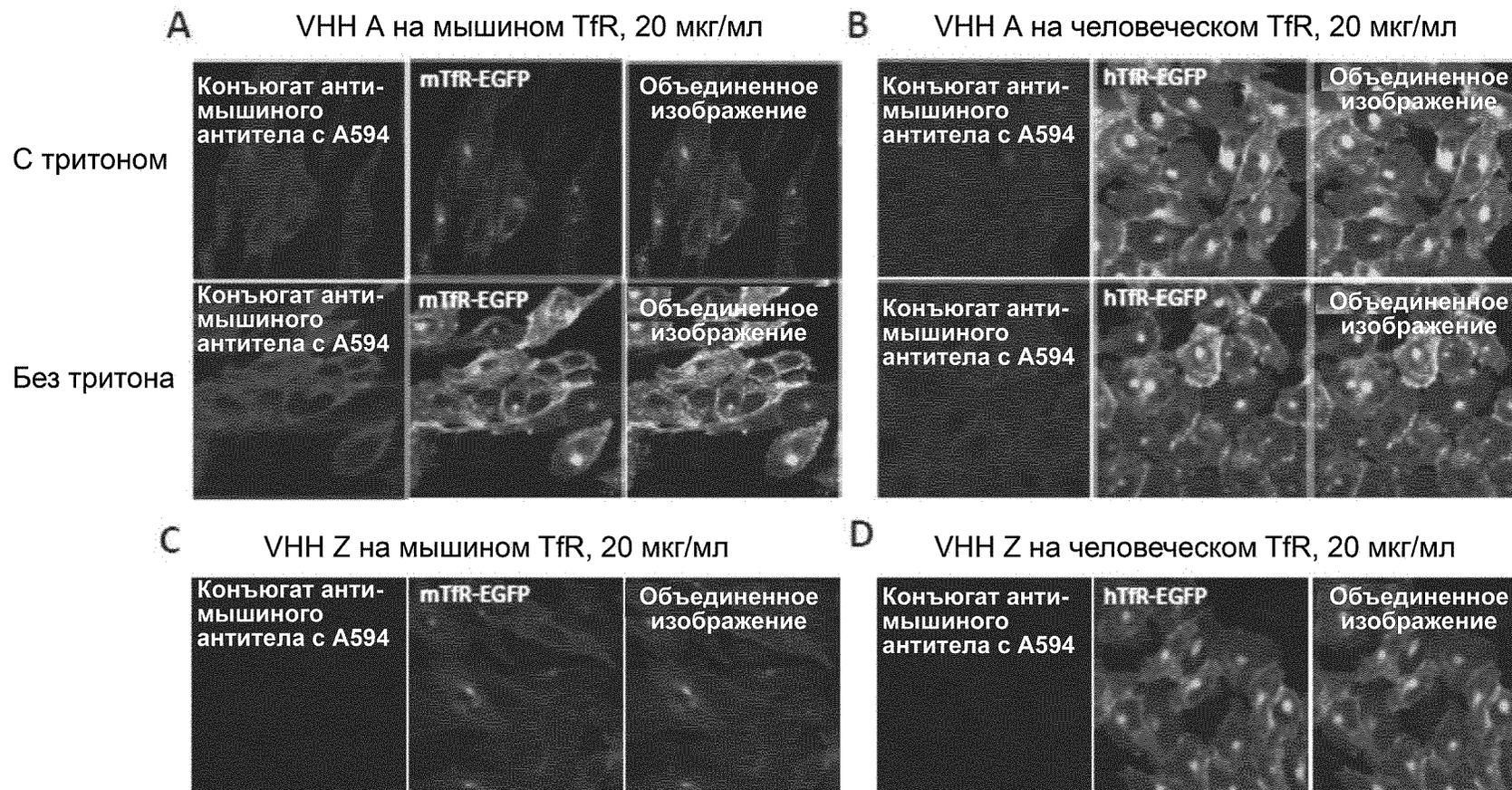
B



C

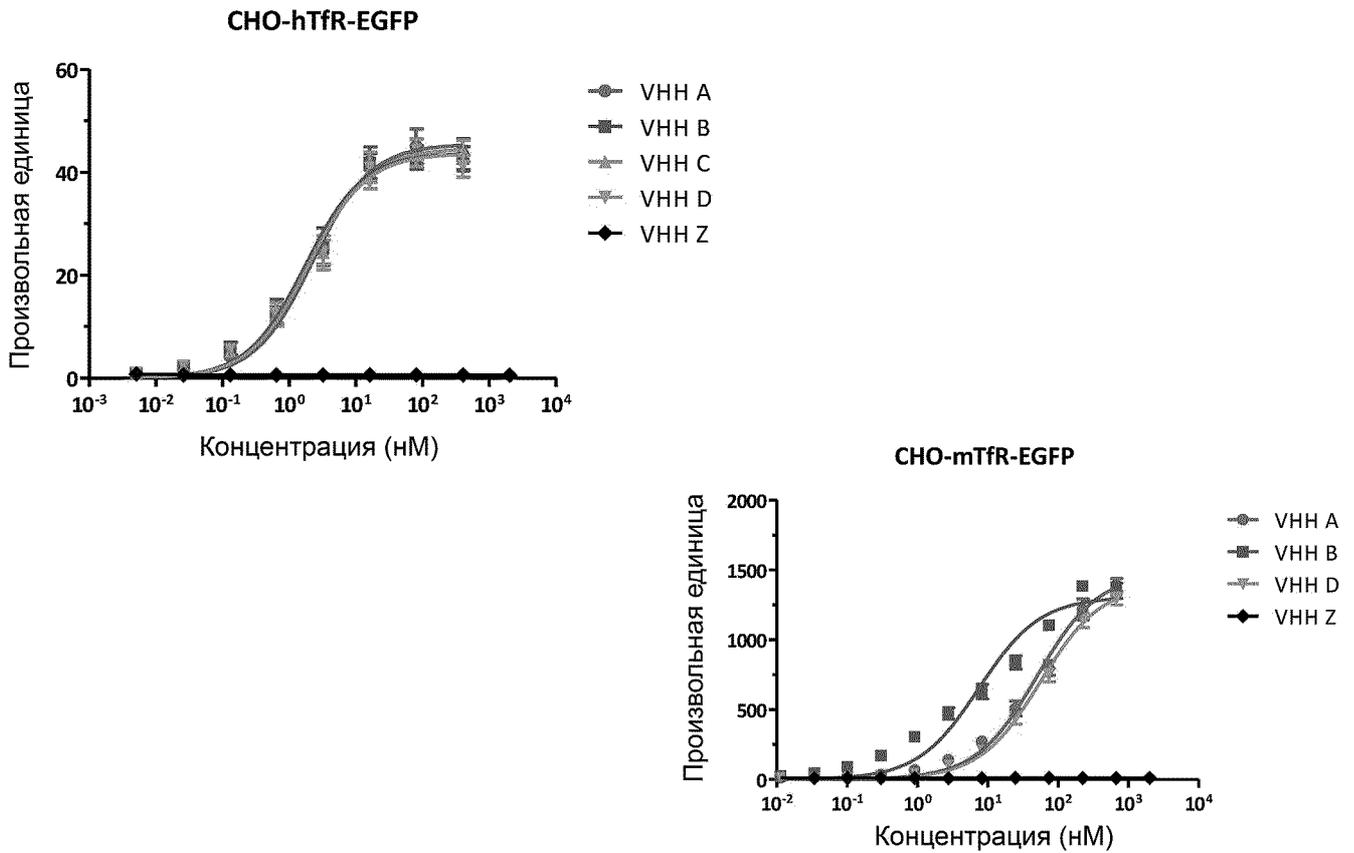


Фиг. 2



Фиг. 3

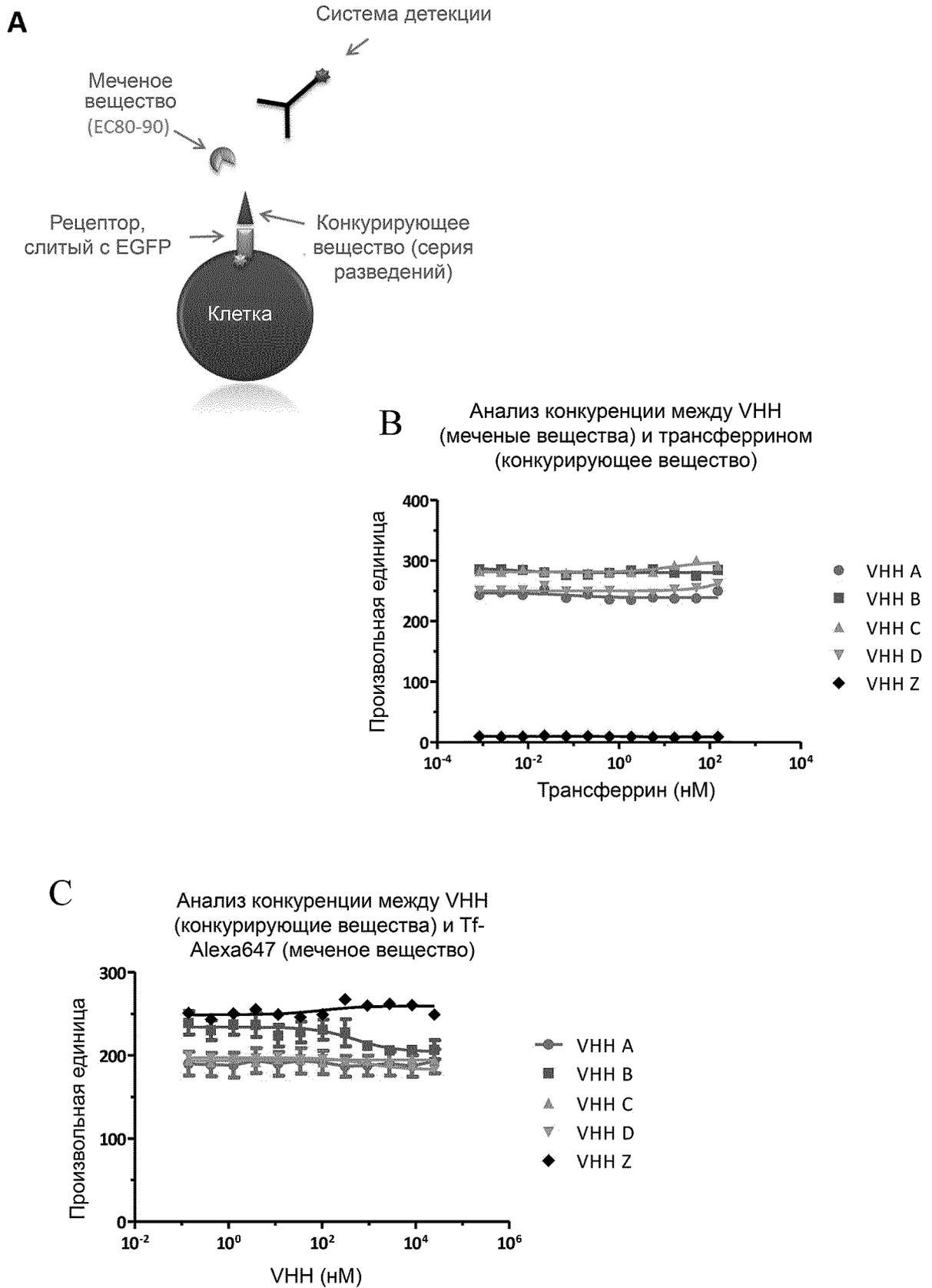
A



B

Наименование VHH	Мишень	Молекулярная масса (Да)	Теоретическая изоэлектрическая точка	Кажущаяся константа диссоциации на человеческом TfR (нМ)	Кажущаяся константа диссоциации на мышинном TfR (нМ)
VHH A	hTfR mTfR	14854.45	6.31	2.7 (\pm 0.40)	50 (\pm 13)
VHH B	hTfR mTfR	14948.48	6.05	1.7 (\pm 0.33)	7.5 (\pm 1.1)
VHH C	hTfR	15158.80	6.32	2.1 (\pm 0.39)	Нет связывания
