

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046752**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.04.18**

(21) Номер заявки  
**201992808**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.05.30**

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

---

(54) **ПОЛИПЕПТИДЫ, ПРЕПЯТСТВУЮЩИЕ ПЕРЕДАЧЕ WNT СИГНАЛОВ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ**

---

(31) **17173782.8**(32) **2017.05.31**(33) **EP**(43) **2020.05.14**(86) **PCT/EP2018/064295**(87) **WO 2018/220080 2018.12.06**

(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:  
**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) S. A. ETTENBERG ET AL: "Inhibition of tumorigenesis driven by different Wnt proteins requires blockade of distinct ligand-binding regions by LRP6 antibodies", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 107, no. 35, 31 August 2010 (2010-08-31), pages 15473-15478, XP055002447, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1007428107 Abstract, paragraph bridging p. 15473-15474, p. 15474 left-hand column first full paragraph, p. 15476 left-hand column second full paragraph - p. 15477 left-hand column first full paragraph, p. 15477 right-hand column lines 33-53 and fig. 5 and 6

JASWINDER K. SETHI ET AL: "Wnt signalling and the control of cellular metabolism", BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 427, no. 1, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 1-17, XP055455473, GB ISSN: 0264-6021, DOI: 10.1042/BJ20091866 abstract, p. 3 second full paragraph, p. 9 third full paragraph

WO-A1-2013109819

WO-A1-2011138392

WO-A2-2007027509

MATTHIAS PAUTHNER ET AL: "Antibody engineering & therapeutics, the annual meeting of the antibody society December 7-10, 2015, San Diego, CA, USA", MABS, vol. 8, no. 3, 24 February 2016 (2016-02-24), pages 617-652, XP055291306, US ISSN: 1942-0862, DOI: 10.1080/19420862.2016.1153211 p. 643 right-hand column fourth full paragraph - p. 644 left-hand column line 9

A. GREGORIEFF ET AL: "Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer", GENES AND DEVELOPMENT, vol. 19, no. 8, 15 April 2005 (2005-04-15), pages 877-890, XP055407439, US ISSN: 0890-9369, DOI: 10.1101/gad.1295405 the whole document WO-A2-2017085172

DENNIS MARK S ET AL: "Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 277, no. 38, 20 September 2002 (2002-09-20), pages 35035-35043, XP002533793, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M205854200 [retrieved on 2002-07-15] the whole document

ALLEN NGUYEN ET AL: "The pharmacokinetics of an albumin-binding Fab (AB.Fab) can be modulated as a function of affinity for albumin", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELEC, vol. 19, no. 7, 18 April 2006 (2006-04-18), pages 291-297, XP007911755, ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/PROTEIN/GZL011 [retrieved on 2006-04-18] the whole document

(57) Изобретение обеспечивает новые конструкции LRP5-связывающих полипептидов, и более специфически, нового LRP5-связывающего одиночного варибельного домена иммуноглобулина, которые могут ингибировать пути передачи сигналов Wnt. Изобретение также относится к специфическим последовательностям таких полипептидов, способам их получения и способам их применения, включая способы лечения заболеваний, таких как злокачественное новообразование.

---

**046752**  
**B1**

**046752**  
**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым полипептидам, связывающим белок 5, родственный белкам семейства рецептора липопротеинов низкой плотности (LRP5). Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим такие полипептиды; к способам получения таких полипептидов; к клеткам-хозяевам, экспрессирующим или способным экспрессировать такие полипептиды; к композициям, содержащим такие полипептиды; и к применениям таких полипептидов или таких композиций, в особенности для терапевтических целей в области онкологических заболеваний.

### Предпосылки создания изобретения

Активация сигнального пути Wnt требует связывания внеклеточных Wnt-лигандов с рецептором Frizzled и корецептором LRP5 (номер доступа: UniProtKB -075197/LRP5\_HUMAN). В клетках млекопитающих существует 19 белков Wnt и 10 рецепторов Frizzled. В отсутствие Wnt-лиганда цитоплазматический бета-катенин фосфорилируется белковым комплексом, состоящим из каркасных белков Axin и APC, а также киназ GSK3-бета и CK1a. Последующее распознавание бета-ТсР-убиквитин-лигазой приводит к убиквитин-опосредованной деградации бета-катенина. В присутствии Wnt-лиганда связывание Wnt с Frizzled и LRP5 приводит к привлечению цитоплазматического эффекторного белка Dvl и фосфорилированию цитоплазматического хвоста LRP5, что обеспечивает сайт для присоединения Axin. Секвестрация Axin с помощью LRP5 приводит к инактивации комплекса Axin-APC-GSK3-бета, а значит, к стабилизации и накоплению внутриклеточного бета-катенина. Таким образом, уровень бета-катенина в цитоплазме растет, и бета-катенин перемещается к ядру, образуя комплексы с членами семейства факторов транскрипции Т-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 с-Мус.

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 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 и усиление Wnt-передачи сигналов в присутствии Wnt-лигандов.

LRP5 действует как привратник лиганд-зависимой активации сигнального пути Wnt и, следовательно, могут считаться мишенями для достижения полной блокады пути, опосредуемого всеми 19-ю лигандами Wnt и 10-ю рецепторами Frizzled, а также усиливаемыми 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. Внеклеточный домен LRP5 содержит четыре повторяющихся бета-пропеллерных элемента, связанные с EGF-подобным доменом, за которыми следуют три LDLR-повтора типа А. Комбинирование структурного и функционального анализа LRP5 указывает на то, что Wnt1 (лиганд класса Wnt1) связывается с фрагментом LRP6, который содержит бета-пропеллеры 1 и 2, а Wnt3a связывается с фрагментом, который содержит бета-пропеллеры 3 и 4.

LRP5 и агенты, препятствующие активности LRP5, были описаны в контексте различных заболеваний, включая поражения костей, липид-модулированные нарушения, болезнь Альцгеймера, ревматоидный артрит и инсулинозависимый диабет (см., например, WO2002/092015, WO2006/102070, WO2009/155055 и WO1998/046743).

Гиперактивация сигнального пути Wnt дополнительно вовлечена в патогенез различных типов рака. При некоторых типах рака частые мутации в молекулах нисходящих сигнальных путей способствуют конститутивной активации пути Wnt (напр., мутации APC при колоректальном раке; активирующая бета-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 бета-катенина. При НМКРЛ, ТНРМЖ и аденокарциноме поджелудочной лиганд-зависимая активация Wnt опосредована множеством механизмов, включая повышенную экспрессию Wnt-лигандов и/или рецепторов LRP5, либо же сайленсинг негативного регулятора LRP5 - DKK1 (ТНРМЖ: 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; Рак поджелудочной: Zhang и др. "Canonical signalling Wnt is required for pancreatic carcinogenesis". *Cancer Res.* 2013; 73(15):4909-22). 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 и способные модулировать сигнальный путь Wnt:

Dickkopf-1 (Dkk1) представляет собой ингибитор LRP5. Dkk1 связывается с LRP5 и трансмембранным белком Kremen, подавляет передачу сигналов Wnt и приводит к быстрой интернализации LRP5. Было показано, что Dkk1 подавляет как Wnt1-, так и Wnt3a-опосредованную передачу сигнала.

Также 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 веса тела и смертностью от колита и генерализованной инфекции. В частности, LRP5 экспрессируется в пролиферирующих эпителиальных клетках тонкого кишечника и необходим для пролиферации кишечного эпителия, что наводит на предположение, что ингибирование LRP5 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 или вообще какие-либо ингибиторы сигнального пути Wnt (Wnt1 и Wnt3a) могут быть использованы в терапевтических целях, напр., могут пойти в разработку как средства против рака.

В WO 1998/046743 A1 описано антитело, специфическое к LRP5, и предполагаются несколько LRP5 пептидов для повышения такого антитела. Тем не менее, не было описано экспериментальных результатов, относящихся к созданию такого антитела, также не было специфически описано такого антитела.

В US9175090 описаны способы ингибирования передачи сигналов Wnt в раковой клетке с дефектной экспрессией Arc путем введения моноклонального антитела, специфически IgM антитела, которое связывает LRP5.

В WO2013/109819 описаны анти-LRP5 антитела, в особенности антитела, потенцирующие активность и/или передачу сигналов Norgin/Fzd4, и их применение для лечения состояний, связанных с ангиогенезом.

Тем не менее, ни одна из описанных в уровне техники LRP5-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 (напр., приводя к нежелательной активации или ингибированию других сигнальных путей, либо же недостаточной активации или ингибированию по отношению к целевым isoформам), 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 изложение сущности изобретения**

В соответствии с первым аспектом изобретения настоящее изобретение обеспечивает полипептид, который связывается с белком 5, родственным белкам семейства рецептора липопротеинов низкой плотности (LRP5), где полипептид содержит одиночный вариабельный домен иммуноглобулина (ISVD), выбранный из группы, включающей следующие LRP5-связывающие ISVD (I)-(IV): (I) ISVD со следующими последовательностями участка, определяющего комплементарность (CDR):

CDR1: TYVMG (SEQ ID NO:1)

CDR2: AISWSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)

CDR3: SRGTSTPSRASGVSRDY (SEQ ID NO:3),

(II) ISVD со следующими CDR последовательностями:

CDR1: RYAVA (SEQ ID NO:4)

CDR2: AITWSSGRIDYADSVKG (SEQ ID NO:5)

CDR3: DRRPRSTGRSGTGSPSTYDY (SEQ ID NO:6),

(III) ISVD со следующими CDR последовательностями:

CDR1: IGAMG (SEQ ID NO:7)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGPCKRDY (SEQ ID NO:9), и

(IV) ISVD со следующими CDR последовательностями:

CDR1: INAMG (SEQ ID NO:10)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGPCKRDY (SEQ ID NO:9).

