

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040170**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2022.04.27

(21) Номер заявки

201891331

(22) Дата подачи заявки

2016.12.02(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)**A61P 35/00** (2006.01)**C07K 16/18** (2006.01)**C07K 16/28** (2006.01)**C07K 16/46** (2006.01)

(54) БИПАРАТОПНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ-АНТАГОНИСТЫ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА Wnt В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

(31) **15197999.4**(32) **2015.12.04**(33) **EP**(43) **2018.12.28**(86) **PCT/EP2016/079575**(87) **WO 2017/093478 2017.06.08**

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

(72) Изобретатель:

**Цинцалла Виттория, Кюнцеле Клаус-
Петер (DE), Бёйсе Мари-Анж, Кроуми
Карен, Сталенс Стефани, Стрюббе
Беатрейс (BE)**

(74) Представитель:

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

(56) **WO-A1-2011138391****WO-A1-201119661****WO-A1-2014029752**

JÄHNICHEN S. ET AL.: "CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 107, no. 47, 23 November 2010 (2010-11-23), pages 20565-20570, XP002611004, ISSN: 0027-8424, DOI:10.1073/PNAS.1012865107 [retrieved on 2010-11-08] the whole document

DANESE M. JOINER ET AL.: "LRP5 and LRP6 in development and disease", TRENDS IN ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM., vol. 24, no. 1, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 31-39, XP055298771, US ISSN: 1043-2760, DOI:10.1016/j.tem.2012.10.003 figure 2

(57) Изобретением обеспечены новые бипаратопные перекрестнореактивные по LRP5/LRP6 связывающие полипептиды, а более конкретно новые бипаратопные перекрестнореактивные по LRP5/LRP6 конструкторы иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов, способные подавлять сигнальные пути Wnt. Изобретение также касается конкретных последовательностей таких полипептидов, способов их производства и применения, включая способы лечения таких заболеваний, как рак.

B1**040170****040170 B1**

Область техники

Настоящее изобретение касается новых полипептидов, связывающих подобный рецептору липопротеинов низкой плотности белок 5 (LRP5) и подобный рецептору липопротеинов низкой плотности белок 6 (LRP6). Изобретение также касается нуклеиновых кислот, кодирующих такие полипептиды; способов изготовления таких полипептидов; клеток-хозяев, которые экспрессируют или способны экспрессировать такие полипептиды; композиций, содержащих такие полипептиды; а также применений таких полипептидов либо таких композиций, в частности, в терапевтических целях в области раковых заболеваний.

Уровень техники

Активация сигнального пути Wnt требует связывания внеклеточных Wnt-лигандов с рецептором Frizzled и корецептором LRP5 (номер доступа: UniProtKB-075197/LRP5_HUMAN) или его близкородственным гомологом LRP6 (номер доступа: UniProtKB-075581/LRP6HUMAN). В клетках млекопитающих существует 19 белков Wnt и 10 рецепторов Frizzled. В отсутствие Wnt-лиганда цитоплазматический β -катенин фосфорилируется белковым комплексом, состоящим из каркасных белков Axin и APC, а также киназ GSK3- β и CK1a. Последующее распознавание β -TсP-убиквитин-лигазой приводит к убиквитин-опосредованной деградации β -катенина. В присутствии Wnt-лиганда связывание Wnt с Frizzled и LRP5 или LRP6 приводит к привлечению цитоплазматического эффекторного белка Dv1 и фосфорилированию цитоплазматического хвоста LRP5 или LRP6, что обеспечивает сайт для присоединения Axin. Секвестрация Axin с помощью LRP5 или LRP6 приводит к инактивации комплекса Axin-APC-GSK3- β , а значит, к стабилизации и накоплению внутриклеточного β -катенина. Таким образом, уровень β -катенина в цитоплазме растёт, и β -катенин перемещается к ядру, образуя комплексы с членами семейства факторов транскрипции T-клеточного фактора (TCF)/фактора, связывающегося с лимфоидным энхансером (LEF). Затем привлекаются механизм базальной транскрипции и транскрипционные коактиваторы, включая белок (CREB-binding protein, CBP), который связывается с белком, связывающимся с цАМФ-чувствительным элементом (cAMP response element-binding protein, CREB), либо его гомолог р300, что приводит к экспрессии различных целевых генов, включая Axin2, циклин D1 и c-Мyc.

Дополнительный уровень лиганд-зависимой регуляции пути Wnt опосредован E3-лигазой RNF43 и ее близкородственным гомологом ZNRF3, а также секретлируемыми белками R-спондинами (de Lau и др. "The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength". *Genes Dev.* 2014; 28(4):305-16). RNF43 является посредником в убиквитинировании рецепторного комплекса Frizzled/LRP5 или LRP6 на клеточной поверхности, приводя к его деградации и, таким образом, подавляя лиганд-зависимую активность пути Wnt. Активности RNF43 противодействуют члены семейства R-спондинов (R-спондиновые лиганды 1-4). При наличии R-спондинового лиганда он устраняет RNF43 с клеточной поверхности, делая возможным накопление комплекса Frizzled/LRP5 или LRP6 и усиление Wnt-сигналинга в присутствии Wnt-лигандов.

LRP5 и LRP6 действуют как привратники лиганд-зависимой активации сигнального пути Wnt и, следовательно, могут считаться мишенями для достижения полной блокады пути, опосредуемого всеми 19 лигандами Wnt и 10 рецепторами Frizzled, а также усиливаемого R-спондиновыми лигандами. В частности, Wnt-лиганды можно подразделить на классы Wnt1 и Wnt3a, каждый из которых для передачи сигнала связывается с разными эпитопами/участками LRP5 и LRP6. Внеклеточный домен LRP5 и LRP6 содержит четыре повторяющихся β -пропеллерных элемента, связанные с EGF-подобным доменом, за которыми следуют три LDLR-повтора типа A. Комбинирование структурного и функционального анализа LRP5 и LRP6 заставляет предположить, что Wnt1 (лиганд класса Wnt1) связывается с фрагментом LRP6, который содержит β -пропеллеры 1 и 2, а Wnt3a связывается с фрагментом, который содержит β -пропеллеры 3 и 4. В настоящий момент известно только изображение внеклеточного домена LRP6, содержащего β -пропеллерные участки 1-4, в низком разрешении (Ahn и др. "Structural basis of Wnt signaling inhibition by Dickkopf binding to LRP5/6". *Dev Cell.* 2011; 21(5):862-73). Однако неточности этих реконструкций в низком разрешении (40 Å) и отсутствие данных о структуре внеклеточного домена LRP6 в комплексе с Wnt-лигандами не позволяют точно установить эпитопы, принимающие участие в связывании лигандов Wnt1 или Wnt3a.

Гиперактивация сигнального пути Wnt принимает участие в патогенезе различных типов рака. При некоторых типах рака частые мутации в молекулах нисходящих сигнальных путей способствуют конститутивной активации пути Wnt (например, мутации APC при колоректальном раке; активирующая β -катенин мутация при печеночноклеточной карциноме). Напротив, при трижды негативном раке молочной железы (ТНРМЖ), немелкоклеточном раке легких (НМКРЛ), аденокарциноме поджелудочной, а также подмножестве колоректальных раков (КРР) и эндометриальных раков активация сигнального пути Wnt приводится в действие лиганд-зависимым механизмом (т.е. аутокринной/паракринной активацией Wnt), выявляемым по внутриклеточному накоплению β -катенина. При НМКРЛ, ТНРМЖ и аденокарциноме поджелудочной лиганд-зависимая активация Wnt опосредована множеством механизмов, включая повышенную экспрессию Wnt-лигандов и/или рецепторов LRP5 и LRP6, либо же сайленсинг негативно-регулятора LRP5 и LRP6 - DKK1 (ТНРМЖ: Liu и др. "LRP6 overexpression defines a class of breast can-

cer subtype and is a target for therapy". *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107 (11):5136-41; Khramtsov и др. "Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome". *Am J. Pathol.* 2010; 176(6): 2911-20; НМКРЛ: Nakashima и др. "Wnt1 overexpression associated with tumor proliferation and a poor prognosis in non-small cell lung cancer patients". *Oncol. Rep.* 2008; 19(1):203-9; Пак поджелудочной: Zhang и др. "Canonical wnt signaling is required for pancreatic carcinogenesis". *Cancer Res.* 2013; 73(15):4909-22). В частности, опубликованные данные показывают, что в здоровых тканях (например, эпителии молочной железы и легкого) β -катенин локализован строго в плазматической мембране. В отличие от этого в большинстве первичных клинических образцов ТНРМЖ, НМКРЛ и аденокарциномы поджелудочной выявлено внутриклеточное накопление β -катенина (т.е. в цитоплазме/ядре; биомаркер активации Wnt-сигналинга) из-за нарушенного Wnt-сигналинга. В недавних публикациях было показано, что лиганд-зависимая активация сигнального пути Wnt опосредована мутировавшим/инактивированным RNF43 (Giannakis и др. "RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers". *Nat. Genet.* 2014; 46(12): 1264-6) либо активацией R-спондиновых слитых транскриптов (кодирующих белки R-спондин2 или R-спондин3, управляемых конститутивно активными сильными промоторами; Seshagiri и др. "Recurrent R-spondin fusions in colon cancer". *Nature* 2012; 488(7413):660-4) Было показано, что инактивация как мутаций RNF43, так и R-спондиновых слитых транскриптов усиливает лиганд-зависимый Wnt-сигналинг *in vitro*, повышая относительное содержание Frizzled на поверхности клетки. Было показано, что лиганд-зависимая активация Wnt в опухолях стимулирует рост опухоли и ее резистентность к химиотерапии либо иммунотерапии, а также связана с рецидивами в доклинических моделях.

Из уровня техники известны некоторые молекулы, связывающие LRP5 или LRP6 и способные модулировать сигнальный путь Wnt: Dickkopf-1 (DKK1) - это ингибитор LRP5 и LRP6. DKK1 связывается с обоими корецепторами Wnt, LRP5 и 6, а также трансмембранным белком Kremen, подавляет Wnt-сигналинг и приводит к быстрой интернализации LRP5 и LRP6. Было показано, что DKK1 подавляет как Wnt1-, так и Wnt3а-опосредованную передачу сигнала. Исследования по структурному моделированию показали, что отдельная молекула DKK1 кооперативно связывается с вытянутым участком внеклеточного домена LRP6 (от 1-го до 3-го β -пропеллера). Структурные анализы предполагают взаимодействие DKK1 и LRP6 по принципу кооперативного связывания, с первоначальным связыванием с 3-м β -пропеллерным участком, которое способствует взаимодействию/связыванию с 1-м и 2-м β -пропеллерными участками, поскольку меняет конформацию внеклеточного домена LRP6. Однако, как уже упоминалось, конкретные эпитопы в доменах 1-го, 2-го и 3-го β -пропеллеров, принимающие участие в связывании DKK1 и LRP6, не выяснены из-за низкого разрешения реконструкций структуры полного внеклеточного домена LRP6, связанного с DKK1.

Было показано, что лечение DKK1 *in vivo* приводит к серьезным токсичным реакциям желудочно-кишечного тракта. В частности, было показано, что опосредованная аденовирусом экспрессия DKK1 у взрослых мышей заметно ингибировала пролиферацию в тонком и толстом кишечнике, что сопровождалось прогрессирующей дегенерацией его архитектуры, большой потерей массы тела и смертностью от колита и генерализованной инфекции. В частности, LRP5 и LRP6 экспрессируются в пролиферирующих эпителиальных клетках тонкого кишечника и необходимы для пролиферации кишечного эпителия, что наводит на предположение, что ингибирование LRP5 и LRP6 может быть токсичным для этой и других нормальных тканей (Zhong и др. "Lrp5 and Lrp6 play compensatory roles in mouse intestinal development". *J. Cell. Biochem.* 2012; 113(1):31-8). Поэтому возникают сомнения в том, что ингибиторы LRP5 и LRP6 или вообще какие-либо ингибиторы сигнального пути Wnt (Wnt1 и Wnt3а) могут быть использованы в терапевтических целях, например, могут пойти в разработку как средства против рака.

WO 2009/056634 относится к молекулам, связывающимся с LRP6, которые могут антагонистически либо агонистически взаимодействовать с сигнальным путем Wnt1 либо с сигнальным путем Wnt3/3а, и которые могут быть использованы в целях диагностики или же для лечения "расстройств, связанных с сигнальным путем Wnt", таких как остеоартрит, поликистоз почек или рак. В этом документе не упомянуты какие-либо конкретные примеры подобных связывающих молекул, определенные своими аминокислотными последовательностями.

В WO 2011/138391 и WO 2011/138392 описаны мультивалентные антитела, связывающие LRP6. В WO 2011/138391 заявлены антитела, блокирующие один из сигнальных путей Wnt (Wnt1 или Wnt3), не усиливая при этом другой путь (соответственно Wnt3 или Wnt1). В WO 2011/138392 среди прочего предоставлены антитела или фрагменты антител, усиливающие сигнал Wnt путем образования рецепторных кластеров LRP6.

В WO 2011/138391 поясняется, что для достижения желаемого эффекта молекулы, связывающие LRP6, следует довести до формата полноразмерных IgG-антител. Приведены примеры бипаратопных молекул LRP6, включающих молекулу IgG с первой специфичностью связывания, соединенную с одноцепочечным Fv-участком со второй специфичностью связывания. Некоторые форматы описаны как обладающие значительно сниженной термостабильностью (T_{m} от 50 до 52°C). Fc-участок может придать молекуле IgG эффекторные функции, такие как комплемент-зависимая цитотоксичность (КЗЦ) или антитело-зависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (АЗКЦ).

В WO 2013/067355 описаны связывающие LRP6 бипаратопные иммуноглобулиновые scFv-конструкты с продленным периодом полувыведения, полученные из молекул IgG, описанных в WO 2011/138391.

В WO 2011/119661 описаны антитела, связывающиеся с LRP6 и подавляющие передачу сигнала через первую изоформу Wnt, особенно через Wnt3 или Wnt3a, но усиливающие передачу сигнала через вторую изоформу Wnt, которая может быть изоформой Wnt1, 2, 2b, 4, 6, 7a, 7b, 8a, 9a, 9b, 10a или 10b. Описаны биспецифические молекулы, связывающиеся с E1-E2-участком LRP6, а также с E3-E4-участком LRP6. Для получения биспецифических антител использовали технологию "выступов-во-впадины".

Эпитопы связывания (определенные аминокислотные остатки в границах внеклеточного домена/ β -пропеллерных участков LRP6), принимающие участие в связывании LRP6 с антителами, не идентифицированы ни в WO 2009/056634, ни в WO 2011/138391 или WO 2013/067355 и лишь частично идентифицированы в WO 2011/119661. В частности, связывающие LRP6 антитела способны подавлять передачу сигнала Wnt с помощью альтернативных механизмов, соответствующих связыванию с различными участками LRP6, включая прямую конкуренцию с Wnts либо ингибирование образования тройных рецепторных комплексов (Wnt-LRP6-Frizzled), тогда как другие усиливают передачу сигнала, возможно, путем образования рецепторных кластеров (Ahn и др." Structural basis of Wnt signaling inhibition by Dickkopf binding to LRP5/6". Dev. Cell. 2011; 21(5):862-73).

Тем не менее, ни одна из описанных в уровне техники связывающих молекул пока что не была допущена органами здравоохранения к применению в качестве лекарственного средства для лечения какой-либо болезни. Говоря конкретнее, подобное применение требует очень особых связывающих свойств, правильной специфичности, чтобы такие молекулы не связывали, не активировали или не ингибировали другие мишени (например, приводя к нежелательной активации или ингибированию других сигнальных путей, либо же недостаточной активации или ингибированию по отношению к целевым изоформам), в случае би- или мультиспецифичных агентов - надлежащей сбалансированности двух или более специфичностей связывания, надлежащих фармакокинетических и фармакодинамических свойств, приемлемого токсикологического профиля и конечно же эффективности *in vivo*.

В свете вышеизложенного существует потребность в новых терапевтических агентах, позволяющих эффективно лечить различные типы раковых заболеваний и опухолей. Таким образом, задачей изобретения является предоставление подобных фармакологически активных агентов, которые могут использоваться в лечении ряда раковых заболеваний, включая НМКРЛ и ТНРМЖ.

В частности, задачей изобретения является предоставление подобных фармакологически активных агентов, композиций и/или способов лечения, которые имеют определенные преимущества по сравнению с используемыми и/или известными из уровня техники на данный момент агентами, композициями и/или способами. Эти преимущества включают эффективность *in vivo*, улучшенные терапевтические и фармакологические свойства, меньшее количество побочных эффектов, а также другие благоприятные свойства, такие как упрощенное изготовление или сниженная стоимость товаров, в особенности по сравнению с уже известными потенциальными лекарственными препаратами.

Краткое описание изобретения

Согласно первому аспекту изобретения настоящим изобретением обеспечены полипептиды, которые специфично связываются с LRP5 или LRP6, причем подобный полипептид согласно изобретению содержит первый иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен (а), выбранный из группы иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов от (I) до (III), определяемых наличием следующих CDR-последовательностей:

(I):

CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)

CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)

CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)

(II):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)

CDR2: AIRRSGRRTYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)

CDR3: ARRVRSSSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6)

(III):

CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)

CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)

CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEY (= SEQ ID NO:9),

и второй иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен (б), выбранный из группы иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов (IV) и (V), определяемых наличием следующих CDR-последовательностей:

(IV):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)

CDR2: AISWGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)

CDR3: SPIPYGSLRRRNNYDY (= SEQ ID NO:12)

(V):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= SEQ ID NO:15).

Термины "первый" и "второй" по отношению к этим иммуноглобулиновым отдельным вариабельным доменам предназначены только для обозначения того, что эти домены являются двумя разными доменами (так как они, по меньшей мере, содержат разные CDR-последовательности). Поэтому данные термины не следует понимать как обозначающие точный порядок или последовательность доменов в подобной полипептидной цепи.

Полипептиды согласно изобретению необязательно содержат третий иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен, в особенности такой, как альбуминсвязывающий иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен, как то домен Alb11, содержащий следующие CDR:

CDR1(Alb11): SFGMS (= SEQ ID NO:16)

CDR2(Alb11): SISGSGSDTLYADSVKG (= SEQ ID NO:17)

CDR3(Alb11): GGSLSR (= SEQ ID NO:18).

Согласно более конкретному варианту осуществления полипептиды согласно изобретению включают иммуноглобулиновые отдельные вариабельные домены, являющиеся доменами VHH, предпочтительно гуманизированными доменами VHH.

Согласно еще более конкретному варианту осуществления полипептиды согласно изобретению содержат первый иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен (а), выбранный из группы иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов от (I) до (III), которые имеют следующие последовательности:

(I):

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSTYTVGWFRQAPGKEREFV
AAIRRRGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCAADTRT
VALLQYRYDYWGQGLTVTVSS

(= SEQ ID NO:19)

(II):

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFV
AAIRRSGRRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCAAARR
VRSSTRYNTGTWWWEYWGQGLTVTVSS

(= SEQ ID NO:20)

(III):

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKEREF
VAAIVRSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCAADR
RGRGENYILLYSSGRYEYWGQGLTVTVSS

(= SEQ ID NO:21),

и второй иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен (б), выбранный из группы, состоящей из иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов (IV) и (V), которые имеют следующие последовательности:

(IV):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISW
 SGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCAASPIPYGSL
 RRRNNYDYWGQGLTVTVSS

(= SEQ ID NO:22), и

(V):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREF
 VAAISWRSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCAADP
 RGYGVAYVSAYYEYWGQGLTVTVSS

(= SEQ ID NO:23).

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления полипептиды согласно изобретению дополнительно содержат фрагмент, продлевающий период полувыведения, при этом указанный фрагмент, продлевающий период полувыведения, ковалентно связан с указанным полипептидом и обязательно выбран из группы, состоящей из альбуминсвязывающего фрагмента, такого как альбуминсвязывающий пептид или альбуминсвязывающий иммуноглобулиновый домен, предпочтительно альбуминсвязывающий иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен, более предпочтительно домен Alb11, трансферринсвязывающего фрагмента, такого как антитрансферриновый иммуноглобулиновый домен, молекулы полиэтиленгликоля, человеческого сывороточного альбумина, а также фрагмента человеческого сывороточного альбумина.

Особенно предпочтительными являются полипептиды, которые в придачу к двум иммуноглобулиновым отдельным вариабельным доменам (а) и (б) согласно описанию выше содержат домен Alb11, имеющий следующую последовательность:

EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSS
 ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTTLYLMNSLRPEDTAVYYCTI
 GGSLSRSSQGLTVTVSS

(= SEQ ID NO:24)

Согласно следующему варианту осуществления изобретение охватывает конкретные полипептиды, содержащие или состоящие из любой из следующих трех полипептидных цепей:

F13500575 с последовательностью SEQ ID NO: 25,

F13500571 с последовательностью SEQ ID NO: 26 и

F13500720 с последовательностью SEQ ID NO: 27.

Согласно дальнейшим аспектам изобретение касается молекул нуклеиновых кислот, векторов экспрессии, клеток-хозяев, а также способов производства, используемых для изготовления изобретенного полипептида. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды согласно изобретению, в выделенном виде могут быть использованы для конструирования соответствующих векторов экспрессии, которые затем могут быть перенесены путем трансфекции в клетки-хозяева, используемые для биофармацевтического производства полипептидов согласно изобретению. Подобные способы изготовления, как правило, включают этапы культивирования клетки-хозяина в условиях, делающих возможной экспрессию полипептида, выделение полипептида и его очистку известными в области методами.

Дальнейшие аспекты, варианты осуществления, применения и способы, в которых используются полипептиды согласно изобретению, будут ясны из нижеследующего детального описания изобретения и приложенной формулы.

Изобретением предоставлены новые молекулы, которые делают возможным более эффективное лечение различных типов рака, таких как ТНРМЖ, КРР и НМКРЛ, с меньшим количеством побочных эффектов. Полипептиды согласно изобретению обеспечивают неожиданный терапевтический эффект (т.е. действенность) при лечении больных раком пациентов, заключающийся в том, что они способны вызывать регресс опухоли, приводящий к полному патоморфологическому ответу (пПО). Ожидается, что это, в свою очередь, приведет к значительному улучшению выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости, особенно в случае большой нереализованной медицинской потребности, такой как, например, при раке молочной железы. Таким образом, полипептиды согласно изобретению обеспечивают новые терапевтические возможности для лечения ряда типов рака, в особенности тех, где выявляют регулируемый сигнальный путь Wnt и накопление β -катенина.

Более того, полипептиды согласно изобретению легко производить, они обладают высокой стабильностью и низкой антигенностью, а также открывают ряд возможностей относительно путей введения, помимо инъекций и инфузий.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показано схематическое изображение бипаратопных полипептидов-антагонистов переда-

чи сигнала Wnt1 и Wnt3a. Они состоят из трех доменов, два из которых связываются с определенными эпитопами LRP5 и LRP6 (блокатор Wnt1 и Wnt3a) и один служит для продления периода полувыведения (домен, связывающийся с человеческим сывороточным альбумином).

На фиг. 2 показано отсутствие корреляции между анализами связывания по методам FACS и ELISA для репрезентативного количества LRP6-связывающих VHH, полученных при иммунизации лам. Панель VHH под номером "1" характеризуется высокой аффинностью к клеткам, экспрессирующим LRP6 на плазматической мембране, выявленной при помощи анализа связывания FACS (по оси y показаны значения MCF). Панель VHH под номером "2" характеризуется высокой аффинностью к рекомбинантному внеклеточному домену человеческого LRP6 (rhLRP6-Fc), выявленной при помощи анализа связывания ELISA (по оси x показаны значения OD405).

На фиг. 3 показано связывание трех бипаратопных перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-конструктов с продленным периодом полувыведения с LRP5 (фиг. 3А) и LRP6 (фиг. 3В), которые сверхэкспрессируются в клеточных линиях HEK293, по сравнению с отрицательным контролем, состоящим из неацелированного связывателя (VHH-конструкт, связывающийся с бактериальным белком, который в клетках HEK293 не экспрессируется).

На фиг. 4 показана полная конкуренция трех бипаратопных перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-конструктов с продленным периодом полувыведения с DKK1 за связывание как с человеческим LRP5 (фиг. 4А), так и человеческим LRP6 (фиг. 4В), которые сверхэкспрессируются в клеточных линиях HEK293, выявленная анализом DKK1-конкуренции на основе FACS.

На фиг. 5 показано полное ингибирование пути Wnt1 и Wnt3a тремя бипаратопными перекрестнореактивными по LRP5/LRP6 VHH-конструктами с продленным периодом полувыведения (фиг. 5А) и сравнение с другими молекулами, связывающимися LRP6 (фиг. 5В: Knob HC YW210.09 и MOR08168IgG1LALA 6475 scfv; фиг. 5С: 802Т) в комбинированном анализе по гену-репортеру Wnt1 и Wnt3a.

На фиг. 6 показано ингибирование Wnt-сигналинга в раковых клетках, выявляемое ингибированием относительной экспрессии мРНК Axin2 (фиг. 6А), а также пролиферацией клеток (фиг. 6В), оцениваемой по снижению процента (%) жизнеспособных клеток, после обработки тремя бипаратопными перекрестнореактивными по LRP5/LRP6 VHH-конструктами с продленным периодом полувыведения (в конечной концентрации 1 мМ) и после обработки 802Т, по сравнению с F013500571 и необработанными (контрольными) клетками (диаграммы с левой и правой сторон фиг. 6В); для обработки одним бипаратопным LRP5/LRP6 конструктором с продленным периодом полувыведения (фиг. 6С) и 802Т (фиг. 6Д) показаны кривые зависимости ответа от дозы.

На фиг. 7 показана эффективность бипаратопных перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-конструктов с продленным периодом полувыведения *in vivo* (F013500571 на фиг. 7А и F013500720 на фиг. 7В), а также Knob HC YW210.09 (фиг. 7С), на моделях опухолей, вызванных Wnt (ксенотрансплантатная модель MMTV-Wnt1).

На фиг. 8 показано ингибирование пути Wnt в опухолях, обрабатываемых бипаратопными перекрестнореактивными по LRP5/LRP6 VHH-конструктами с продленным периодом полувыведения F013500571 и F013500720, выявляемое снижением уровня экспрессии мРНК Axin2 по сравнению с контрольной группой.

На фиг. 9 показано влияние подавления Wnt3a-сигналинга на высвобождение провоспалительного цитокина ФНО- α дендритными клетками (фиг. 9А), а также влияние на активацию Т-клеток, выявляемую высвобождением интерферона- γ , после обработки бипаратопным перекрестнореактивным по LRP5/LRP6 VHH-конструктором с продленным периодом полувыведения. Каждый символ обозначает отдельного донора дендритных клеток (ДК). Приведенные данные нормализованы до уровней ФНО- α в необработанном контроле (фиг. 9А), и каждый символ обозначает уникальную донорскую пару для ДК и Т-клеток (панель В).

Детальное описание изобретения

Определения.