VHH D	hTfR mTfR	15009.48	6.05	1.9 (\pm 0.33)	56 (\pm 4.7)
VHH Z	Неизвестно	15073.48	6.15	Нет связывания	Нет связывания

Фиг. 4

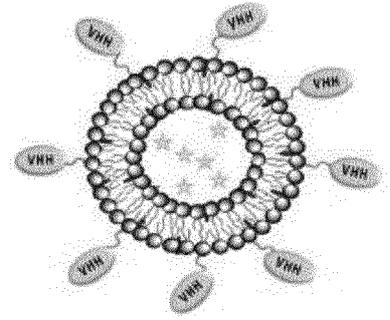


Фиг. 5

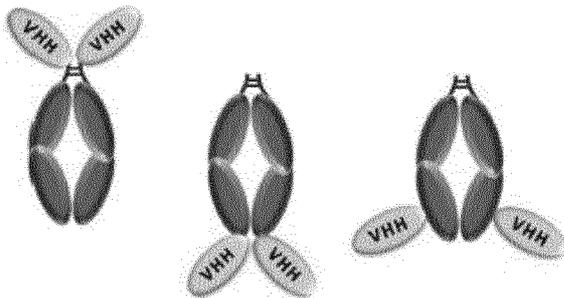
Одновалентный VHH –
переносимое вещество



Функционализированные
наночастицы и
ЛИПОСОМЫ

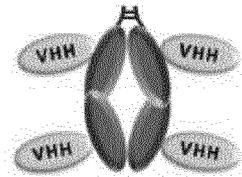


Двухвалентный VHH2 –
переносимое вещество

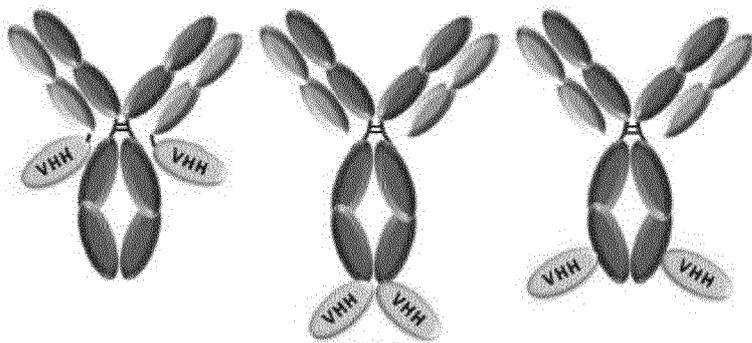


Fc фрагмент человеческого IgG1

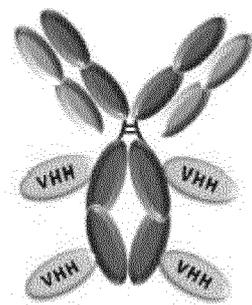
Поливалентный VHH_n –
переносимое вещество