В этом аспекте, полипептид согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит первый ISVD (а), выбранный из ISVD (I) и (II), как определено выше, и второй ISVD (б), выбранный из ISVD (III) и (IV), как определено выше. Еще более предпочтительно, один или несколько ISVD (I)-(IV) определяются как содержащие следующие последовательности, соответственно:

(I)

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSTYVMGWFRQAPGKEREFVAAISW  
SGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAASRGSTSTPSR  
ASGVSRDYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO:11), или

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRFTSTYVMGWFRQAPGKEREFVAAISW  
SGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAASRGSTSTPSR  
ASGVSRDYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO:23),

(II)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYAVAWFRQAPGKEREFVAAITW  
SSGRIDYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADRRPRSTGR  
SGTGSPSTYDYWGQGLTLTVSSA (SEQ ID NO:12),

(III)

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRIGAMGWYRQAPGKQRELVAAVSS  
GGSTYYVDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNRETGPYGPCK  
RDYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO:13), или

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRIGAMGWYRQAPGKQRELVAAVSS  
GGSTYYVDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNRETGPYGPCK  
RDYWGQGLTLTVSSA (SEQ ID NO:22), и

(IV)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRINAMGWYRQAPGKQRELVAAVSS  
GGSTYYVDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNRETGPYGPCK  
RDYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO:14).

Термины "первый" и "второй" по отношению к таким ISVD или доменам в целом, как используется в настоящем изобретении, 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. Другими словами, вышеуказанные ISVD (а) и (б) могут быть рас-

положены либо в следующем порядке (а)-(б) или в следующем порядке (б)-(а) в пределах полипептидов, описанных в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид, описанный в настоящем изобретении, содержит первый ISVD (а), содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: TYVMG (SEQ ID NO: 1)

CDR2: AISWSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)

CDR3: SRGTSTPSRASGVSRDY (SEQ ID NO:3), и второй ISVD (б), содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: IGAMG (SEQ ID NO:7)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGPCKRDY (SEQ ID NO:9).

В некоторых вариантах осуществления, полипептид, описанный в настоящем изобретении, содержит первый ISVD (а), содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: TYVMG (SEQ ID NO: 1)

CDR2: AISWSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)

CDR3: SRGTSTPSRASGVSRDY (SEQ ID NO:3), и второй ISVD (б), содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: INAMG (SEQ ID NO:10)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGPCKRDY (SEQ ID NO:9).

В некоторых вариантах осуществления, полипептид, описанный в настоящем изобретении, содержит первый ISVD (а), содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: RYAVA (SEQ ID NO:4)

CDR2: AITWSSGRIDYADSVKG (SEQ ID NO:5)

CDR3: DRRPRSTGRSGTGSPSTYDY (SEQ ID NO:6), и второй ISVD (б), содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: IGAMG (SEQ ID NO:7)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGPCKRDY (SEQ ID NO:9).

В некоторых вариантах осуществления, полипептид, описанный в настоящем изобретении, содержит первый ISVD (а), содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: RYAVA (SEQ ID NO:4)

CDR2: AITWSSGRIDYADSVKG (SEQ ID NO:5)

CDR3: DRRPRSTGRSGTGSPSTYDY (SEQ ID NO:6), и второй ISVD (б), содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: INAMG (SEQ ID NO:10)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGPCKRDY (SEQ ID NO:9).

Специфически, ISVD из полипептидов, описанных в настоящем изобретении (например, ISVD, содержащие CDR последовательности, как определено выше) представляют собой VHH домены, предпочтительно гуманизированные VHH домены.

В некоторых вариантах осуществления, ISVD (I) из полипептидов, описанных в настоящем изобретении, содержит последовательность SEQ ID NO:11 или последовательность SEQ ID NO:23. В некоторых вариантах осуществления, ISVD (II) содержит последовательность SEQ ID NO:12. В некоторых вариантах осуществления, ISVD (III) содержит последовательность SEQ ID NO:13 или последовательность SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления, ISVD (IV) содержит последовательность SEQ ID NO:14.

Специфически, полипептиды, описанные в настоящем изобретении, содержат первый ISVD (а) и второй ISVD (б), где указанный первый ISVD содержит последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:23, и указанный второй ISVD содержит последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления, первый ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:11 и второй ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления, первый ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:12 и второй ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления, первый ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:23, и второй ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления, первый ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:11 и второй ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления, первый ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:11 и второй ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления, первый ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:12 и второй ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления, первый ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:12 и второй ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:22. В

некоторых вариантах осуществления, первый ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:23 и второй ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления, первый ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:23 и второй ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:13.

В соответствии с одним аспектом, первый ISVD и второй ISVD из полипептидов, описанных в настоящем изобретении, ковалентно связаны линкерным пептидом, где указанный линкерный пептид обязательно содержит или состоит из третьего ISVD; например, альбуминсвязывающего ISVD.

В соответствии с дальнейшим аспектом, полипептиды, описанные в настоящем изобретении, дополнительно содержат компонент, увеличивающий период полужизни, который ковалентно связан с указанным полипептидом и необязательно, выбран из группы, включающей альбуминсвязывающий компонент, такой как альбуминсвязывающий пептид или альбуминсвязывающий домен иммуноглобулина, трансферринсвязывающий компонент, такой как анти-трансферриновый домен иммуноглобулина, молекула полиэтиленгликоля, сывороточный альбумин человека, и фрагмент сывороточного альбумина человека. Специфически, компонент, увеличивающий период полужизни, представляет собой альбуминсвязывающий компонент, предпочтительно альбуминсвязывающий ISVD, еще более предпочтительно Alb 11 домен, содержащий следующую последовательность:

EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVS  
SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG  
GSLSRSSQGTLVTVSS (SEQ ID NO:21)

В соответствии с предпочтительным аспектом, полипептиды, описанные в настоящем изобретении, содержат первый (а) и второй (б) LRPS-связывающий ISVD и третий ISVD (в), например, альбуминсвязывающий ISVD (в); указанный первый ISVD, связывающий LRP5 (а), выбранный из группы, включающей ISVD (I) и (II):

(I) ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: TYVMG (SEQ ID NO: 1)  
CDR2: AISWGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)  
CDR3: SRGTSTPSRASGVSRDY (SEQ ID NO:3), и

(II) ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: RYAVA (SEQ ID NO:4)  
CDR2: AITWSSGRIDYADSVKG (SEQ ID NO:5)  
CDR3: DRRPRSTGRSGTGSPSTYDY (SEQ ID NO:6), указанный второй ISVD (б), выбранный из

группы, включающей ISVD (III) и (IV):

(III) ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: IGAMG (SEQ ID NO:7)  
CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)  
CDR3: ETGPYGGPKRDY (SEQ ID NO:9), и

(IV) ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: INAMG (SEQ ID NO:10)  
CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)  
CDR3: ETGPYGGPKRDY (SEQ ID NO:9), и указанный альбуминсвязывающий ISVD (в) определя-

ется как содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: SFGMS (SEQ ID NO:15)  
CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO:16)  
CDR3: GGSLSR (SEQ ID NO:17).

Например, полипептид содержит первый и второй ISVD, как определено с помощью CDR последовательностей выше, и третий ISVD, который представляет собой альбуминсвязывающий ISVD, как определено с помощью CDR последовательностей выше, и который непосредственно или опосредованно соединяет первый и второй ISVD. В некоторых вариантах осуществления, первый ISVD ковалентно связан с помощью пептидного линкера с третьим ISVD, который ковалентно связан со вторым ISVD с помощью пептидного линкера. Термины "первый" и "второй", как указано выше, не указывают их положения в пределах полипептида, следовательно, от N до C конца ISVD последовательности в пределах полипептида могут быть расположены либо в следующем порядке ISVD (а)-(в)-(б), (а)-[линкер]-(в)-[линкер]-(б), (б)-(в)-(а), (б)-[линкер]-(в)-[линкер]-(а).

В некоторых вариантах осуществления, полипептид содержит первый ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: TYVMG (SEQ ID NO: 1)  
CDR2: AISWGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)  
CDR3: SRGTSTPSRASGVSRDY (SEQ ID NO:3), второй ISVD, содержащий следующие CDR по-

следовательности:

CDR1: IGAMG (SEQ ID NO:7)  
CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)  
CDR3: ETGPYGGPKRDY (SEQ ID NO:9), и альбуминсвязывающий ISVD (третий ISVD) определя-

ется как содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: SFGMS (SEQ ID NO:15)  
 CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO:16)  
 CDR3: GGSLSR (SEQ ID NO:17).

В некоторых вариантах осуществления, полипептид содержит первый ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: TYVMG (SEQ ID NO: 1)  
 CDR2: AISWSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)  
 CDR3: SRGTSTPSRASGVSRDY (SEQ ID NO:3), второй ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: INAMG (SEQ ID NO:10)  
 CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)  
 CDR3: ETGPYGGPKRDY (SEQ ID NO:9), и альбуминсвязывающий ISVD определяется как содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: SFGMS (SEQ ID NO:15)  
 CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO:16)  
 CDR3: GGSLSR (SEQ ID NO:17).

В некоторых вариантах осуществления, полипептид содержит первый ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: RYAVA (SEQ ID NO:4)  
 CDR2: AITWSSGRIDYADSVKG (SEQ ID NO:5)  
 CDR3: DRRPRSTGRSGTGPSTYDY (SEQ ID NO:6), второй ISVD со следующими CDR последовательностями:

CDR1: IGAMG (SEQ ID NO:7)  
 CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)  
 CDR3: ETGPYGGPKRDY (SEQ ID NO:9), и альбуминсвязывающий ISVD определяется как содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: SFGMS (SEQ ID NO:15)  
 CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO:16)  
 CDR3: GGSLSR (SEQ ID NO:17).

В некоторых вариантах осуществления, полипептид содержит первый ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: RYAVA (SEQ ID NO:4)  
 CDR2: AITWSSGRIDYADSVKG (SEQ ID NO:5)  
 CDR3: DRRPRSTGRSGTGPSTYDY (SEQ ID NO:6), второй ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: INAMG (SEQ ID NO:10)  
 CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)  
 CDR3: ETGPYGGPKRDY (SEQ ID NO:9), и альбуминсвязывающий ISVD определяется как содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: SFGMS (SEQ ID NO:15)  
 CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO:16)  
 CDR3: GGSLSR (SEQ ID NO:17).