Вышеизложенные и другие аспекты и варианты осуществления изобретения будут ясны из приведенного далее описания, в котором

а) если не указано или не определено иное, все использованные термины имеют обычное для данной области значение, которое очевидно специалисту. К примеру, настоящим ссылаемся на стандартные пособия, такие как Sambrook и др., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2-е изд.), Т. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, Нью-Йорк, (1990), Roitt и др., "Immunology" (2-е изд.), Gower Medical Publishing, Лондон, Нью-Йорк (1989), а также на процитированные здесь документы общего уровня техники. Кроме того, если не указано иное, все способы, этапы, методики и манипуляции, конкретные детали которых не описаны, могут быть выполнены и выполнялись известным *per se* способом, что будет ясно специалисту. Для примера опять-таки ссылаемся на стандартные пособия, процитированные здесь документы общего уровня техники и дальнейшие упоминаемые документы;

б) если не указано иное, термины "иммуноглобулин" и "последовательность иммуноглобулина" - используются ли они для обозначения тяжелоцепочечного антитела либо же обычного 4-цепочечного антитела - использованы в качестве общих терминов, охватывающих полноразмерные антитела, их отдельные цепи, а также любые их части, домены или фрагменты (включая, но не ограничиваясь ими, антигенсвязывающие домены либо фрагменты, такие как V_HH-домены или V_H/V_L-домены соответственно). Кроме того, используемый здесь термин "последовательность" (например, в составе таких терминов, как "последовательность иммуноглобулина", "последовательность антитела", "последовательность (отдельного) переменного домена", "V_HH-последовательность" или "последовательность белка") следует в целом понимать как охватывающий и соответствующую аминокислотную последовательность, и кодирующие ее последовательности нуклеиновой кислоты или нуклеотидные последовательности, если только контекстом не подразумевается более ограниченное толкование;

в) термин "домен" (полипептида или белка) здесь и далее обозначает складчатую белковую структуру, которая способна удерживать свою третичную структуру независимо от остального белка. Как правило, домены отвечают за отдельные функциональные свойства белков, и во многих случаях могут быть добавлены, удалены или перенесены на другой белок без потери функции остатка белка и/или домена.

г) Термин "иммуноглобулиновый домен" здесь и далее использован для обозначения глобулярного участка в цепи антитела (такой как, например, цепь обычного 4-цепочечного антитела или тяжелоцепочечного антитела) либо же полипептида, который по сути состоит из такого глобулярного участка. Иммуноглобулиновые домены отличаются тем, что сохраняют характерную для молекул антител иммуноглобулиновую укладку, представляющую собой 2-слойный "сэндвич" из примерно семи антипараллельных β-нитей, уложенных в два β-листа, необязательно стабилизированные консервативной дисульфидной связью;

д) термин "иммуноглобулиновый переменный домен" здесь и далее обозначает иммуноглобулиновый домен, состоящий по сути из четырех "каркасных участков", которые здесь и в документах уровня техники обозначаются как "каркасный участок 1" или "FR1"; "каркасный участок 2" или "FR2"; "каркасный участок 3" или "FR3" и "каркасный участок 4" или "FR4" соответственно; эти каркасные участки перемежаются тремя "участками, определяющими комплементарность" или "CDR", которые здесь и в документах уровня техники обозначаются как "определяющий комплементарность участок 1" или "CDR1"; "определяющий комплементарность участок 2" или "CDR2" и "определяющий комплементарность участок 3" или "CDR3" соответственно. Таким образом, общую структуру или последовательность иммуноглобулинового переменного домена можно отобразить в следующем виде: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. Именно иммуноглобулиновый переменный домен(ы) придает антителу специфичность по антигену, поскольку на нем находится антигенсвязывающий участок;

е) термин "иммуноглобулиновый отдельный переменный домен" здесь и далее обозначает иммуноглобулиновый переменный домен, который способен специфично связываться с эпитопом антигена, не будучи спаренным с дополнительным переменным иммуноглобулиновым доменом. Одним из примеров иммуноглобулиновых отдельных переменных доменов в контексте данного изобретения являются "доменные антитела", такие как иммуноглобулиновые отдельные переменные домены V_H и V_L (V_H-домены и V_L-домены). Другим важным примером иммуноглобулиновых отдельных переменных доменов являются "V_HH-домены" (или же просто V_HH) верблюдовых, определение которым дано ниже.

В свете вышеизложенного определение антигенсвязывающий домен обычного 4-цепочечного антитела (такого как молекула IgG, IgM, IgA, IgD или IgE; известны из уровня техники) или Fab-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, F_v-фрагмента, такого как дисульфидносшитый F_v- или scF_v-фрагмент, или диатела (все известны из уровня техники), происходящий от подобного обычного 4-цепочечного антитела, как правило, не будет считаться иммуноглобулиновым отдельным переменным доменом, так как в этих случаях связывание с соответствующим эпитопом антигена обычно не происходит при участии только одного (отдельного) иммуноглобулинового домена, но требует пары (объединенных) иммуноглобулиновых доменов, таких как переменные домены легкой и тяжелой цепи, т.е. пары V_H-V_L иммуноглобулиновых доменов, которые совместно связываются с эпитопом соответствующего антигена;

е1) "V_HH-домены", известные также как V_HH, V_HH-домены, V_HH-фрагменты антител и V_HH-антитела, изначально были описаны как антигенсвязывающие иммуноглобулиновые (переменные) домены "тяжелоцепочечных антител" (т.е. "антител, не имеющих легких цепей"; Hamers-Casterman C, Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E.B., Bendahman N., Hamers R.: "Naturally occurring antibodies devoid of light chains"; Nature 363, 446-448 (1993)). Термин "V_HH-домен" был выбран, чтобы отличать такие переменные домены от переменных доменов тяжелой цепи, имеющих в обычных 4-цепочечных антителах (которые здесь и далее обозначены как "V_H-домены" или "V_H-домены") и от переменных доменов легкой цепи, имеющих в обычных 4-цепочечных антителах (которые здесь и далее обозначены как "V_L-домены" или "V_L-домены"). V_HH-домены способны специфично связываться с эпитопом без дополнительного антигенсвязывающего домена (в отличие от V_H- или V_L-доменов обычного 4-цепочечного антитела, в случае которого V_L- и V_H-домены распознают эпитоп совместно). V_HH-домены являются малыми, устойчивыми и эффективными антигенраспознающими единицами, образованными отдельным иммуноглобулиновым доменом.

В контексте настоящего изобретения термины V_{HH}-домен, V_{HH}, V_{HH}-домен, V_{HH}-фрагмент антитела, V_{HH}-антитело, а также "Nanobody®" и "Nanobody"-домен ("Nanobody" является торговой маркой компании Ablynx N.V.; Гент; Бельгия) применяются взаимозаменяемо и обозначают представителей иммуноглобулиновых отдельных переменных доменов (имеющих структуру FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 и специфично связывающихся с эпитопом, не нуждаясь для этого в присутствии второго иммуноглобулинового переменного домена), которые также можно отличить от V_H-доменов по так называемым "отличительным остаткам" согласно определению в, например, WO 2009/109635, фиг. 1.

Аминокислотные остатки V_{HH}-домена нумеруют по общей системе нумерации V_H-доменов, разработанной Kabat и др. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Бетесда, Мэриленд, Публикация № 91), согласно ее применению для V_{HH}-доменов Верблюдовых, показанному, например, на фиг. 2 из Riechmann и Muyldermans, J. Immunol. Methods 231, 25-38 (1999). Согласно этой системе нумерации

FR1 состоит из аминокислотных остатков в положениях 1-30,
 CDR1 состоит из аминокислотных остатков в положениях 31-35,
 FR2 состоит из аминокислотных остатков в положениях 36-49,
 CDR2 состоит из аминокислотных остатков в положениях 50-65,
 FR3 состоит из аминокислотных остатков в положениях 66-94,
 CDR3 состоит из аминокислотных остатков в положениях 95-102,
 FR4 состоит из аминокислотных остатков в положениях 103-113.

Однако следует отметить - и это хорошо известно для V_H-доменов и для V_{HH}-доменов - что общее количество аминокислотных остатков в каждом CDR может различаться и может не соответствовать общему количеству аминокислотных остатков, предусмотренному нумерацией по Kabat (а именно, одно или более положений согласно нумерации по Kabat в реальной последовательности могут не быть заняты, либо же реальная последовательность может содержать больше аминокислотных остатков, чем предусмотрено системой Kabat). Это значит, что в целом нумерация по Kabat может соответствовать или не соответствовать реальной нумерации аминокислотных остатков в реальной последовательности.

Из уровня техники известны альтернативные методы нумерации аминокислотных остатков V_H-доменов, которые могут аналогичным образом применяться и к V_{HH}-доменам. Тем не менее, если не указано иное, в настоящем описании, формуле и на фигурах используется нумерация по Kabat, примененная к V_{HH}-доменам согласно описанию выше.

Общее количество аминокислотных остатков в V_{HH}-домене, как правило, находится в диапазоне от 110 до 120, часто между 112 и 115. Следует, однако, отметить, что для описанных здесь целей могут подходить и более короткие и длинные последовательности.

Дальнейшие структурные характеристики и функциональные свойства V_{HH}-доменов и содержащих их полипептидов могут быть подытожены следующим образом.

V_{HH}-домены ("спроектированные" природой для функционального связывания с антигеном без присутствия переменного домена легкой цепи и без какого-либо взаимодействия с ним) способны функционировать как отдельная, относительно небольшая функциональная антигенсвязывающая структурная единица, домен или полипептид. Это отличает V_{HH}-домены от V_H- и V_L-доменов обычного 4-цепочечного антитела, которые сами по себе, как правило, не пригодны к практическому применению в качестве отдельных антигенсвязывающих белков или отдельных иммуноглобулиновых переменных доменов, но нуждаются в комбинировании в той или иной форме, чтобы обеспечить функциональную антигенсвязывающую единицу (как, например, в обычных фрагментах антител, таких как Fab-фрагменты; в scFv, состоящих из V_H-домена, ковалентно связанного с V_L-доменом).

Благодаря этим уникальным свойствам использование V_{HH}-доменов - отдельно или в качестве части большего полипептида - имеет ряд значительных преимуществ по сравнению с использованием обычных V_H- и V_L-доменов, scFv или обычных фрагментов антител (таких как Fab- или F(ab')₂-фрагменты):

для высокоаффинного и высокоселективного связывания антигена требуется только один домен, так что отпадает необходимость иметь в наличии два отдельных домена, а также удостоверяться в правильной пространственной конформации и конфигурации этих двух доменов (т.е. при помощи специальных линкеров, как в случае scFv);

V_{HH}-домены могут экспрессироваться с одного гена и не требуют посттрансляционной укладки или модификаций;

V_{HH}-домены можно легко встроить в мультивалентные и мультиспецифичные форматы (о чем говорится далее);

V_{HH}-домены хорошо растворимы и не обладают склонностью к агрегации (как мышиные антигенсвязывающие домены, описанные Ward и др., Nature 341: 544-546 (1989));

V_{HH}-домены очень устойчивы к действию температуры, pH, протеаз и других денатурирующих агентов или условий и поэтому могут изготавливаться, храниться или транспортироваться без использования холодильного оборудования, тем самым экономя финансы, время и предотвращая последствия для окружающей среды;

V_{HH}-домены относительно просто и дешево изготовить, даже в производственных масштабах. На-

пример, VHH-домены и содержащие их полипептиды можно изготовить микробным культивированием (например, согласно описанию ниже), не используя системы экспрессии млекопитающих, требующиеся, например, для обычных фрагментов антител;

VHH-домены по сравнению с обычными 4-цепочечными антителами и их антигенсвязывающими фрагментами относительно невелики (приблизительно 15 кДа или в 10 раз меньше, чем обычный IgG), а потому

лучше проникают в ткани и

могут быть введены в более высоких дозах нежели обычные 4-цепочечные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты;

VHH-домены могут проявлять так называемые свойства полостного связывания (среди прочего благодаря удлиненной по сравнению с обычными VH-доменами петле их CDR3), и потому им доступны также мишени и эпитопы, недоступные для обычных 4-цепочечных антител и их антигенсвязывающих фрагментов.

Способы получения VHH-доменов, связывающихся с конкретным антигеном или эпитопом, были описаны ранее, например, в WO 2006/040153 и WO 2006/122786. Также в этом документе детально описано, что VHH-домены верблюдовых можно "гуманизировать", заменив один или более аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности оригинальной VHH-последовательности одним или более аминокислотными остатками, находящимися в тех же положениях VH-домена обычного 4-цепочечного антитела человека. Гуманизированный VHH-домен может содержать одну или больше полностью человеческих последовательностей каркасных участков, а в еще более конкретном варианте осуществления может содержать человеческие последовательности каркасных участков, полученные из DP-29, DP-47, DP-51 или их части, необязательно скомбинированные с последовательностями JH, такими как JH5.

е2) "Доменные антитела", также известные как "Dab", "Domain Antibodies" и "dAbs" (где термины "Domain Antibodies" и "dAbs" используются в качестве торговых марок группой компаний GlaxoSmith-Kline), были описаны, например, в Ward E.S. и др.: "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*"; *Nature* 341: 544-546 (1989); Holt L.J. и др.: "Domain antibodies: proteins for therapy"; *TRENDS in Biotechnology* 21(11): 484-490 (2003); а также в WO 2003/002609.

Доменные антитела по сути соответствуют VH- или VL-доменам млекопитающих, не являющихся верблюдовыми, в частности человеческих 4-цепочечных антител. Чтобы иметь возможность связывать эпитоп как отдельный антигенсвязывающий домен, т.е. не будучи в паре с соответствующим VL- или VH-доменом, необходим специальный отбор по таким антигенсвязывающим свойствам, например, при помощи библиотек последовательностей отдельных человеческих VH- или VL-доменов.

Доменные антитела, как и VHH, имеют молекулярную массу от приблизительно 13 до приблизительно 16 кДа, а если получены из полностью человеческих последовательностей, то не требуют гуманизации для, например, терапевтического применения на людях. Как и в случае VHH-доменов, они хорошо экспрессируются в прокариотных системах экспрессии, что обеспечивает значительное уменьшение общих производственных затрат.

Доменные антитела, как и VHH-домены, можно подвергать аффинному созреванию, вводя в аминокислотную последовательность одного или более CDR изменения, которые приводят к улучшению аффинности получаемого иммуноглобулинового отдельного варибельного домена к его соответствующему антигену по сравнению с соответствующей родительской молекулой. Подвергнутые аффинному созреванию молекулы иммуноглобулиновых отдельных варибельных доменов согласно изобретению можно изготовить известными из уровня техники способами, например, описанными у Marks и др., 1992, *Biotechnology* 10:779-783, или Barbas и др., 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813.; Shier и др., 1995, *Gene* 169:147-155; Yelton и др., 1995, *Immunol.* 155: 1994-2004; Jackson и др., 1995, *J. Immunol.* 154(7):3310-9; а также Hawkins и др., 1992, *J. Mol. Biol.* 226(3): 889 896; K.S. Johnson and R.E. Hawkins, "Affinity maturation of antibodies using phage display", Oxford University Press 1996.

е3) Кроме того, специалисту в данной области также будет ясно, что можно "пересадить" один или более из вышеупомянутых CDR на другие "каркасы", включая, но не ограничиваясь ими, каркасы человеческого происхождения или неиммуноглобулиновые каркасы. Подходящие каркасы и методики для подобной пересадки CDR известны из уровня техники.

ж) Термины "эпитоп" и "антигенная детерминанта", которые могут использоваться взаимозаменяемо, обозначают часть макромолекулы, такой как полипептид, распознаваемую антигенсвязывающими молекулами, такими как обычные антитела или полипептиды согласно изобретению, а более конкретно антигенсвязывающим участком этих молекул. Эпитопы определяют минимальный участок связывания иммуноглобулина и потому являются мишенью специфичности иммуноглобулина.

Часть антигенсвязывающей молекулы (такой как обычное антитело или полипептид согласно изобретению), которая распознает эпитоп, называют паратопом.

з) Термин "бипаратопная" (антиген-)связывающая молекула или "бипаратопный" полипептид здесь и далее обозначает полипептид, содержащий первый иммуноглобулиновый отдельный варибельный

домен и второй иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен согласно данному здесь определению, причем эти два вариабельных домена способны связываться с двумя разными эпитопами одного антигена, при этом один моноспецифичный иммуноглобулин, такой как, например, обычное антитело или один иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен, в нормальных условиях не связывается с обоими этими эпитопами одновременно. Бипаратопные полипептиды согласно изобретению состоят из вариабельных доменов с разными специфичностями по эпитопам и не содержат взаимно комплементарных пар вариабельных доменов, связывающихся с одним и тем же эпитопом. Поэтому они не конкурируют друг с другом за связывание с LRP5 или LRP6.

и) Полипептид (такой как иммуноглобулин, антитело, иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен, полипептид согласно изобретению либо антигенсвязывающая молекула или ее фрагмент в общем понимании), способный "связывать", "связываться с", "специфично связывать" или "специфично связываться с", обладающий "аффинностью к" и/или "специфичностью по" определенному эпитопу, антигену или белку (либо по крайней мере одной его части, фрагменту или эпитопу), называют "полипептидом к" или "полипептидом, направленным против" указанного эпитопа, антигена или белка, либо же он является "связывающей" молекулой в отношении такого эпитопа, антигена или белка.

к) В целом термин "специфичность" относится к ряду различных типов антигенов или эпитопов, с которыми может связываться конкретная антигенсвязывающая молекула или антигенсвязывающий белок (такой как иммуноглобулин, антитело, иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен или полипептид согласно изобретению). Специфичность антигенсвязывающего белка можно определить на основании его аффинности и/или авидности. Аффинность, отображаемая равновесной константой диссоциации антигена и антигенсвязывающего белка (K_D), является мерой силы связывания эпитопа и антигенсвязывающего участка антигенсвязывающего белка: чем меньше значение K_D , тем больше сила связывания эпитопа и антигенсвязывающей молекулы (альтернативно аффинность можно выражать как константу аффинности (K_A), которая является $1/K_D$). Как будет понятно специалисту (например, на основании дальнейшей информации из этого документа), аффинность можно определить известным *per se* способом в зависимости от конкретного интересующего антигена. Авидность - это мера силы связывания антигенсвязывающей молекулы (такой как иммуноглобулин, антитело, иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен или полипептид согласно изобретению) с конкретным рассматриваемым антигеном. Авидность зависит как от аффинности эпитопа и его антигенсвязывающего участка на антигенсвязывающей молекуле, так и от количества соответствующих применимых сайтов связывания на антигенсвязывающей молекуле.

Как правило, антигенсвязывающие белки (такие как полипептиды согласно изобретению) имеют при связывании константу диссоциации (K_D) от $10E-5$ до $10E-14$ моль/л (М) или меньше, предпочтительно от $10E-7$ до $10E-14$ моль/л (М) или меньше, более предпочтительно от $10E-8$ до $10E-14$ моль/л, еще более предпочтительно от $10E-11$ до $10E-13$ (измеренную, например, анализом Kinetex; известен из уровня техники), и/или константу ассоциации (K_D) по меньшей мере $10E7$ ME-1, предпочтительно по меньшей мере $10E8$ ME-1, более предпочтительно по меньшей мере $10E9$ ME-1, такую как по меньшей мере $10E11$ ME-1. Любое значение K_D выше $10E-4$ М, как правило, полагают указывающим на неспецифичное связывание. Предпочтительно полипептид согласно изобретению связывается с желаемым антигеном с K_D меньшей чем 500 нМ, предпочтительно меньшей чем 200 нМ, более предпочтительно меньшей чем 10 нМ, такой как меньше 500 пМ. Специфичное связывание антигенсвязывающего белка с антигеном или эпитопом можно определить любым подходящим известным *per se* методом, включая, например, описанные здесь анализы, анализ Скэтчарда и/или анализы конкурентного связывания, такие как радиоиммуноанализы (РИА), иммуноферментные анализы (ИФА) и сэндвич-анализы конкуренции, а также различные их варианты, известные *per se* из уровня техники.

л) Термин "перекрестнореактивный" по отношению к связывающим молекулам, способным связываться и с LRP5, и с LRP6 ("перекрестнореактивные по LRP5/LRP6"), следует понимать как то, что такие связывающие молекулы могут специфично связываться с эпитопом, содержащимся в молекуле LRP5, а также альтернативно могут специфично связываться с эпитопом, содержащимся в молекуле LRP6. Обычно такая перекрестная реактивность может возникнуть в случае, когда эпитопы разных белков, с которыми связывается такая связывающая молекула, имеют похожую структуру и/или последовательность, напр., представляют собой консервативные эпитопы, напр., которые есть у входящих в определенное семейство белков (напр., LRP5 и LRP6, которые принадлежат к семейству белков LRP).

м) Аминокислотные остатки обозначены стандартными трехбуквенными или однобуквенными кодами аминокислот, общеизвестными и общепринятыми в данной области. При сравнении двух аминокислотных последовательностей термин "аминокислотная разница" обозначает inserции, делеции или замещения указанного числа аминокислотных остатков в положении эталонной последовательности по сравнению со второй последовательностью. В случае замещения(й) оно(и) предпочтительно является(ются) консервативным(и) аминокислотным(и) замещением(ями), т.е. аминокислотный остаток заменен на другой аминокислотный остаток с похожей химической структурой, и это не влияет или не влияет существенно на функцию, активность или другие биологические свойства полипептида. Подобные консервативные аминокислотные замещения хорошо известны в данной области, например, из

WO 98/49185, где консервативные аминокислотные замещения предпочтительно являются замещениями, при которых одна аминокислота из нижеприведенных групп (I)-(V) замещена другим аминокислотным остатком из той же группы: (I) малые алифатические, неполярные или слабополярные остатки Ala, Ser, Thr, Pro и Gly; (II) полярные, негативно заряженные остатки и их (незаряженные) амиды Asp, Asn, Glu и Gln; (III) полярные, позитивно заряженные остатки His, Arg и Lys; (IV) большие алифатические, неполярные остатки Met, Leu, Ile, Val и Cys; и (V) ароматические остатки: Phe, Tyr и Trp. Особенно предпочтительными являются следующие консервативные аминокислотные замещения:

Ala на Gly или на Ser;
 Arg на Lys;
 Asn на Gln или на His;
 Asp на Glu;
 Cys на Ser;
 Gln на Asn;
 Glu на Asp;
 Gly на Ala или на Pro;
 His на Asn или на Gln;
 Ile на Leu или на Val;
 Leu на Ile или на Val;
 Lys на Arg, на Gln или на Glu;
 Met на Leu, на Tyr или на Ile;
 Phe на Met, на Leu или на Tyr;
 Ser на Thr;
 Thr на Ser;
 Trp на Tyr;
 Tyr на Trp или на Phe;
 Val на Ile или на Leu.

н) Молекула нуклеиновой кислоты или полипептида считается "(в) по сути выделенной (форме)" - например, по сравнению со своим природным биологическим источником и/или реакционной средой или культуральной средой, из которого(й) ее получают - после отделения этой молекулы по меньшей мере от одного другого компонента, с которым она обычно связана в означенном(й) источнике или среде, такого как другая нуклеиновая кислота, другой белок/полипептид, другой биологический компонент или макромолекула либо по меньшей мере один загрязнитель, примесь или второстепенный компонент. В частности, молекула нуклеиновой кислоты или полипептида считается "по сути выделенной" после того, как ее очистили по меньшей мере 2-кратно, в частности по меньшей мере 10-кратно, более конкретно по меньшей мере 100-кратно и до 1000-кратно или больше. Молекула нуклеиновой кислоты или полипептида, находящаяся в "по сути выделенной форме", предпочтительно по сути гомогенна, что определено с помощью подходящего метода, такого как подходящий хроматографический метод, такой как электрофорез в полиакриламидном геле.

о) "Идентичность последовательностей", например, двух последовательностей иммуноглобулиновых отдельных переменных доменов, отражает процентную долю аминокислот, которые в этих двух последовательностях совпадают. Ее можно рассчитать или определить по описанию в абзаце f) на стр. 49 и 50 WO 2008/020079. "Сходство последовательностей" отражает процентную долю аминокислот, которые либо идентичны, либо являются консервативными аминокислотными замещениями.

Специфичность по мишени.

Полипептиды согласно изобретению специфичны по LRP5 и LRP6 в том смысле, что содержат иммуноглобулиновые отдельные переменные домены, специфично связывающиеся с эпитопами, наличествующими в обоих этих молекулах (молекулы, перекрестнореактивно связывающие LRP5/LRP6).

Молекулы согласно изобретению связываются с человеческими формами LRP5 и LRP6, а предпочтительно также и с их аналогами у других видов, имеющих значение для разработки лекарств, т.е. LRP5 и LRP6 яванской макаки и мыши.

Полипептиды согласно изобретению.

В самом широком смысле изобретением обеспечены новые фармакологически активные агенты для лечения раковых заболеваний. Агенты согласно изобретению принадлежат к новому классу связывающих молекул, а именно к бипаратопным перекрестнореактивным по LRP5/LRP6 полипептидам, которые содержат два или больше иммуноглобулиновых отдельных переменных доменов, связывающихся с LRP5 и/или LRP6 по разным эпитомам. Термины "перекрестнореактивный" и "бипаратопный" пояснены выше, так что бипаратопные перекрестнореактивные по LRP5/LRP6 молекулы можно определить как молекулы, способные связываться с LRP5 по двум разным эпитомам, содержащимся в белке LRP5, а также способные связываться с LRP6 по двум соответствующим эпитомам, содержащимся в белке LRP6.

Более конкретно полипептиды согласно изобретению содержат

первый иммуноглобулиновый отдельный переменный домен, способный специфично связываться и с LRP5, и с LRP6 (перекрестнореактивный по LRP5/LRP6) по эпитопу/таким образом, который приво-

дит к подавлению сигнального пути Wnt1, подавляя активируемую Wnt1 транскрипцию гена-мишени, и второй иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен, способный специфично связываться и с LRP5, и с LRP6 (перекрестнореактивный по LRP5/LRP6) по эпитопу/таким образом, который приводит к подавлению сигнального пути Wnt3a, подавляя активируемую Wnt3a транскрипцию гена-мишени.

Благодаря двум иммуноглобулиновым отдельным вариабельным доменам в подобном полипептиде, причем два домена связываются с разными эпитопами (имеющими отношение к передаче сигнала Wnt1/Wnt3a), эти молекулы являются бипаратопными связывающимися молекулами. Этот режим бипаратопного связывания схематически показан на фиг. 1.

В связи с этим следует отметить, что предполагается, что полипептиды согласно изобретению могут связываться с одной отдельной молекулой LRP5 или LRP6 по обоим своим LRP5/LRP6-связывающим доменам, как показано на фиг. 1 (режим внутримолекулярного связывания). Тем не менее, могут иметь место и другие режимы связывания.

Наконец, предполагается, что полипептиды согласно изобретению способны конкурировать с DKK1 - природным лигандом LRP5 и LRP6, препятствующим Wnt1- и Wnt3a-сигналингу - за связывание с LRP5 и LRP6, тем самым ингибируя сигнальные пути Wnt1 и Wnt3a. Тем не менее, эту теорию также не следует понимать как ограничивающую объем изобретения.