Fc фрагмент человеческого IgG1

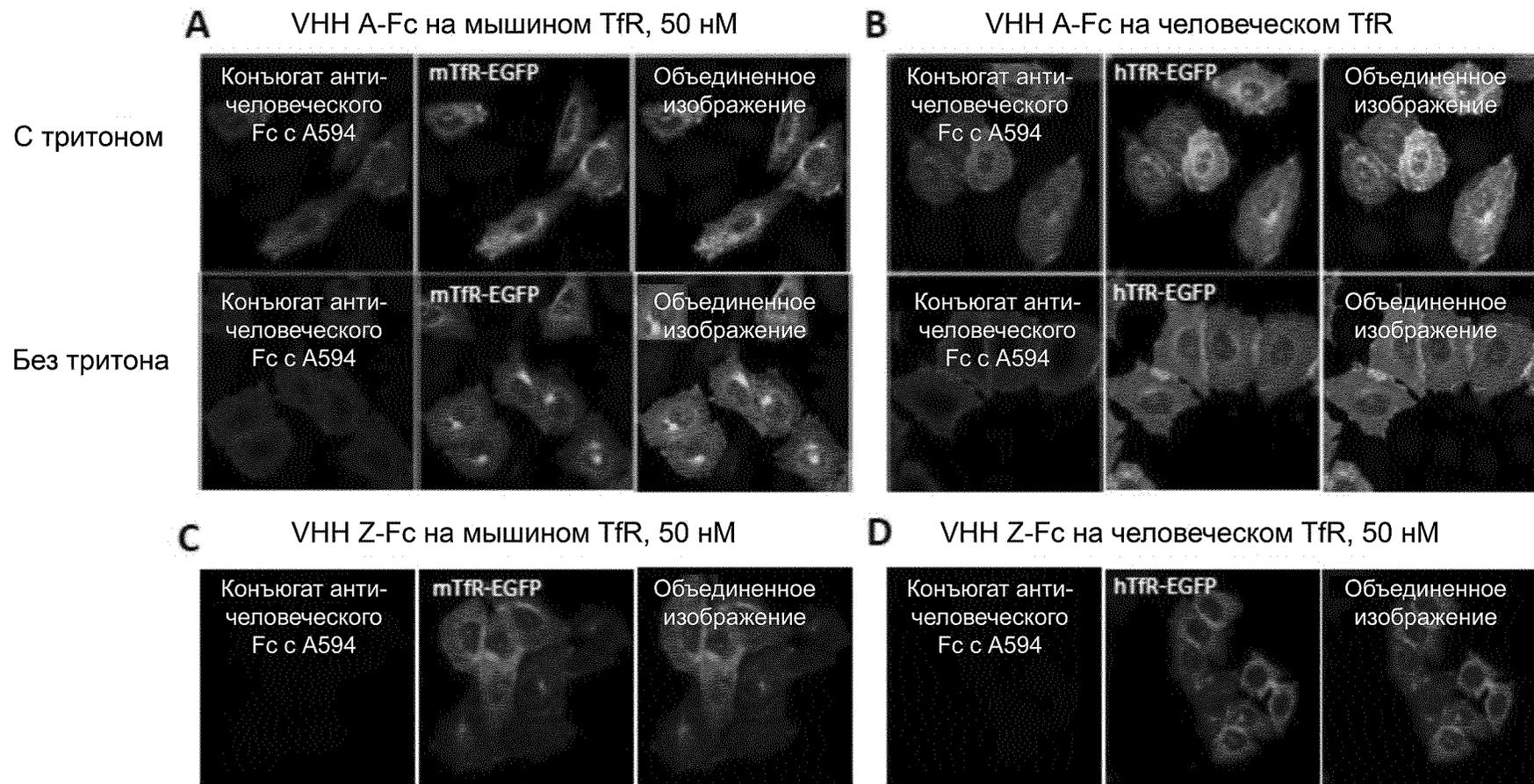


Цельный IgG



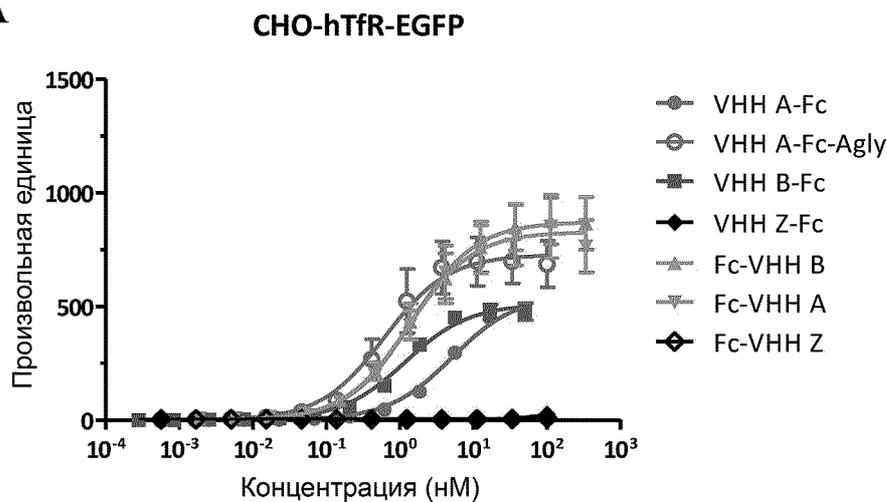
Цельный IgG

Фиг. 6

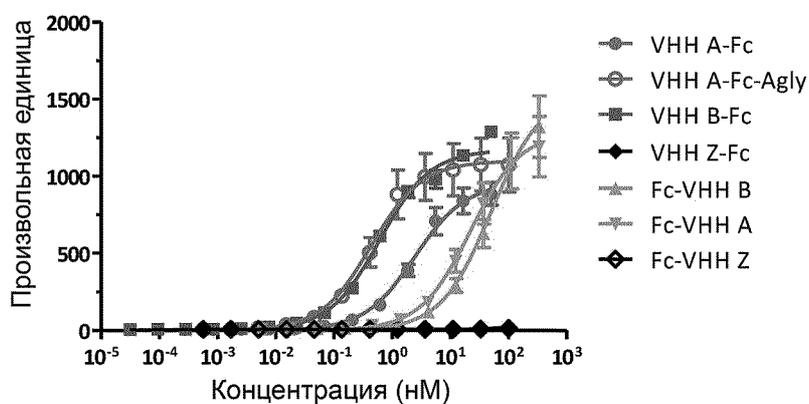


Фиг. 7

A



CHO-mTfR-EGFP

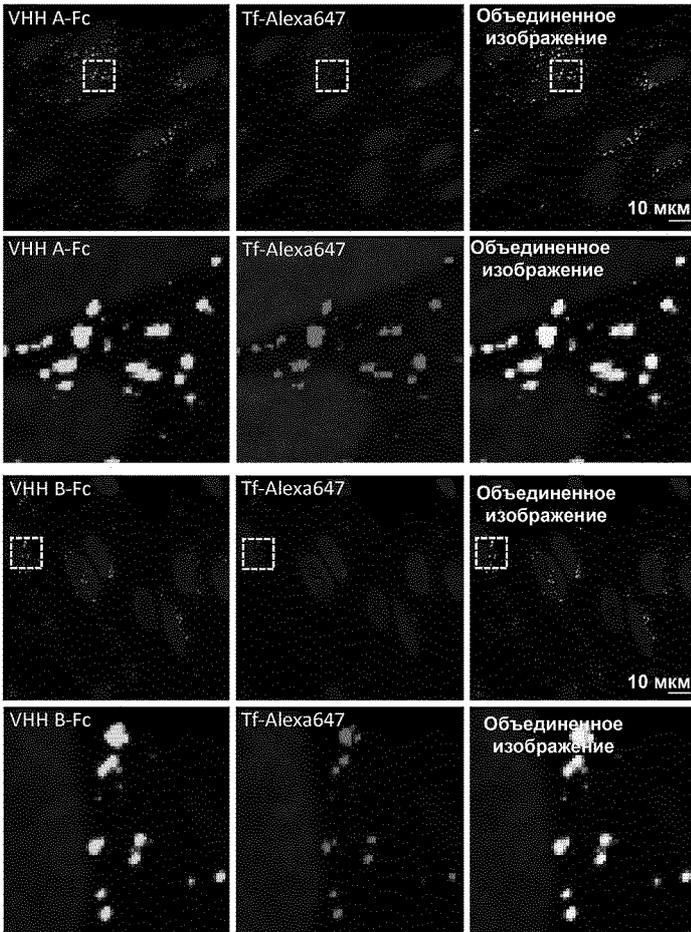


B

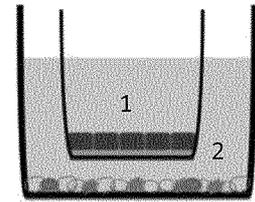
Наименование VHH	Мишень	Молекулярная масса (Да)	Кажущаяся константа диссоциации на человеческом TfR (нМ)	Кажущаяся константа диссоциации на мышинном TfR (нМ)
VHH A-Fc	hTfR mTfR	77309	5.1 (\pm 0.58)	2.5 (\pm 0.36)
VHH A-Fc-Agly	hTfR mTfR	77255	0.61 (\pm 0.18)	0.44 (\pm 0.12)
VHH B-Fc	hTfR mTfR	77497	1.2 (\pm 0.13)	0.61 (\pm 0.051)
VHH Z-Fc	Неизвестно	78152	Нет связывания	Нет связывания
Fc-VHH A	hTfR mTfR	77334	1.3 (\pm 0.30)	22 (\pm 4.7)
Fc-VHH B	hTfR mTfR	77497	1.5 (\pm 0.29)	51 (\pm 10)
Fc-VHH Z	Неизвестно	78266	Нет связывания	Нет связывания