В некоторых вариантах осуществления, ISVD, как определяется в соответствии с их CDR последовательностями в вышеописанных полипептидах, перегруппированы таким образом, что альбуминсвязывающий ISVD непосредственно или опосредованно (например, с помощью линкерного пептида) соединяет первый и второй ISVD.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид, описанный в настоящем изобретении, содержит или состоит из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 18, 19 и 20.

В еще дальнейшем аспекте, настоящее изобретение относится к полипептиду, который связывается с LRP5, содержащему ISVD, который конкурирует за связывание с LRP5 с эталонным ISVD, где эталонный ISVD имеет последовательность, идентифицированную в SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 22 или 23.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к полипептиду, который связывается с LRP5, содержащему первый ISVD (а), который конкурирует за связывание с LRP5 с первым эталонным ISVD, где первый эталонный ISVD имеет последовательность, идентифицированную в SEQ ID NO: 11, 23 или 12, и второй ISVD (б), который конкурирует за связывание с LRP5 со вторым эталонным ISVD, где второй эталонный ISVD имеет последовательность, идентифицированную в SEQ ID NO: 13, 22 или 14.

В еще одном аспекте, настоящее изобретение относится к полипептиду, который связывается с LRP5, содержащему первый LRP5-связывающий домен, предпочтительно ISVD, и второй LRP5-связывающий домен, предпочтительно ISVD, где первый домен связывает участок LRP5, который отличается от LRP5 участка, с которым связывается второй домен. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления, первый LRP5-связывающий домен блокирует Wnt3a связывающий сайт в LRP5, и

предпочтительно ингибирует Wnt3a-опосредованную транскрипцию целевого гена, и/или где второй LRP5-связывающий домен блокирует Wnt1 связывающий сайт в LRP5, и предпочтительно ингибирует Wnt1-опосредованную транскрипцию целевого гена.

Согласно дальнейшим аспектам, изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, векторам экспрессии, клеткам-хозяевам, а также способам производства, используемым 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, напр., при раке молочной железы. Таким образом, полипептиды согласно изобретению обеспечивают новые терапевтические возможности для лечения ряда типов рака, в особенности тех, где выявляют разрегулированный сигнальный путь Wnt и накопление бета-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 фигур

На фиг. 1 показано схематическое изображение бипаратопных полипептидов, противодействующих передаче сигналов Wnt1 и Wnt3a. Они состоят из трех доменов, два из которых связываются с различными эпитопами LRP5 (блокатор Wnt1 и Wnt3a) и один домен для продления периода полувыведения (домен, связывающийся с человеческим сывороточным альбумином).

На фигурах 2A/2B показано связывание трех бипаратопных LRP5-селективных VHH конструкций с продленным периодом полувыведения, то есть, особенно предпочтительных полипептидов согласно настоящему изобретению, с LRP5 человека (фиг. 2A) и LRP6 человека (фиг. 2B), которые сверхэкспрессируются в клеточных линиях HEK293, по сравнению с отрицательным контролем, состоящим из ненацеленного связывающего компонента (VHH конструкция, которая связывается с бактериальным белком, который не экспрессируется в клетках HEK293) и по сравнению с LRP5/6-перекрестно-реагирующим связывающим компонентом, MOR08168IgG1LALA 6475 scfv. Бипаратопные LRP5 специфические VHH конструкции с продленным периодом полувыведения согласно настоящему изобретению связываются только с LRP5 человека без обнаруживаемого связывания с LRP6 человека, в отличие от LRP5/6-перекрестно-реагирующего связывающего компонента.

На фигурах 3A/3B показана полная DKK1 конкуренция трех бипаратопных LRP5-селективных VHH конструкций с продленным периодом полувыведения, то есть, особенно предпочтительных полипептидов согласно настоящему изобретению, за связывание как с LRP5 человека (фиг. 3A), так и мышинным LRP5 (фиг. 3B), которые сверхэкспрессируются в клеточных линиях HEK293, как было обнаружено с помощью анализа DKK1-конкуренции на основе FACS.

На фигурах 4A/4B показано полное ингибирование пути Wnt1 (фиг. 4A) и Wnt3a (фиг. 4B) тремя бипаратопными LRP5-селективными VHH конструкциями с продленным периодом полувыведения, то есть, особенно предпочтительными полипептидами согласно настоящему изобретению.

На фиг. 5 показано ингибирование передачи сигналов Wnt в раковых клетках, как обнаруживается путем ингибирования относительной экспрессии мРНК Axin2 (правая панель), и пролиферации клеток (левая панель), оцениваемой по снижению процента (%) жизнеспособных клеток, после лечения с применением бипаратопной LRP5-селективной VHH конструкции с продленным периодом полувыведения, то есть, особенно предпочтительного полипептида согласно настоящему изобретению (в конечной концентрации 1 мкМ).

На фигурах 6A/6B показана эффективность *in vivo* бипаратопных LRP5-селективных VHH конструкций с продленным периодом полувыведения (F012900082 на фиг. 6A и F012900141 на фиг. 6B), то есть, особенно предпочтительных полипептидов согласно настоящему изобретению, на моделях опухолей, вызванных Wnt (ксенотрансплантатная модель MMTV-Wnt1).

На фиг. 7 показано ингибирование пути передачи сигналов Wnt в опухолях, леченных с применением бипаратопных LRP5-селективных VHH конструкций с продленным периодом полувыведения, то есть,

особенно предпочтительных полипептидов согласно настоящему изобретению, как обнаруживается путем уменьшения экспрессии мРНК Axin2/RNF43/Notum по сравнению с контрольной группой.

На фиг. 8 показано, что LRP5 экспрессируется на более высоком уровне, чем LRP6 в дендритных клетках моноцитарного происхождения человека (левая панель). Кроме того, супрессивное влияние Wnt3a на активацию Т-клеток, как определено путем высвобождения гамма-интерферона, сильно подавляется лечением с применением бипаратопных LRP5-селективных VHH конструкциям с продленным периодом полувыведения (центральная и правая панели), то есть, предпочтительных пептидов согласно настоящему изобретению. Каждый символ обозначает отдельного донора дендритных клеток (ДК). Приведенные данные нормализованы до уровней ФНО-альфа в необработанном контроле и каждый символ обозначает уникальную донорскую пару для ДК и Т-клеток.

На фиг. 9 показано селективное ингибирование RNF43 мутантной CRC органоидной пролиферации (RNF43 mut1 и RNF43 mut2) по сравнению с отсутствием существенного влияния на RNF43 дикого типа CRC органоидную пролиферацию (RNF43 WT), оцениваемую по снижению процента (%) жизнеспособных клеток, после лечения с применением бипаратопной LRP5-селективной VHH конструкции с продленным периодом полувыведения, то есть, особенно предпочтительного полипептида согласно настоящему изобретению. Также описаны IC<sub>50</sub> нМ значения ингибирования RNF43 мутантной CRC органоидной пролиферации.

На фиг. 10 показано селективное ингибирование передачи сигналов Wnt в RNF43 мутантных CRC органоидах (RNF43 mut1 и RNF43 mut2) по сравнению с отсутствием существенного влияния в RNF43 дикого типа CRC органоиде (RNF43 WT), как обнаруживается путем ингибирования относительной экспрессии мРНК hAxin2, после лечения с применением бипаратопной LRP5-селективной VHH конструкции с продленным периодом полувыведения, то есть, особенно предпочтительный полипептид согласно настоящему изобретению (в конечной концентрации 62 нМ).

#### **Подробное 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 тяжелой цепи 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 VHH-домены или VH/VL-домены, соответственно). Кроме того, используемый здесь термин "последовательность" (например, в составе таких терминов, как "последовательность иммуноглобулина", "последовательность антитела", "последовательность (отдельного) переменного домена", "VHH-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, напр., цепь обычного 4-цепочечного антитела или тяжелой цепи 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 бета-нитей, уложенных в два бета-листа, необязательно стабилизированные консервативной дисульфидной связью.

д) Термин "вариабельный домен иммуноглобулина" 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 "одиночный переменный домен иммуноглобулина" (или ISVD) 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 ISVD в контексте данного изобретения являются "доменные антитела", такие как ISVD VH и VL (VH-домены и VL-домены). Другим важным примером ISVD являются "VHH-домены" (или же просто VHH) верблюдовых, определение которым дано ниже.

В свете вышеизложенного определения антигенсвязывающий домен обычного 4-цепочечного антитела (такого, как молекула IgG, IgM, IgA, IgD или

IgE; известны из уровня техники) или Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, Fv-фрагмента, такого как дисульфидно сшитый Fv- или scFv-фрагмент, или диатела (все известны из уровня техники), происходящий от подобного обычного 4-цепочечного антитела, как правило, не будет считаться ISVD, 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 VH-VL иммуноглобулиновых доменов, которые совместно связываются с эпитопом соответствующего антигена.

е1) "VHH-домены", известные также как VHH, V<sub>H</sub>H-домены, VHH-фрагменты антител и VHH-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 EB, Bendahman N, Hamers R.: "Naturally occurring antibodies devoid of light chains"; Nature 363, 446-448 (1993)). Термин "VHH-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<sub>H</sub>-домены" или "VH-домены") и от переменных доменов легкой цепи, имеющих в обычных 4-цепочечных антителах (которые здесь и далее обозначены как "V<sub>L</sub>-домены" или "VL-домены"). VHH-домены способны специфично связываться с эпитопом без дополнительного антигенсвязывающего домена (в отличие от VH- или VL-доменов обычного 4-цепочечного антитела, в случае которого VL- и VH-домены распознают эпитоп совместно). VHH-домены являются малыми, устойчивыми и эффективными антигенраспознающими единицами, образованными отдельным иммуноглобулиновым доменом.

В контексте настоящего изобретения термины VHH-домен, VHH, V<sub>H</sub>H-домен, VHH-фрагмент антитела, VHH-антитело, а также "Nanobody®" и "Nanobody®-домен" ("Nanobody" является торговой маркой компании Ablynx N.V.; Гент; Бельгия) применяются взаимозаменяемо и обозначают представителей ISVD (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 VH-доменов по так называемым "отличительным остаткам" согласно определению в, напр., WO2009/109635, фиг. 1.