Более конкретно полипептиды согласно изобретению специфично связываются с LRP5 или LRP6, причем подобные полипептиды содержат первый иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен (а), выбранный из группы иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов от (I) до (III), определяемых наличием следующих CDR-последовательностей:

(I):

CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)
 CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)
 CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)
 [- CDR домена Wnt1-333E06mod]

(II):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)
 CDR2: AIRRSGRRTYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)
 CDR3: ARRVRSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6)
 [= CDR домена Wnt1-333G06]

(III):

CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)
 CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)
 CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEY (= SEQ ID NO:9)
 [= CDR домена Wnt1-332D03mod],

и второй иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен (б), выбранный из группы иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов (IV) и (V), определяемых наличием следующих CDR-последовательностей:

(IV):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)
 CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)
 CDR3: SPIPYGSLRRRRNNYDY (= SEQ ID NO:12)
 [= CDR домена Wnt3a-093A01]

(V):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)
 CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)
 CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= SEQ ID NO:15)
 [= CDR домена Wnt3a-367B10].

Использование терминов "первый" и "второй" по отношению к этим иммуноглобулиновым отдельным вариабельным доменам предназначено только для обозначения того, что эти домены являются разными доменами, так как они содержат разные CDR-последовательности и связываются с разными эпитопами. Однако данные термины не следует понимать как обозначающие точный порядок или последовательность доменов в подобной полипептидной цепи. Другими словами, вышеозначенные иммуноглобу-

линовые отдельные переменные домены (а) и (б) в полипептиде согласно изобретению могут быть расположены в порядке (а)-(б) или в порядке (б)-(а).

Термин "специфично связываются с LRP5 или LRP6" следует понимать как то, что иммуноглобулиновые отдельные переменные домены (а) и (б) являются перекрестно реактивными по отношению к LRP5 и LRP6. Само собой, связывающие свойства таких молекул определяются их (CDR) последовательностями, так что изложенный выше и в формуле признак "специфично связываются с LRP5 или LRP6" предназначен только для иллюстрирования практического применения изобретения, но не для ограничения его объема.

Имуноглобулиновые отдельные переменные домены, как правило, состоят по сути из четырех каркасных участков (FR1-FR4 соответственно) и трех участков, определяющих комплементарность (CDR1-CDR3 соответственно). Чтобы пребывать в одном полипептиде или полипептидной цепи, указанные первый и второй иммуноглобулиновые отдельные переменные домены должны быть ковалентно связаны, либо напрямую, либо через пептид-линкер.

Поэтому общую структуру молекул согласно изобретению можно также изобразить как FR(a)1 - CDR(a)1 - FR(a)2 - CDR(a)2 - FR(a)3 - CDR(a)3 - FR(a)4 - [пептид-линкер] - FR(б)1 - CDR(б)1 - FR(б)2 - CDR(б)2 - FR(б)3 - CDR(б)3 - FR(б)4, где

FR(a) обозначает каркасный участок первого иммуноглобулинового отдельного переменного домена,

FR(б) обозначает каркасный участок второго иммуноглобулинового отдельного переменного домена,

CDR(a) обозначает CDR первого иммуноглобулинового отдельного переменного домена,

CDR(б) обозначает CDR второго иммуноглобулинового отдельного переменного домена,

[пептид-линкер] обозначает необязательно присутствующий пептид-линкер,

при этом CDR имеют определенные выше последовательности.

Опять-таки следует понимать, что (а) и (б) могут меняться местами, т.е. молекулы с общей структурой FR(б)1 - CDR(б)1 - FR(б)2 - CDR(б)2 - FR(б)3 - CDR(б)3 - FR(б)4 - [пептид-линкер] - FR(a)1 - CDR(a)1 - FR(a)2 - CDR(a)2 - FR(a)3 - CDR(a)3 - FR(a)4 тоже охватываются настоящим изобретением.

Пептид-линкер необязательно содержит третий домен либо состоит из него, такой как альбумин-связывающий иммуноглобулиновый отдельный переменный домен, как-то домен Alb11, содержащий следующие CDR:

CDR(Alb11)1: SFGMS (= SEQ ID NO:16)

CDR(Alb11)2: SISGSGSDTLYADSVKG (= SEQ ID NO:17)

CDR(Alb11)3: GGSLSR (= SEQ ID NO:18)

Отсюда следует группа полипептидов согласно изобретению со следующей общей структурой:

FR(a)1 - CDR(a)1 - FR(a)2 - CDR(a)2 - FR(a)3 - CDR(a)3 - FR(a)4 - [пептид-линкер] - FR(Alb11)1 - CDR(Alb11)1 - FR(Alb11)2 - CDR(Alb11)2 - FR(Alb11)3 - CDR(Alb11)3 - FR(Alb11)4 - [пептид-линкер] - FR(б)1 - CDR(б)1 - FR(б)2 - CDR(б)2 - FR(б)3 - CDR(б)3 - FR(б)4.

Опять-таки, порядок трех иммуноглобулиновых отдельных переменных доменов (а), (б) и Alb11 не закреплен, напротив, полипептиды со следующим порядком вышеуказанных доменов (б)-Alb11 - (а) тоже охватываются.

Более того, изобретением также охвачены полипептиды, в которых домен Alb11 находится на N- или C-конце полипептида (например, Alb11 - (а) - (б), Alb11 - (б) - (а), (а) - (б) - Alb11 или же (б) - (а) - Alb11).

В трех предпочтительных вариантах осуществления полипептиды согласно изобретению содержат иммуноглобулиновые отдельные переменные домены, определенные следующим образом.

Первый предпочтительный вариант осуществления. Полипептиды, содержащие первый иммуноглобулиновый отдельный переменный домен со следующими последовательностями CDR:

CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)

CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)

CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)

и второй иммуноглобулиновый отдельный переменный домен со следующими последовательностями CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)

CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)

CDR3: SPIPYGSLRRRNNYDY (= SEQ ID NO:12).

Второй предпочтительный вариант осуществления. Полипептиды, содержащие первый иммуноглобулиновый отдельный переменный домен со следующими последовательностями CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)

CDR2: AIRRSGRRTYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)

CDR3: ARRVRSSSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6)

и второй иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен со следующими последовательностями CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= SEQ ID NO:15).

Третий предпочтительный вариант осуществления. Полипептиды, содержащие первый иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен со следующими последовательностями CDR:

CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)

CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)

CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEY (= SEQ ID NO:9)

и второй иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен со следующими последовательностями CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= SEQ ID NO:15).

Разумеется, вышеизложенные варианты, т.е. необязательно содержащие пептиды-линкеры и/или дополнительные домены, в особенности домен Alb11, с различным порядком иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов, применимы и к этим трем предпочтительным вариантам осуществления.

В особенно предпочтительном варианте осуществления альбуминсвязывающий иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен расположен между двумя LRP5/LRP6-связывающими иммуноглобулиновыми отдельными вариабельными доменами. Поэтому три особенно предпочтительных варианта осуществления можно представить следующим образом.

Первый особенно предпочтительный вариант осуществления. Полипептиды, содержащие первый (LRP5/LRP6-связывающий) иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен со следующими последовательностями CDR:

CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)

CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)

CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)

альбуминсвязывающий иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен со следующими последовательностями CDR:

CDR1: SFGMS (= SEQ ID NO:16)

CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (= SEQ ID NO:17)

CDR3: GGSLSR (= SEQ ID NO:18);

и второй (LRP5/LRP6-связывающий) иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен со следующими последовательностями CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)

CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)

CDR3: SPIPYGSLRRRNNYDY (= SEQ ID NO:12);

либо в изложенном порядке, либо с измененным порядком вышеуказанных доменов.

Второй особенно предпочтительный вариант осуществления. Полипептиды, содержащие первый (LRP5/LRP6-связывающий) иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен со следующими последовательностями CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)

CDR2: AIRRSGRRTYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)

CDR3: ARRVRSSSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6);

альбуминсвязывающий иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен со следующими последовательностями CDR:

CDR1: SFGMS (= SEQ ID NO:16)

CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (= SEQ ID NO:17)

CDR3: GGSLSR (= SEQ ID NO:18);

и второй (LRP5/LRP6-связывающий) иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен со следующими последовательностями CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)

CDR3: DPRGYGVAYVVSAYYEEY (= SEQ ID NO:15);

либо в изложенном порядке, либо с измененным порядком вышеуказанных доменов.

Третий особенно предпочтительный вариант осуществления. Полипептиды, содержащие первый (LRP5/LRP6-связывающий) иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен со следующими последовательностями CDR:

CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)

CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)

CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEEY (= SEQ ID NO:9);

альбуминсвязывающий иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен со следующими последовательностями CDR:

CDR1: SFGMS (= SEQ ID NO:16)

CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (= SEQ ID NO:17)

CDR3: GGSLSR (= SEQ ID NO:18);

и второй (LRP5/LRP6-связывающий) иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен со следующими последовательностями CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)

CDR3: DPRGYGVAYVVSAYYEEY (= SEQ ID NO:15);

либо в изложенном порядке, либо с измененным порядком вышеуказанных доменов.

Вышеупомянутые последовательности CDR сведены в табл. 1А, 1Б и 1В.

Таблица 1А

Последовательности CDR иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов, препятствующих передаче сигнала Wnt1

	Wnt1-333E06mod	Wnt1-333G06	Wnt1-332D03mod
CDR1	TYTVG (SEQ ID NO:1)	SYAMG (SEQ ID NO:4)	RYTMG (SEQ ID NO:7)
CDR2	AIRRRGSSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	AIRRRGRRTYYADSVKG (SEQ ID NO:5)	AIVRSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:8)
CDR3	DTRTVALLQYRYDY (SEQ ID NO:3)	ARRVRSSTRYNTGTW WWEY (SEQ ID NO:6)	DRRGRGENYILLYSSGRYEEY (SEQ ID NO:9)

Таблица 1Б

Последовательности CDR иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов, препятствующих передаче сигнала Wnt3a

	Wnt3a-093A01	Wnt3a-367B10
CDR1	SYAMG (SEQ ID NO:10)	SYAMG (SEQ ID NO:13)
CDR2	AISWSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:11)	AISWRSGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:14)
	Wnt3a-093A01	Wnt3a-367B10
CDR3	SPIPYGSLRRRRNNYDY (SEQ ID NO:12)	DPRGYGVAYVVSAYYEEY (SEQ ID NO:15)

Последовательности CDR иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов, связывающихся с сывороточным альбумином (домен Alb11)

	Alb11 домен
CDR1	SFGMS (SEQ ID NO:16)
CDR2	SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO:17)
CDR3	GGSLSR (SEQ ID NO:18)

В дополнение к вышеустановленным последовательностям CDR иммуноглобулиновые отдельные вариабельные домены, содержащиеся в полипептидах согласно изобретению, содержат последовательности иммуноглобулиновых каркасных участков (FR). Эти последовательности предпочтительно не являются иммуногенными для людей и потому предпочтительно являются человеческими или гуманизированными FR-последовательностями. Приемлемые человеческие или гуманизированные FR-последовательности известны из уровня техники. Особенно предпочтительные последовательности FR можно найти в показанных ниже вариантах осуществления, описывающих полные иммуноглобулиновые отдельные вариабельные домены, а значит и последовательности CDR и FR.

Согласно более конкретному варианту осуществления полипептиды согласно изобретению включают иммуноглобулиновые отдельные вариабельные домены, являющиеся доменами VHH, предпочтительно гуманизированными доменами VHH.

Согласно еще более конкретному варианту осуществления полипептиды согласно изобретению содержат первый иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен (а), выбранный из группы иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов от (I) до (III), которые имеют следующие последовательности:

(I)

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKEREFVA
AIRRRGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
DTRTVALLQYRYDYWGQGLTVTVSS

[= домен Wnt1-333E06mod; = SEQ ID NO:19]

(II)

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA
AIRRSGRRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
ARRVRSSTRYNTGTWWWEYWGQGLTVTVSS

[= домен Wnt1-333G06; = SEQ ID NO:20], и

(III)

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKEREFVA
AIVRSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
DRRGRGENYILLYSSGRYEYWGQGLTVTVSS

[= домен Wnt1-332D03mod; = SEQ ID NO:21],

и второй иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен (б), выбранный из группы, состоящей из иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов (IV) и (V), которые имеют следующие последовательности:

(IV)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA
AISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
SPIPYGSLRRRRNNYDYWGQGLTVTVSS

[= домен Wnt3a-093A01; = SEQ ID NO:22], и

(V)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA
AISWRSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
DPRGYGVAYVSAYYEYWGQGLTVTVSS

[= домен Wnt3a-367B10; = SEQ ID NO:23].

Предпочтительными вариантами осуществления являются полипептиды, содержащие первый иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 19 и второй иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 22; или

первый иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 20 и второй иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 23; или

первый иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 21 и второй иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 23.

Таким образом, вышеописанные варианты осуществления можно схематически изобразить как иовд(а) - [пептид-линкер] - иовд(б), где "иовд" обозначает соответствующий иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен, а остальные определения и варианты остаются такими же, что и выше, особенно в отношении наличия необязательных пептидов-линкеров и/или дополнительных доменов, особенно домена Alb11, а также в отношении разных порядков иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов.

Согласно конкретным вариантам осуществления вышеуказанные полипептиды могут дополнительно содержать фрагмент, продлевающий период полувыведения, при этом указанный фрагмент, продлевающий период полувыведения, ковалентно связан с указанным полипептидом и необязательно выбран из группы, состоящей из альбуминсвязывающего фрагмента, такого как альбуминсвязывающий пептид или альбуминсвязывающий иммуноглобулиновый домен, предпочтительно альбуминсвязывающий иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен, более предпочтительно домен Alb11, трансферринсвязывающего фрагмента, такого как антитрансферриновый иммуноглобулиновый домен, молекулы полиэтиленгликоля, сывороточного альбумина, предпочтительно человеческого сывороточного альбумина, а также фрагмента (человеческого) сывороточного альбумина.

Последовательность вышеупомянутого иммуноглобулинового отдельного вариабельного домена Alb11 следующая:

EVQLVESGGGLVQPGNSRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSS
ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI
GGSLSRSSQGLTVTVSS

(= домен Alb11; = SEQ ID NO:24)

Дальнейшие примеры иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов, связывающихся с человеческим сывороточным альбумином, известны из уровня техники и детально описаны, например, в международных патентных публикациях WO 2006/122787 и WO 2008/028977. Другие пептиды, связывающиеся с человеческим сывороточным альбумином, описаны, например, в WO 2008/068280, WO 2009/127691 и WO 2011/095545.

Таким образом, тремя предпочтительными конкретными вариантами осуществления изобретения являются

первый предпочтительный конкретный вариант осуществления. Полипептиды, содержащие первый (LRP5/LRP6-связывающий) иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 19;

альбуминсвязывающий иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 24;

второй (LRP5/LRP6-связывающий) иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 22;

либо в изложенном порядке, либо с измененным порядком вышеуказанных трех доменов;

второй предпочтительный конкретный вариант осуществления. Полипептиды, содержащие

первый (LRP5/LRP6-связывающий) иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 20;

альбуминсвязывающий иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 24;

второй (LRP5/LRP6-связывающий) иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 23;

либо в изложенном порядке, либо с измененным порядком вышеуказанных трех доменов;

третий предпочтительный конкретный вариант осуществления. Полипептиды, содержащие

первый (LRP5/LRP6-связывающий) иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 21;

альбуминсвязывающий иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 24;

второй (LRP5/LRP6-связывающий) иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 23;

либо в изложенном порядке, либо с измененным порядком вышеуказанных трех доменов.

В еще более предпочтительных конкретных вариантах осуществления альбуминсвязывающий иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен расположен между двумя LRP5/LRP6-связывающими иммуноглобулиновыми отдельными вариабельными доменами.

Последовательности вышеупомянутых иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов сведены в табл. 2А, 2Б и 2В.

Таблица 2А

Последовательности иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов, препятствующих передаче сигнала Wnt1

VHH ID SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Wnt1- 333E06 mod SEQ ID NO:19	AVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAASGR TFS	TYTVG	WFRQAP GKREFV A	AIRRRG SSTYYA DSVKG	RFTISRDN SKNT VYLQMNSLRPE DTAVYYCAA	DTRTV ALLQY RYDY	WGQGT LVTVSS
Wnt1- 333G06 SEQ ID NO:20	AVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAASGG TFS	SYAM G	WFRQAP GKREFV A	AIRRS G RRTYYA DSVKG	RFTISRDN SKNT VYLQMNSLRPE DTAVYYCAA	ARRVR SSTRY NTGT WWWE Y	WGQGT LVTVSS
Wnt1- 332D03 mod SEQ ID NO:21	AVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAASGL TFS	RYTM G	WFRQAP GKREFV A	AIVRS G GSTYYA DSVKG	RFTISRDN SKNT VYLQMNSLRPE DTAVYYCAA	DRRGR GENYI LLYSS GRYEY	WGQGT LVTVSS

Таблица 2Б

Последовательности иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов, препятствующих передаче сигнала Wnt3a

VHH ID SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Wnt3a- 093A01 SEQ ID NO:22	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAASGR TFS	SYAM G	WFRQAP GKREFV A	AISWSG GSTYYA DSVKG	RFTISRDN SKNT VYLQMNSLRPE DTAVYYCAA	SPIPY GSLLR RRNN YDY	WGQGT LVTVSS
Wnt3a- 367B10 SEQ ID NO:23	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAASGG TFS	SYAM G	WFRQAP GKREFV A	AISWRS GSTYYA DSVKG	RFTISRDN SKNT VYLQMNSLRPE DTAVYYCAA	DPRGY GVAY VSAYY EY	WGQGT LVTVSS

Последовательности иммуноглобулиновых отдельных варибельных доменов, связывающихся с сывороточным альбумином (домен Alb11)

VHH ID SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Alb11 SEQ ID NO:24	EVQLVES GGGLVQ PGNSLRL SCAASGF TFS	SFGMS	WVRQAP GKGLEW VS	SISGSGS DTLYAD SVKG	RFTISRDNAKTT LYLQMNSLRPED TAVYYCTI	GGSLSR	SSQGT LTVSS

Как установлено выше, (по меньшей мере два) иммуноглобулиновых отдельных варибельных домена в полипептиде согласно изобретению могут быть соединены друг с другом напрямую, без использования линкера, либо же через линкер. Линкер предпочтительно является пептидным линкером и согласно изобретению подобран так, чтобы сделать возможным связывание по меньшей мере двух иммуноглобулиновых отдельных варибельных доменов с каждой из их эпитопных мишеней.

Подходящие линкеры *inter alia* зависят от эпитопов и в особенности от расстояния между эпитопами, с которыми связываются иммуноглобулиновые отдельные варибельные домены, на молекулах-мишенях. Специалисту это будет понятно на основании данного описания, необязательно после некоторого ограниченного количества рутинных экспериментов.

Таким образом, подходящие линкеры могут содержать аминокислотную последовательность, например, длиной в 9 или более аминокислот, предпочтительно по крайней мере 17 аминокислот, как-то примерно 20-40 аминокислот. Последовательность линкера может быть встречающейся в природе или не встречающейся в природе. В случае применения в терапевтических целях линкер предпочтительно не является иммуногенным для субъекта, которому вводят полипептид согласно изобретению.

Одной из пригодных групп линкерных последовательностей являются линкеры, полученные из шарнирного участка тяжелоцепочечных антител, согласно описанию в WO 1996/34103 и WO 1994/04678. Другим примером являются полиаланиновые линкерные последовательности, такие как Ala-Ala-Ala.

Дальнейшими предпочтительными примерами линкерных последовательностей являются линкеры Gly/Ser разной длины, такие, как линкеры $(gly_xser_y)_z$, включая, например, $(gly_4ser)_3$, $(gly_4ser)_5$, $(gly_4ser)_7$, $(gly_3ser)_3$, $(gly_3ser)_5$, $(gly_3ser)_7$, $(gly_3ser)_2)_3$, $(gly_3ser_2)_5$ и $(gly_3ser_2)_7$.

Альтернативно или дополнительно к полипептидному линкеру по меньшей мере два иммуноглобулиновых отдельных варибельных домена в полипептиде согласно изобретению могут быть соединены друг с другом с помощью другого фрагмента, такого как другой полипептид, который в предпочтительном, но не единственном варианте осуществления может быть дополнительным иммуноглобулиновым отдельным варибельным доменом, согласно уже данному выше определению. Такой фрагмент может быть по сути неактивным либо может оказывать биологический эффект, такой как улучшение желаемых свойств полипептида, либо же может придавать полипептиду одно или более дополнительное желаемое свойство. Как уже излагалось выше, предпочтительный дополнительный полипептидный домен продлевает период полувыведения полипептида, являясь таким как домен, связывающийся с (человеческим) сывороточным альбумином, такой как домен Alb11.

Поэтому согласно следующему варианту осуществления изобретение в особенности охватывает полипептиды, содержащие любую из нижеследующих последовательностей, при этом точные аминокислотные последовательности можно взять из табл. 3 ниже

SEQ ID NO: 25 (= последовательность полипептида F013500575),

SEQ ID NO: 26 (= последовательность полипептида F013500571) и

SEQ ID NO: 27 (= последовательность полипептида F013500720).

Согласно еще более конкретному варианту осуществления полипептиды согласно изобретению выбраны из следующей группы молекул:

полипептид F013500575 с последовательностью SEQ ID NO: 25,

полипептид F013500571 с последовательностью SEQ ID NO: 26 и

полипептид F013500720 с последовательностью SEQ ID NO: 27.

Полипептиды согласно изобретению делают возможным более эффективное лечение ряда типов рака, таких как ТНПМЖ, КРР и НМКРЛ. У них улучшены *in vitro* характеристики (т.е. более высокая эффективность подавления пути Wnt), см., например, примеры 7 и 8 ниже, а также значительные способности подавлять рост опухоли *in vivo*, что ведет к более высокой эффективности *in vivo* по сравнению с другими связывающими LRP6 молекулами, что показано, например, примерами 9 и 10 ниже.

В частности, как показано *in vivo* на модели опухоли, вызванной Wnt, бипаратопные перекрестно-реактивные по LRP5/LRP6 гуманизированные VHH-конструкты с продленным периодом полувыведения были способны подавлять Wnt-сигналинг и рост опухоли *in vivo*, обеспечивая даже значительное уменьшение опухоли (т.е. подавление роста опухоли более чем на 100%), чего в тех же экспериментальных условиях нельзя было достичь при помощи известного связывающего LRP6 вещества. Уменьшение опухоли (т.е. регресс опухоли) является, вне всяческого сомнения, желательным терапевтическим эффектом (т.е. действительностью) при лечении больных раком пациентов. Более того, регресс опухоли, приводящий к полному патоморфологическому ответу (пПО), является признанной клинической конечной точкой, свидетельствующей о значительном улучшении выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости.

В тех же экспериментах *in vivo* не наблюдали значимых изменений массы тела (<10%), а результаты гистопатологических анализов желудочно-кишечных тканей не показали какого-либо токсического влияния вышеупомянутых полипептидов согласно изобретению. Это особенно удивительно в свете вышеупомянутых исследований экспрессии DKK1 *in vivo* (т.е. приводивших к изъязвлению слизистой кишечника и потере массы тела).

Таким образом, полипептиды согласно изобретению фактически обеспечивают новые терапевтические возможности для лечения раковых заболеваний, особенно в случае большой нереализованной медицинской потребности, такой, как, например, при (трижды негативном) раке молочной железы.

Как ни странно, изобретатели пришли к такому решению не по традиционному пути, т.е. пытаюсь разработать ингибиторы или связывающие молекулы с высокой специфичностью/селективностью по одной определенной мишени, такой как LRP6 (упоминаемый в качестве мишени для лечения "заболеваний, опосредованных передачей сигнала Wnt", например, в WO 2009/056634). Наоборот, изобретатели разработали молекулы, нацеленные одновременно на два родственных белка - LRP6 и LRP5 - и таким образом достигли вышеописанных значительно улучшенных эффектов *in vitro* и *in vivo*, которые нельзя было предположить по известной из уровня техники информации.

Молекулярный механизм, лежащий в основе такого преимущества, ясен не полностью, однако можно предположить - не имея намерения ограничиваться конкретной теорией - что подобные перекрестно-реактивные молекулы могут обладать дополнительным, а потому более сильным влиянием на весьма запутанный сигнальный каскад сигнального пути Wnt.

Вышеописанные дающие преимущество эффекты дополнительно проиллюстрированы примерами ниже и имеющимися в них сравнительными данными.

Более того, полипептиды согласно изобретению просты в изготовлении и лучше растворяются, что означает, что их можно хранить и/или вводить в более высоких по сравнению с обычными антителами концентрациях. Они стабильны при комнатной температуре и дольше остаются стабильными даже при экстремальных значениях pH, так что могут изготавливаться, храниться и/или транспортироваться без использования холодильного оборудования, тем самым экономя финансы, время и предотвращая последствия для окружающей среды. Благодаря вышеизложенному, а также своей низкой иммуногенности, они дополнительно открывают ряд возможностей относительно путей введения, помимо инъекций и инфузий, а также относительно протоколов введения и использования конкретных устройств.

Нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева.

Согласно дальнейшим аспектам изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот и векторам экспрессии, кодирующим полипептиды согласно изобретению, а также к экспрессирующим их клеткам-хозяевам. Эти нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева полезны при изготовлении полипептидов согласно изобретению, и их дополнительные аспекты и варианты осуществления будут подробнее описаны ниже во взаимосвязи с изложением способов производства полипептидов согласно изобретению.

Терапевтическое применение.

Благодаря своим биологическим свойствам полипептиды согласно изобретению пригодны для лечения заболеваний, характеризующихся избыточной или аномальной пролиферацией клеток, таких как рак и идиопатический легочный фиброз (ИЛФ).

Например, полипептидами согласно изобретению можно лечить следующие раковые заболевания, опухоли и другие пролиферативные заболевания, не ограничиваясь ими,

рак головы и шеи; рак легкого, такой как, например, немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ) и мелкоклеточный рак легкого (МКРЛ); новообразования средостения, такие как, например, нейрогенные опухоли и мезенхимальные опухоли; рак желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), такой как, например, рак пищевода, желудка, поджелудочной железы, печени и желчных протоков (включая, например, печеночно-клеточную карциному (ПКК)), а также тонкого и толстого кишечника (включая, например, колорек-

тальный рак); рак предстательной железы; рак яичек; гинекологические виды рака, такие как, например, рак яичников; рак молочной железы, такой как, например, карцинома молочной железы, гормон-рецептор-положительный рак молочной железы, Her2-положительный рак молочной железы и трижды негативный рак молочной железы; рак эндокринной системы; саркомы мягких тканей, такие как, например, фибросаркома, рабдомиосаркома, ангиосаркома, саркома Капоши; саркомы костей, такие как, например, миелома, остеосаркома, опухоль Юинга, фибросаркома, остеохондрома, остеобластома и хондробластома; мезотелиомы; рак кожи, такой как, например, карцинома базальных клеток, плоскоклеточная карцинома, карцинома клеток Меркеля и меланома; новообразования центральной нервной системы и головного мозга, такие как, например, астроцитомы, глиобластома, глиома, нейробластома и ретинобластома; лимфомы и лейкозы, такие как, например, В-клеточные неходжкинские лимфомы (НХЛ), Т-клеточные неходжкинские лимфомы, хронический В-клеточный лимфоцитарный лейкоз (В-ХЛЛ), хронический Т-клеточный лимфоцитарный лейкоз (Т-ХЛЛ), болезнь Ходжкина (БХ), лейкоз с большими гранулярными лимфоцитами (БГЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), острый миелогенный/миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый лимфатический/лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), множественная миелома (ММ), плазмацитома и миелодиспластические синдромы (МДС); а также опухоли неизвестной первичной локализации.