Фиг. 8

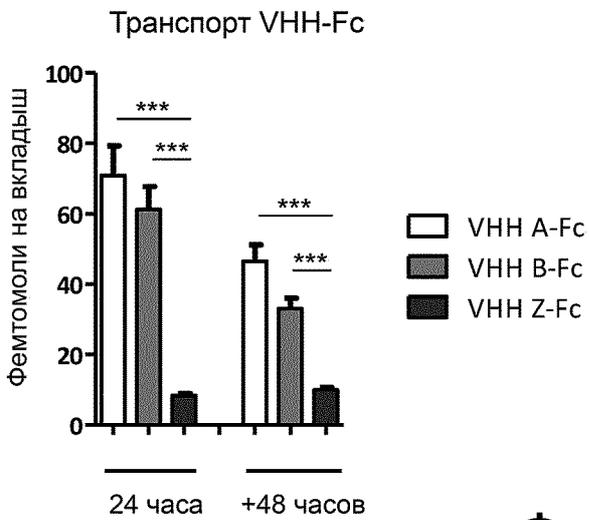
A



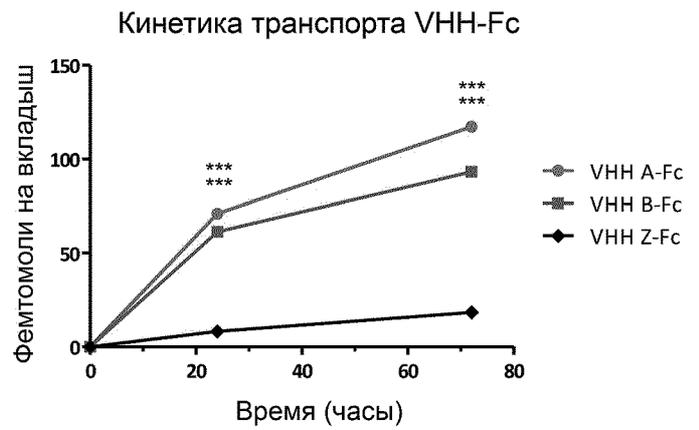
B



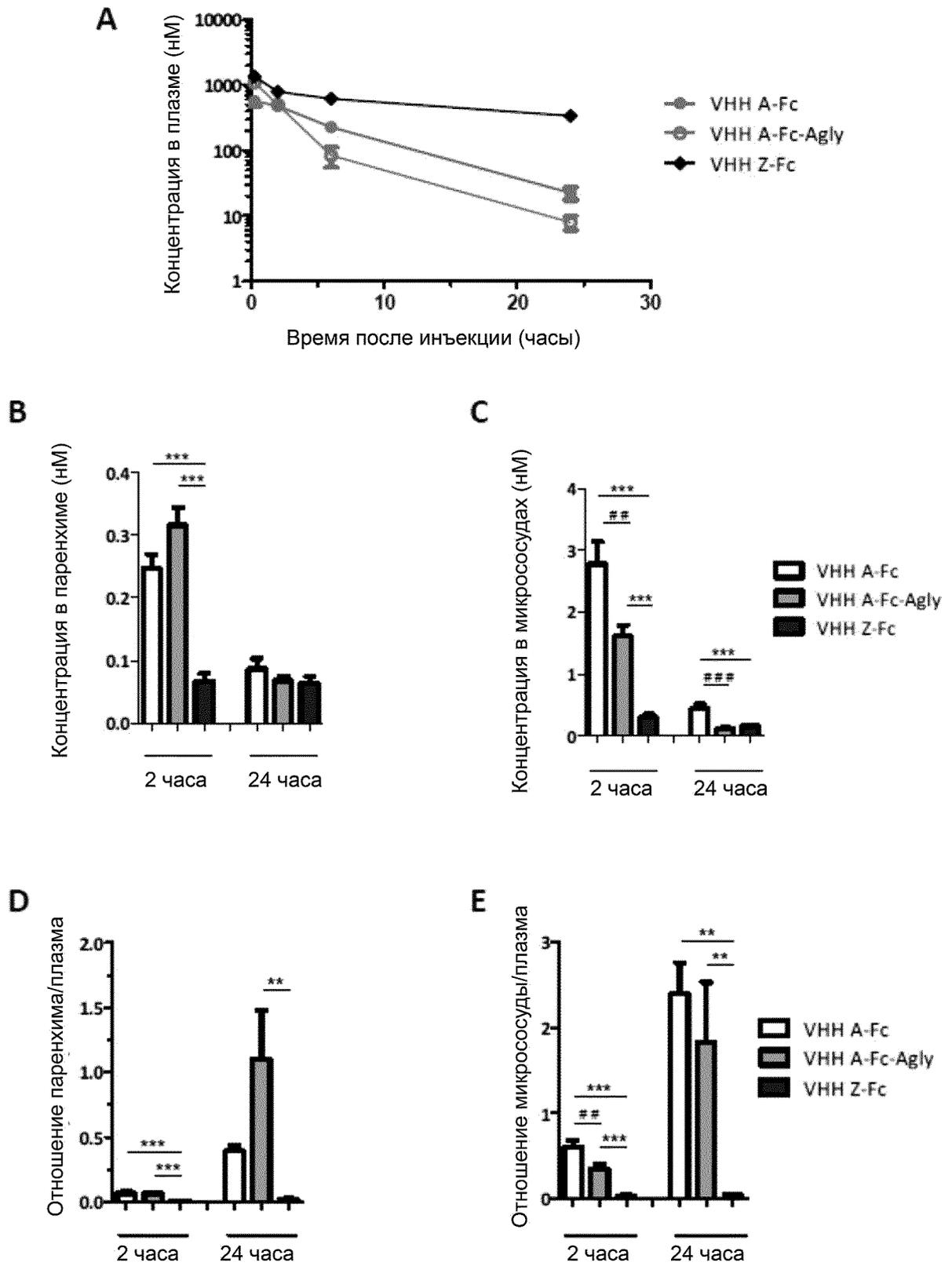
C



D

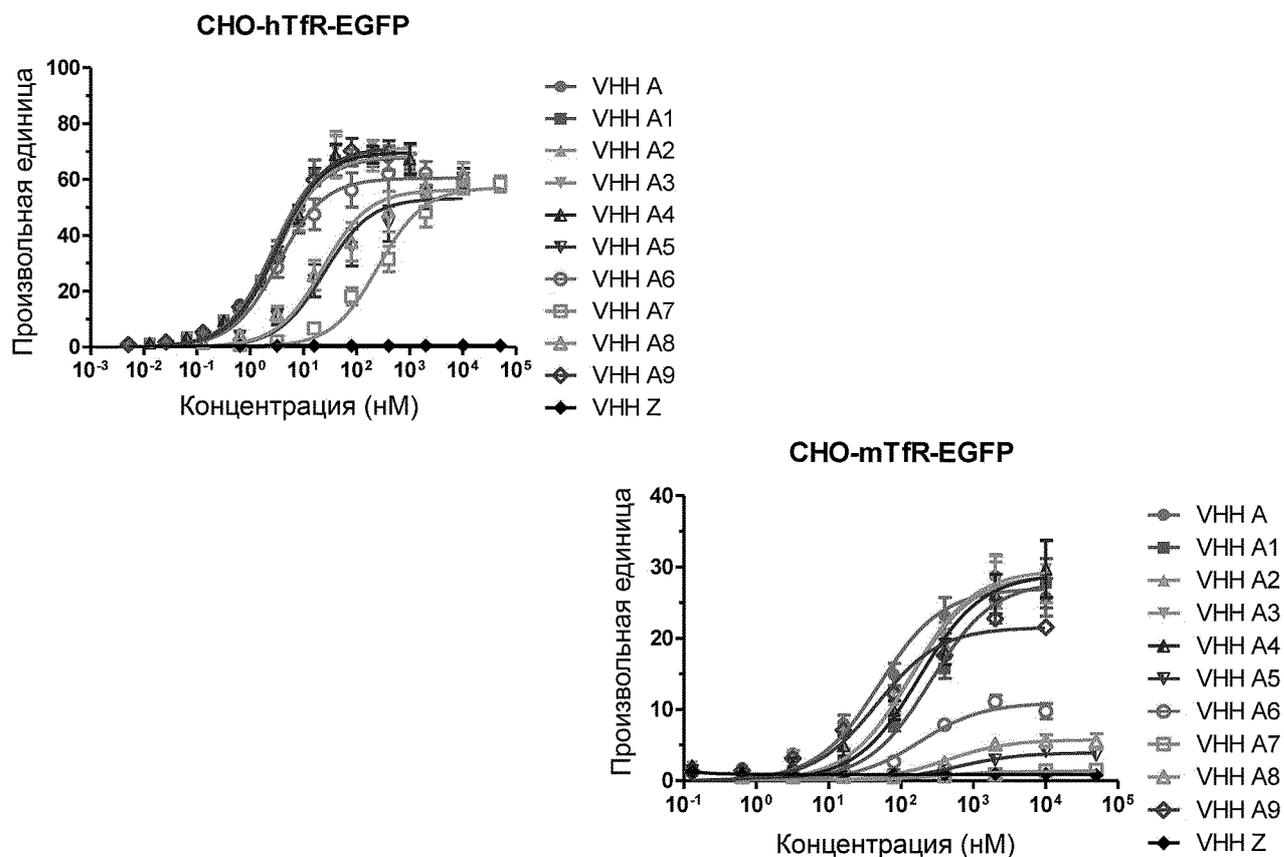


ФИГ. 9



Фиг. 10

A

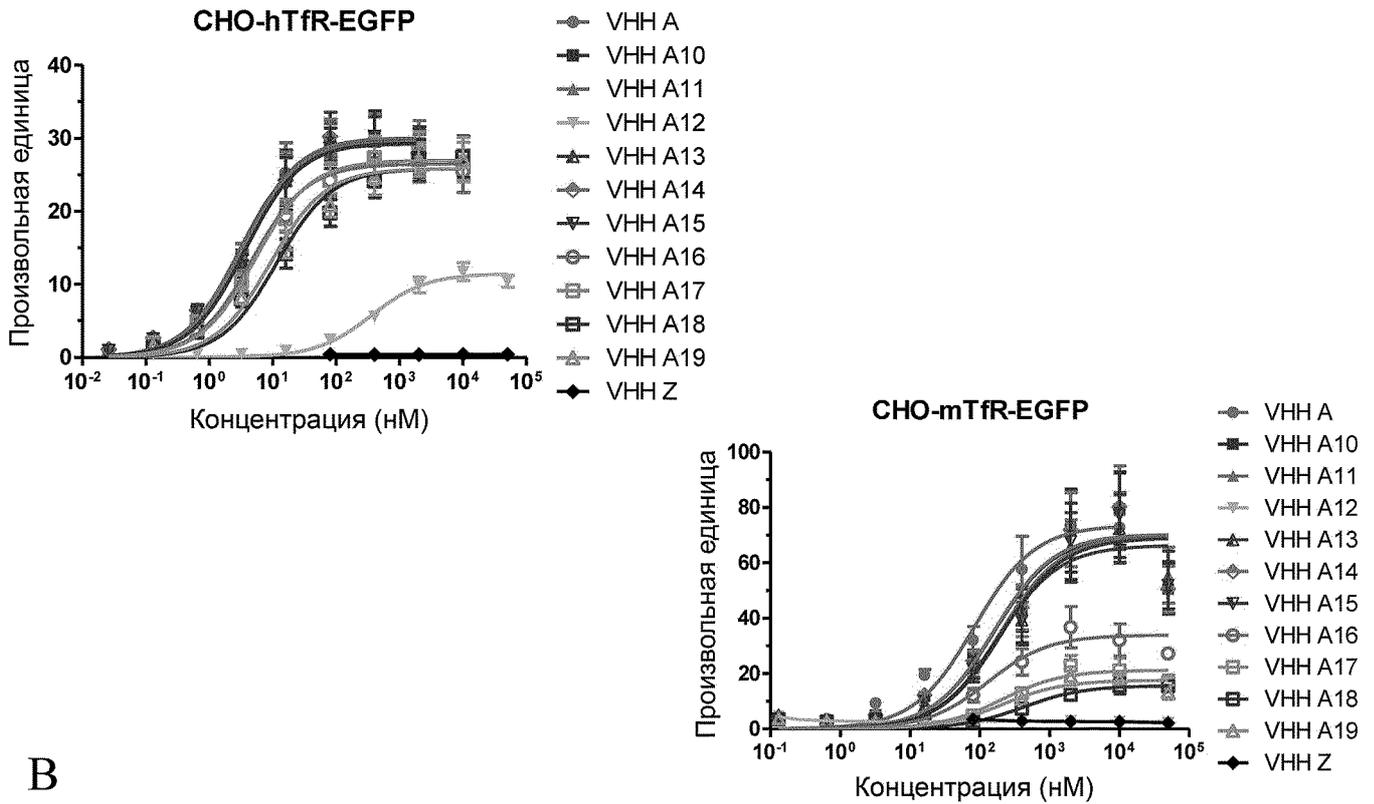


B

Наименование VHH	Мишень	Молекулярная масса (Да)	Теоретическая изоэлектрическая точка	Кажущаяся константа диссоциации на человеческом TfR (нМ)	Кажущаяся константа диссоциации на мышшином TfR (нМ)
VHH A	hTfR mTfR	14854.45	6.31	2.7 (\pm 0.40)	50 (\pm 13)
VHH A1	hTfR mTfR	14824.42	6.31	3.2 (\pm 0.52)	259 (\pm 62)
VHH A2	hTfR mTfR	14810.44	6.66	3.2 (\pm 0.59)	136 (\pm 41)
VHH A3	hTfR mTfR	14824.42	6.31	3.3 (\pm 0.56)	138 (\pm 42)
VHH A4	hTfR mTfR	14811.42	6.31	3.1 (\pm 0.46)	179 (\pm 51)
VHH A5	hTfR mTfR	14762.35	6.31	25 (\pm 7.6)	604 (\pm 256)
VHH A6	hTfR mTfR	14794.33	6.31	3.4 (\pm 0.75)	182 (\pm 44)
VHH A7	hTfR mTfR	14812.37	6.31	255 (\pm 51)	Низкое связывание
VHH A8	hTfR mTfR	14810.44	6.66	23 (\pm 6.9)	427 (\pm 146)
VHH A9	hTfR mTfR	14797.35	6.04	3.4 (\pm 0.50)	47 (\pm 17)
VHH Z	Неизвестно	15073.48	6.15	Нет связывания	Нет связывания