Аминокислотные остатки VHH-домена нумеруют по общей системе нумерации V<sub>H</sub>-доменов, разработанной Kabat и др. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Бетесда, Мэриленд, Публикация № 91), согласно ее применению для VHH-доменов Верблюдовых, показанному, напр., 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<sub>H</sub>-доменов и для VHH-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<sub>H</sub>-доменов, которые могут аналогичным образом применяться и к V<sub>HH</sub>-доменам. Тем не менее, если не указано иное, в настоящем описании, формуле и на фигурах используется нумерация по Kabat, примененная к V<sub>HH</sub>-доменам согласно описанию выше.

Общее количество аминокислотных остатков в V<sub>HH</sub>-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<sub>HH</sub>-доменов и содержащих их полипептидов могут быть подытожены следующим образом:

V<sub>HH</sub>-домены ("спроектированные" природой для функционального связывания с антигеном без присутствия варибельного 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<sub>HH</sub>-домены от V<sub>H</sub>-и V<sub>L</sub>-доменов обычного 4-цепочечного антитела, которые сами по себе, как правило, не пригодны к практическому применению в качестве отдельных антигенсвязывающих белков или ISVD, 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<sub>H</sub>-домена, ковалентно связанного с V<sub>L</sub>-доменом).

Благодаря этим уникальным свойствам использование V<sub>HH</sub>-доменов - отдельно или в качестве части большего полипептида - имеет ряд значительных преимуществ по сравнению с использованием обычных V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-доменов, scFv или обычных фрагментов антител (таких, как Fab- или F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты):

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

V<sub>HH</sub>-домены могут экспрессироваться с одного гена и не требуют посттрансляционной укладки или модификаций;

V<sub>HH</sub>-домены можно легко встроить в мультивалентные и мультиспецифичные форматы (о чем говорится далее);

V<sub>HH</sub>-домены хорошо растворимы и не обладают склонностью к агрегации (как мышинные антигенсвязывающие домены, описанные Ward и др., Nature 341: 544-546 (1989));

V<sub>HH</sub>-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<sub>HH</sub>-домены относительно просто и дешево изготовить, даже в производственных масштабах. Например, V<sub>HH</sub>-домены и содержащие их полипептиды можно изготовить микробным культивированием (напр., согласно описанию ниже), не используя системы экспрессии млекопитающих, требующиеся, например, для обычных фрагментов антител;

V<sub>HH</sub>-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;

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

Способы получения V<sub>HH</sub>-доменов, связывающихся с конкретным антигеном или эпитопом, были описаны ранее, напр., в WO2006/040153 и WO2006/122786. Также в этом документе детально описано, что V<sub>HH</sub>-домены Верблюдовых можно "гуманизировать", заменив один или более аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности оригинальной V<sub>HH</sub>-последовательности одним или более аминокислотными остатками, находящимися в тех же положениях V<sub>H</sub>-домена обычного 4-цепочечного антитела человека. Гуманизированный V<sub>HH</sub>-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.

e2) "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, напр., 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 WO2003/002609.

Доменные антитела по сути соответствуют V<sub>H</sub>- или V<sub>L</sub>-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, напр., 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, напр., 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 ISVD к его соответствующему антигену по сравнению с соответствующей родительской молекулой. Подвергнутые аффинному созреванию молекулы ISVD 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; KS Johnson and RE 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 ISVD и второй ISVD согласно данному здесь определению, причем эти два переменных домена способны связываться с двумя разными эпитопами одного антигена, при этом один моноспецифичный иммуноглобулин, такой как, напр., обычное антитело или один ISVD, в нормальных условиях не связывается с обоими этими эпитопами одновременно. Бипаратопные полипептиды согласно изобретению состоят из переменных доменов с разными специфичностями по эпитопам и не содержат взаимно комплементарных пар переменных доменов, связывающихся с одним и тем же эпитопом. Поэтому они не конкурируют друг с другом за связывание с LRP5.

и) Полипептид (такой, как иммуноглобулин, антитело, ISVD, 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, ISVD 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, ISVD 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/литр (M) или меньше, предпочтительно от  $10E-7$  до  $10E-14$  моль/литр (M) или меньше, более предпочтительно от  $10E-8$  до  $10E-14$  моль/литр, еще

более предпочтительно от  $10E-11$  до  $10E-13$  (измеренную, напр., анализом Kinexa; известен из уровня техники), и/или константу ассоциации ( $K_A$ ) 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  $10E-4$  M, 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 из варианты, известные *per se* из уровня техники.

л) Термин "перекрестнореактивный" по отношению к связывающим молекулам, способным связываться 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.

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 инсерции, 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), то есть 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;  
 Tyr 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 от по меньшей мере 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", напр., двух последовательностей ISVD, отражает процентную долю аминокислот, которые в этих двух последовательностях совпадают. Ее можно рассчитать или определить по описанию в абзаце f) на страницах 49 и 50 WO2008/020079. "Сходство последовательностей" отражает процентную долю аминокислот, которые либо идентичны, либо являются консервативными аминокислотными замещениями.

Специфичность по мишени.

Полипептиды согласно изобретению имеют специфичность к LRP5, в том смысле, что они типично содержат ISVD, которые специфически связываются с эпитопами LRP5. Предпочтительно, полипептиды согласно изобретению имеют аффинность и/или avidность к LRP5, в особенности LRP5 человека, которая по меньшей мере в 10 раз, предпочтительно по меньшей мере в 100 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 1000 раз, еще более предпочтительно по меньшей мере в 10000 раз, даже еще более предпочтительно по меньшей мере в 100000 раз или по меньшей мере 1000000 раз более сильная, чем их аффинность и/или avidность к LRP6, в особенности LRP6 человека (Номер доступа: UniProtKB - 075581/LRP6\_HUMAN). Наиболее предпочтительно, полипептиды перекрестно не реагируют с LRP6, в особенности LRP6 человека (см. пример 7,1).

Молекулы согласно изобретению будут связываться с человеческими формами LRP5, и предпочтительно также с оппонентами у других видов, имеющих значение для разработки лекарственных средств, то есть, LRP5 яванской макаки и мыши.

Полипептиды согласно изобретению.

В самом широком смысле, изобретение обеспечивает новые фармакологически активные агенты для лечения раковых заболеваний. Типичные агенты в соответствии с изобретением принадлежат к новому классу связывающих молекул, а именно бипаратопные полипептиды, которые содержат два или больше ISVD, связывающихся с LRP5 по разным эпитомам. Термин "бипаратопный" пояснен выше, таким образом, что бипаратопные молекулы могут быть определены как молекулы, способные связываться с LRP5 по двум разным эпитомам, содержащимся в белке LRP5.

В одном аспекте, полипептид согласно изобретению содержит первый LRP5-связывающий домен, и второй LRP5-связывающий домен, где первый домен связывает участок LRP5, который отличается от LRP5 участка, с которым связывается второй домен. Такой LRP5-связывающий домен может представлять собой любой домен иммуноглобулина, например, любой домен иммуноглобулина, описанного в настоящей заявке. Предпочтительно, такой LRP5-связывающий домен представляет собой ISVD.

В одном варианте осуществления, первый домен блокирует Wnt3a связывающий сайт в LRP5, и предпочтительно ингибирует Wnt3a-опосредованную транскрипцию целевого гена, и/или где второй домен блокирует Wnt1 связывающий сайт в LRP5, и предпочтительно ингибирует Wnt1-опосредованную транскрипцию целевого гена.

Другими словами, полипептиды согласно изобретению могут включать:

первый ISVD, который способный специфически связываться с LRP5 с помощью эпитопа/таким образом, что приводит к ингибированию сигнального пути Wnt3a, вследствие этого ингибируется Wnt3a-опосредованная транскрипция целевого гена, и

второй ISVD, который способный специфически связываться с LRP5 с помощью эпитопа/таким образом, что приводит к ингибированию сигнального пути Wnt1, вследствие этого ингибируется Wnt1-опосредованная транскрипция целевого гена.

Благодаря двум ISVD, присутствующим в полипептидах, описанных выше, где два домена связываются с разными эпитопами (имеющими отношение к передаче сигнала Wnt1/Wnt3a), эти молекулы являются бипаратопными связывающими 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 по обоим своим LRP5-связывающим доменам, как показано на фиг. 1 (режим внутримолекулярного связывания). Тем не менее, могут иметь место и другие режимы связывания.

В завершение, предполагается, что полипептиды согласно изобретению способны конкурировать с DKK1 - природным лигандом LRP5, и препятствовать передаче сигналов Wnt1 и Wnt3a - за связывание с LRP5, тем самым ингибируя сигнальный путь Wnt1, а также сигнальный путь Wnt3a. Тем не менее, эту теорию также не следует понимать как ограничивающую объем изобретения.

Специфически, настоящее изобретение обеспечивает полипептид, который связывается с белком 5, родственными белкам семейства рецептора липопротеинов низкой плотности (LRP5), где полипептид содержит ISVD, выбранный из группы, включающей следующие LRP5-связывающие ISVD:

(I) ISVD, имеющий следующие последовательности участка, определяющего комплементарность (CDR):

CDR1: TYVMG (SEQ ID NO: 1)

CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)

CDR3: SRGTSTPSRASGVSRDY (SEQ ID NO:3),

(II) ISVD, имеющий следующие CDR последовательности:

CDR1: RYAVA (SEQ ID NO:4)  
 CDR2: AITWSSGRIDYADSVKG (SEQ ID NO:5)  
 CDR3: DRRPRSTGRSGTGPSTYDY (SEQ ID NO:6),  
 (III) ISVD, имеющий следующие CDR последовательности:  
 CDR1: IGAMG (SEQ ID NO:7)  
 CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)  
 CDR3: ETGPYGPVKRDY (SEQ ID NO:9), и  
 (IV) ISVD, имеющий следующие CDR последовательности:  
 CDR1: INAMG (SEQ ID NO:10)  
 CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)  
 CDR3: ETGPYGPVKRDY (SEQ ID NO:9).