Подразумевается, что все вышеупомянутые раковые заболевания, опухоли, новообразования и т.д., охарактеризованные конкретной локализацией/местом происхождения в теле, включают как первичные опухоли, так и происходящие от них метастатические опухоли.

Более конкретно полипептиды согласно изобретению полезны при лечении таких заболеваний, в особенности раковых заболеваний, при которых аномальная пролиферация клеток вызвана аномальным (активированным) Wnt-сигналингом, либо он принимает в ней участие.

Поэтому полипептиды согласно изобретению особенно полезны для лечения солидных опухолей, более конкретно для лечения рака легких, печени, ободочной кишки, головного мозга, щитовидной железы, поджелудочной железы, молочной железы, яичников и предстательной железы, а еще более конкретно для лечения немелкоклеточного рака легких (НМКРЛ), трижды негативного рака молочной железы (ТНРМЖ) и колоректального рака (КРР). В частности, полипептиды согласно изобретению можно использовать для лечения пациентов с местнораспространенным или метастатическим ТНРМЖ, пациентов с метастатическим НМКРЛ либо местнораспространенным или метастатическим КРР в качестве одиночного агента или в комбинации с целью продлить выживаемость без прогрессирования (ВБП) и общую выживаемость (ОВ). Кроме того, полипептиды согласно изобретению можно использовать в качестве неоадьювантной терапии для пациентов с раком молочной железы в целях достижения полного патоморфологического ответа (пПО; определяется как отсутствие остаточного инвазивного рака и рака *in situ* при гистопатологической оценке полностью иссеченного образца молочной железы и проб из всех регионарных лимфоузлов после завершения неоадьювантной системной терапии).

Полипептиды согласно изобретению можно использовать в терапевтических протоколах в контексте первой линии, второй линии или любой дальнейшей линии лечения.

Полипептиды согласно изобретению можно использовать для профилактики, краткосрочного или длительного лечения вышеупомянутых заболеваний, необязательно в комбинации с лучевой терапией и/или хирургией.

Также полипептиды согласно изобретению особо пригодны для лечения других заболеваний, вызванных аномальной пролиферацией клеток, в которой принимает участие сигнальный путь Wnt, таких как идиопатический легочный фиброз (ИЛФ). (Konigshoff и др. "Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis". *PLoS One* 2008;3(5):e2142; Lam и др. "Wnt coreceptor Lrp5 is a driver of idiopathic pulmonary fibrosis". *Am J. Respir. Crit Care Med.* 2014;190(2):185-95).

Кроме того, полипептиды согласно изобретению особо пригодны для лечения ретинопатий, в особенности для лечения диабетической ретинопатии из-за аномальной активации Wnt в клетках внутренней сетчатки, которая вызывает усиленное аномальное образование кровеносных сосудов сетчатки, что приводит к развитию и прогрессированию диабетической ретинопатии (Chen Y. и др. "Activation of the Wnt pathway plays a pathogenic role in diabetic retinopathy in humans and animal models" *The Am J. Pathol.* 2009; 175(6):2676-85., Gao и др. "Elevated LRP6 levels correlate with vascular endothelial growth factor in the vitreous of proliferative diabetic retinopathy" *Mol. Vis.* 2015; 21:665-72).

И наконец, поскольку показано, что подавление сигнальных путей Wnt1/Wnt3a может также влиять на дендритные клетки (ДК) и функционирование дендритных клеток, полипептиды согласно изобретению могут быть полезны для лечения иммунных и инфекционных заболеваний, а также для влияния на микроокружение опухоли при различных раковых заболеваниях из числа перечисленных выше. Опухоли активно подавляют противоопухолевый иммунитет, а ДК играют важную роль в механизме уклонения рака от иммунитета. В частности, исследования показали, что Wnt-лиганды в микроокружении опухоли способны также инициировать паракринный сигналинг в иммунных клетках и регулировать противоопухолевый иммунитет хозяина (Hong и др. "beta-catenin promotes regulatory T-cell responses in tumors by inducing vitamin A metabolism in dendritic cells". *Cancer Res.* 2015; 75(4):656-65).

Разумеется, вышеописанное также охватывает применение полипептидов согласно изобретению в

различных способах лечения вышеуказанных заболеваний путем введения терапевтически эффективной дозы пациенту, нуждающемуся в таковой, равно как и применение этих полипептидов для изготовления лекарственных средств для лечения подобных заболеваний, равно как и фармацевтические композиции, включающие такие полипептиды согласно изобретению, равно как и составление и/или изготовление лекарственных средств, включающих такие полипептиды согласно изобретению, и т.д. и т.п.

Комбинации с другими активными веществами.

Полипептиды согласно изобретению можно использовать в одиночку или в комбинации с другими фармакологически активными веществами, такими как вещества передового уровня или стандарта лечения, такие как, например, цитостатические или цитотоксичные вещества, ингибиторы пролиферации клеток, антиангиогенные вещества, стероиды, иммуномодуляторы/ингибиторы контрольных точек и т.п.

Цитостатические и/или цитотоксичные активные вещества, которые можно вводить в комбинации с соединениями согласно изобретению, включают, не ограничиваясь ими, гормоны, аналоги гормонов и антигормоны, ингибиторы ароматазы, агонисты и антагонисты LHRH, ингибиторы факторов роста (такие факторы роста, как, например, фактор роста тромбоцитов (PDGF), фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), эпидермальный фактор роста (EGF), инсулиноподобные факторы роста (IGF), эпидермальный фактор роста человека (HER, например HER2, HER3, HER4) и фактор роста гепатоцитов (HGF)), где ингибиторы представляют собой, например, антитела против фактора роста, антитела против рецептора фактора роста и ингибиторы тирозинкиназы, такие как, например, цетуксимаб, gefitinib, afatinib, nintedanib, imatinib, lapatinib, bosutinib и trastuzumab; антиметаболиты (например, антифолаты, такие как метотрексат, ралтитрексед, пиримидиновые аналоги, такие как 5-фторурацил (5-ФУ), капецитабин и гемцитабин, пуриновые и аденозиновые аналоги, такие как меркаптопурин, тиогуанин, кладрибин и пентостатин, цитарабин (ara C), флударабин); противоопухолевые антибиотики (например, антрациклины); производные платины (например, цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин); алкилирующие агенты (например, эстрамустин, мехлорэтамин, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, дакарбазин, циклофосфамид, ифосфамид, темозоломид, нитрозомочевина, такие как, например, кармустин и ломустин, тиотепа); антимитотические агенты (например, алкалоиды Vinca, такие как, например, винбластин, виндезин, винорелбин и винкрестин; а также таксаны, такие как паклитаксел, доцетаксел); ингибиторы ангиогенеза, ингибиторы тубулина; ингибиторы синтеза ДНК, ингибиторы PARP, ингибиторы топоизомеразы (например, эпиподофиллотоксины, такие как, например, этопозид и этопозид, тенипозид, амсакрин, топотекан, иринотекан, митоксантрон), ингибиторы серин/треонинкиназы (например, ингибиторы PDK1, ингибиторы Raf, ингибиторы A-Raf, ингибиторы B-Raf, ингибиторы C-Raf, ингибиторы mTOR, ингибиторы mTORC1/2, ингибиторы PI3K, ингибиторы PI3K α , двойные ингибиторы mTOR/PI3K, ингибиторы STK33, ингибиторы AKT, ингибиторы PLK1 (такие как воласертиб), ингибиторы CDK, ингибиторы киназы Auroга), ингибиторы тирозинкиназы (например, ингибиторы PTK2/FAK), ингибиторы белок-белкового взаимодействия, ингибиторы MEK, ингибиторы ERK, ингибиторы FLT3, ингибиторы BRD4, ингибиторы IGF-1R, агонисты TRAILR2, ингибиторы Bcl-xL, ингибиторы Bcl-2, ингибиторы Bcl-2/Bcl-xL, ингибиторы рецептора ErbB, ингибиторы BCR-ABL, ингибиторы ABL, ингибиторы Src, аналоги рапамицина (например, эверолимус, темзиролимус, ридафоролимус, сирилолимус), ингибиторы синтеза андрогенов, ингибиторы рецепторов андрогенов, ингибиторы DNMT, ингибиторы HDAC, ингибиторы ANG1/2, ингибиторы CYP17, радиофармацевтические препараты, иммунотерапевтические агенты, такие как ингибиторы иммунных контрольных точек (например, молекулы/иммуноглобулины, связывающие CTLA4, PD1, PD-L1, LAG3 и TIM3, такие как ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб), противораковые вакцины, такие как традиционная противоопухолевая вакцина (клеточные вакцины, например, Sipuleucel-T для лечения рака предстательной железы), персонализированные неоантигенные вакцины и онколитические вирусы, а также различные химиотерапевтические агенты, такие как амифостин, анагрелид, клодронат, филграстин, интерферон, интерферон- α , лейковорин, ритуксимаб, прокарбазин, левамизол, месна, митотан, памидронат и порфирин.

Особенно предпочтительными являются способы лечения, включающие применение полипептидов согласно изобретению в комбинации с лекарственным средством, выбранным из группы, состоящей из

(I) антител против VEGF (бевацизумаб и другие антиангиогенные вещества), с или без комбинации с химиотерапией (включая комбинацию доксорубин/циклофосфамид и/или комбинацию капецитабин/доцетаксел по неоадьювантной схеме; протокол таксан/платина для первой и позднейших линий лечения) для пациентов с раком молочной железы;

(II) ИТК EGFR для НМКРЛ, мутантного по EGFR, либо кризотиниба для НМКРЛ с перестройкой АЛК, с или без комбинации с химиотерапией (цитотоксичная комбинированная терапия препаратами платины, включая гемцитабин/цисплатин как терапию первой линии; доцетаксел или пеметрексед как терапию второй линии для пациентов с раком легких);

(III) антител против EGFR (цетуксимаб и панитумумаб для опухолей с KRAS дикого типа), с или без комбинации с химиотерапией (включая иринотекан), комбинации с антителами против VEGF (бевацизумаб и другие антиангиогенные вещества) или комбинации с регорафенибом, например, для лечения пациентов с КРР;

(IV) иммунотерапевтических агентов, включая агенты против PD-1, такие как пембролизумаб и ниволумаб, агенты против PD-L1, агенты против CTLA4, агенты против BTLA, агенты против LAG3 и агенты против TIM3, такие как антитела против PDL1 и т.д., например, для лечения пациентов с раком молочной железы, легкого и КРР;

(V) химиотерапевтических агентов, таких как антинеопластические препараты на основе платины, либо же в комбинации с химиотерапевтическим протоколом FOLFOX, включая фолиновую кислоту, 5'-фторурацил и оксалиплатин, либо же в комбинации с химиотерапевтическим протоколом FOLFOXIRI, включая фолиновую кислоту, 5'-фторурацил, оксалиплатин и иринотекан, например, для лечения пациентов с раком молочной железы и КРР.

Если два или более вещества либо принципа действия используют как части комбинированного протокола химиотерапии, то их можно вводить тем же путем либо разными путями, по сути в одно и то же время (т.е. одновременно, параллельно) либо в разное время (например, последовательно, подряд, попеременно, по порядку или в любом ином виде переменного режима).

Если вещества или принципы вводят одновременно одним и тем же путем, то их можно вводить в виде разных фармацевтических препаратов или композиций либо как часть комбинированного фармацевтического препарата или композиции. Кроме того, если два или более вещества либо принципа используют как части комбинированного протокола химиотерапии, то каждое вещество или принцип можно вводить в том же количестве и по тому же протоколу, которые используются для одиночного применения соединения или принципа, и такое комбинированное применение может иметь синергический эффект или не иметь его. Однако если комбинированное применение двух или более активных веществ приводит к синергическому эффекту, то можно уменьшить количество одного, нескольких или всех вводимых веществ или принципов, сохраняя при этом желаемое терапевтическое действие. Это может быть полезным, например, для избежания, ограничения или уменьшения каких-либо нежелательных побочных эффектов, связанных с применением одного или более веществ или принципов в обычных количествах, сохраняя при этом желаемый фармакологический или терапевтический эффект.

Разумеется, вышеописанным охвачены изготовление и способы изготовления полипептидов согласно изобретению для комбинированного применения с вышеуказанными комбинационными партнерами. Охвачены также изготовление и способы изготовления вышеуказанных комбинационных партнеров для комбинированного применения с полипептидами согласно изобретению. Таким образом, изобретением обеспечены, например, способы применения либо изготовления для применения иммуномодулятора/ингибитора контрольных точек, такого как антитела против PD1, такого как пембролизумаб или ниволумаб, для введения в комбинации с полипептидом согласно изобретению, а более конкретно для введения в составе комбинированного терапевтического протокола с полипептидом согласно изобретению.

Более того, изобретением также охвачены наборы, в которые входят по меньшей мере один полипептид согласно изобретению и один или более других компонентов, выбранных из группы, состоящей из других лекарственных средств, применяемых для лечения заболеваний и расстройств согласно описанию выше, а также устройств согласно описанию ниже.

Фармацевтические композиции, способы введения, дозировки.

Специалисту будет ясно, что вышеописанные способы лечения заболевания подразумевают изготовление лекарственного средства для лечения указанного заболевания. Таким образом, изобретение также относится к фармацевтическим композициям для лечения вышеупомянутых заболеваний, причем подобные композиции содержат по меньшей мере один полипептид согласно изобретению.

Полипептиды согласно изобретению и/или содержащие их композиции можно вводить пациенту, нуждающемуся в этом, любым подходящим способом, в зависимости от конкретного используемого фармацевтического препарата или композиции. Таким образом, полипептиды согласно изобретению и/или содержащие их композиции можно вводить, например, внутривенно (в.в.), подкожно (п.к.), внутримышечно (в.м.), внутривентриально (в.б.), через кожу, перорально, сублингвально (например, в виде сублингвальной таблетки, спрея или капель, помещаемых под язык и адсорбируемых через слизистые мембраны в подязычную капиллярную сеть), (внутри-)назально (например, в виде назального спрея и/или аэрозоля), поверхностно, с помощью суппозитория, ингаляцией либо любым другим подходящим способом в эффективном количестве или дозировке.

Полипептиды согласно изобретению и/или содержащие их композиции вводят согласно протоколу лечения, подходящему для лечения и/или облегчения заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению или облегчению. Врач, как правило, может определить подходящий протокол лечения в зависимости от таких факторов, как заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению или облегчению, степень тяжести заболевания, степень тяжести его симптомов, конкретный применяемый полипептид согласно изобретению, конкретный путь введения и применяемый фармацевтический препарат либо композиция, возраст, пол, вес, режим питания, общее состояние пациента и т.п. факторы, хорошо известные врачу. Как правило, протокол лечения включает введение одного или более полипептидов согласно изобретению либо одной или более содержащих их композиций в терапевтически эффективных количествах или дозах.

Как правило, для лечения и/или облегчения упомянутых здесь заболеваний, расстройств и состояний, в зависимости от конкретного подлежащего лечению заболеваний, расстройства или состояния, силы конкретного используемого полипептида согласно изобретению, используемых конкретного пути введения и конкретного фармацевтического препарата либо композиции полипептиды согласно изобретению в общем вводят в количестве от 0,005 до 20,0 мг на 1 кг массы тела и дозу, предпочтительно от 0,05 до 10,0 мг/кг/дозу, еще более предпочтительно от 0,5 до 10 мг/кг/дозу, либо непрерывно (например, инфузией), либо, что более предпочтительно, в виде отдельных доз (таких как, например, принимаемые дважды в неделю, раз в неделю, раз в месяц; см. ниже), но все это может существенно отличаться, особенно в зависимости от вышеупомянутых параметров. Поэтому в некоторых случаях достаточной может быть доза меньше указанной здесь минимальной дозы, тогда как в других случаях она может превышать верхнюю границу. При введении больших количеств рекомендуется разделять их на ряд меньших доз, принимаемых в течение дня.

В зависимости от конкретного полипептида согласно изобретению, а также его конкретных фармакокинетических и других свойств его можно вводить раз в день, каждый второй, третий, четвертый, пятый или шестой день, раз в неделю, раз в месяц и т.п. Протокол введения может подразумевать долгосрочное еженедельное лечение. Под "долгосрочным" имеется в виду длительность по крайней мере две недели, предпочтительно месяцы или годы.

Действенность полипептидов согласно изобретению, а также содержащих их композиций можно проверить с помощью любого подходящего известного *per se* анализа *in vitro*, анализа на клетках, анализа *in vivo* и/или на животной модели, либо же любой их комбинации, в зависимости от конкретной рассматриваемой болезни. Подходящие анализы и животные модели будут ясны специалисту и для примера включают анализы и животные модели, используемые в примерах ниже.

Предпочтительно полипептиды согласно изобретению обладают лучшими характеристиками, нежели обычные известные в данной области антитела (такие как связывающие LRP6, описанные в разделе "Уровень техники" выше), по меньшей мере в одном из этих анализов или моделей, а предпочтительно в одной или больше моделей *in vivo*.

Препараты.

Для фармацевтического применения полипептиды согласно изобретению могут быть введены в состав фармацевтического препарата, включающего (I) по меньшей мере один полипептид согласно изобретению и (II) по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество, адъювант и/или стабилизатор, а также (III) необязательно один или более дополнительных фармакологически активных полипептидов или соединений. Под "фармацевтически приемлемым" следует понимать материал, не проявляющий каких-либо биологических или других нежелательных эффектов при введении индивидууму и не взаимодействующий пагубно с любым из других компонентов фармацевтической композиции (таким как, например, фармацевтически активный ингредиент), которая содержит соответствующий материал. Конкретные примеры можно найти в стандартных пособиях, таких как, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е изд., Mack Publishing Company, США (1990). Например, полипептиды согласно изобретению можно рецептировать и вводить любым способом, известным *per se* для обычных антител и фрагментов антител, а также других фармацевтически активных белков. Таким образом, согласно следующему варианту осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции или препарату, содержащим по меньшей мере один полипептид согласно изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество, адъювант и/или стабилизатор, а также необязательно одно или более дополнительных фармакологически активных веществ.

Фармацевтические препараты для парентерального введения, такого как внутривенная, внутримышечная, подкожная инъекция или внутривенная инфузия, могут, например, являться стерильными растворами, суспензиями, дисперсиями, эмульсиями или порошками, которые содержат действующее вещество и пригодны, необязательно после дополнительного этапа растворения или разведения, для инъекции или инфузии. Подходящие носители или разбавители для подобных препаратов включают, для примера и не для ограничения, стерильную воду и фармацевтически приемлемые водные буферы и растворы, такие как физиологический фосфатно-солевой раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнка; масла с водой; глицерин; этанол; гликоли, такие как пропиленгликоль, а также минеральные масла, животные масла и растительные масла, например арахисовое масло, соевое масло и пригодные их смеси.

Растворы полипептидов согласно изобретению могут также содержать консервант для предотвращения роста микроорганизмов, такой как антибактериальные и противогрибковые вещества, например п-гидроксибензоаты, парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота, тиомерсал, этилендиаминтетрауксусная кислота (и ее соли со щелочными металлами) и т.п. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические агенты, например сахара, буферы или хлорид натрия. Необязательно могут использоваться эмульгаторы и/или диспергаторы. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, образованием липосом, поддержанием нужного размера частиц в случае дисперсий и применением поверхностно-активных веществ. Можно также добавлять другие вещества, задерживающие абсорбцию, например, алюминия моностеарат и желатин. Растворы можно разливать в инъекционные флаконы, ампу-

лы, бутылки для инфузий и т.п.

В любом случае конечная лекарственная форма должна быть стерильной, жидкой и стабильной в условиях производства и хранения. Стерильные инъекционные растворы изготавливают включением действующего вещества в необходимое количество надлежащего растворителя, по необходимости с различными другими ингредиентами из вышеперечисленных, с последующей стерилизующей фильтрацией. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами изготовления являются методы вакуумного высушивания и вымораживания, позволяющие получить порошок действующего вещества и любого желаемого дополнительного ингредиента из их раствора, предварительно прошедшего стерилизующую фильтрацию.

Обычно предпочитают водные растворы или суспензии. Как правило, подходящими препаратами для терапевтических белков, таких как полипептиды согласно изобретению, являются забуференные растворы белков, такие как растворы, содержащие белок в подходящей концентрации (такой как от 0,001 до 400 мг/мл, предпочтительно от 0,005 до 200 мг/мл, более предпочтительно от 0,01 до 200 мг/мл, более предпочтительно 1,0-100 мг/мл, такой как 1,0 мг/мл (в.в. введение) или 100 мг/мл (п.к. введение) и водный буфер, такой как

фосфатно-солевой раствор, pH 7,4,
 другие фосфатные буферы, pH 6,2-8,2,
 ацетатные буферы, pH 3,2-7,5, предпочтительно pH 4,8-5,5,
 гистидиновые буферы, pH 5,5-7,0,
 сукцинатные буферы, pH 3,2-6,6 и
 цитратные буферы, pH 2,1-6,2,

и, необязательно, соли (например, NaCl) и/или сахара (например, сахароза и трегалоза) и/или другие полиолы (например, маннит и глицерин) для обеспечения изотоничности раствора.

Предпочтительными забуференными растворами белков являются растворы, содержащие приблизительно 0,05 мг/мл полипептида согласно изобретению, растворенного в 25 мМ фосфатного буфера, pH 6,5, с отрегулированной добавлением 220 мМ трегалозы изотоничностью. Дополнительно подобные растворы могут содержать другие агенты, такие как детергенты, например, 0,02% Tween-20 или Tween-80. Препараты для подкожного применения могут содержать значительно большие концентрации полипептида согласно изобретению, такие как до 100 мг/мл или даже выше 100 мг/мл. Однако специалисту в данной области будет ясно, что вышеуказанные ингредиенты и количества являются только одной, предпочтительной из возможностей. Специалисту будут немедленно очевидны, либо же легко выводимы из вышеизложенного их альтернативы и варианты.

Также по сравнению с обычными антителами или фрагментами антител одним из больших преимуществ применения полипептидов согласно изобретению является то, что их можно легко вводить путями, отличными от парентерального введения, и легко составить их рецептуру для такого введения. Например, как описано в международной патентной заявке WO 2004/041867, подобные полипептиды можно рецептировать как препараты для перорального, интраназального, внутривенного и трансдермального введения.

Согласно следующему аспекту изобретения полипептид согласно изобретению можно использовать в комбинации с устройством, используемым для введения полипептида, таким как шприц, ручка-инъектор, микронасос или другое устройство.

Способы производства и очистки.

Изобретением также предоставлены способы производства полипептида согласно изобретению, причем такие способы в целом включают этапы

культивирования клеток-хозяев, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид согласно изобретению (здесь и далее: "нуклеиновую кислоту согласно изобретению") в условиях, делающих возможной экспрессию полипептида согласно изобретению;

выделения или изолирования полипептида, экспрессированного клетками-хозяевами, из культуры;

и

необязательно дальнейшей очистки, и/или модификации, и/или рецептирования полипептида согласно изобретению.

Нуклеиновая кислота согласно изобретению может, например, быть молекулой ДНК, содержащей кодирующие последовательности, а также регуляторные последовательности и необязательно природные или искусственные интроны, либо может быть молекулой кДНК. Она может иметь свои первоначальные кодоны или же оптимизированные кодоны, специально адаптированные для экспрессии в предполагаемой клетке-хозяине или организме-хозяине. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения нуклеиновая кислота согласно изобретению находится по сути в выделенной форме согласно определению выше.

Нуклеиновая кислота согласно изобретению может также находиться в виде, наличествовать в и/или являться частью вектора, такого как, например, плаزمид, космид или YAC, который опять-таки может находиться по сути в выделенной форме. Вектор может быть по сути вектором экспрессии, т.е. вектором, способным обеспечить экспрессию полипептида *in vitro* и/или *in vivo* (например, в подходя-

шей клетке-хозяине, организме-хозяине и/или системе экспрессии). Подобный вектор экспрессии, как правило, содержит хотя бы одну нуклеиновую кислоту согласно изобретению, функционально связанную с одним или более подходящими регуляторными элементами, такими как промотор(ы), энхансер(ы), терминатор(ы) и т.п. Конкретные примеры подобных регуляторных элементов и других элементов, таких как факторы встраивания, маркеры отбора, сигнальные или лидерные последовательности, репортерные гены и т.п., полезные или необходимые для экспрессии полипептидов согласно изобретению, описаны, например, на стр. 131-133 WO 2006/040153.

Нуклеиновые кислоты согласно изобретению можно изготовить или получить известным *per se* способом (например, автоматизированным синтезом ДНК и/или технологией рекомбинантных ДНК) на основании приведенной здесь информации об аминокислотных последовательностях полипептидов согласно изобретению.

Согласно другому варианту осуществления изобретение относится к хозяину или клетке-хозяину, экспрессирующему или способному экспрессировать полипептид согласно изобретению; и/или который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид согласно изобретению. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления означенные клетки-хозяева являются бактериальными клетками, дрожжевыми клетками, грибковыми клетками или клетками млекопитающих.

Для производства в промышленных масштабах предпочтительные гетерологические хозяева для (промышленного) производства иммуноглобулиновых отдельных переменных доменов-полипептидов и содержащих их белковых лекарств включают штаммы *E. coli*, *Pichia pastoris* и *S. cerevisiae*, которые подходят для крупномасштабной экспрессии, производства и ферментации и, в частности, для крупномасштабной (био-)фармацевтической экспрессии, производства и ферментации.

Полипептиды согласно изобретению, вырабатываемые в клетке согласно описанию выше, могут вырабатываться либо внутриклеточно (например, в цитозоле, периплазме или в тельцах включения) с последующим выделением из клеток-хозяев и необязательной дальнейшей очисткой; либо же они могут вырабатываться внеклеточно (секретироваться в среду, где культивируются клетки-хозяева) с последующим выделением из культуральной среды и необязательной дальнейшей очисткой.

Дополнительные способы и реактивы, используемые для рекомбинантного производства полипептидов, такие как подходящие векторы экспрессии, методы трансформации или трансфекции, маркеры отбора, методы индуцирования экспрессии белка, условия культивирования и т.п., известны из уровня техники. Точно так же специалисту известны техники выделения и очистки белка, подходящие для способа производства полипептида согласно изобретению.

Производство полипептидов согласно изобретению ферментацией в удобных рекомбинантных организмах-хозяевах, таких как *E. coli* и дрожжи, является финансово выгодным по сравнению с обычными антителами, которым, как правило, нужно дорогое оборудование для культивирования клеток млекопитающих. Более того, достижимы высокие уровни экспрессии, и выход полипептидов согласно изобретению находится в диапазоне 1-10 г/л (*E. coli*) и до 10 г/л (дрожжи) и более.

Примеры

Пример 1. Иммунизация лам LRP5 и LRP6 с целью индуцирования гуморального иммунного ответа.