Фиг. 11

A

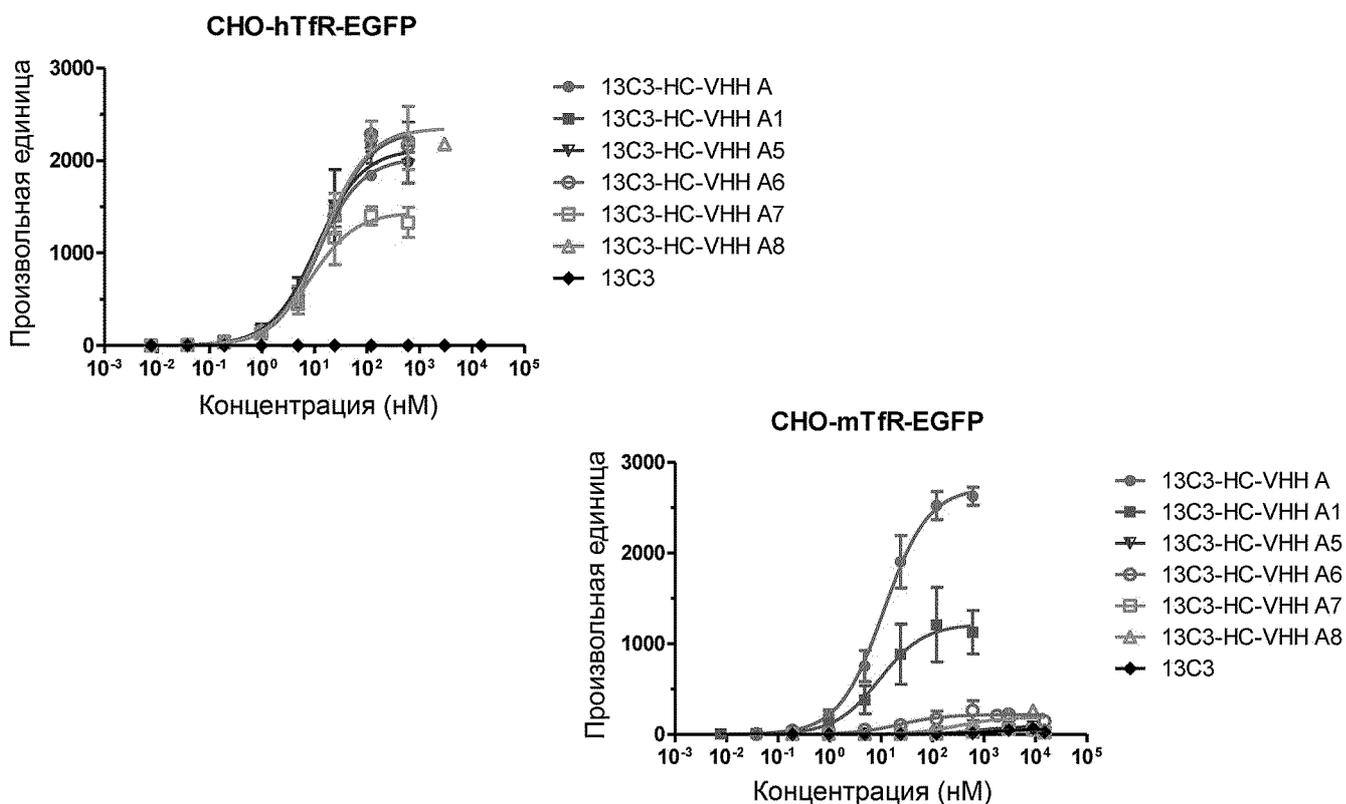


B

Наименование VHH	Мишень	Молекулярная масса (Да)	Теоретическая изоэлектрическая точка	Кажущаяся константа диссоциации на человеческом TfR (нМ)	Кажущаяся константа диссоциации на мышинном TfR (нМ)
VHH A	hTfR mTfR	14854.45	6.31	2.7 (\pm 0.40)	50 (\pm 13)
VHH A10	hTfR mTfR	14854.45	6.31	3.4 (\pm 0.87)	159 (\pm 70)
VHH A11	hTfR mTfR	14870.45	6.31	3.4 (\pm 0.82)	197 (\pm 78)
VHH A12	hTfR	14820.43	6.31	363 (\pm 76)	Нет связывания
VHH A13	hTfR mTfR	14840.42	6.31	3.5 (\pm 0.97)	187 (\pm 76)
VHH A14	hTfR mTfR	14840.42	6.31	3.3 (\pm 0.83)	158 (\pm 69)
VHH A15	hTfR mTfR	14838.45	6.31	3.7 (\pm 0.97)	207 (\pm 93)
VHH A16	hTfR mTfR	14836.41	6.31	4.7 (\pm 1.2)	131 (\pm 55)
VHH A17	hTfR mTfR	14854.45	6.31	5.3 (\pm 1.4)	208 (\pm 87)
VHH A18	hTfR mTfR	14840.42	6.31	12 (\pm 3.1)	416 (\pm 151)
VHH A19	hTfR mTfR	14868.48	6.31	9.2 (\pm 2.3)	210 (\pm 86)
VHH Z	Неизвестно	15073.48	6.15	Нет связывания	Нет связывания