Полипептид согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит первый ISVD (а), выбранный из ISVD (I) и (II), как определено выше, и второй ISVD (б), выбранный из ISVD (III) и (IV), как определено выше. В одном варианте осуществления, первый ISVD представляет собой ISVD (I) и второй ISVD представляет собой ISVD (III). В дальнейшем варианте осуществления, первый ISVD представляет собой ISVD (I) и второй ISVD представляет собой ISVD (IV). В другом дальнейшем варианте осуществления, первый ISVD представляет собой ISVD (II) и второй ISVD представляет собой ISVD (III). В другом варианте осуществления, первый ISVD представляет собой ISVD (II) и второй ISVD представляет собой ISVD (IV). Предпочтительно, ISVD (I) дополнительно определяется как имеющий последовательность, идентифицированную как SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:23, ISVD, (II) дополнительно определяется как имеющий последовательность, идентифицированную как SEQ ID NO:12, ISVD (III) дополнительно определяется как имеющий последовательность, идентифицированную как SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:22, и/или ISVD (IV) дополнительно определяется как имеющий последовательность, идентифицированную как SEQ ID NO:14.

Использование терминов "первый" и "второй" по отношению к таким ISVD предназначено только для обозначения того, что эти домены являются разными доменами, так как они содержат разные CDR последовательности и будут связываться с разными эпитопами. Однако данные термины не следует понимать как обозначающие точный порядок или последовательность доменов в такой полипептидной цепи. Другими словами, вышеуказанные ISVD могут быть расположены либо в следующем порядке (I)/(II) - (III)/(IV) или в следующем порядке (III)/(IV) - (I)/(II) в пределах такого полипептида согласно изобретению.

ISVD типично 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, указанный первый и указанный второй ISVD должны быть ковалентно связаны, либо напрямую или через линкерный пептид (например, линкерную последовательность, имеющую происхождение из шарнирной области тяжелой цепи антитела, поли-аланиновой линкерной последовательности, Gly/Ser линкеров различной длины или подобные).

Таким образом, общая структура молекул согласно изобретению также может быть представлена следующим образом:

FR(a)1 - CDR(a)1 - FR(a)2 - CDR(a)2 - FR(a)3 - CDR(a)3 - FR(a)4 - [линкерный пептид] - 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 ISVD,

FR(б) обозначает каркасный участок второго ISVD,

CDR(a) обозначает CDR первого ISVD,

CDR(б) обозначает CDR второго ISVD,

[линкерный пептид] обозначает линкерный пептид, который необязательно может присутствовать, предпочтительно, где CDR имеют последовательности, как указано выше (то есть, CDR из (а) могут представлять собой CDR из (I) или (II) и CDR из (б) могут представлять собой CDR из (III) или (IV),).

Также следует принять во внимание, что (а) и (б) могут меняться местами, то есть, что молекулы, имеющие общую структуру FR(б)1 - CDR(б)1 - FR(б)2 - CDR(б)2 - FR(б)3 - CDR(б)3 - FR(б)4 - [линкерный пептид] - FR(a)1 - CDR(a)1 - FR(a)2 - CDR(a)2 - FR(a)3 - CDR(a)3 - FR(a)4 также могут охватываться настоящим изобретением.

Линкерный пептид может содержать аминокислотную последовательность, например, имеющую длину 9 или более аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 17 аминокислот, такую как приблизительно 20-40 аминокислот. Линкерная последовательность может представлять собой встречающуюся в природе последовательность или не встречающуюся в природе последовательность. Типичные линкерные последовательности включают, но не ограничиваясь только ими, линкерные последовательности, имеющих происхождение из шарнирной области тяжелых цепей антител, поли-аланиновые линкерные последовательности, и Gly/Ser линкеры различной длины (например, (gly<sub>x</sub>ser<sub>y</sub>)<sub>z</sub> линкеры, такие как (gly<sub>4</sub>ser)<sub>3</sub>, (gly<sub>4</sub>ser)<sub>5</sub>, (gly<sub>4</sub>ser)<sub>7</sub>, (gly<sub>3</sub>ser)<sub>3</sub>, (gly<sub>3</sub>ser)<sub>5</sub>, (gly<sub>3</sub>ser)<sub>7</sub>, (gly<sub>3</sub>ser<sub>2</sub>)<sub>3</sub>, (gly<sub>3</sub>ser<sub>2</sub>)<sub>5</sub>, и (gly<sub>3</sub>ser<sub>2</sub>)<sub>7</sub>).

Предпочтительно, полипептид дополнительно содержит альбумин-связывающий ISVD (например, третий ISVD), предпочтительно и где альбумин-связывающий ISVD ковалентно связывает сегмент полипептида, где сегмент содержит или состоит из первого ISVD (например, ISVD (I) или (II), как определено

выше), к сегменту полипептида, где сегмент содержит или состоит из второй ISVD (например, ISVD (III) или (IV), как определено выше). Другими словами, линкерный пептид может ковалентно связывать указанный первый ISVD с указанным вторым ISVD, где указанный линкерный пептид предпочтительно содержит или состоит из дополнительного ISVD, более предпочтительно альбумин-связывающий ISVD, в особенности альбумин-связывающий ISVD, как определено в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид содержит или состоит из третьего домена, такого как, например, альбуминсвязывающий ISVD, такой как Alb11 домен, содержащий следующие CDR:

CDR(Alb11)1: SFGMS (= SEQ ID NO:15)  
 CDR(Alb11)2: SISGSGSDTLYADSVKG (= SEQ ID NO:16)  
 CDR(Alb11)3: GGSLSR (= SEQ ID NO:17)

Это приводит к группе полипептидов согласно изобретению, имеющих следующую общую структуру:

FR(a)1 - CDR(a)1 - FR(a)2 - CDR(a)2 - FR(a)3 - CDR(a)3 - FR(a)4 - [линкерный пептид] - FR(Alb11)1- CDR(Alb11)1- FR(Alb11)2 - CDR(Alb11)2 -FR(Alb11)3 - CDR(Alb11)3 - FR(Alb11)4 - [линкерный пептид] - FR(б)1 - CDR(б)1 - FR(б)2 - CDR(б)2 - FR(б)3 - CDR(б)3 - FR(б)4, предпочтительно, где CDR имеют последовательности, как указано выше (то есть, CDR из (а) могут представлять собой CDR из (I) или (II) и CDR из (б) могут представлять собой CDR из (III) или (IV).

Опять-таки, порядок трех ISVD (а), (б) и Alb11 не закреплен, напротив, полипептиды со следующим порядком вышеуказанных доменов в следующем порядке:

(б) - Alb11 - (а)

тоже охватываются настоящим изобретением.

Кроме того, полипептиды, имеющие Alb11 домен на N- или C-концевой области полипептида (например, Alb11 - (а) - (б), Alb11 - (б) - (а), (а) - (б) - Alb11, или (б) - (а) - Alb11) также будут охватываться настоящим изобретением. В трех предпочтительных вариантах осуществления, полипептиды согласно изобретению включают ISVD, определенные следующим образом:

Первый предпочтительный вариант осуществления: Полипептиды, содержащие первый ISVD, имеющий следующие CDR последовательности: CDR1: TYVMG (SEQ ID NO: 1)

CDR2: AISWSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)

CDR3: SRGTSTPSRASGVSRDY (SEQ ID NO:3), и второй ISVD, имеющий следующие CDR последовательности:

CDR1: INAMG (SEQ ID NO:10)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGPCKRDY (SEQ ID NO:9).

Второй предпочтительный вариант осуществления: Полипептиды, содержащие первый ISVD, имеющий следующие CDR последовательности:

CDR1: RYAVA (SEQ ID NO:4)

CDR2: AITWSSGRIDYADSVKG (SEQ ID NO:5)

CDR3: DRRPRSTGRSGTGSPSTYDY (SEQ ID NO:6), и второй ISVD, имеющий следующие CDR последовательности:

CDR1: IGAMG (SEQ ID NO:7)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGPCKRDY (SEQ ID NO:9)

Третий предпочтительный вариант осуществления: Полипептиды, содержащие первый ISVD, имеющий следующие CDR последовательности:

CDR1: TYVMG (SEQ ID NO: 1)

CDR2: AISWSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)

CDR3: SRGTSTPSRASGVSRDY (SEQ ID NO:3) и второй ISVD, имеющий следующие CDR последовательности:

CDR1: IGAMG (SEQ ID NO:7)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGPCKRDY (SEQ ID NO:9).

Разумеется, вышеизложенные варианты - то есть, необязательно включающие линкерные пептиды (например, линкерную последовательность, имеющую происхождение из шарнирной области тяжелых цепей антител, поли-аланиновые линкерные последовательности, Gly/Ser линкеры различной длины или подобные) и/или другие домены, в особенности включающие Alb11 домен, с различным порядком ISVD - также будут применимы к этим трем предпочтительным вариантам осуществления.

В особенно предпочтительном варианте осуществления, альбуминсвязывающий ISVD (например, Alb11) расположен между двумя LRP5-связывающими ISVD (ISVD (а) и (б)). Поэтому, такие предпочтительные полипептиды могут иметь структуру (а) - Alb11 - (б) или (б) - Alb11 - (а)). Специфически, альбуминсвязывающий ISVD (например, Alb11) может быть ковалентно связан с, либо напрямую или через линкерный пептид (например, линкерную последовательность, имеющую происхождение из шарнирной

области тяжелых цепей антител, поли-аланиновые линкерные последовательности, Gly/Ser линкеры различной длины или подобные) LRP5-связывающие ISVD домены (а) и (б) с их N- и С-концевыми областями (например, N-концевая область альбуминсвязывающего домена связана с ISVD (а) и С-концевая область альбуминсвязывающего домена связана с ISVD (б) или наоборот, предпочтительно, где ISVD содержат CDR или полноразмерные ISVD последовательности, как указано выше (то есть, CDR/ISVD последовательности из (а) могут представлять собой CDR/ISVD последовательности из (I) или (II) и CDR/ISVD последовательности из (б) могут представлять собой CDR/ISVD последовательности из (III) или (IV)).