Для идентификации перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-доменов связывания необходимо было разработать и воплотить ряд протоколов иммунизации лам. Сначала лам иммунизировали рекомбинантными внеклеточными доменами белков LRP6 и LRP5 (от человека и мыши). Однако функциональная оценка вышеупомянутого рекомбинантного белка LRP5 показала, что только эпитоп связывания класса Wnt1 был уложен надлежащим образом. И наоборот, ничто не указывало на надлежащую укладку домена связывания класса LRP5-Wnt3a. Поэтому для разработки подходящих для иммунизации антигенов нужна была дополнительная работа. В качестве обходного пути лам иммунизировали клетками HEK293, стабильно трансфицированными человеческим LRP5 или человеческим LRP6. Однако и тогда можно было достичь лишь очень слабой экспрессии человеческого LRP5 как при временной, так и при стабильной трансфекции, а также с применением разных клеточных линий (клетки HEK293, CHO и NIH-3T3). Поэтому для достижения достаточной экспрессии LRP5 нужна была еще дополнительная работа. В конце концов, после некоторого количества безуспешных проб и ошибок этого удалось достичь разработанным протоколом, подразумевающим стабильную котрансфекцию клеток HEK293 MesDC-2, шапероном, который должен повышать экзогенную экспрессию LRP5. Но даже тогда, т.е. после коэкспрессии MesDC-2 на протяжении создания стабильно трансфицированной LRP5 клеточной линии неоднократно наблюдалась нестабильность экспрессии белка. Это привело к проблеме: экспрессия LRP5 во время иммунизации и отбора могла быть утрачена. Чтобы решить эту дополнительную проблему, количество пассажей клеток, экспрессирующих LRP5, ограничили насколько возможно и выполняли дополнительную сортировку клеток с целью обогащения по клеткам, экспрессирующим LRP5.

Лам дополнительно иммунизировали ДНК, кодирующей LRP5, и ДНК, кодирующей LRP6, с и без шаперона hMesDC-2 на противоположных концах. Нескольким ламам ввели дополнительные стимулы в попытке усилить перекрестнореактивный иммунный ответ с целью повысить шансы идентификации перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-доменов.

Через регулярные промежутки времени брали образцы иммунизированной крови (ЛПК), определя-

ли серологический ответ и готовили из выделенных ЛПК общую РНК. После иммунизации рекомбинантным белком наблюдали средний серологический ответ на LRP6, в отличие от слабого серологического ответа на LRP5. Средний иммунный ответ на LRP5 наблюдали у лам, иммунизированных ДНК. И наоборот, для иммунизации клетками наблюдали очень слабый иммунный ответ. Дополнительно исследовали синтетические библиотеки. Тем не менее, в конце концов удалось достичь достаточного разнообразия репертуара для продвижения на следующий этап, изложенный в примере 2.

Пример 2. Выделение моновалентных VHH-доменов (VHH), связывающих LRP5 и LRP6.

Создание библиотеки.

Непосредственно после отбора иммунных тканей выделяли общую РНК, подтверждали целостность и концентрацию РНК. Из этих препаратов РНК делали образцы кДНК. Нуклеотидные последовательности, кодирующие VHH, амплифицировали из образцов кДНК одноэтапной РВ-ПЦР. Ампликоны по 700 п.о., специально амплифицированные из кДНК присутствующих в образце IgG2 и IgG3, выделяли из агарозного геля и впоследствии использовали как шаблон для "гнездовой" ПЦР. Затем продукты ПЦР расщепляли SfiI и BstEI и вшивали в соответствующие сайты рестрикции фагмидного вектора рAX50. Сшитые смеси электропорацией вводили в *Escherichia coli* TG-1. Полученный пул трансформантов составил генетическое разнообразие библиотеки фаг-дисплея.

рAX50 - это вектор экспрессии, полученный из рUC119, содержащий ген резистентности к ампициллину и промотор/ас, за которым следует кодирующая последовательность сигнального пептида рIII-белка в одной рамке считывания с расположенным дальше сайтом встраивания VHH-домена. В рамке считывания с последовательностью, кодирующей VHH-домен, вектор кодирует С-конечный Мус, гексагистидиновую метку и рIII-белок колифага. После заражения библиотеки клонов *E. coli* TG-1 фагом-хелпером присутствие рAX50 делает возможной выработку частичек фага в этих клонах, выводя индивидуальные VHH-домены в виде белка, слитого с рIII-белком.

Отбор.

Для отбора создавали и использовали библиотеки VHH-доменных фагмид. Принимая во внимание очень высокую межвидовую гомологичность белков (LRP5 и LRP6 человека и ламы), было неясно, обеспечит ли вызванный у лам иммунный ответ достаточное разнообразие VHH-доменов. Поэтому во время отбора параллельно с иммунными библиотеками использовали две синтетические библиотеки.

Во время отбора использовали следующие различные стратегии:

смена полученных от LRP5 и LRP6 инструментов, чтобы увеличить шанс обнаружить перекрестно-реактивные по LRP5/LRP6 VHH-домены, например, отбор по библиотекам от иммунизированных LRP5 лам с помощью полученных из LRP6 белков, или же использование и LRP5, и LRP6 во время отбора по синтетическим библиотекам;

смена вида-источника для отбора человеческих/мышинных перекрестно-реактивных по LRP5/LRP6 VHH-доменов (перекрестная с мышами реактивность таких антагонистов LRP5 и LRP6 позволяет оценить эффективность, т.е. подавление роста опухоли, и профиль безопасности, необходимые для оценки терапевтического окна в тех же доклинических моделях (т.е. в ксенотрансплантатных моделях опухолей на мышах));

отбор "в растворе" при помощи рекомбинантных белков, чтобы удерживать эпитопы в природной конформации. Дополнительное препятствие заключалось в том, что рекомбинантные белки LRP5 и LRP6 при непосредственном нанесении на планшеты ELISA для связывания теряли надлежащую укладку. Поэтому рекомбинантные белки биотинилировали и, подтвердив надлежащую укладку функциональными анализами, использовали для отбора "в растворе";

отбор с помощью клеток, сверхэкспрессирующих LRP5 или LRP6, с целью обеспечить природную конформацию рецепторов. Удивительно, но это оказалось важным приемом, особенно необходимым для улучшения отбора доменов, связывающихся с доменом LRP5 класса Wnt3a, поскольку функциональные данные по рекомбинантному белку показали недостаточно правильную укладку Wnt3a-связывающего эпитопа.

Пример 3. Скрининг моновалентных VHH.

После отбора клоны выращивали в 96-лунковых планшетах с глубокими лунками (объемом 1 мл) и индуцировали экспрессию VHH добавлением ИПТГ. Согласно стандартной методике, описанной, например, в WO 2011/107507, готовили периплазматические экстракты отдельных клонов и проводили их скрининг на связывание с человеческими LRP6 и LRP5. Изначально скрининг периплазматических экстрактов осуществляли анализом связывания ELISA с рекомбинантными LRP6 и LRP5, который является чувствительным, помехоустойчивым и высокопродуктивным анализом по сравнению с анализом связывания на основе FACS. После очистки VHH, идентифицированными анализами ELISA, давали дополнительную характеристику с помощью анализа связывания FACS, чтобы подтвердить связывание очищенных VHH с рецепторами LRP6 и LRP5 в их естественной конформации.

Обычно ожидается хорошая корреляция анализов связывания по методам ELISA и FACS. Однако в данном случае VHH, лучше всего связывающиеся с LRP6 и LRP5 в анализе ELISA (т.е. с высокой аффинностью к рекомбинантному внеклеточному домену LRP6 или LRP5), не проявили вовсе никакого или очень слабое связывание с человеческими LRP6 и LRP5 в анализе связывания FACS, что показано на

фиг. 2 на панели связывающих веществ "2". Использование разных буферов покрытия (фосфатно-солевого буфера Дульбекко и бикарбонатного буфера) и блокирующих растворов при постановке ELISA (Marvel и БСА) не устранило наблюдаемое расхождение. Вместо этого было обнаружено, что очень слабые согласно ELISA связыватели показали высокую аффинность к LRP5 и LRP6 в анализах связывания FACS при использовании клеток, экспрессирующих LRP5 и LRP6, как показано на фиг. 2 на панели связывающих веществ "2". Эти дополнительные данные и эксперименты сделали возможным отбор высокоаффинных связывающих веществ, распознающих естественную конформацию двух рецепторов. Сверх того, было подтверждено, что эти высокоаффинные связывающие вещества распознают в белках LRP5 и LRP6 зависящий от конформации эпитоп, а не линейный эпитоп. Эти дополнительные нестандартные данные и эксперименты сделали возможным отбор терапевтически важных веществ, связывающих LRP5 и LRP6, которые должны обладать высокой аффинностью к LRP5 и LRP6, экспрессируемым на плазматической мембране в своей природной конформации.

Поэтому, невзирая на (I) низкую продуктивность анализов связывания FACS, (II) менее помехоустойчивую постановку анализа и (III) вышеописанные сложности, возникшие из-за потерь экспрессии рекомбинантного белка при пассировании клеток, сверхэкспрессирующих LRP5, эти анализы все же использовали для последующего отбора и характеристики высокоаффинных VHH-связывателей. Если вкратце, клетки инкубировали с разведениями очищенных VHH (серийные разведения 1:5 от 1 μ M до 1 пM в конечной концентрации) на протяжении 1,5 ч при 4°C на планшетном шейкере. После 5-кратной промывки клеток буфером FACS, состоящим из 1x фосфатно-солевого буфера (ФСБ) + 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) + 0,05% азида натрия, их инкубировали на протяжении от 30 мин до 1 ч при 4°C с поликлональным мышинным антителом, связывающимся с каркасным участком VHH, а значит, связывающимся со всеми проверяемыми связывателями LRP5 и/или LRP6. После трехкратного промывания клеток буфером FACS их инкубировали на протяжении от 30 мин до 1 ч при 4°C с меченым вторичным антителом (противомышинное, ФЭ) с последующим трехкратным промыванием буфером FACS. Флуоресценцию измеряли с помощью FACS Array (BD).

На основании данных о связывании FACS и анализа последовательностей в иммунных библиотеках и библиотеках синтетического происхождения идентифицировали в общем сто перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 семейств/кластеров VHH. Примеры их представителей показаны и определены своей последовательностью ниже. VHH экспрессировали в *E.coli* и очищали. Если экспрессия в *E.coli* была недостаточной, VHH продуцировали в *Pichia pastoris*. Краткое описание экспрессии и очистки VHH приведено ниже.

Общая экспрессия VHH в *E.coli*.

Кодирующие последовательности встраивали в вектор экспрессии pAX100 и экспрессировали в *E.coli* в виде с-Мус белков с гексагистидиновой меткой. Клетки *E.coli* TG-1, содержащие нужные VHH-конструкты, выращивали (37°C, 250 об/мин) во встряхиваемых колбах на среде TB с добавлением канамицина и индуцировали добавлением 1 мМ ИПТГ для экспрессии. После центрифугирования клеточных культур готовили периплазматические экстракты методом замораживания-оттаивания осадка и ресуспендирования его в ФСБД.

Общая экспрессия VHH в *Pichia (P.) pastoris*.

Кодирующие последовательности встраивали в вектор экспрессии pAX159 и экспрессировали в *P. pastoris* в виде с-Мус белков с гексагистидиновой меткой. Клетки *P. pastoris* X-33, содержащие нужные VHH-конструкты, выращивали (30°C, 250 об/мин) на среде BGCM (Buffered Glycerol-Complex Medium, комплексная среда с забуференным глицерином; Invitrogen). На третий день среду меняли на BMCM (Buffered Methanol-Complex Medium, комплексная среда с забуференным метанолом; Invitrogen) и выращивали культуру дальше, регулярно индуцируя ее добавлением 0,5 об.% метанола (100%). После центрифугирования клеточных культур отбирали супернатант (содержащий секретлируемые VHH).

Очистка VHH.

VHH с гексагистидиновой меткой очищали на Tecan EVO150 аффинной хроматографией с иммобилизованным металлом (RoboColumns 100 ul Nickel Sepharose™ 6 FF, Atoll), элюировали с колонки 250 мМ-имидазолом и затем обессоливали до ФСБД. Целостность и чистоту VHH подтверждали SDS-PAGE и/или вестерн-блоттингом с детекцией антителами против Мус и VHH.

Пример 4. In vitro-характеристика очищенных моновалентных VHH.

После скрининга очищенным VHH с высокой аффинностью к клеткам, экспрессирующим LRP5 и LRP6, давали характеристику при помощи ряда функциональных и биофизических анализов, описанных ниже.

4.1. Сила связывания с LRP5 и LRP6, перекрестная реактивность. Анализ конкуренции с DKK1 на основе FACS.

Во время характеристики перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 моновалентных VHH наблюдали, что полученные в анализе связывания FACS данные не всегда коррелировали с силой, наблюдаемой в анализах по гену-репортеру Wnt1 и Wnt3a, скорее всего, из-за высокой скорости диссоциации некоторых VHH. Поэтому возникла необходимость в разработке этого дополнительного анализа (т.е. FACS для кон-

конкуренции с DKK1), который показал себя более надежным в отношении селективности и определения силы связывания, а также сравнения связывания с LRP5 и LRP6. Целью был отбор функциональных VHH, связывающихся с LRP5 и LRP6 с одинаковой силой, чтобы одной и той же концентрацией достичь блокады обоих рецепторов.

Поэтому идентифицированные функциональные VHH к Wnt1 и Wnt3a характеризовали FACS для конкуренции с DKK1 следующим образом.

Для анализа конкуренции с DKK1 на основе FACS использовали клетки HEK293 со стабильной сверхэкспрессией человеческого LRP5 или человеческого LRP6. Человеческий рекомбинантный DKK1 (rhDKK1 - R&D Systems, артикул 5439-DK/CF) добавляли к клеткам в постоянной конечной концентрации 1 нМ. Клетки инкубировали с rhDKK1 и LRP5- и/или LRP6-связывателями (серийные разведения очищенных VHH 1:5) на протяжении 1,5 ч при 4°C на планшетном шейкере. После трехкратного промывания клеток буфером FACS их инкубировали с биотинилированным козлиным антителом против человеческого DKK1 (R&D Systems, арт. BAF1096) на протяжении 30 мин при 4°C на планшетном шейкере. После трехкратного промывания клеток буфером FACS их инкубировали со стрептавидином ФЭ (BD Biosciences, арт. 554061) на протяжении от 30 мин до 1 ч при 4°C на планшетном шейкере в темноте. Клетки дважды промывали буфером FACS, измеряли флуоресценцию с помощью FACS Array (BD) и отмечали значения MCF.

Ожидается, что перекрестнореактивные по LRP5/LRP6 VHH будут конкурировать с человеческим DKK1 за связывание с HEK293, сверхэкспрессирующими человеческий LRP5, равно как и за связывание с HEK293, сверхэкспрессирующими человеческий LRP6. Напротив, специфичный по LRP5 VHH конкурировал бы с человеческим DKK1 за связывание с HEK293, сверхэкспрессирующими человеческий LRP5, но не за связывание с HEK293, сверхэкспрессирующими человеческий LRP6 (либо конкурировал бы, но очень слабо (>200 нМ) (и наоборот, то же самое касается специфичных по LRP6 VHH). В результате этого эксперимента было продемонстрировано, что присутствующие перекрестнореактивные по LRP5/LRP6 VHH конкурировали с человеческим DKK1 за связывание с HEK293, сверхэкспрессирующими человеческий LRP5, равно как и с HEK293, сверхэкспрессирующими человеческий LRP6 (т.е. снижение значения MCF при повышении концентрации связывателя, где полному подавлению DKK1-связывания при наивысшей проверенной концентрации соответствовали значения MCF ≤ 60).

4.2. Межвидовая перекрестная реактивность: мышь и яванская макака.

Чтобы определить, способна ли отобранная панель перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH связываться с LRP5 и LRP6 от мыши и яванской макаки, выполняли следующий FACS для конкуренции с DKK1.

Серийные разведения VHH инкубировали с клетками HEK293, стабильно экспрессирующими LRP5 мыши, LRP5 макаки, LRP6 мыши либо LRP6 макаки в присутствии 1 и 0,3 нМ hDKK1 (концентрация ниже EC₅₀ для мыши и макаки соответственно). Связывание DKK1 с клетками выявляли с помощью биотинилированного антитела против DKK1 со стрептавидином-ФЭ в качестве вторичного детектора, согласно описанию выше. В результате смогли продемонстрировать такую перекрестную реактивность.

4.3. Эпитоп-специфическая сортировка.

Эксперименты по сортировке выполняли для самых сильных блокирующих Wnt1-сигналинг перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH, чтобы определить разные эпитопные группы. В частности, отдельные VHH проверяли на способность конкурировать с другими биотинилированными VHH (т. наз. эталонными VHH) за связывание с рецепторами LRP5 и LRP6 с помощью анализов на основе FACS. Серийные разведения отдельных VHH инкубировали на клетках HEK293, стабильно экспрессирующих человеческие LRP5 или LRP6, вместе с 200 пМ или 500 пМ биотинилированных эталонных VHH (концентрации ниже значения EC₅₀). Связывание биотинилированных эталонных VHH с клетками определяли с помощью стрептавидина-ФЭ. Конкуренция VHH с эталонными VHH за связывание с LRP5 и LRP6 проявляется снижением флуоресценции, измеренной FACS Array.

В результате этих опытов блокаторы Wnt1 подразделили на три группы. Более низкая аффинность VHH не позволила провести эксперименты по эпитоп-специфической сортировке для блокаторов Wnt3a.

4.4. Анализы по гену-репортеру Wnt1 и Wnt3a.

Способность перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH подавлять Wnt-сигналинг проверяли функциональным анализом Wnt1 и Wnt3a. В этом отношении невозможно было использовать установленный протокол, пришлось сделать несколько попыток, чтобы установить биохимические функциональные анализы, такие как анализы блокирования Wnt1/Wnt3a - LRP5/LRP6: KD всем сложностям с рекомбинантными белками LRP5 и LRP6 (см. пример 1), нет функционального рекомбинантного Wnt1-лиганда (включая доступные в продаже). Белки Wnt содержат много консервативных цистеинов и модифицированы мононенасыщенной жирной кислотой (пальмитинолеиновой кислотой), присоединенной к консервативному серину. Эти посттрансляционные модификации необходимы для эффективного сигналинга и секретирования Wnt. Структурные анализы показали, что один из доменов, содержащий липид пальмитинолеиновую кислоту, необходим для связывания с рецептором Frizzled, приводя к смене конформации, делающей возможным взаимодействие Wnt-лигандов с LRP5 и LRP6 на клеточной поверхности. Оказалось, что такие посттрансляционные модификации необходимы для функциональных исследо-

ваний с этим белком, но в то же время подобные липидные посттрансляционные модификации очень сильно усложняют экспрессию и очистку этих белков (из-за плохой растворимости). Поэтому это стало большой преградой для биохимических анализов.

Поэтому для характеристики очищенных VHH был разработан функциональный анализ на клеточной основе: анализ Wnt по гену-репортеру β -лактамазы. В частности, для подавления пути Wnt1 клетки CellSensor LEF/TCF-bla FreeStyle 293F (Invitrogen, арт. K1677) трансфицировали человеческим Wnt1 и отбирали клоны со стабильной сверхэкспрессией человеческого Wnt1. Для проверки подавления пути Wnt3a создавали клетки CellSensor LEF/TCF-bla FreeStyle 293F со стабильной сверхэкспрессией человеческого Wnt3a. Клеточная линия CellSensor® LEF/TCF - bla FreeStyle™ 293 содержит репортерный ген β -лактамазы под контролем индуцируемого Wnt промотора LEF/TCF, который стабильно встроено в клетки FreeStyle™ 293 (Invitrogen). Таким образом, экспрессия Wnt1 или Wnt3a в этих клетках приводит к конститутивной экспрессии, а значит, и к ферментативной активности β -лактамазы. Потому обработка функциональными перекрестнореактивными по LRP5/LRP6 VHH должна привести к подавлению пути Wnt1 и Wnt3a, что приведет к подавлению ферментативной активности β -лактамазы.

Для анализа 1E06/мл клеток со сверхэкспрессией Wnt1 или Wnt3a высевали на 384-луночный планшет для тканевых культур и инкубировали на протяжении ночи при 37°C. На следующий день готовили серийные разведения различных перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH и добавляли к клеткам в присутствии LiCl в конечной концентрации 10 нМ. В качестве положительного контроля к клеткам добавляли DKK1 в финальной концентрации 200 нМ. Обработка DKK1 приводила к полному подавлению пути Wnt1 и Wnt3a и поэтому к полному подавлению ферментативной активности β -лактамазы. Клетки инкубировали на протяжении ночи при 37°C. На следующий день ферментативную активность β -лактамазы измеряли согласно инструкциям производителя (Invitrogen, арт. K1085). Для флюоресцентной эмиссии получали значения при 460 нм и 530 нм при помощи стандартного флюоресцентного планшетного ридера, и соотношение эмиссии при 460/530 нм наносили на график относительно указанной обработки. Эффективность рассчитывали относительно положительного контроля (DKK1 в финальной концентрации 200 нМ).

Всего отобрали двенадцать перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 блокаторов Wnt1, полная эффективность и сила которых была большей чем 50 нМ. Идентифицировали четырнадцать перекрестнореактивных блокаторов Wnt3a, в основном слабых. Только один блокатор Wnt3a показал хорошую силу (ниже 5 нМ).

4.5. Анализы фосфорилирования Wnt1 и Wnt3a.

Самые мощные и эффективные образцы из каждой группы блокаторов Wnt1, а также самые мощные и эффективные блокаторы Wnt3a впоследствии проверяли в анализах фосфорилирования LRP5 и LRP6, зависящего от Wnt1 и Wnt3a. В анализах фосфорилирования использовали клетки CellSensor LEF/TCF 293F от Invitrogen (арт. K1677), котрансфицированные векторами экспрессии, кодирующими либо Wnt1, либо Wnt3a. Так как образование комплекса Wnt-Frizzled-LRP5 или -LRP6 приводит к фосфорилированию LRP5 или LRP6 и последующей нисходящей передаче сигнала, для измерения такой передачи можно использовать количественное определение фосфорилирования. Чтобы получить специфичные по LRP5 и LRP6 показания, клетки подвергали лизису и выполняли иммунопреципитацию с помощью антитела, селективного по LRP5 или LRP6 (направленного против внутриклеточного домена двух рецепторов). Фосфорилированные LRP5 или LRP6 выявляли вестерн-блоттингом с использованием поликлонального антитела против фосфо-LRP6 (Ser1490) (Cell Signaling Technology), выявляющего фосфорилированные белки и LRP5, и LRP6. Отобранную панель очищенных VHH, блокирующих Wnt1 и Wnt3a, содержащую по крайней мере один представитель VHH из каждой группы, проверяли в финальных концентрациях от 10 до 100 нМ. В частности, клетки инкубировали на протяжении ночи в присутствии блокирующих VHH перед лизисом клеток и иммунопреципитацией LRP5 и LRP6. Эффективность VHH, блокирующих Wnt1 и Wnt3a, при блокировании фосфорилирования LRP5 и LRP6 рассчитывали количественной оценкой полос вестерн-блоттинга по сравнению с положительным контролем (DKK1, финальная концентрация 1 мкМ).

4.6. Биофизическая характеристика.

Перекрестнореактивным по LRP5/LRP6 VHH-доменам давали дальнейшую оценку экспрессии и очистки в *E. coli* и *Pichia pastoris*, как описано в примере 3. В частности, выход экспрессии моновалентных образцов панели VHH считали приемлемым, если он был выше 0,1 мг/л. Отобранные перекрестнореактивные по LRP5/LRP6 VHH показали экспрессию в диапазоне 0,1-8,2 мг/л в *E. coli* и выше в *Pichia pastoris* (>1 мг/л). Экспрессию оценивали анализом SDS-PAGE.

Термостабильность моновалентных перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH определяли флюоресцентным анализом теплового сдвига (ATC) с помощью Lightcycler (Roche). VHH инкубировали при разных значениях pH в присутствии Sypro Orange, применяя градиент температуры. После разворачивания укладки, вызванного теплом, обнажаются гидрофобные участки белков, с которыми связывается Sypro Orange, что приводит к повышению интенсивности флюоресценции (Возб/Эм = 465/580 нм). Точка перегиба на первой производной кривой интенсивности флюоресценции служит мерой температуры

плавления ($T_{пл}$). У всех VHH $T_{пл}$ повышалась при повышении pH и выравнивалась при pH 6, что является типичной для VHH схемой $T_{пл}$. Для перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-блокаторов Wnt1 и VHH-блокаторов Wnt3a получили среднее значение 82°C при pH 7.

Методом аналитической эксклюзионной хроматографии исследовали потенциальную возможность агрегации и мультимеризации VHH к LRP5 и LRP6. С этой целью 8 мкг очищенного образца VHH в концентрации 0,5 мг/мл инжестировали с помощью оборудования Dionex Ultimate 3000 в колонку Agilent SEC-3. В качестве подвижной фазы применяли L-аргининовый буфер (10 mM фосфата, 300 mM Arg-HCl, pH 6,0) на скорости потока 1 мл/мин. Ни один из VHH к LRP5 и LRP6 не имел больших проблем с агрегацией во время ЭХ-анализа: профили указывали на более чем 95% мономеров в большинстве образцов.

Пример 5. Создание и характеристика бипаратопных конструкторов с продленным периодом полувыведения.

Перекрестнореактивные по LRP5/LRP6 VHH для Wnt1 и Wnt3a использовали в качестве строительных блоков для создания бипаратопного конструктора, изображенного на фиг. 1. В качестве метода продления периода полувыведения использовали геновое слияние с VHH, связывающимся с сывороточным альбумином. Три строительных блока (Wnt1-блокатор, Wnt3a-блокатор и альбуминсвязывающий) соединяли гибким линкером. VHH вырабатывали в *P. pastoris* и очищали по описанию в примере 3. Полученные конструкторы, т.е. бипаратопные перекрестнореактивные по LRP5/LRP6 VHH-конструкторы, встраивали в вектор экспрессии рAX159 для *P. pastoris* в виде VHH-конструкторов с сMyc-гексагистидиновой меткой на С-конце согласно стандартным процедурам, описанным, например, в WO 2012/131078. Исследовали разную ориентацию строительных блоков и разные линкеры, особенно GS-линкеры. На основании данных моделирования, отражающих увеличенную площадь поверхности между потенциальными сайтами связывания Wnt1 и Wnt3a в LRP6 (т.е. то, что β -пропеллеры 1 и 2 не находятся в непосредственной близости от β -пропеллера 3), выбрали относительно длинный GS-линкер. Наилучшие результаты касательно силы по комбинированному анализу по гену-репортеру Wnt1 и Wnt3a получили при встраивании VHH, связывающего человеческий сывороточный альбумин/ЧСА, в середину. Использовали 35-GS-линкер, а VHH-блокаторы Wnt1 и Wnt3a расположили в предпочтительном порядке.