Фиг. 12

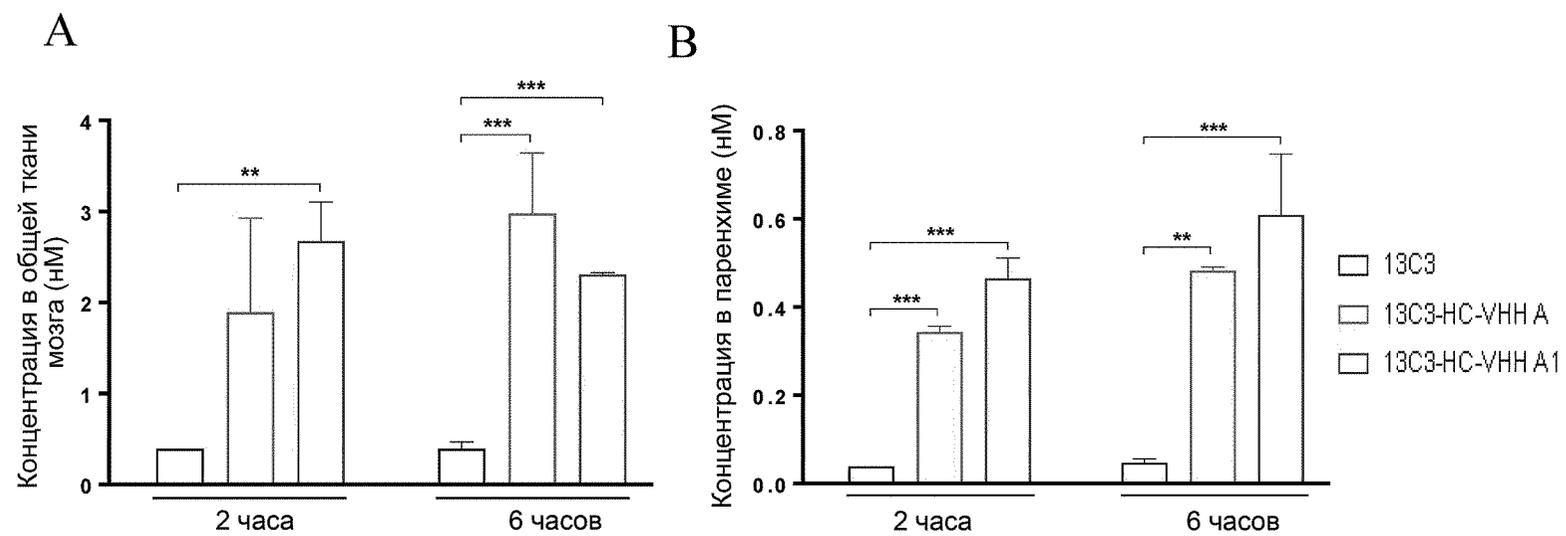
A



B

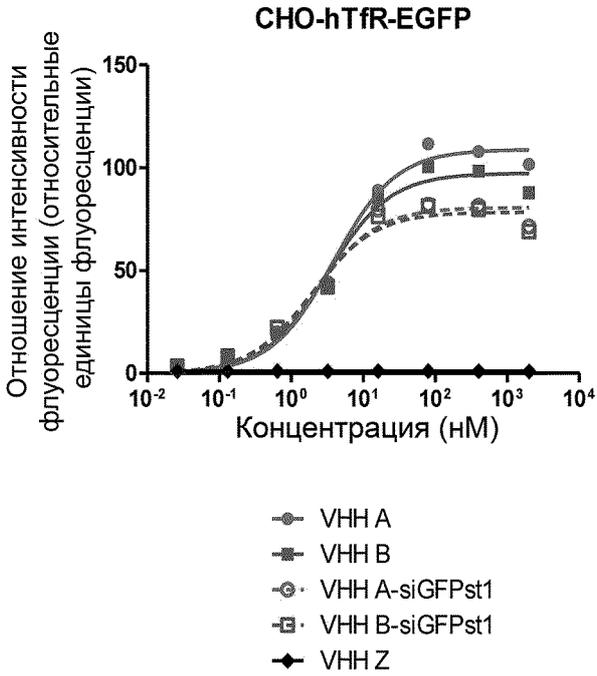
Наименование молекулы	Молекулярная масса (Да)	Кажущаяся константа диссоциации на человеческом TfR (нМ)	Кажущаяся константа диссоциации на мышинном TfR (нМ)
13C3-HC-VHH A	170259	11.1 (\pm 1.6)	11.3 (\pm 1.8)
13C3-HC-VHH A1	170199	15 (\pm 2.1)	9.4 (\pm 5.2)
13C3-HC-VHH A5	170075	11 (\pm 2.8)	Низкое связывание
13C3-HC-VHH A6	170139	15 (\pm 2.0)	23 (\pm 17)
13C3-HC-VHH A7	170175	8.3 (\pm 2.6)	Низкое связывание
13C3-HC-VHH A8	170171	15 (\pm 3.2)	315 (\pm 232)
13C3-LC-VHH A	171092	17 (\pm 4.3)	106 (\pm 17)
13C3	144913	Нет связывания	Нет связывания