Три особенно предпочтительных варианта осуществления можно представить следующим образом:

Первый особенно предпочтительный вариант осуществления: Полипептиды, содержащие первый (LRP5-связывающий) ISVD, имеющий следующие CDR последовательности:

CDR1: TYVMG (SEQ ID NO:1)

CDR2: AISWGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)

CDR3: SRGTSTPSRASGVSRDY (SEQ ID NO:3) альбуминсвязывающий ISVD, имеющий следующие CDR последовательности:

CDR1: SFGMS (= SEQ ID NO:15)

CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (= SEQ ID NO:16)

CDR3: GGSLSR (= SEQ ID NO:17);

и второй (LRP5-связывающий) ISVD, имеющий следующие CDR последовательности:

CDR1: INAMG (SEQ ID NO:10)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGGPKRDY (SEQ ID NO:9);

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

Второй особенно предпочтительный вариант осуществления: Полипептиды, содержащие первый (LRP5-связывающий) ISVD, имеющий следующие CDR последовательности:

CDR1: RYAVA (SEQ ID NO:4)

CDR2: AITWSSGRIDYADSVKG (SEQ ID NO:5)

CDR3: DRRPRSTGRSGTGSPSTYDY (SEQ ID NO:6); альбуминсвязывающий ISVD, имеющий следующие CDR последовательности:

CDR1: SFGMS (= SEQ ID NO:15)

CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (= SEQ ID NO:16)

CDR3: GGSLSR (= SEQ ID NO:17);

и второй (LRP5-связывающий) ISVD, имеющий следующие CDR последовательности:

CDR1: IGAMG (SEQ ID NO:7)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGGPKRDY (SEQ ID NO:9); либо в изложенном порядке, либо с измененным порядком вышеуказанных доменов.

Третий особенно предпочтительный вариант осуществления: Полипептиды, содержащие первый (LRP5-связывающий) ISVD, имеющий следующие CDR последовательности:

CDR1: TYVMG (SEQ ID NO: 1)

CDR2: AISWGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)

CDR3: SRGTSTPSRASGVSRDY (SEQ ID NO:3); альбуминсвязывающий ISVD, имеющий следующие CDR последовательности:

CDR1: SFGMS (= SEQ ID NO:15)

CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (= SEQ ID NO:16)

CDR3: GGSLSR (= SEQ ID NO: 17);

и второй (LRP5-связывающий) ISVD, имеющий следующие CDR последовательности:

CDR1: IGAMG (SEQ ID NO:7)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGGPKRDY (SEQ ID NO:9); либо в изложенном порядке, либо с измененным порядком вышеуказанных доменов. CDR последовательности, указанные выше, сведены в таблицах IA, IB, и IC:

Таблица IA

CDR последовательности ISVD, препятствующих передаче сигнала Wnt3a

	F0129097A08	F0129093A02
CDR1	TYVMG (SEQ ID NO:1)	RYAVA (SEQ ID NO:4)

CDR2	AISWSSGGSTYYAD SVKG (SEQ ID NO:2)	AITWSSGRIDYADSV KG (SEQ ID NO:5)
CDR3	SRGTSTPSRASGV SRYDY (SEQ ID NO:3)	DRRPRSTGRSGTGSPS TYDY (SEQ ID NO:6)

Таблица IB

CDR последовательности ISVD, препятствующих передаче сигнала Wnt1

	F012904 6C10(E1A,N32G)	F012904 6C10
CDR1	IGAMG (SEQ ID NO:7)	INAMG (SEQ ID NO:10)
CDR2	AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)	AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)
CDR3	ETGPYGPCKRDY (SEQ ID NO:9)	ETGPYGPCKRDY (SEQ ID NO:9)

Таблица IC

CDR последовательности ISVD, связывающихся с сывороточным альбумином (Alb11 домен")

	Alb11 домен
CDR1	SFGMS (SEQ ID NO:15)
CDR2	SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO:16)
CDR3	GGSLSR (SEQ ID NO:17)

В дополнение к последовательностям CDR, как указано выше, ISVD, содержащиеся в полипептидах согласно изобретению, включают последовательности каркасных участков (FR) иммуноглобулина. Эти последовательности предпочтительно не являются иммуногенными для людей, и, следовательно, предпочтительно представляют собой человеческие или гуманизированные FR последовательности. Подходящие человеческие или гуманизированные FR последовательности известны в данной области техники. Специфически предпочтительные FR последовательности можно найти в показанных ниже вариантах осуществления, описывающих полные ISVD, а значит, и CDR последовательности, а также FR последовательности.

В соответствии с более специфическим вариантом осуществления, полипептиды согласно изобретению содержат ISVD (например, ISVD, как определено с помощью CDR последовательностей, перечисленных в таблицах IA-IC и образующих ISVD (а), (б), или (в), как указано в вариантах осуществления, представленных выше), которые представляют собой VHH домены, и предпочтительно гуманизированные VHH домены. Специфически, полипептиды, описанные в настоящей заявке, содержат первый ISVD (а), который содержит CDR последовательности из (I) или (II) и второй ISVD (б) который содержит CDR последовательности из (III) или (IV), и третий ISVD, который представляет собой альбуминсвязывающий ISVD (например, Alb11), ISVD которого представляют собой VHH домены, и предпочтительно гуманизированные VHH домены.

В соответствии с еще более специфическим вариантом осуществления, полипептиды согласно изобретению включают первый ISVD (а), выбранный из группы, включающей ISVD (I) и (II), которые имеют следующие последовательности:

(I)

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYVMGWFRQAPGKEREFV  
 AAISWSSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYC  
 AASRGTSTPSRASGVSRDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:11), или  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSTYVMGWFRQAPGKEREFV  
 AAISWSSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYC  
 AASRGTSTPSRASGVSRDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:23), и

(II)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYAVAWFRQAPGKEREFV  
 AAITWSSGRIDYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCA  
 ADRRPRSTGRSGTGSSTYDYWGQGLTVTVSSA (SEQ ID NO: 12),

и второй ISVD (б), выбранный из группы, включающей ISVD (III) и (IV), которые имеют следующие последовательности:

(III)

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRIGAMGWYRQAPGKQREL  
 AAVSSGGSTYYVDSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYC  
 NRETGPYGGPKRDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:13), или  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRIGAMGWYRQAPGKQRE  
 VAAVSSGGSTYYVDSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYY  
 NRETGPYGGPKRDYWGQGLTVTVSSA (SEQ ID NO:22), и

(IV)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRINAMGWYRQAPGKQREL  
 AAVSSGGSTYYVDSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYC  
 NRETGPYGGPKRDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:14).

Предпочтительными вариантами осуществления являются полипептиды, содержащие первый ISVD, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:23 и второй ISVD, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:14; или первый ISVD, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:12 и второй ISVD, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:13; или первый ISVD, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:11 и второй ISVD, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:22.

Таким образом, вышеописанные варианты осуществления можно схематически изобразить как isvd(a) - [линкерный пептид] - isvd(б), где "isvd" обозначает соответствующий ISVD, и где остальные определения и варианты остаются такими же, как указано выше, как указано выше, особенно в отношении наличия необязательных линкерных пептидов и/или дополнительных доменов, особенно Alb11 домена, а также в отношении разных порядков ISVD.

Специфически, альбуминсвязывающий ISVD (например, Alb11) может быть ковалентно связан с, либо напрямую или через линкерный пептид (например, линкерную последовательность, имеющую происхождение из шарнирной области тяжелых цепей антител, поли-аланиновые линкерные последовательности, Gly/Ser линкеры различной длины или подобные) LRP5-связывающие ISVD домены (а) и (б) с их N- и C-концевыми областями; например, N-концевая область альбуминсвязывающего домена связана через линкерный пептид с ISVD (а) и C-концевая область альбуминсвязывающего домена связана через линкерный пептид с ISVD (б) или наоборот, предпочтительно, где ISVD содержат полноразмерные ISVD последовательности, как указано выше (то есть, ISVD последовательности из (а) могут представлять собой ISVD последовательности из (I) или (II) и ISVD последовательности из (б) могут представлять собой ISVD последовательности из (III) или (IV), как определено выше).

В некоторых вариантах осуществления, первый ISVD связан с альбуминсвязывающим ISVD с помощью линкерного пептида и второй ISVD связан напрямую с альбуминсвязывающим ISVD. В некоторых вариантах осуществления, второй ISVD связан с альбуминсвязывающим ISVD с помощью линкерного пептида и первый ISVD связан напрямую с альбуминсвязывающим ISVD. В некоторых вариантах осуществления, оба первый и второй ISVD связаны с альбуминсвязывающим ISVD с помощью линкерного пептида, соответственно.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления изобретения, вышеуказанные полипептиды дополнительно могут включать компонент, увеличивающий период полужизни, где указанный компонент, увеличивающий период полужизни, ковалентно связан с указанным полипептидом и необязательно, выбран из группы, включающей альбуминсвязывающий компонент, такой как альбуминсвязывающий пептид или альбуминсвязывающий домен иммуноглобулина, предпочтительно альбуминсвязывающий ISVD, более предпочтительно Alb11 домен, трансферринсвязывающий компонент, такой как анти-трансферриновый домен иммуноглобулина, молекула полиэтиленгликоля, сывороточный альбумин, предпочтительно сывороточный альбумин человека, и фрагмент (человеческого) сывороточного альбумина.

Последовательность вышеуказанного Alb11 ISVD является следующей:

EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE  
WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYC  
 TI  
GGSLSRSSQGTLVTVSS

(= Alb11 домен; = SEQ ID NO: 21)

Дальнейшие примеры ISVD, связывающихся с сывороточным альбумином человека, известны в данной области техники, и описаны более подробно например, в международных патентных публикациях WO2006/122787 и WO2008/028977. Другие пептиды, связывающиеся с сывороточным альбумином человека, описаны, например, в WO2008/068280, WO2009/127691, и WO2011/095545.