С целью отбора оптимальных VHH-связывателей и комбинаций связывателей создали библиотеку, в которой VHH, связывающий человеческий сывороточный альбумин/ЧСА, поместили между LRP5/LRP6 Wnt1-Wnt3a-блокаторами. В частности, в библиотеке использовали панель высокоаффинных связывателей с большой силой и эффективностью согласно анализам Wnt1 или Wnt3a (анализы по гену-репортеру и фосфорилированию), чтобы создать бипаратопные конструкторы с продленным периодом полувыведения, спроектированные, как показано на фиг. 1. После экспрессии в *Pichia pastoris* (как описано в примере 3) и последующей очистки бипаратопные конструкторы с продленным периодом полувыведения подвергали скринингу с помощью анализов по гену-репортеру Wnt1 и Wnt3a (описан в примере 4) в присутствии 30 мкМ ЧСА в трех разведениях (1/100, 1/1000, 1/7000), с целью оценить эффективность и относительную силу. В целом наблюдали хорошую корреляцию данных репортерных анализов Wnt1 и Wnt3a, и для множества форматов измерили высокую эффективность. Для дальнейшей оценки отобрали всего 11 бипаратопных по LRP5 и LRP6 конструкторов с продленным периодом полувыведения, принимая во внимание эффективность в обоих репортерных анализах и разнообразие блокаторов Wnt1 и Wnt3a. Эти дальнейшие оценочные анализы описаны ниже.

Анализы по гену-репортеру Wnt1 и Wnt3a.

Анализы по гену-репортеру Wnt1 и Wnt3a выполняли согласно описанию в примере 4.4, в присутствии конечной концентрации ЧСА 30 мкМ. Очищенные бипаратопные по LRP5/LRP6 конструкторы проверяли в 12 разведениях, начиная с 2,5 мкМ.

Большинство конструкторов показало высокую силу от 1,7 до 0,16 нМ и полную эффективность в обоих репортерных анализах, что отражено в табл. 4 ниже. Последовательности установленных там индивидуальных VHH-доменов, ингибирующих Wnt1 и Wnt3a, приведены в табл. 5 ниже.

Таблица 4

Сила и эффективность отобранных бипаратопных перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-конструктов с продленным периодом полувыведения в анализе по гену-репортеру в присутствии ЧСА

Конструкт	N-конец	C-конец	Репортерный анализ Wnt1		Репортерный анализ Wnt3a	
			IC ₅₀ (M)	% инг.	IC ₅₀ (M)	% инг.
F013500053	F0129093A01	F0130333G06	2,3E-10	102	4,1E-10	97
F013500039	F0129093A03	F0130333E06	1,7E-09	102	1,6E-09	82
F013500046	F0130332D03	F0129093A01	5,1E-10	102	6,0E-10	96
F013500016	F0130332D03	F0130367B10	3,1E-10	102	2,7E-10	99
F013500018	F0130332D03	F0130378B05	7,4E-10	102	1,3E-09	98
F013500047	F0130333E06	F0129093A01	8,8E-10	102	9,1E-10	94
F013500026	F0130333E06	F0130367B10	3,3E-10	102	2,6E-10	100
F013500021	F0130333G06	F0130367B10	1,6E-10	102	1,8E-10	102
F013500032	F0130378A04	F0130333G06	2,4E-10	102	4,3E-10	94
F013500033	F0130378B05	F0130333G06	1,8E-10	102	2,5E-10	88
F013500030	F0130378B05	F0130372C08	1,4E-09	102	1,3E-09	96

Таблица 5

Последовательности VHH-доменов, приведенных в табл. 4

VHH ID Специфичность	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
F0129093A01 Wnt3a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYA MGWFRQAPGKEREVAAISWSGGSTYYADSVK GRFTISRDN SKNTVYLQMNLRPEDTAVYYCAA SPIPYGSLRRRNNYDYWGQGLTVTVSSAAAEQ <u>KLISEEDLN GAAHHHHHH</u>	28
F0130333G06 Wnt1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYA MGWFRQAPGKEREVAAIRRSGRRTYYADSVK GRFTISRDN SKNTVYLQMNLRPEDTAVYYCAA ARRVRSSTRYNTGTWWWEYWGQGLTVTVSSA <u>AAEQKLISEEDLN GAAHHHHHH</u>	29
F0129093A03 Wnt3a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYV MGWFRQAPGKEREVAAINWSGSRTYYADSVK GRFTISRDN SKNTVYLQMNLRPEDTAVYYCAA SRSSYAGRYYELYDYWGQGLTVTVSSAAAEQ <u>KLISEEDLN GAAHHHHHH</u>	30
F0130333E06 Wnt1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYT VGWFRQAPGKEREVAAIRRRGSSTYYSDSVK RFTISRDN SKNTVYLQMNLRPEDTAVYYCAAD TRTVALLQYRYDYWGQGLTVTVSSAAAEQKLI <u>SEEDLN GAAHHHHHH</u>	31
F0130332D03 Wnt1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYT MGWFRQAPGKEREVAAINRSGGSTYYSDSVK GRFTISRDN SKNTVYLQMNLRPEDTAVYYCAA DRRGRGENYSLLYSSNRYEYWGQGLTVTVSSA <u>AAEQKLISEEDLN GAAHHHHHH</u>	32
F0130367B10 Wnt3a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYA MGWFRQAPGKEREVAAISWRSGSTYYADSVK GRFTISRDN SKNTVYLQMNLRPEGTAVYYCAA DPRGYGVAYVSAYYEWYWGQGLTVTVSSGAAE <u>QKLISEEDLN GAAHHHHHH</u>	33
F0130378B05 Wnt3a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSSYA MGWFRQAPGKEREVAAISRSGGRRTYYADSVK GRFTISRDN SKNTVYLQMNLRPEDTAVYYCAA DRRVYSTLPPTSRYNWYWGQGLTVTVSSAAAEQ <u>KLISEEDLN GAAHHHHHH</u>	34
F0130378A04 Wnt3a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYA MGWFRQAPGKEREVAAITRTGRRTYYADSVK GRFTISRDN SKNTVYLQMNLRPEDTAVYYCAA DRRGYYYDSSFYDYWGQGLTVTVSSAAAEQ <u>LISEEDLN GAAHHHHHH</u>	35

F0130372C08 Wntl	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYG MGWFRQAPGKEREVVAAISWSGGRTYYADSVK GRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRPEDTAVYYCAA KRRGRGSVSPNSSRYNYWGQGLTVTVSSAAA <u>EQKLISEEDLNGAAHHHHHH</u>	36
F013500016	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYT MGWFRQAPGKEREVVAAINRSGGSTYYSDSVK GRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRPEDTAVYYCAA DRRGRGENYSLLYSSNRYEYWGQGLTVTVSSG GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFS SFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADS VKGRFTISRDN AKTTL YLQMNSLRPEDTAVYYC TIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGK EREVVAAISWRSGSTYYADSVKGRFTISRDN SK NTVY LQMNSLRPEGTAVYYCAADPRGYGVAY VSAYYEWGQGLTVTVSSGAAEQKLISEEDLNG <u>AAHHHHHH</u>	37
F013500018	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYT MGWFRQAPGKEREVVAAINRSGGSTYYSDSVK GRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRPEDTAVYYCAA DRRGRGENYSLLYSSNRYEYWGQGLTVTVSSG GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFS SFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADS VKGRFTISRDN AKTTL YLQMNSLRPEDTAVYYC TIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGWFRQAPGK EREVVAAISRSGRTYYADSVKGRFTISRDN SKN TVY LQMNSLRPEDTAVYYCAADRRVYSTLPPTT SRYNYWGQGLTVTVSSGAAEQKLISEEDLNGA <u>AHHHHHH</u>	38

F013500021	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYA MGWFRQAPGKEREFVAAIRRSGRRTYYADSVK GRFTISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTAVYYCAA ARRVRSSTRYNTGTWWWEYWGQGLVTVSSG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGTFSS SFGMSWVRQAPKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYQLQMNSLRPEDTAVYYC TIGGSLRSQQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGK EREFVAAISWRSGSTYYADSVKGRFTISRDNK NTVYQLQMNSLRPEGTAVYYCAADPRGYGVAY VSAYYEWGQGLVTVSSGAAEQKLISEEDLNG <u>AAHHHHHH</u>	39
F013500026	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYT VGWFRQAPGKEREFVAAIRRRGSSTYYSDSVKG RFTISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTAVYYCAAD TRTVALLQYRYDYWGQGLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGLVQPGNSLRLSCAASGTFSSFGMSWVR QAPKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLYQLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRS SQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAIS WRSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYQLMN SLRPEGTAVYYCAADPRGYGVAYVSAYYEW GQGLVTVSSGAAEQKLISEEDLNGAAHHHHH <u>H</u>	40
F013500030	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSSYA MGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGRTYYADSVK GRFTISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTAVYYCAA DRRVYSTLPPTTSRYNYWGQGLVTVSSGGGG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGTFSSFGMS WVRQAPKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNKTTLYQLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS LSRSSQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGRTFSDYGMGWFRQAPGKEREFV AAISWGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYQL QMNSLRPEDTAVYYCAAARRRGRGSVSPNSSRY NYWGQGLVTVSSGAAEQKLISEEDLNGAAHH <u>HHHH</u>	41

F013500032	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYA MGWFRQAPGKEREFVAAITRTGRRTYYADSVK GRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRPEDTAVYYCAA DRRGYYYYDSSFYDYWGQGLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQ LVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSW VRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFT ISRDNAKTTLVYVYLMNSLRPEDTAVYYCTIGGSL RSSQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA AIRRSGRRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYV MNSLRPEDTAVYYCAAARRVRSSTRYNTGTW WWEYWGQGLVTVSSGAAEQKLISEEDLNGAA <u>HHHHHH</u>	42
F013500033	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAGRTFSSYA MGWFRQAPGKEREFVAAIRSGGRRTYYADSVK GRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRPEDTAVYYCAA DRRVYSTLPPTTSRYNYWGQGLVTVSSGGGGG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNAKTTLVYVYLMNSLRPEDTAVYYCTIGGS LSRSSQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA AIRRSGRRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYV MNSLRPEDTAVYYCAAARRVRSSTRYNTGTW WWEYWGQGLVTVSSGAAEQKLISEEDLNGAA <u>HHHHHH</u>	43
F013500039	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYV MGWFRQAPGKEREFVAAINWGSRTYYADSVK GRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRPEDTAVYYCAA SRSSYAGRYYELYDYWGQGLVTVSSGGGGG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNAKTTLVYVYLMNSLRPEDTAVYYCTIGGS LSRSSQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKEREFVA AIRRRGSSTYYSDSVKGRFTISRDNKNTVYVYV MNSLRPEDTAVYYCAADTRTVALLQYRYDYW GQGLVTVSSGAAEQKLISEEDLNGAAHHHHH <u>H</u>	44

F013500046	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYT MGWFRQAPGKEREFVAAINRSGGSTYYSDSVK GRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRPEDTAVYYCAA DRRGRGENYSLLYSSNRYEYWGQGLTVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS SFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYVYLMNSLRPEDTAVYYC TIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGK EREFVAAISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDNK NTVYVYLMNSLRPEDTAVYYCAAASPIPYGSLRR RNNYDYWGQGLTVTVSSGAAEQKLISEEDLNG <u>AAHHHHHH</u>	45
F013500047	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYT VGWFRQAPGKEREFVAAIRRRGSSTYYSDSVK RFTISRDNKNTVYVYLMNSLRPEDTAVYYCAAD TRTVALLQYRYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSFGMSWVR QAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLYVYLMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRS SQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAIS WSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLMN SLRPEDTAVYYCAAASPIPYGSLRRRNNYDYWG QGLTVTVSSGAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHHH	46
F013500053	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYA MGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGSTYYADSVK GRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRPEDTAVYYCAA SPIPYGSLRRRNNYDYWGQGLTVTVSSGGGGG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSFGMS WVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNKTTLYVYLMNSLRPEDTAVYYCTIGGS LSRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA AIRRSGRRTYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLM NSLRPEDTAVYYCAAARRVRSSTRYNTGTW WWEYWGQGLTVTVSSGAAEQKLISEE <u>DLNGAAHHHHHH</u>	47

Примечание: описанные в табл. 5 молекулы содержат тус-гексагистидиновую метку (подчеркнута), чтобы облегчить очистку рекомбинантно экспрессированных полипептидов; эта метка не нужна для и, как правило, не принимает участия связывания молекул с их мишенями.

Пример 6. Оптимизация последовательностей VHH и VHH-конструктов.

Оптимизация последовательностей - это процесс, в котором родительскую последовательность подвергают мутации, чтобы сделать ее более схожей с человеческой зародышевой консенсусной последовательностью IGHV3-IGHJ. К примеру, конкретные аминокислоты каркасных участков (за исключением так называемых отличительных остатков) заменяют их человеческими аналогами так, чтобы сохранить структуру, активность и стабильность белка.

Эти мутации можно разделить на следующие категории.

1. Стандартные: оптимизация последовательностей в этих положениях не должна существенно изменять стабильность, активность или аффинность VHH, поэтому их все изменяют одновременно, получая базовый вариант.

2. Уникальные: неизвестно, как оптимизация последовательностей в этих положениях повлияет на стабильность, активность или аффинность VHH, поэтому их исследуют индивидуально на основании базового варианта.

Известно, что отличительные остатки критично важны для стабильности, активности и аффинности VHH, поэтому их не меняют.

Кроме того, аминокислоты CDR, для которых есть экспериментальное подтверждение того, что они чувствительны к посттрансляционным модификациям (ПТМ), изменяли так, чтобы инактивировать сайт ПТМ, не трогая при этом структуру, активность и стабильность белка. Наиболее часто встречающиеся

посттрансляционные модификации, описанные для антител и VHH, перечислены в табл. 6 ниже. Чувствительность VHH к посттрансляционным модификациям анализировали по исследованиям с форсированной нагрузкой, применяя ряд стандартных условий, включая обработку H_2O_2 для оценки окисления метионина, высокую температуру, высокий pH и длительное хранение для оценки дезамидирования аспарагина и изомеризации аспартата. Процентную долю окисления, дезамидирования и изомеризации измеряли согласно стандартным процедурам и сравнивали с эталонными образцами (VHH, хранившимися при $-20^\circ C$). Для определения потенциально чувствительных остатков выполняли анализ цельных белков методом обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ) и картирование пептидов методом масс-спектрометрии (МС). Если после стресс-теста в VHH наблюдались посттрансляционные модификации, соответствующую(ие) аминокислоту(ы) подвергали мутации.

Таблица 6

Потенциальные посттрансляционные модификации и потенциально запускающие их мотивы

Мотив	Модификация
M	Окисление Met
N-S/G/H/N/A	Дезамидирование Asn
D-S/G/H	Изомеризация Asp
N-X-S/T-X (X ≠ P)	Гликозилирование Asn
Q/E	пироглутамат

В результате в вышеописанные конструкторы ввели несколько мутаций, получив, среди прочего, три конструктора, показанные в табл. 3 выше, отобранные для дальнейшей характеристики *in vitro* и *in vivo*, как показано в дальнейших примерах.

Пример 7. *In vitro*-характеристика трех бипаратопных перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-конструкторов с продленным периодом полувыведения. Сравнение с другими связывающими LRP6 молекулами.

После оптимизации последовательностей VHH три бипаратопных перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-конструктора с продленным периодом полувыведения рекомбинантно экспрессировали и очищали, после чего характеризовали с помощью ряда функциональных и биофизических анализов, описанных ниже.

7.1. Анализ связывания FACS.

Связывание с человеческими LRP5 и LRP6 определяли на клетках анализом FACS, как показано на фиг. 3А и 3В. В частности, связывание с человеческим LRP5 проверяли на клетках HEK293 со стабильной сверхэкспрессией человеческого LRP5. Для связывания с человеческим LRP6 использовали клетки HEK293 со стабильной сверхэкспрессией человеческого LRP6. Клетки инкубировали с разведениями LRP5- и LRP6-связывателей (серийные разведения связывателей 1:5, соответствующие финальным концентрациям, показанным на фиг. 3А и 3В) на протяжении 1,5 ч при $4^\circ C$ на планшетном шейкере. После 5-кратной промывки клеток буфером FACS, состоящим из $1 \times$ ФСБ (Invitrogen, арт. 141190-094) + 10% ЭБС (Sigma, арт. F7524) + 0,05% азида натрия, их инкубировали на протяжении 1 ч при $4^\circ C$ с поликлональным мышинным антителом, связывающимся с каркасным участком VHH. После трехкратного промывания клеток буфером FACS их инкубировали на протяжении 1 ч при $4^\circ C$ с меченым вторичным антителом (противомышинное, ФЭ (115-116-071)) с последующим трехкратным промыванием буфером FACS. Флюоресценцию измеряли с помощью FACS Array (BD). Связыванию с человеческими LRP5 и LRP6 при наивысшей проверенной концентрации соответствовали значения MCF ≥ 600 . Отрицательный контроль состоял из ненацеленного связывателя (VHH-конструкт, связывающийся с бактериальным белком, который в клетках HEK293 не экспрессируется). Как показано соответственно на фиг. 3А и 3В, связыванию с человеческими LRP5 и LRP6 соответствовали значения MCF ≥ 600 и ≥ 1600 , при наивысшей проверенной концентрации трех бипаратопных перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-конструкторов с продленным периодом полувыведения. Эти данные подтверждают, что отформатированные бипаратопные связывающие молекулы с оптимизированной последовательностью в своей природной конформации в системе анализа на клетках связываются как с человеческим LRP5, так и с человеческим LRP6. Значения EC_{50} связывания с hLRP5 и hLRP6 приведены в табл. 7 ниже.

Таблица 7

Значения EC_{50} связывания с человеческими LRP5 и LRP6, определенные анализом связывания FACS

Анализ связывания на основе FACS	F013500571	F013500575	F013500720
hLRP5, EC_{50} (нМ)	0,01	0,001	0,02
hLRP6, EC_{50} (нМ)	0,02	0,01	0,02

7.2. Анализ конкуренции с DKK1 на основе FACS.

Силу и эффективность трех бипаратопных перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-конструкторов дополнительно анализировали анализом конкуренции с DKK1 на основе FACS, описанным в примере 4.1. Клетки HEK293 со стабильной сверхэкспрессией человеческого LRP5 или человеческого LRP6 инкубировали с серийными разведениями перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-

конструктов (серийные разведения 1:5, соответствующие финальным концентрациям, показанным на фиг. 4А и 4В). Перекрестнореактивные по LRP5/LRP6 VHH конкурировали с человеческим DKK1 за связывание с клетками HEK293, сверхэкспрессирующими человеческий LRP5, равно как и за связывание с клетками HEK293, сверхэкспрессирующими человеческий LRP6, как показано соответственно на фиг. 4А и 4В. Полного подавления связывания DKK1 достигли при наивысших проверенных концентрациях (≥ 10 нМ), что соответствовало значениям MCF ≤ 60 . Напротив, специфичный по LRP5 VHH конкурировал бы с человеческим DKK1 за связывание с HEK293, сверхэкспрессирующими человеческий LRP5, но не за связывание с HEK293, сверхэкспрессирующими человеческий LRP6 (либо конкурировал бы, но очень слабо (>200 нМ) (и наоборот, то же самое касается специфичных по LRP6 VHH). В результате этого эксперимента было продемонстрировано, что присутствующие перекрестнореактивные по LRP5/LRP6 VHH конкурировали с человеческим DKK1 за связывание с HEK293, сверхэкспрессирующими человеческий LRP5, равно как и с HEK293, сверхэкспрессирующими человеческий LRP6 (т.е. снижение значения MCF при повышении концентрации связывателя, где полному подавлению DKK1-связывания при наивысшей проверенной концентрации соответствовали значения MCF ≤ 60). Значения IC₅₀ для конкуренции DKK1 за связывание с hLRP5 и hLRP6 с тремя перекрестнореактивными по LRP5/LRP6 VHH-конструктами приведены в табл. 8 ниже. Эти данные подтверждают связывание трех перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-конструктов с человеческим LRP5 и с человеческим LRP6, а также показывают весьма сходную аффинность (здесь определяемую как значения силы IC₅₀ в анализе конкуренции с DKK1) двух рецепторов. Более того, данные упрочняют позицию, что отформатированные бипаратопные связывающие молекулы с оптимизированной последовательностью в своей природной конформации связываются как с человеческим LRP5, так и с человеческим LRP6.

Таблица 8

Значения IC₅₀ конкуренции с DKK1 за связывание с человеческими LRP5 и LRP6, определенные анализом связывания FACS

Анализ конкуренции с DKK1	F013500571	F013500575	F013500720
hLRP5, IC ₅₀ (нМ)	0,03	0,03	0,3
hLRP6, IC ₅₀ (нМ)	0,01	0,1	0,2

7.3. Комбинированный анализ по гену-репортеру Wnt1 и Wnt3a.

Силу и эффективность отформатированных бипаратопных связывающих молекул с оптимизированной последовательностью анализировали по комбинированному анализу по гену-репортеру Wnt1 и Wnt3a, чтобы обеспечить функциональную проверку блокаторов Wnt1 и Wnt3a в одном анализе. Комбинированный анализ по гену-репортеру Wnt1 и Wnt3a основан на описанном в примере 4.4 анализе, со следующими изменениями протокола. 1E06/мл клеток со сверхэкспрессией Wnt1 высевали на 384-луночный планшет для тканевых культур и обрабатывали рекомбинантным человеческим Wnt3a (рек.чел. Wnt3a: R&D #5036-WN/CF), после чего клетки инкубировали на протяжении ночи при 37°C. На следующий день готовили серийные разведения различных бипаратопных перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH и добавляли к клеткам в присутствии LiCl в конечной концентрации 10 нМ. В качестве положительного контроля к клеткам добавляли DKK1 в финальной концентрации 200 нМ. Обработка DKK1 приводила к полному подавлению комбинированного пути Wnt1 и Wnt3a и поэтому к полному подавлению ферментативной активности β -лактамазы. Клетки инкубировали на протяжении ночи при 37°C. На следующий день измеряли ферментативную активность β -лактамазы согласно инструкциям производителя. Как указано в примере 4.4, для флюоресцентной эмиссии получали значения при 460 нм и 530 нм при помощи стандартного флюоресцентного планшетного ридера, и соотношение эмиссии при 460/530 нм наносили на график относительно указанной обработки. Значение соотношения флюоресценции [460/535 нм], обозначенное на фиг. 5А как "базовая линия", соответствует полному ингибированию пути Wnt1 и Wnt3a, определенному обработкой с положительным контролем (DKK1 в финальной концентрации 200 нМ). Значение соотношения флюоресценции [460/535 нм], обозначенное как "Wnt1", соответствует активации только пути Wnt1, определенной по клеткам, сверхэкспрессирующим Wnt1 (т.е. не обработанным рекомбинантным человеческим Wnt3a). Значение соотношения флюоресценции [460/535 нм], обозначенное как "Wnt1 + Wnt3a", соответствует комбинированной активации путей Wnt1 и Wnt3a, определенной обработкой клеток, сверхэкспрессирующих Wnt1, рекомбинантным человеческим Wnt3a. Как показано на фиг. 5А, полное подавление (т.е. соотношение флюоресценции [460/535 нм], соответствующее базовой линии) достигалось обработкой тремя перекрестнореактивными по LRP5/LRP6 отформатированными бипаратопными связывающими молекулами с оптимизированной последовательностью. Кроме того, отмечалась также значительная сила, как показано в табл. 9 ниже на значениях IC₅₀.

Значения IC_{50} подавления путей Wnt1 и Wnt3a в комбинированном анализе Wnt1 и Wnt3a по гену-репортеру

Комбинированный анализ Wnt1 и Wnt3a по гену-репортеру	F013500571	F013500575	F013500720
IC_{50} (нМ)	0,05	0,2	0,06

Далее силу и эффективность перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 отформатированных бипаратопных связывающих молекул с оптимизированной последовательностью сравнивали с известными прежде молекулами, связывающими LRP6, упомянутыми в WO 2011/138391 и WO 2011/119661.

В WO 2011/138391 были описаны мультвалентные антитела, связывающиеся с LRP6 и ингибирующие взаимодействие с лигандом как пропеллера 1 (например, Wnt1), так и пропеллера 3 (например, Wnt3). Эти мультвалентные антитела, связывающиеся с LRP6, являются бипаратопными молекулами, связывающими LRP6, состоящими из антитела IgG в качестве первого связывающего рецептор домена и фрагмента scFv в качестве второго связывающего рецептор домена, при этом антитело IgG и фрагмент scFv соединены линкером. В WO 2011/138391 сообщается, что все связывающие LRP6 молекулы имеют примерно одинаковую силу по репортерному анализу Wnt1 и Wnt3a (фиг. 18 WO 2011/138391). Поэтому для сравнительных опытов можно выбрать любую из этих мультвалентных молекул, связывающихся с LRP6. Поэтому как первое соединение для сравнения было решено использовать конструктор "901" (обозначенный MOR08168IgG1LALA 6475 scfv; также показан на фиг. 27 WO 2011/138391).

В WO 2013/067355 показаны производные этого конструктора "901". Более конкретно описаны соединения 801Т и 802Т (см. информацию на стр. 132 описания), имеющие два LRP6-связывающих домена scFv плюс фрагмент, продлевающий период полувыведения. Так как, по всей видимости, 801Т и 802Т имеют одинаковые силу и биофизические характеристики *in vitro*, то для нижеописанных экспериментов брали только один из них - вариант 802Т.

В WO 2011/119661 описаны биспецифические антитела, связывающиеся с LRP6 и подавляющие передачу сигнала по многим изоформам Wnt. Эти биспецифические антитела против LRP6 связываются с двумя разными участками LRP6 и подавляют передачу сигнала, индуцируемую изоформами Wnt, среди них Wnt1 и Wnt3a. Для получения этих биспецифических антител против LRP6 использовали конструирование по принципу "выступы-во-впадины" (Atwell и др. "Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library". J. Mol. Biol. 1997; 270(1):26-35). В примере 11 WO 2011/119661 описан гибрид IgG с гетеродимерами тяжелой цепи YW211.31.62 и YW210.09. Поэтому в целях сравнения сгенерировали два биспецифических гибридных антитела IgG с гетеродимерами тяжелой цепи YW211.31.62 и YW210.09, пользуясь техникой "выступов-во-впадины", т.е. с аминокислотными изменениями, спроектированными для создания выступа на СН3 тяжелой цепи YW210.09 и впадины на СН3 тяжелой цепи YW211.31.62 или наоборот, и обозначили их как Knob HC YW210.09 и Knob HC YW211.31.62 соответственно. Эти два конструктора охарактеризовали с помощью репортерных анализов Wnt1 и Wnt3a согласно примеру 4.4. Как и ожидалось, два биспецифических гибрида IgG с гетеродимерами тяжелой цепи YW211.31.62 и YW210.09 в анализах Wnt1 и Wnt3a показали одинаковую силу, что отмечено в табл. 10 ниже. Поэтому для показанных дальше сравнительных примеров в качестве второго сравнительного соединения выбрали Knob HC YW210.09.