Фиг. 13

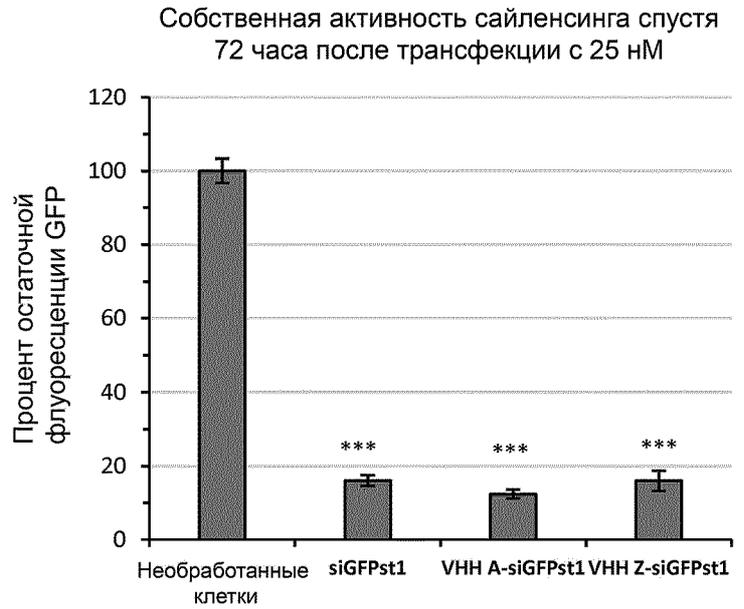


Фиг. 14

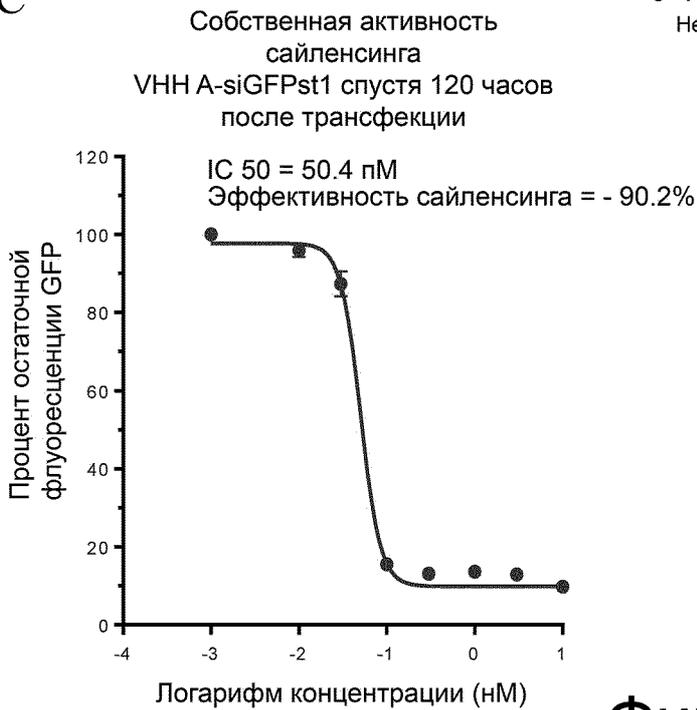
A



B

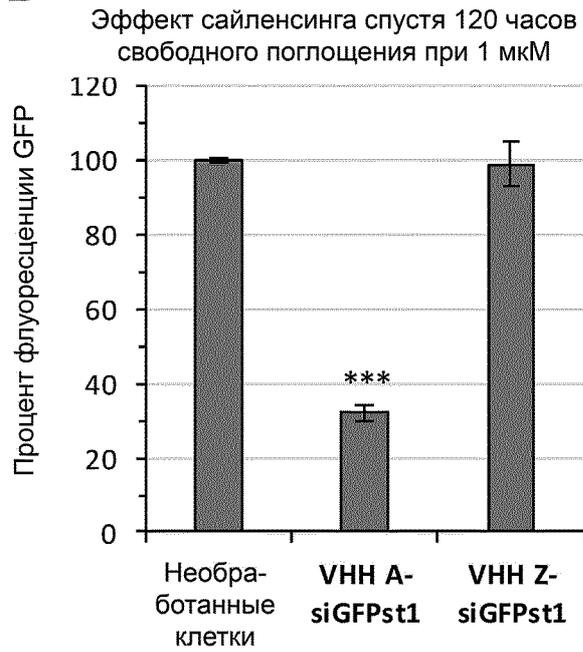


C

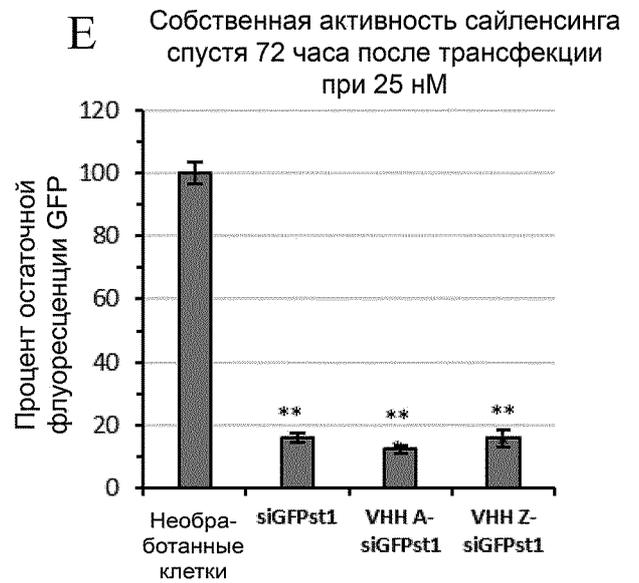


Фиг. 15

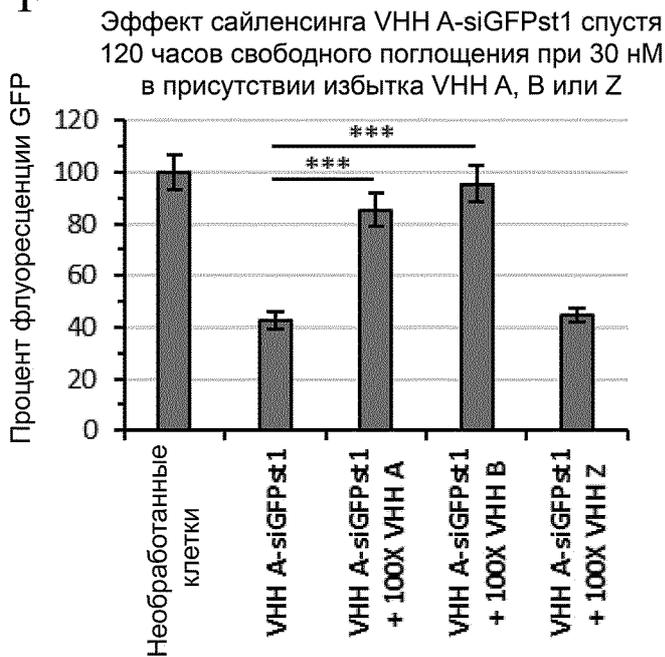
D



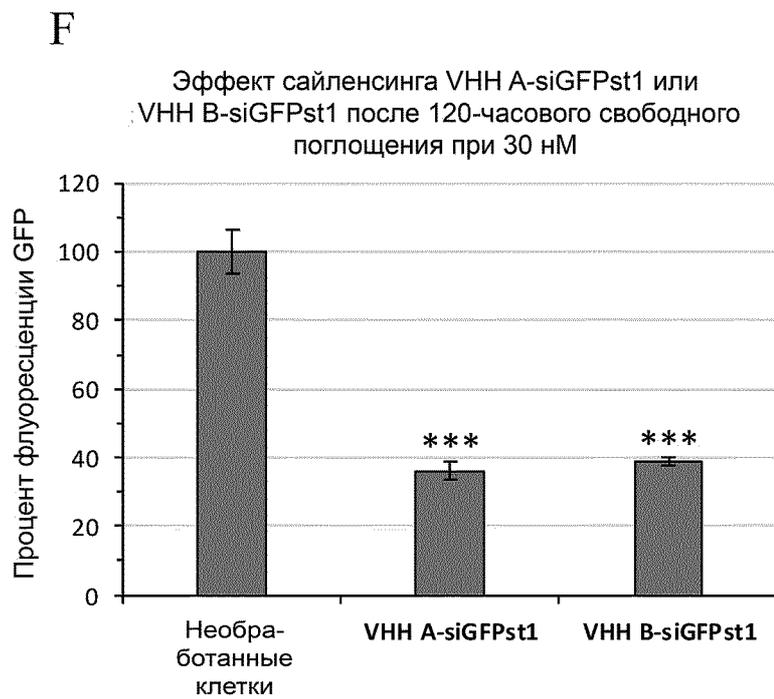
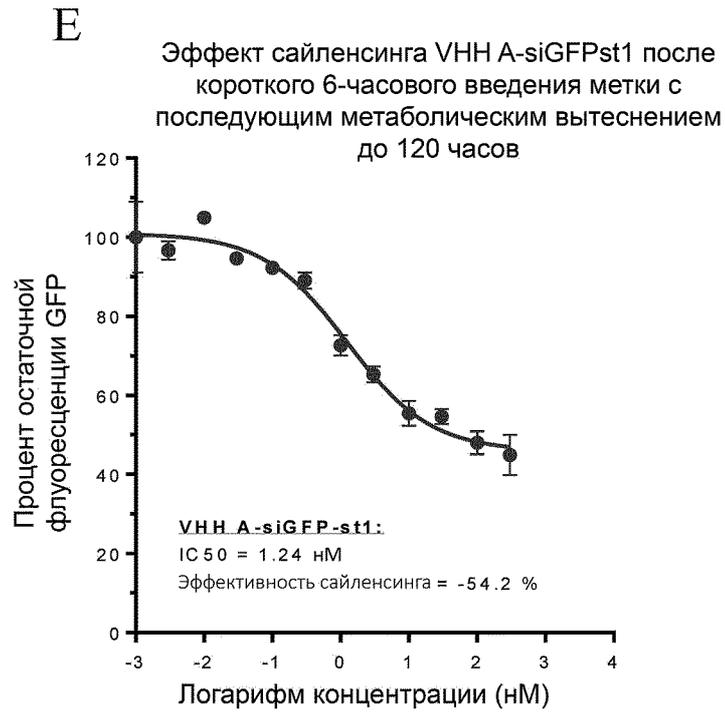
E



F

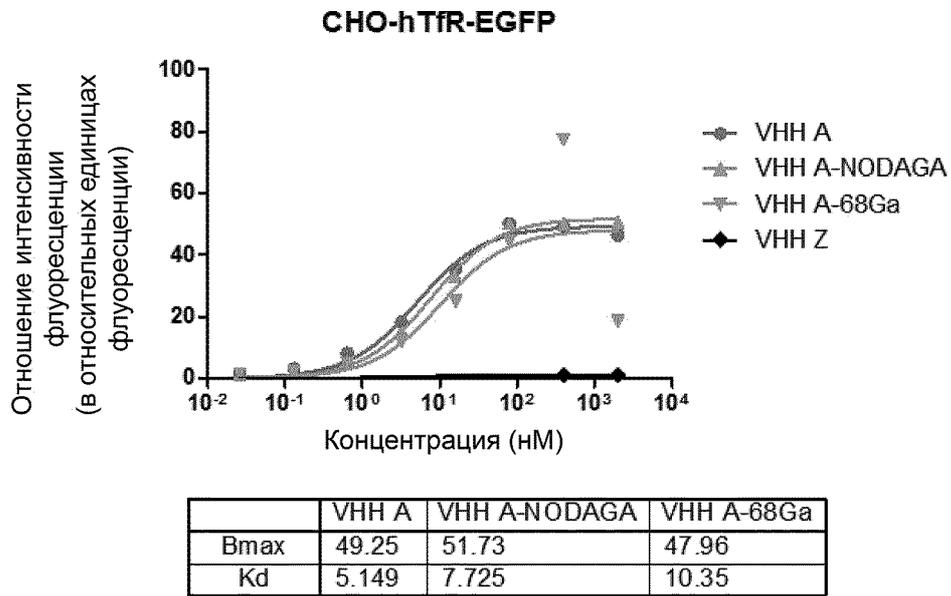


Фиг. 15 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



Фиг. 15 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

A



B



Фиг. 16