Таким образом, тремя предпочтительными конкретными вариантами осуществления изобретения являются:

Первый предпочтительный конкретный вариант осуществления: Полипептиды, содержащие первый (LRP5-связывающий) ISVD, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:23;

альбуминсвязывающий ISVD, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:21;

второй (LRP5-связывающий) ISVD, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:14;

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

Второй предпочтительный конкретный вариант осуществления: Полипептиды, содержащие первый (LRP5-связывающий) ISVD, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:12;

альбуминсвязывающий ISVD, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:21;

второй (LRP5-связывающий) ISVD, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:13;

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

Третий предпочтительный конкретный вариант осуществления: Полипептиды, содержащие первый (LRP5-связывающий) ISVD, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:11;

альбуминсвязывающий ISVD, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:21;

второй (LRP5-связывающий) ISVD, имеющий аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID NO:22;

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

В еще более предпочтительных конкретных вариантах осуществления, альбуминсвязывающий ISVD расположен между двумя LRP5-связывающими ISVD.

Последовательности ISVD, указанных выше, сведены в таблицах ПА, ПБ, и ПС:

Таблица IА

Последовательности ISVD, препятствующих передаче сигнала Wnt3a

VHH ID SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
<b>F012909 7A08(E1 A,V23A)</b> SEQ ID NO:11	AVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAA SGRTFS (SEQ ID NO:24)	TYVMG (SEQ ID NO:1)	WFRQAPGK EREFVA (SEQ ID NO:25)	AISWSSG STYYADS VKG (SEQ ID NO:2)	RFTISRDNKNTVY LQMNSLRPEDTAVY YCAA (SEQ ID NO:26)	SRGTST PSRASG VSRDY Y (SEQ ID NO:3)	WGQGT L VTVSS (SEQ ID NO:27)
<b>F012909 3A02</b> SEQ ID NO:12	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAA SGLTFS (SEQ ID NO:28)	RYAVA (SEQ ID NO:4)	WFRQAPGK EREFVA (SEQ ID NO:25)	AITWSSG RIDYADS VKG (SEQ ID NO:5)	RFTISRDNKNTVY LQMNSLRPEDTAVY YCAA (SEQ ID NO:26)	DRRPRS TGRSGT GSPSTY DY (SEQ ID NO:6)	WGQGT L VTVSSA (SEQ ID NO:29)
<b>F012909 7A08 (SEQ ID NO:23)</b>	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCVA SGRTFS (SEQ ID NO:30)	TYVMG (SEQ ID NO:1)	WFRQAPGK EREFVA (SEQ ID NO:25)	AISWSSG STYYADS VKG (SEQ ID NO:2)	RFTISRDNKNTVY LQMNSLRPEDTAVY YCAA (SEQ ID NO:26)	SRGTST PSRASG VSRDY Y (SEQ ID NO:3)	WGQGT L VTVSS (SEQ ID NO:27)

Таблица IВ

Последовательности ISVD, препятствующих передаче сигнала Wnt1

VHH ID SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
<b>F012904 6C10 (E1A,N32G)</b> SEQ ID NO:13	AVQLVE SGGGLV QPGGSL RLSCAA SGSIFR (SEQ ID NO:31)	IGAMG (SEQ ID NO:7)	WYRQAPG KQRELVA (SEQ ID NO:32)	AVSSGG STYYVD SVKG (SEQ ID NO:8)	RFTISRDNK NTVYLQMN LRPEDTAVYY CNR (SEQ ID NO:33)	ETGPY GPPKR DY (SEQ ID NO:9)	WGQGT L VTVSS (SEQ ID NO:27)
<b>F012904 6C10</b> SEQ ID NO:14	EVQLVE SGGGLV QPGGSL RLSCAA SGSIFR (SEQ ID NO:34)	INAMG (SEQ ID NO:10)	WYRQAPG KQRELVA (SEQ ID NO:32)	AVSSGG STYYVD SVKG (SEQ ID NO:8)	RFTISRDNK NTVYLQMN LRPEDTAVYY CNR (SEQ ID NO:33)	ETGPY GPPKR DY (SEQ ID NO:9)	WGQGT L VTVSS (SEQ ID NO:27)
<b>VHH ID SEQ ID NO:</b>	<b>FR1</b>	<b>CDR1</b>	<b>FR2</b>	<b>CDR2</b>	<b>FR3</b>	<b>CDR3</b>	<b>FR4</b>
<b>F012904 6C10(N32G)</b> SEQ ID NO:22	EVQLVE SGGGLV QPGGSL RLSCAA SGSIFR (SEQ ID NO:34)	IGAMG (SEQ ID NO:7)	WYRQAPG KQRELVA (SEQ ID NO:32)	AVSSGG STYYVD SVKG (SEQ ID NO:8)	RFTISRDNK NTVYLQMN LRPEDTAVYY CNR (SEQ ID NO:33)	ETGPY GPPKR DY (SEQ ID NO:9)	WGQGT L VTVSSA (SEQ ID NO:29)

Таблица IС

Последовательность ISVD, связывающихся с сывороточным альбумином (Alb11 домен)

VHH ID SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
<b>Alb11</b> SEQ ID NO:21	EVQLVES GGGLVQP GNSLRLS CAASGFT FS (SEQ ID NO:35)	SFGMS (SEQ ID NO:15)	WVRQAPG KGLEWVS (SEQ ID NO:36)	SISGSGS DTLYAD SVKG (SEQ ID NO:16)	RFTISRDNKNTTL YLQMNSLRPEDT AVYYCTI (SEQ ID NO:37)	GGSL R (SEQ ID NO:17)	SSQGT L VTVSS (SEQ ID NO:38)

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к полипептиду, который связывается с LRP5, содержащему ISVD, который конкурирует за связывание с LRP5 с эталонным ISVD, где эталонный ISVD имеет последовательность, идентифицированную в SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 22 или 23. Предпочтительно ISVD блокирует Wnt1 или Wnt3a связывающий сайт в LRP. В особенности ISVD ингибирует Wnt1-опосредованную или Wnt3a-опосредованную транскрипцию целевого гена.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к полипептиду, который связывается с LRP5, содержащему первый ISVD, который конкурирует за связывание с LRP5 с первым эталонным ISVD, где первый эталонный ISVD имеет последовательность, идентифицированную в SEQ ID NO: 11, 23 или 12, и второй ISVD, который конкурирует за связывание с LRP5 со вторым эталонным ISVD, где второй эталонный ISVD имеет последовательность, идентифицированную в SEQ ID NO: 13, 22 или 14. Предпочтительно первый ISVD блокирует Wnt3a связывающий сайт в LRP5, в особенности, ингибирует Wnt3a опосредованную транскрипцию целевого гена. Альтернативно, или дополнительно к этому, второй ISVD

может блокировать Wnt1 связывающий сайт в LRP5, в особенности ингибировать Wnt1-опосредованную транскрипцию целевого гена.

В настоящем изобретении, выражение "ISVD, который конкурирует за связывание с антигеном с эталонным ISVD" (или сходные выражения) включает все ISVD, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонный ISVD или с эпитопом, которые перекрываются с эпитопом эталонного ISVD и ингибируют связывание эталонного ISVD с антигеном (то есть, LRP5) до определённой степени. Предпочтительно, такие ISVD связываются с тем же эпитопом, что и эталонный ISVD и/или по существу полностью ингибируют связывание эталонного ISVD (таких как любой из указанных выше) с антигеном (то есть, LRP5). Независимо от того, будет ли определённый ISVD представлять собой ISVD, который конкурирует за связывание с эталонным ISVD, легко можно тестировать квалифицированным специалистом в данной области техники, если он имеет знания в области эталонного ISVD и антигена, даже без знаний эпитопа антигена, с которым связывается эталонный ISVD, путем осуществления любого из анализов конкурентного связывания, известных в данной области техники. Такие анализы конкурентного связывания хорошо известны в данной области техники. Например, квалифицированный специалист в данной области техники может инкубировать антиген с меченным эталонным ISVD и может сравнивать количество антигенсвязанного меченного эталонного ISVD с количеством меченного эталонного ISVD, который связывается с антигеном при предварительном инкубировании с тестируемым ISVD. Если это последнее количество уменьшено (то есть, поскольку предварительное инкубирование предоставляет возможность тестируемому ISVD блокировать связывающие сайты, которые они совместно используют с эталонным ISVD), то можно сделать вывод о том, что тестируемый ISVD конкурирует за связывание с антигеном с эталонным ISVD.

Как установлено выше, (по меньшей мере два) ISVD, присутствующие в полипептиде согласно изобретению, могут быть соединены друг с другом напрямую, без использования линкера, либо же через линкер. Линкер предпочтительно представляет собой линкерный пептид и, в соответствии с изобретением, может быть подобран таким образом, чтобы сделать возможным связывание по меньшей мере двух различных ISVD с каждым из их целевых эпитопов.

Подходящие линкеры *inter alia* зависят от эпитопов и, специфически, от расстояния между эпитопами на целевых молекулах, с которыми будут связываться ISVD. Специалисту это будет понятно на основании данного описания, необязательно - после некоторого ограниченного количества рутинных экспериментов.

Таким образом, подходящие линкеры могут содержать аминокислотную последовательность, например, имеющую длину 9 или более аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 17 аминокислот, например, приблизительно 20-40 аминокислот. Линкерная последовательность может представлять собой встречающуюся в природе последовательность или не встречающуюся в природе последовательность. В случае применения для терапевтических целей, линкер предпочтительно не является иммуногенным для субъекта, которому вводят полипептид согласно изобретению.

Одной из пригодных групп линкерных последовательностей являются линкеры, имеющих происхождение из шарнирной области тяжелых цепей антител, как описано в WO1996/34103 и WO1994/04678. Другими примерами являются поли-аланиновые линкерные последовательности, такие как Ala-Ala-Ala.