Таблица 10

Значения IC_{50} подавления путей Wnt1 и Wnt3a в анализах Wnt1 и Wnt3a по гену-репортеру

Репортерный анализ Wnt	Knob HC YW210.09	Knob HC YW211.31.62
Wnt1, IC_{50} (нМ)	4,8	4,6
Wnt3a, IC_{50} (нМ)	0,7	0,9

Силу и эффективность бипаратопных перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-конструкторов с продленным периодом полувыведения сравнивали с бипаратопной молекулой MOR08168IgG1LALA 6475 scfv, связывающей LRP6, с биспецифической молекулой Knob HC YW210.09 против LRP6 и с биспецифической молекулой 802Т против LRP6, используя комбинированный анализ по гену-репортеру Wnt1 и Wnt3a. Как показано на фиг. 5В, полное подавление (т.е. соотношение флуоресценции [460/535 нм], соответствующее базовой линии на фиг. 5В) достигалось обработкой Knob HC YW210.09 (биспецифическим гибридным антителом IgG с гетеродимерами тяжелой цепи YW211.31.62 и YW210.09) так же, как и перекрестнореактивной по LRP5/LRP6 отформатированной бипаратопной связывающей молекулой с оптимизированной последовательностью F013500571. Однако F013500571 показал большую силу, как отмечено в табл. 11 ниже. В то же время бипаратопные молекулы MOR08168IgG1LALA 6475 scfv и 802Т, связывающие LRP6, показали недостаточно полное подавление Wnt1 и Wnt3a (т.е. соотношение флуоресценции [460/535 нм] значительно выше базовой линии на фиг. 5В и 5С соответственно). Эти данные указывают на то, что обе бипаратопные молекулы MOR08168IgG1LALA 6475 scfv и 802Т, связывающие LRP6, имеют значительно меньшую эффективность при подавлении Wnt1 и Wnt3a по сравнению

с F013500571. Поэтому для описанных далее экспериментов *in vivo* в качестве сравнительного соединения был выбран Knob HC YW210.09 (пример 9; эффективность *in vivo*).

Таблица 11

Значения IC₅₀ подавления путей Wnt1 и Wnt3a в комбинированном анализе Wnt1 и Wnt3a по гену-репортеру

Комбинированный анализ Wnt1 и Wnt3a по гену-репортеру	F013500571	Knob HC YW210.09	MOR08168IgG1LALA 6475 scfv	802T
IC ₅₀ (нМ)	0,05	1,15	0,19	0,01

Пример 8. Влияние трех бипаратопных перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-конструктов с продленным периодом полувыведения на передачу сигнала Wnt и жизнеспособность раковых клеточных линий.

Способность бипаратопных перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-конструктов с продленным периодом полувыведения подавлять активный Wnt-сигналинг дополнительно охарактеризовали с помощью клеточных линий с активным Wnt-сигналингом, описанных ранее (Bafico и др. "An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human cancer cells". *Cancer Cell* 2004; 6(5):497-506; DeAlmeida и др. "The soluble wnt receptor Frizzled8CRD-hFc inhibits the growth of teratocarcinomas *in vivo*". *Cancer Res.* 2007; 67(11):5371-9); Akiri и др. "Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung carcinoma". *Oncogene.* 2009; 28(21):2163-72). Если вкратце, линии раковых клеток с активным Wnt-сигналингом, PA-1 и PA-TU-8988S, высевали на 12-луночные планшеты и обрабатывали перекрестнореактивными по LRP5/LRP6 VHH-конструктами в конечной концентрации 1 мкМ на протяжении двух дней. Способность подавлять Wnt-сигналинг выявляли по ингибированию экспрессии мРНК Axin2, эндогенного гена-мишени Wnt. Анализ экспрессии кПЦР выполняли с использованием стандартных методик РНК. Выделение РНК осуществляли с помощью QIAGEN RNeasy Mini Kit согласно протоколу QIAGEN; синтез кДНК - с помощью Superscript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, арт. 11754050) и кПЦР - с помощью TaqMan Gene Expression Assay с праймерами/зондами Axin2 TaqMan (Hs00610344_m1 AXIN2 FAM, Life Technologies), а также с эукариотическим 18s эндогенным контрольным VIC-MGB (4319413E-1307061, Applied Biosystems).

Как показано на фиг. 6А, и раковые клетки PA-TU8988S, и PA-1 при обработке тремя бипаратопными перекрестнореактивными по LRP5/LRP6 VHH-конструктами с продленным периодом полувыведения показали значительное снижение относительных уровней мРНК Axin2 (т.е. нормализованных по эндогенному контролю) по сравнению с необработанными (контрольными) клетками. Эти данные демонстрируют способность бипаратопных перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-конструктов с продленным периодом полувыведения подавлять Wnt-сигналинг в клеточных линиях с активным Wnt-сигналингом. Кроме того, исследовали влияние блокады Wnt-сигналинга на жизнеспособность клеток раковых клеточных линий PA-TU8988S и YAPC, о которых ранее сообщалось, что их пролиферация зависит от активного Wnt-сигналинга (Jiang и др. "Inactivating mutations of RNF43 confer Wnt dependency in pancreatic ductal adenocarcinoma". *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(31): 12649-54). Жизнеспособность клеток измеряли анализом Alamar Blue (Invitrogen, арт. DAL1100) через десять дней после обработки бипаратопными перекрестнореактивными по LRP5/LRP6 VHH-конструктами с продленным периодом полувыведения (финальная концентрация 1 мкМ) или сравнительным соединением 802Т (финальная концентрация 1 мкМ). Как показано на фиг. 6В, раковые клетки PA-TU8988S при обработке тремя бипаратопными перекрестнореактивными по LRP5/LRP6 VHH-конструктами с продленным периодом полувыведения показали значительное снижение процента жизнеспособных клеток (снижение на ≥75%) по сравнению с необработанными (контрольными) клетками. После обработки 802Т влияния на жизнеспособность клеток не обнаружили (фиг. 6В, диаграмма с правой стороны). Эти данные демонстрируют способность бипаратопных перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 VHH-конструктов с продленным периодом полувыведения подавлять пролиферацию клеточных линий, зависимых от активного Wnt-сигналинга, а также превосходство этих конструкторов над 802Т.

Кроме того, для F013500571 по сравнению с 802Т на линиях раковых клеток PA-TU8988S (фиг. 6С) и YAPC (фиг. 6D) оценили зависимость жизнеспособности клеток от дозы. При обработке F013500571 выявили дозозависимое снижение жизнеспособности клеток. В отличие от этого, при обработке сравнительным соединением 802Т влияния на жизнеспособность клеток не обнаружили ни в одной из линий раковых клеток PA-TU8988S и YAPC. Эти данные демонстрируют, что бипаратопные перекрестнореактивные по LRP5/LRP6 VHH-конструкты с продленным периодом полувыведения имеют лучший эффект по сравнению с 802Т.

Пример 9. Эффективность *in vivo*.

Перекрестнореактивные по LRP5/LRP6 бипаратопные VHH-конструкты/связывающие молекулы с продленным периодом полувыведения дополнительно охарактеризовали *in vivo* на модели опухоли, вызванной Wnt. Осуществили опыты, призванные определить, подавляют ли эти связывающие молекулы рост опухоли *in vivo*. На этой же модели опухоли, вызванной Wnt, определяли эффективность сравни-

тельного соединения Knob HC YW210.09. Трансгенная экспрессия Wnt-лигандов с помощью LTR-энхансера вируса опухоли молочной железы мышей (промотора MMTV) у мышей приводит к обширной гиперплазии протоков с последующей аденокарциномой молочной железы у трансгенных (ТГ) мышей до 6-месячного возраста. Эти опухоли молочной железы вызываются индуцированной глюкокортикоидами сверхэкспрессией Wnt-лигандов и по своим характеристикам подобны ТНРМЖ-опухолям, включая экспрессию эпителиальных и мезенхимальных маркеров (подобный базальному фенотип) и активный Wnt-сигналинг, оцениваемый по внутриклеточной локализации β -катенина. В частности, опухоли молочной железы у трансгенных мышей MMTV-Wnt-1 зависят от Wnt1. В самом деле, сообщалось, что блокирование активности Wnt с помощью растворимого рецептора Wnt, включающего богатый цистеином домен (БЦД) Frizzled8, слитый с человеческим Fc-доменом (F8CRDhFc) (DeAlmeida и др. "The soluble wnt receptor Frizzled8CRD-hFc inhibits the growth of teratocarcinomas in vivo". *Cancer Res.* 2007;67(11):5371-9), подавляет рост опухоли *in vivo*. Поэтому выделенные из трансгенных мышей MMTV-Wnt1 опухоли подкожно пассировали в виде кусочков опухоли бестимусным мышам в количестве от 2 до 5 пассажей перед началом опыта по эффективности. Между 14 и 21 днями после имплантации, когда опухоли достигли среднего объема приблизительно 150-250 мм³, мышей рандомизировали по группам по 7 мышей и вводили им в.в. соединения. Перекрестнореактивные по LRP5/LRP6 бипаратопные VHH-конструкты с prolonged периодом полувыведения вводили мышам в.в. дважды в неделю, в дозах, показанных на фиг. 7А для F013500571 и на фиг. 7В для F013500720. Сравнительное соединение Knob HC YW210.09 также вводили в.в. дважды в неделю, но в более высоких дозах, т.е. 30 и 45 мг/кг (фиг. 7С), из-за данных, полученных для этого соединения в вышеописанных экспериментах *in vitro*. Во время опыта по эффективности отслеживали объем опухоли и массу тела, и медианные объемы опухолей показаны на фиг. 7А-7С. В конце опыта по эффективности определяли подавление роста опухоли (ПРО). В частности, ПРО определяли для каждой группы лечения по сравнению с контрольной группой (обработка мышей гистидиновым буфером -буфером с 20 мМ гистидина и pH 6,5 в опыте на фиг. 7А и 7В, либо же цитратным буфером в опыте на фиг. 7С). Кроме того, в конце опыта по эффективности выполняли желудочно-кишечный (ЖК) гистопатологический анализ (Г&Э-окрашиванием срезов ЖК-тракта от двенадцатиперстной до прямой кишки) с целью оценить потенциальную токсичность антагонистов LRP5 и LRP6. Подавление роста опухоли (ПРО), результат ЖК-гистопатологического анализа в конце исследования эффективности *in vivo*, смертность, соответствующая количеству мышей, которых пришлось умертвить из-за значительной потери массы тела (>18% потерь массы тела по сравнению с началом опыта по эффективности), а также количество регрессов опухолей (когда объем опухоли в конце опыта меньше, чем объем опухоли в начале лечения), для каждой группы лечения приведены в табл. 12А, 12Б и 12В, а данные экспериментов показаны также на фиг. 7А, 7В и 7С соответственно.

Таблица 12А

Эффективность F013500571 *in vivo* при в.в. введении дважды в неделю
Результаты этого эксперимента показаны также на фиг. 7А

	Доза [мг/кг]	ПРО [%]	Регрессов [x/7]	Смертность [x/7]	Гистопатологическая оценка ЖКТ
Контроль	Гистидиновый буфер	-	-	-	-
F013500571	10	128	7	0	Без особенностей
	4	113	7	0	Без особенностей
	2	61	0	0	не опр.

Таблица 12Б

Эффективность F013500720 *in vivo* при в.в. введении дважды в неделю
Результаты этого эксперимента показаны также на фиг. 7В

	Доза [мг/кг]	ПРО [%]	Регрессов [x/7]	Смертность [x/7]	Гистопатологическая оценка ЖКТ
Контроль	Гистидиновый буфер	-	-	-	-
F013500720	1	128	7	0	Без особенностей
	0.4	60	0	0	Без особенностей
	0.2	17	0	0	не опр.

Эффективность Knob HC YW210.09 *in vivo* при в.в. введении дважды в неделю
Результаты этого эксперимента показаны также на фиг. 7С

в.б.	Доза [мг/кг]	ПРО [%]	Регрессов [x/7]	Смертность [x/7]	Гистопатологическая оценка ЖКТ
Контроль	Цитратный буфер	-	-	-	-
Knob HC YW210.09	30	80	0	0	-
	45	85	0	0	Без особенностей

Как можно понять по фиг. 7А-7С и табл. 12А-12В, лечение бипаратопными перекрестнореактивными по LRP5/LRP6 VHH-конструктами с продленным периодом полувыведения (F013500571 в дозе 4 и 10 мг/кг и F013500720 в дозе 1 мг/кг по графику 2р/неделю) действительно приводило к регрессу опухоли (т.е. подавлению росту опухоли (ПРО) >100%, что соответствует уменьшению опухоли; уменьшение объема опухоли в конце опыта по эффективности по сравнению с объемом опухоли в начале опыта), при этом не отмечалось значительных изменений массы тела (<10%) и на гистопатологическом анализе ЖКТ не отмечалось особенностей. Важно, что в отличие от этого, при лечении LRP6-специфичным связывателем Knob HC YW210.09 не наблюдали никакого регресса опухолей, даже в максимальной вводимой мышам по графику в.в. дозе, которая соответствовала 90 мг/кг по графику 3р/неделю.

Чтобы дополнительно исследовать наблюдаемые в вышеописанном эксперименте различия эффективности *in vivo*, поставили еще один опыт, позволяющий более частое введение мышам (трижды в неделю) еще большей дозы сравнительного соединения. Вкратце, чтобы достичь такого усиленного влияния, сравнительное соединение вводили в.б., как указано в нижеследующей табл. 12Д.

Таблица 12Д

Эффективность Knob HC YW210.09 *in vivo* при в.б. введении
дважды или трижды в неделю согласно указанному

в.б.	Доза [мг/кг]	График	ПРО [%]	Регрессов [x/5]	Смертность [x/5]
Контроль	Цитратный буфер	Трижды в неделю	-	-	-
Knob HC YW210.09	45	Дважды в неделю	55	1	0
	90	Дважды в неделю	85	0	0
	90	Трижды в неделю	87	0	0

Как видно по данным, приведенным в табл. 12Д, в этой постановке также не достигли значительного усиления эффекта в плане ПРО. Иными словами, эти эксперименты, данные и результаты четко указывают на более высокую эффективность бипаратопных VHH-конструктов с продленным периодом полувыведения по сравнению с Knob HC YW210.09, а также беспрецедентную способность полипептидов согласно изобретению не только ослаблять рост опухоли, но даже вызывать ее уменьшение. Уменьшение опухоли (т.е. регресс опухоли) является, вне всяческого сомнения, желательным терапевтическим эффектом (т.е. действенностью) при лечении больных раком пациентов. В самом деле, в клинических исследованиях лекарства, вызывающие регресс опухоли, приводящий к полному патоморфологическому ответу (пПРО), положительно приводят к значительному улучшению выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости в случае большой нереализованной медицинской потребности, такой как при раке молочной железы.

Вышеописанные сравнительные примеры также демонстрируют, что перекрестнореактивные по LRP5/LRP6 бипаратопные VHH-конструкты с продленным периодом полувыведения не только являются лучшими по своим характеристикам связывания, таким как аффинность или значения K_D , но они также имеют большие преимущества и лучшие характеристики в условиях *in vivo*.

Далее изучили, может ли соединение MOR08168IgG1LALA 6475 scfv обеспечить такой же положительный эффект. С этой целью выполнили следующее исследование переносимости *in vivo* на мышах. Соединение MOR08168IgG1LALA 6475 scfv вводили в.в. в дозе 3 мг/кг дважды в неделю (2qw); это те же самые доза и протокол, для которых в WO 2011/138391 на ксенотрансплантатной модели опухоли была обнаружена эффективность *in vivo*, согласно описанию на фиг. 22 этого документа. Первую обработку MOR08168IgG1LALA 6475 scfv осуществили в день 1, а начиная с дня 6 у мышей отмечали значительную потерю массы тела. На 10-й день некоторые мыши, обрабатываемые соединением MOR08168IgG1LALA 6475 scfv, показали значительную потерю массы тела (>10%). На 11-й день мышей умертвили, и гистопатологический анализ ЖКТ показал воспаление с эрозией ободочной кишки и слепой

кишки мышей. Эти данные указывают на то, что MOR08168IgG1LALA 6475 scfv в эффективной дозе/протоколе непереносим. Таким образом, бипаратопные перекрестнореактивные по LRP5/LRP6 VHH-конструкты с продленным периодом полувыведения имеют преимущество в отношении терапевтического окна; т.е. они вызывают регресс опухоли без значительных изменений массы тела (<10%) и без особенностей, которые бы выявлялись гистопатологическим анализом ЖКТ.

Пример 10. Подавление пути Wnt in vivo.

Чтобы дополнительно оценить влияние перекрестнореактивных по LRP5/LRP6 бипаратопных VHH-конструктов/связывающих молекул с продленным периодом полувыведения на Wnt-сигналинг, в конце описанного в примере 9 опыта по эффективности выделяли опухоли. В частности, опухоли выделяли через 16 ч после последней инъекции соединений или контрольной обработки. Подавление Wnt-сигналинга определяли по снижению экспрессии мРНК Axin2 в опухолях, анализируемой согласно описанию в примере 8. Кратность изменения экспрессии мРНК Axin2 относительно контрольной группы показана на фиг. 8А для эффективности F013500571 in vivo и на фиг. 8В для эффективности F013500720 in vivo. Количественное определение снижения экспрессии мРНК Axin2 в каждой группе лечения приведено в табл. 13А и 13Б ниже.

Таблица 13А

Снижение экспрессии мРНК Axin2 в опухолях при лечении F013500571

Данные относятся к фиг. 7А и 8А

	Доза [мг/кг]	ПРО [%]	Снижение Axin2 (%)
Контроль	Гистидиновый буфер	-	
F013500571	10	128	83
	4	113	77
	2	61	35

Таблица 13Б

Снижение экспрессии мРНК Axin2 в опухолях при лечении F013500720

Данные относятся к фиг. 7В и 8В

	Доза [мг/кг]	ПРО [%]	Снижение Axin2 (%)
Контроль	Гистидиновый буфер	-	
F013500720	1	128	92
	0,4	60	-21
	0,2	17	35

Как видно по фиг. 8А и 8В, а также табл. 13А и 13Б, в опухолях, обработанных молекулами, перекрестнореактивно связывающими LRP5/LRP6, наблюдались значительное снижение и дозозависимое уменьшение (в частности, для обработки F013500571) экспрессии мРНК Axin2 по сравнению с контрольной группой. Эти результаты заставляют предположить, что молекулы, перекрестнореактивно связывающие LRP5/LRP6, действительно способны подавлять рост опухоли, подавляя Wnt-сигналинг в опухолевых клетках.

Пример 11. Способ промышленного производства.

11.1. Ферментация.

Любой из полипептидов, перечисленных в табл. 3 и 5 выше, может экспрессироваться в цитоплазме различных штаммов *E. coli*, таких как W3110, TG1, BL21, BL21(DE3), HMS174, HMS174(DE3), MM294, под контролем индуцибельного промотора. Этот промотор может быть выбран из lacUV5, tac, T7, trp, T5, araB. Среда культивирования предпочтительно полностью определены по Wilms и др., 2001 (Wilms B., Hauck A., Reuss M., Syladat C., Mattes R., Siemann M. и Altenbuchner J.: High-Cell-Density Fermentation for Production of L-N-Carbamoylase Using an Expression System Based on the Escherichia coli rhaBAD Promoter. *Biotechnology and Bioengineering*, 73: 95-103 (2001)), DeLisa и др., 1999 (DeLisa M. P., Li J. C, Rao G., Weigand W.A. и Bentley W.E.: Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of Escherichia coli using an on-line optical sensor. *Biotechnology and Bioengineering*, 65: 54-64.(1999)) либо эквивалентны им. Тем не менее, дополнение среды такими аминокислотами, как изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан и валин, либо комплексными компонентами, такими как соевый пептон или дрожжевой экстракт, может оказаться полезным. Ферментационный процесс выполняли полунепрерывным способом. Условия: температура 30-40°C, pH 6-7,5, растворенного кислорода больше 20%. После потребления первоначального источника углерода культуру подпитывают вышеуказанной (или эквивалентной) питательной средой. При накоплении в ферментере 40-90 г/л сухой массы клеток культуру индуцируют надлежащим индуктором, соответствующим использованной промоторной системе (например, ИПТГ, лактозой, арабинозой). Индукцию могут осуществлять

как импульсную полную индукцию либо как частичную индукцию, подавая соответствующий индуктор в ферментер на протяжении длительного времени. Фаза выработки должна длиться не менее 4 ч. Клетки отделяют центрифугированием в роторных центрифугах, трубчатых центрифугах или тарельчатых сепараторах, супернатант культуры сливают.

11.2. Очистка.

Клеточную массу *E. coli* ресуспендируют в 6-8-кратном количестве лизисного буфера (фосфатный или трис-буфер, pH 7-8,5). Лизис клеток предпочтительно осуществляют гомогенизацией под высоким давлением с последующим удалением обломков клеток путем центрифугирования в роторных, трубчатых центрифугах или тарельчатых сепараторах. Супернатант, содержащий целевой белок, необязательно фильтруют через фильтр на 0,22-10 мкм и разделяют катионообменной хроматографией (например, Toyopearl MegaCap® II SP-550EC, Toyopearl GigaCap S-650M, SP Sepharose BB, SP Sepharose FF или S HyperCel™) при pH 7-8,5. Элюирование осуществляют линейно повышающимся градиентом NaCl при pH 7-8,5. Фракции, содержащие целевой белок, объединяют и затем инкубируют с 5-10 мМ ДТТ с целью предотвратить димеризацию или агрегацию, опосредованную свободными цистеиновыми остатками. После дальнейшего добавления 0,8-1М сульфата аммония или 2-3М NaCl раствор разделяют гидрофильной хроматографией (например, на Phenyl Sepharose HP, Phenyl Sepharose FF, Butyl Sepharose HP, Butyl Sepharose FF, Butyl Toyopearl 650 (S,M,C), Phenyl Toyopearl 650 (S, M, C)) при pH 7-8,5. Элюирование осуществляют линейно понижающимся градиентом сульфата аммония или NaCl при pH 7-8,5 в присутствии 5 мМ ДТТ. Фракции, содержащие целевой белок с минимальной степенью чистоты 90%, объединяют и обессоливают диалфильтрацией в присутствии 5 мМ ДТТ с последующим концентрированием до приблизительно 5 мг/мл. Затем выполняют рефолдинг, разводя белковый раствор 1:5-1:20 50 мМ трис, 150 мМ NaCl, 4 мМ цистамина, 10 мМ CHAPS при pH 8,5 до финальной концентрации белка 0,25-1 мг/мл. Рефолдинговый раствор инкубируют, помешивая, на протяжении 12-36 ч при комнатной температуре и затем разделяют катионообменной хроматографией (например, SP Sepharose FF, SP Sepharose HP, Toyopearl SP-650 (S, M, C)) при pH 7-8,5. Элюирование осуществляют линейно повышающимся градиентом NaCl при pH 7-8,5. Фракции, содержащие мономерный целевой белок, объединяют и вводят в состав 25 мМ фосфата натрия и 220 мМ очищенной от эндотоксинов трегалозы при pH 7,5 путем диалфильтрации. Раствор стерилизуют фильтрацией и хранят при 2-8°C.

Пример 12. Фармацевтический препарат для п.к. введения.

Любой из вышеописанных бипаратопных полипептидных конструкторов согласно изобретению может быть отобран для производства фармацевтического препарата для подкожного введения со следующим составом:

Лекарственная субстанция:	100 мг/мл (от 1 до 3 нмоль/мл)
Ацетатный буфер:	25 мМ
Трегалоза:	220 мМ
Tween-20:	0,02 %

Лекарственную субстанцию вводят в состав раствора вышеуказанной композиции, стерилизуют и хранят при 2-8°C.

Пример 13. Фармацевтическое применение на людях.

Изготовленный в примере 11.2 раствор вводят пациенту, нуждающемуся в этом, такому как человек, больной раком, чувствительным к ингибиторам Wnt-сигналинга, путем внутривенной инфузии (в дозе от 100 до 200 мг) с интервалом от двух до четырех недель.

Пример 14. Влияние подавления Wnt3a-сигналинга на высвобождение провоспалительных цитокинов дендритными клетками в анализе ex-vivo.

У здоровых доноров с их информированного согласия брали МКПК. Человеческие дендритные клетки моноцитарного происхождения (Мо-ДК) создавали следующим образом: МКПК культивировали на среде X-VIVO с добавлением 50 нг/мл GM-CSF и 50 нг/мл IL-4. После 24 ч культивирования супернатант осторожно отбирали и заменяли средой X-VIVO с добавлением тех же GM-CSF и IL-4. На четвертый день супернатант осторожно отбирали и заменяли средой X-VIVO в присутствии только ЛПС или в комбинации с человеческим Wnt3a либо с человеческим Wnt3a и молекулами, перекрестнореактивно связывающимися LRP5/LRP6. На следующий день супернатанты собирали и подвергали анализу ФНО-α по методу ELISA согласно инструкциям производителя. Как сообщалось ранее (Oderup и др. "Canonical and noncanonical Wnt proteins program dendritic cell responses for tolerance". J. Immunol. 2013; 190(12): 6126-34), и как показано на фиг. 9A, Wnt3a непосредственно подавляет секрецию провоспалительных цитокинов (т.е. высвобождение ФНО-α) дифференцированными дендритными клетками (ДК). Вызванное Wnt3a подавление высвобождения ФНО-α из ДК возобновлялось при добавлении молекул, перекрестнореактивно связывающих LRP5/LRP6.

Эти данные демонстрируют, что отформатированные бипаратопные связывающие молекулы с оптимизированной последовательностью способны восстановить секрецию ФНО-α в обработанных Wnt3a

дендритных клетках, тем самым подавляя ингибиторное влияние Wnt на дендритные клетки.

Следует отметить, что блокирование пути Wnt в дендритных клетках микроокружения опухоли может представлять потенциальный терапевтический подход к нарушению опухолеопосредованного подавления иммунитета и дополнения противоопухолевого иммунитета.

Чтобы исследовать влияние ДК на Т-клетки (эффektorные Т-клетки), предварительно обработанные Wnt3а ДК, с или без молекул, перекрестнореактивно связывающих LRP5/LRP6, культивировали совместно с Т-клетками, выделенными из МКПК, как описывалось ранее (Oderup и др. "Canonical and non-canonical Wnt proteins program dendritic cell responses for tolerance". J. Immunol. 2013; 190(12): 6126-34). Через 3 дня совместного культивирования ДК/Т-клеток собирали супернатанты и подвергали их анализу на ИФН- γ по методу ELISA согласно инструкциям производителя.

Секреция ИФН- γ является маркером активации Т-клеток. Как показано на фиг. 9В, Wnt3а-опосредованное подавление ДК приводит к сниженной секреции ИФН- γ Т-клетками (подавление функции Т-клеток), которая полностью восстанавливается обработкой молекулами, перекрестнореактивно связывающими LRP5/LRP6.

В итоге эти данные показывают, что молекулы, перекрестнореактивно связывающие LRP5/LRP6, подавляют ингибиторное влияние Wnt на дендритные клетки, приводя к восстановлению функции Т-клеток.

Известно, что постоянная активация/стимуляция Т-клеток вызывает конечное дифференцирование, приводящее к истощенному фенотипу Т-клеток, прогрессирующей потере функции Т-клетками. Поэтому предусматривается, что влияние молекул, перекрестнореактивно связывающих LRP5/LRP6, на Т-клетки, опосредованное активацией ДК, может быть ограничено истощением Т-клеток. Поэтому ожидается, что комбинированное лечение, в котором введение молекул, перекрестнореактивно связывающих LRP5/LRP6, объединено со введением ингибитора иммунных контрольных точек, блокирующего истощение Т-клеток, должно помочь активировать и поддерживать функцию Т-клеток, тем самым изменяя микроокружение опухоли и поддерживая терапевтический эффект молекул согласно изобретению.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, специфично связывающийся с LRP5 (белок 5, связывающий рецептор липопротеинов низкой плотности) и LRP6 (белок 6, связывающий рецептор липопротеинов низкой плотности), содержащий

первый иммуноглобулиновый отдельный переменный домен, выбранный из группы иммуноглобулиновых отдельных переменных доменов (I)-(III), определяемых наличием следующих CDR-последовательностей:

(I):

CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)

CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)

CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)

(II):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)

CDR2: AIRRSGRRTYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)

CDR3: ARRVRSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6)

(III):

CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)

CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)

CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEY (= SEQ ID NO:9),

и второй иммуноглобулиновый отдельный переменный домен, выбранный из группы иммуноглобулиновых отдельных переменных доменов (IV) и (V), определяемых наличием следующих CDR-последовательностей:

(IV):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)

CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)

CDR3: SPIPYGSLRRRRNNYDY (= SEQ ID NO:12)

(V):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= SEQ ID NO:15).

2. Полипептид по п.1, отличающийся тем, что указанный первый иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен содержит следующие последовательности CDR:

CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)

CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)

CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)

и где

указанный второй иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен содержит следующие последовательности CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)

CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)

CDR3: SPIPYGSLRRRRNNYDY (= SEQ ID NO:12).

3. Полипептид по п.1, отличающийся тем, что указанный первый иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен содержит следующие последовательности CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)

CDR2: AIRRSGRRTYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)

CDR3: ARRVRSSSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6)

и где

указанный второй иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен содержит следующие последовательности CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= SEQ ID NO:15).

4. Полипептид по п.1, отличающийся тем, что указанный первый иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен содержит следующие последовательности CDR:

CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)

CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)

CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEY (= SEQ ID NO:9)

и где

указанный второй иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен содержит следующие последовательности CDR:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= SEQ ID NO:15).

5. Полипептид по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанные иммуноглобулиновые отдельные вариабельные домены являются доменами VHH, предпочтительно гуманизированными доменами VHH.

6. Полипептид по п.1, отличающийся тем, что указанный первый иммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен выбран из группы иммуноглобулиновых отдельных вариабельных доменов (I)-(III) со следующими последовательностями:

(I):

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKEREV
AAIRRRGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRPEDTAVYYCAADTRT
VALLQYRYDYWGQGLVTVSS

(= SEQ ID NO:19),

(II):

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREVAAIRR
SGRRYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRPEDTAVYYCAAARRVRSST
RYNTGTWWWEYWGQGLVTVSS

(= SEQ ID NO:20),

(III):

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKEREV
AAIVRSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRPEDTAVYYCAADRR
GRGENYILLYSSGRYEWGQGLVTVSS

(= SEQ ID NO:21),

и где

указанный второй иммуноглобулиновый отдельный варибельный домен выбран из группы, состоящей из иммуноглобулиновых отдельных варибельных доменов (IV) и (V) со следующими последовательностями:

(IV):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREV
VAAISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRPEDTAVYYCAASPI
PYGSLLRRRNNYDYWGQGLVTVSS

(= SEQ ID NO:22),

(V):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREVAAISW
RSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRPEDTAVYYCAADPRGYGVA
YVSAYYEYWGQGLVTVSS

(= SEQ ID NO:23).

7. Полипептид по п.1 или 2, отличающийся тем, что указанный первый иммуноглобулиновый отдельный варибельный домен имеет аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 19, и

указанный второй иммуноглобулиновый отдельный варибельный домен имеет аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 22.

8. Полипептид по п.1 или 3, отличающийся тем, что

указанный первый иммуноглобулиновый отдельный варибельный домен имеет аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 20, и

указанный второй иммуноглобулиновый отдельный варибельный домен имеет аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 23.

9. Полипептид по п.1 или 4, отличающийся тем, что

указанный первый иммуноглобулиновый отдельный варибельный домен имеет аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 21, и

указанный второй иммуноглобулиновый отдельный варибельный домен имеет аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 23.

10. Полипептид по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что указанные первый и второй иммуноглобулиновые отдельные варибельные домены ковалентно связаны пептидом-линкером, где указанный пептид-линкер необязательно содержит третий иммуноглобулиновый отдельный варибельный домен или состоит из него.

11. Полипептид по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что полипептид дополнительно содержит фрагмент, продлевающий период полувыведения, при этом указанный фрагмент, продлевающий период полувыведения, ковалентно связан с указанным полипептидом и необязательно выбран из группы, состоящей из альбуминсвязывающего фрагмента, такого как альбуминсвязывающий пептид или альбуминсвязывающий иммуноглобулиновый домен, трансферринсвязывающего фрагмента, такого как анти-трансферриновый иммуноглобулиновый домен, молекулы полиэтиленгликоля, человеческого сыворо-

точного альбумина, а также фрагмента человеческого сывороточного альбумина.

12. Полипептид по п.11, отличающийся тем, что указанный фрагмент, продлевающий период полувыведения, является альбуминсвязывающим иммуноглобулиновым отдельным варибельным доменом, предпочтительно доменом Alb11, определяемым SEQ ID NO: 24.

13. Полипептид, специфично связывающийся с LRP5 или LRP6, выбранный из группы полипептидов, содержащих или состоящих из SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27.

14. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по любому из пп.1-13, предпочтительно в выделенной форме.

15. Вектор экспрессии, обеспечивающий экспрессию полипептида по пп.1-13, содержащий нуклеиновую кислоту по п.14.

16. Клетка-хозяин для получения полипептида по пп.1-13, несущая вектор экспрессии по п.15.

17. Способ производства полипептида по любому из пп.1-13, включающий этапы культивирования клетки-хозяина по п.16 в условиях, делающих возможной экспрессию полипептида по любому из пп.1-13; и

выделения указанного полипептида.

18. Способ по п.17, дополнительно включающий этап очистки указанного полипептида.

19. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая (I) в качестве действующего вещества полипептид по любому из пп.1-13 и (II) фармацевтически приемлемый носитель.

20. Фармацевтическая композиция по п.19, дополнительно содержащая разбавитель, вспомогательное вещество, адъювант и/или стабилизатор.

21. Применение полипептида по любому из пп.1-13 для лечения рака, предпочтительно рака молочной железы, рака легкого, рака поджелудочной железы, колоректального рака, сарком, рака яичников или печеночноклеточной карциномы, либо для лечения идиопатического легочного заболевания, либо для лечения ретинопатии, вызванной аномальной передачей сигнала Wnt.

22. Применение полипептида по любому из пп.1-13 для лечения трижды негативного рака молочной железы (ТНРМЖ).

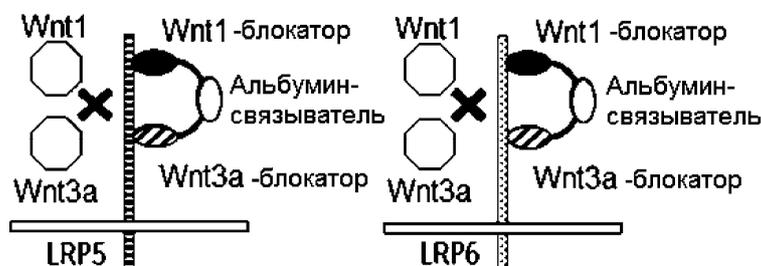
23. Применение полипептида по любому из пп.1-13 в комбинации с химиотерапевтическим средством, терапевтически активным соединением, подавляющим ангиогенез, ингибитором пути сигнальной трансдукции, ингибитором EGFR, иммуномодулятором, ингибитором иммунных контрольных точек или средством для гормональной терапии для лечения рака.

24. Комбинация терапевтического средства, выбранного из группы, состоящей из химиотерапевтических средств, терапевтически активных соединений, подавляющих ангиогенез, ингибиторов пути сигнальной трансдукции, ингибиторов EGFR, иммуномодуляторов, ингибиторов иммунных контрольных точек и средств для гормональной терапии, с полипептидом по любому из пп.1-13 для лечения рака.

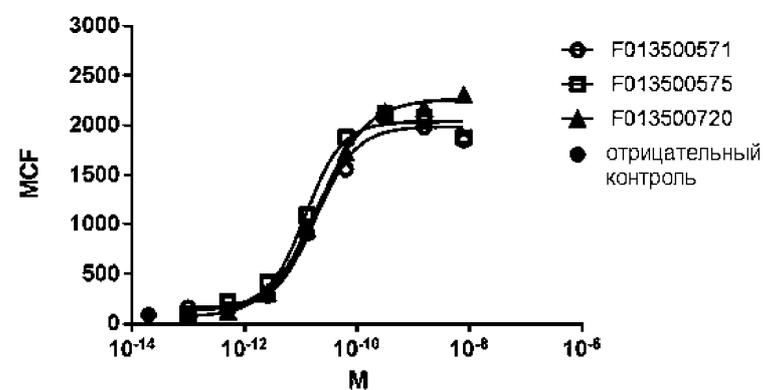
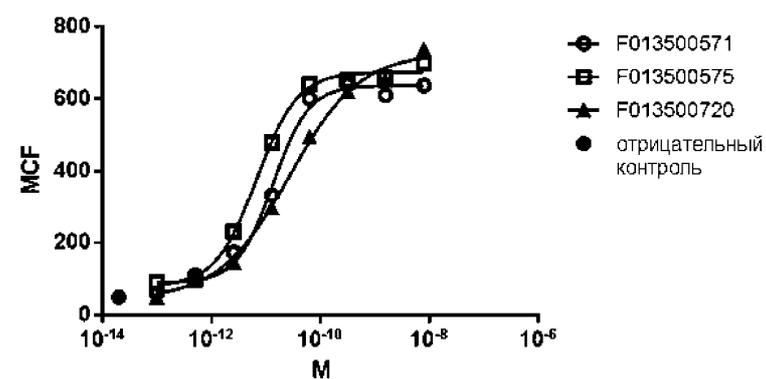
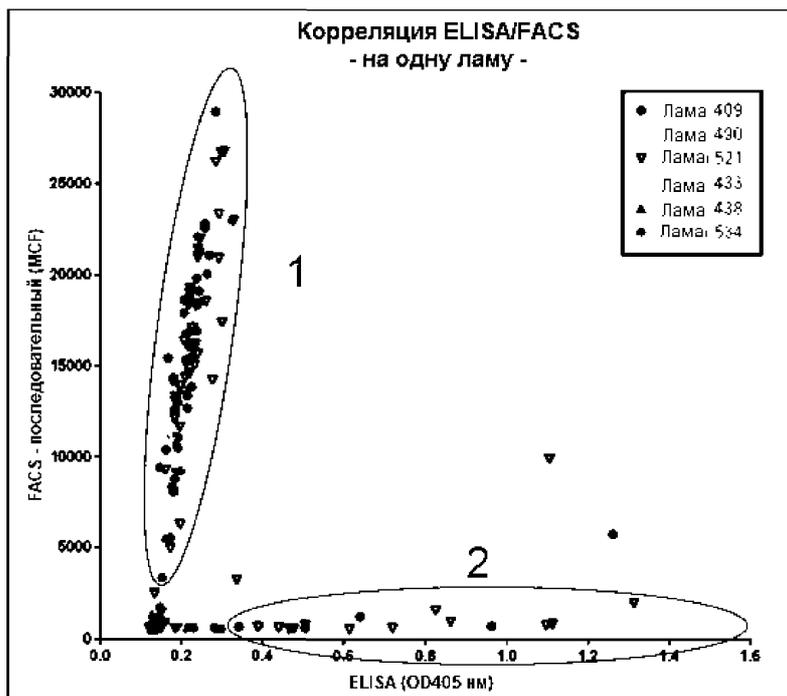
25. Способ лечения рака, идиопатического легочного заболевания или ретинопатии у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение указанному пациенту эффективного количества полипептида по любому из пп.1-13 или фармацевтической композиции по п.19.

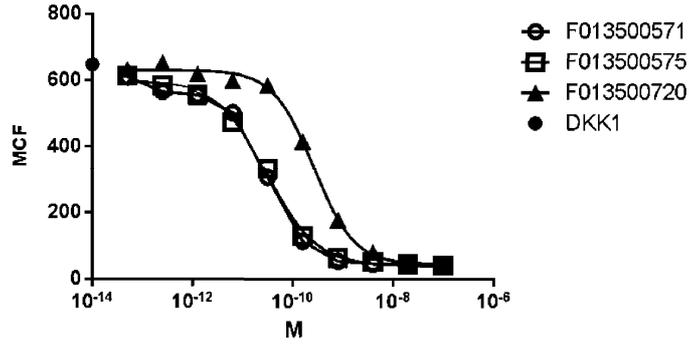
26. Применение полипептида по любому из пп.1-13 для модификации микроокружения опухоли путем подавления вызываемой Wnt1 и Wnt3a транскрипции гена-мишени в дендритных клетках.

27. Применение полипептида по любому из пп.1-13 в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек, выбранным из группы, состоящей из антител против PD-1, антител против PD-L1, антител против CTLA4, антител против BTLA, антител против LAG3 и антител против TIM3, или с противоопухолевой вакциной для лечения рака.

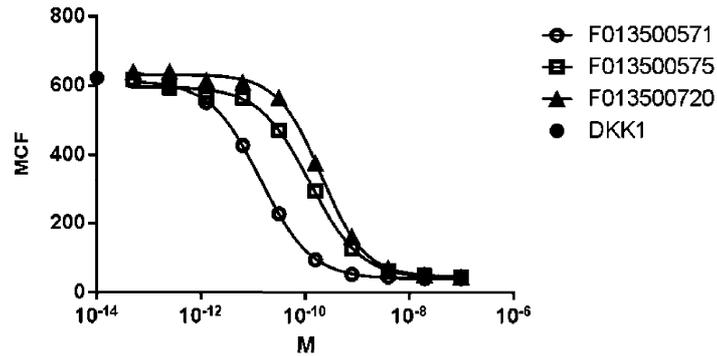


Фиг. 1

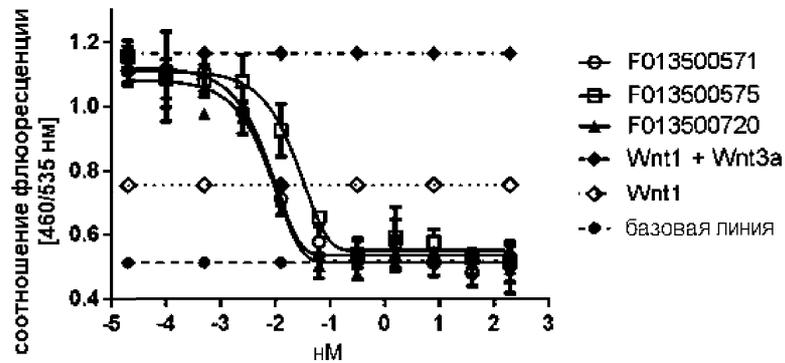




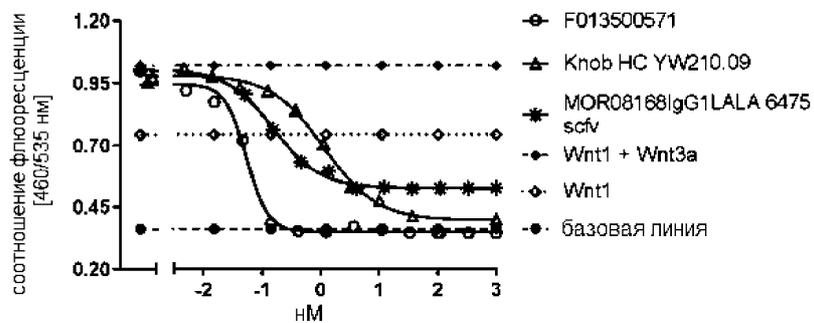
Фиг. 4А



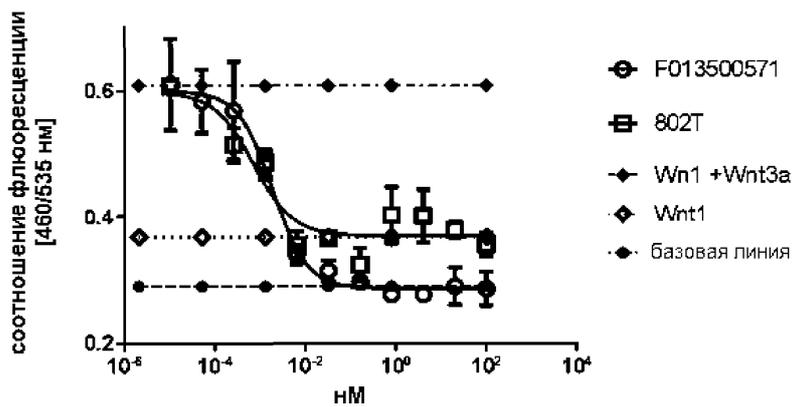
Фиг. 4В



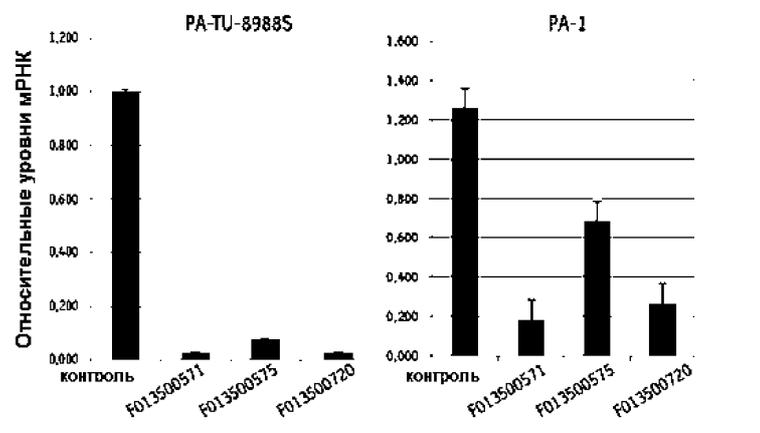
Фиг. 5А



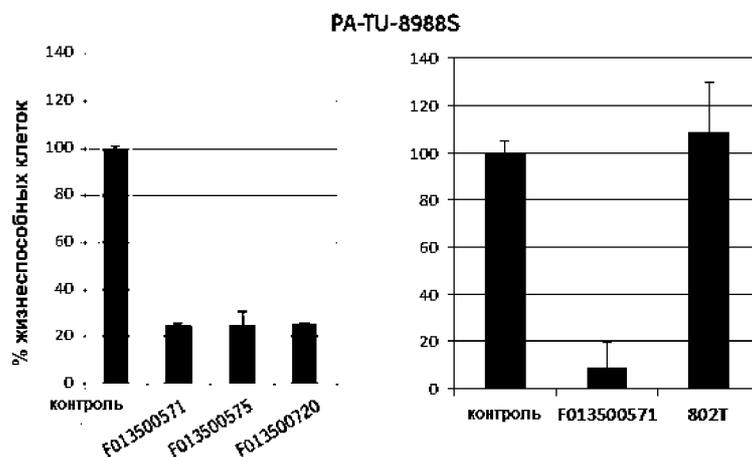
Фиг. 5В



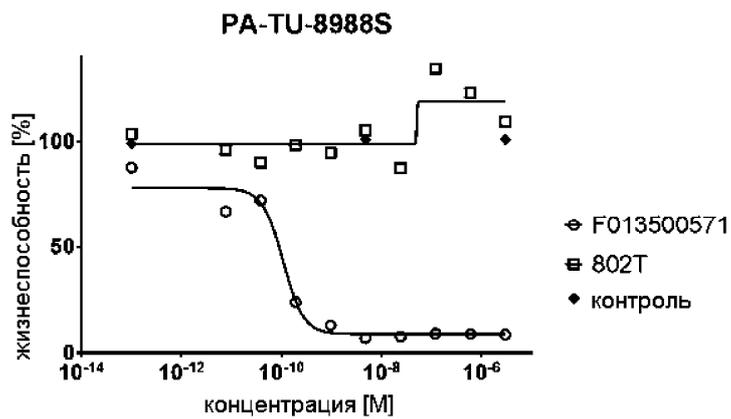
Фиг. 5С



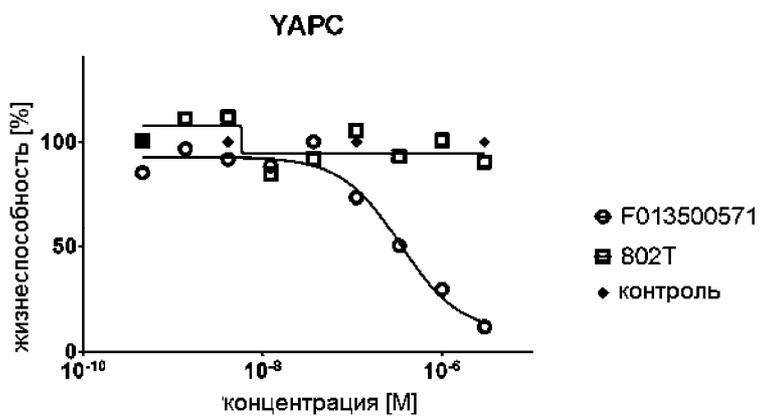
Фиг. 6А



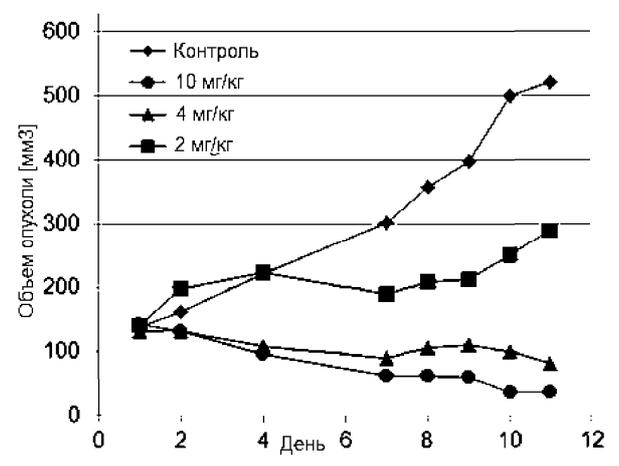
Фиг. 6В



Фиг. 6С

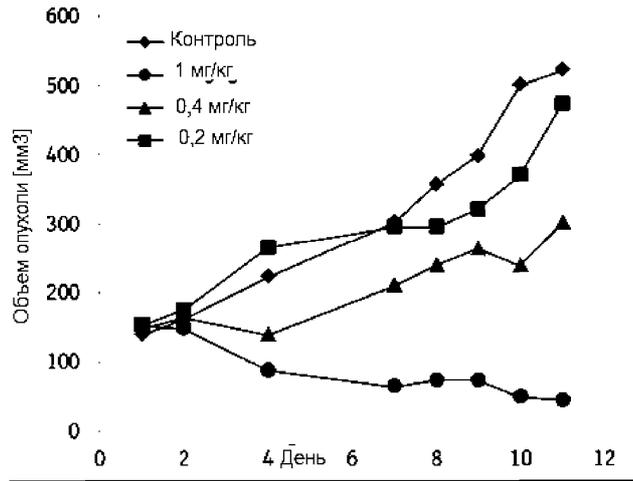


Фиг. 6D

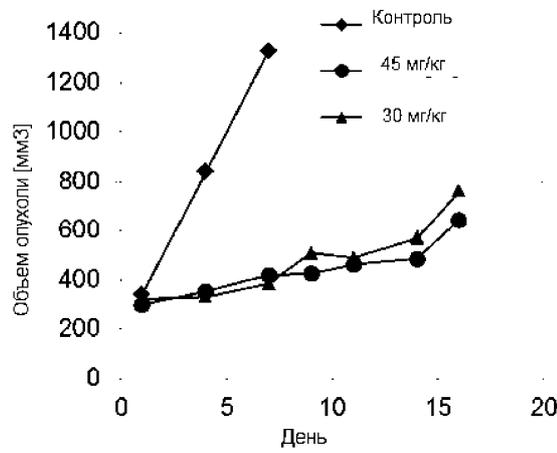


Фиг. 7А

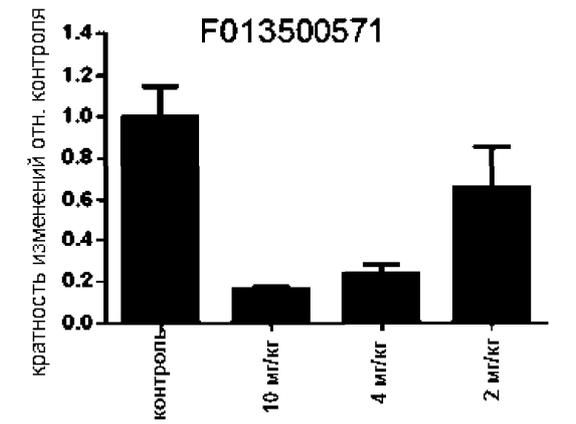
040170



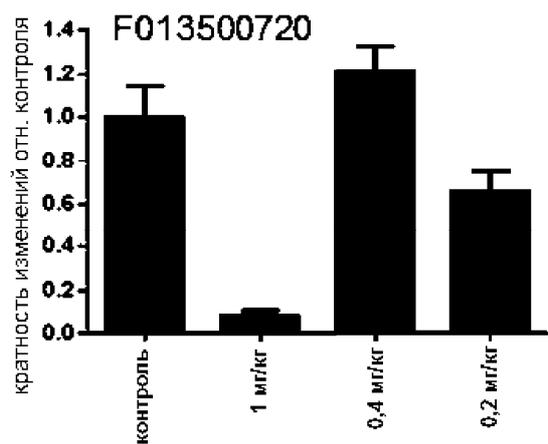
Фиг. 7В



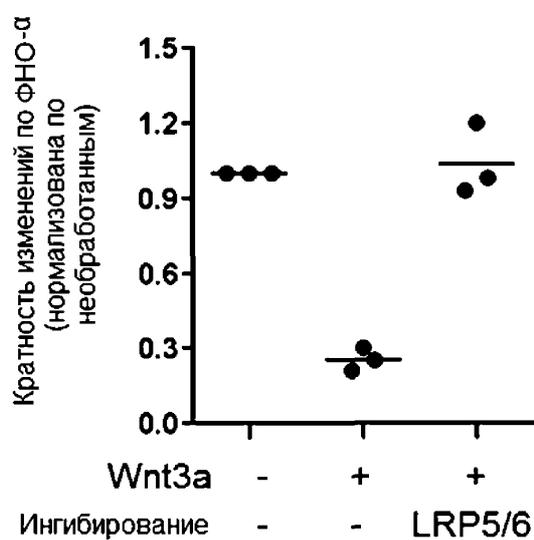
Фиг. 7С



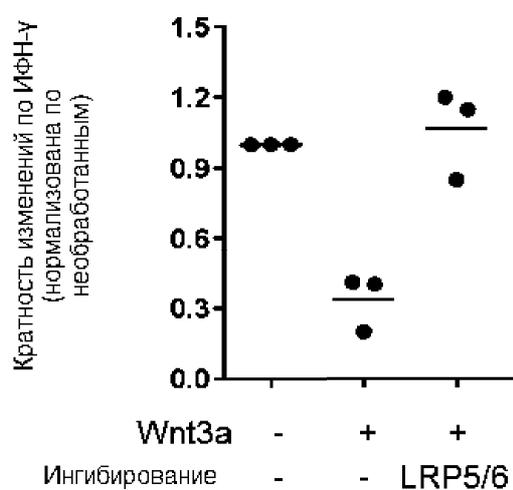
Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 9А



Фиг. 9В