Дальнейшими предпочтительными примерами линкерных последовательностей являются Gly/Ser линкеры различной длины, такие как  $(gly_xser_y)_z$  линкеры, 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 ISVD, присутствующих в полипептиде согласно изобретению, могут быть соединены друг с другом с помощью другого компонента, такого как другой полипептид, который, в предпочтительном, но неограничивающем варианте осуществления, может представлять собой дополнительный ISVD, как уже было описано выше. Такой компонент может быть либо по существу неактивным или может иметь биологический эффект, такой как улучшение желательных свойств полипептида или может придавать полипептиду одно или несколько желательных свойств. Как уже излагалось выше, предпочтительный дополнительный полипептид домен будет продлевать период полувыведения полипептида, являясь таким, как домен, связывающийся с (человеческим) сывороточным альбумином, такой как Alb11 домен.

Таким образом, в соответствии с дальнейшим вариантом осуществления, изобретение специфически включает полипептиды, содержащие любую из нижеследующих последовательностей, при этом точные аминокислотные последовательности можно взять из табл. III ниже:

F012900082, имеющий последовательность, идентифицированную как SEQ ID NO: 18,

F012900135, имеющий последовательность, идентифицированную как SEQ ID NO: 19, и

F012900141, имеющий последовательность, идентифицированную как SEQ ID NO: 20.



В частности, как показано *in vivo* на модели опухоли, вызванной Wnt, бипаратопные LRP5 гуманизированные VHN конструкции с продленным периодом полувыведения были способны подавлять передачу сигналов Wnt и рост опухоли *in vivo*, обеспечивая даже значительное уменьшение опухоли (т.е., подавление роста опухоли более чем на 100%). Уменьшение опухоли (т.е., регресс опухоли) является желательным терапевтическим эффектом (т.е., действенностью) 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 веса 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 веса тела).

Кроме того, примеры, описанные ниже, демонстрируют способность бипаратопной LRP5 специфической VHN конструкции с продленным периодом полувыведения селективно ингибировать пролиферацию раковых клеток, несущих мутации в RNF43 гене, которые зависят от активной передачи сигнала Wnt. Специфически, это дополнительно показывает, что бипаратопные LRP5 специфические VHN конструкции с продленным периодом полувыведения, описанные в настоящем изобретении, селективно ингибируют передачу сигнала Wnt раковыми клетками, несущими мутации в RNF43 гене.

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

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, напр., немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ) и мелкоклеточный рак легкого (МКРЛ); Новообразования средостения, такие как, напр., нейрогенные опухоли и мезенхимальные опухоли; Рак желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), такой как, напр., рак пищевода, желудка, поджелудочной железы, печени и желчных протоков (включая, напр., печеночноклеточную карциному (ПКК)), а также тонкого и толстого кишечника (включая, напр., колоректальный рак); Рак предстательной железы; Рак яичек; Гинекологические виды рака, такие как, напр., рак яичников; Рак молочной железы, такой как, напр., 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, напр., фибросаркома, рабдомиосаркома, ангиосаркома, саркома Капоши; Саркомы костей, такие как, напр., миелома, остеосаркома, опухоль Юинга, фибросаркома, остеохондрома, остеобластома и хондробластома; Мезотелиомы;

Рак кожи, такой как, напр., карцинома базальных клеток, плоскоклеточная карцинома, карцинома клеток Меркеля и меланома; Новообразования центральной нервной системы и головного мозга, такие как, напр., астроцитомы, глиобластома, глиома, нейробластома и ретинобластома; Лимфомы и лейкозы, такие как, напр., 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 лимфати-

ческий/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 ретинопатии, 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 разрыву 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/Wnt3а 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).

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, напр., 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, напр., 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, гефитиниб, афатиниб, нинтеданиб, иматиниб, лапатиниб, босутиниб и трастузумаб; антиметаболиты (напр., 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 (напр., антрациклины); производные платины (напр., цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин); алкилирующие агенты (напр., эстрамустин, мехлорэтамин, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, дакарбазин, циклофосфамид, ифосфамид, темозоломид, нитрозомочевины, такие как, например, кармустин и ломустин, тиотепа); антимитотические агенты (напр., алкалоиды Vinca, такие как, например, винбластин, виндезин, винорелбин и винкристин; а также таксаны, такие как паклитаксел, доцетаксел); ингибиторы ангиогенеза, ингибиторы тубулина; ингибиторы синтеза ДНК, ингибиторы PARP, ингибиторы топоизомеразы (например, эпиодофиллотоксины, такие как, например, этопозид и этопозид, тенипозид, амсакин, топотекан, иринотекан, митоксантрон), ингибиторы серин/треонинкиназы (напр., ингибиторы PDK1, ингибиторы Raf, ингибиторы A-Raf, ингибиторы B-Raf, ингибиторы C-Raf, ингибиторы mTOR, ингибиторы mTORC1/2, ингибиторы PI3K, ингибиторы PI3K $\alpha$ , двойные ингибиторы mTOR/PI3K, ингибиторы STK33, ингибиторы AKT, ингибиторы PLK1 (такие как воласертиб), ингибиторы CDK, ингибиторы киназы Aurog), ингибиторы тирозинкиназы (напр., 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, сиролимус), 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 (напр., молекулы/иммуноглобулины, связывающие CTLA4, PD1, PD-L1, LAG3 и TIM3, такие как ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб), противораковые вакцины, такие как традиционная противоопухолевая вакцина (клеточные вакцины, напр., 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-альфа, 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 неoadьювантной 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, напр., 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., напр., 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, напр., 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 (напр., 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 фарма-

цветического 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 для, например, избегания, 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.

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, напр., 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.), внутрибрюшинно (в.б.), через кожу, перорально, сублингвально (напр., в виде сублингвальной таблетки, спрея или капель, помещаемых под язык и адсорбируемых через слизистые мембраны в подязычную капиллярную сеть), (внутри-)назально (напр., 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 тому подобные 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 заболевания, 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 килограмм 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 (напр., инфузией), либо, что более предпочтительно, в виде отдельных доз (таких как, напр., принимаемые дважды в неделю, раз в неделю, раз в месяц; см. ниже), но все это может 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, 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, напр., фармацевтически активный ингредиент), которая содержит соответствующий материал. Конкретные примеры можно найти в стандартных пособиях, таких как, напр., 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 Хэнкса; 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, *p*-гидроксibenзоаты, 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, ампулы, 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, рН 3,2-7,5, предпочтительно рН 4,8-5,5,  
гистидиновые буферы, рН 5,5-7,0,  
сукцинатные буферы, рН 3,2-6,6, и  
цитратные буферы, рН 2,1-6,2,

и, необязательно, соли (напр., NaCl) и/или сахара (напр., сахароза и трегалоза) и/или другие полиолы (напр., 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, рН 6,5, с отрегулированной добавлением 220 мМ трегалозы изотоничностью. Дополнительно подобные растворы могут содержать другие агенты, такие как детергенты, напр., 0,02% Tween-20 или Tween-80. Препараты для подкожного применения могут содержать 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 WO2004/041867, 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; и

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, напр., 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 в по сути выделенной форме согласно определению выше.

Нуклеиновая кислота согласно изобретению может также находиться в виде, наличествовать в и/или являться частью вектора, такого как, например, плазида, космида или YAC, который опять-таки может находиться в по сути выделенной форме. Вектор может быть по сути вектором экспрессии, т.е., вектором, способным обеспечить экспрессию полипептида *in vitro* и/или *in vivo* (напр., в подходящей 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, напр., на стр. 131-133 WO2006/040153.

Нуклеиновые кислоты согласно изобретению можно изготовить или получить известным *per se* способом (напр., 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 ISVD 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 (напр., 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 с помощью LRP5 для индуцирования гуморального иммунного ответа.

Для иммунизации лам необходимо было разработать и внедрить несколько протоколов для идентификации VHH доменов, связывающих LRP5: Сначала ламы иммунизировали с помощью рекомбинантных внеклеточных доменов белка LRP5 (мыши). Однако функциональная оценка вышеуказанного рекомбинантного белка LRP5 показала, что рекомбинантный белок не был надлежащим образом уложен. Следовательно, для разработки подходящих антигенов для иммунизации нужна была дополнительная работа. В качестве обходного пути, ламы иммунизировали клетками HEK293, стабильно трансфицированными LRP5 человека или LRP5 яванской макаки (цино). Однако и тогда можно было достичь только очень низкой экспрессии LRP5 человека или цино, как при временной, так и при стабильной трансфекции, а также с применением различных клеточных линий (HEK293 и CHO). Таким образом, необходима еще дополнительная работа для достижения достаточной экспрессии LRP5. В конечном итоге, и после некоторого количества безуспешных проб и ошибок, этого удалось достичь путем разработки протокола, предусматривающего стабильную ко-трансфекцию HEK293 клеток с применением MesDC-2, шаперона, который должен повышать экзогенную экспрессию LRP5. Но даже тогда, то есть, после ко-экспрессии MesDC-2 на протяжении создания LRP5 стабильно трансфицированной клеточной линии, неоднократно наблюдалась экспрессия белка. В отличие от этого, существенно более высокие и стабильные уровни экспрессии достигались при совместной экспрессии LRP6 человека с MesDC-2 в клетках HEK293. Эти полученные результаты согласовываются с опубликованными данными, показывающими присущую стимуляцию LRP5 человека как очень плохо экспрессируемого белка (Fleury и др., *Protein Expr Purif.* 2010 Mar; 70(1):39-47). Это привело к проблеме, что экспрессия LRP5 может быть потеряна во время иммунизации и селекции. Чтобы решить эту дополнительную проблему, количество пассажей клеток, экспрессирующих LRP5, ограничили максимально возможно и выполняли дополнительную сортировку клеток с целью обогащения клеток, экспрессирующих LRP5.

Лам дополнительно иммунизировали с применением ДНК, кодирующей LRP5, с и без шаперона hMesDC-2 на противоположных концах. Нескольким ламам ввели дополнительные стимулы в попытке усилить межвидовой перекрестно-реактивный иммунный ответ, с целью повысить шансы идентификации анти-человеческих LRP5 VHH доменов, перекрестно реагирующих с мышинным и цино LRP5.

Через регулярные промежутки времени отбирали образцы иммунизированной крови (PBL), определяли серологический ответ, и из выделенных PBL готовили общую РНК. После иммунизации рекомбинантным белком наблюдали низкий серологический ответ на LRP5; в отличие от этого, средний LRP5 иммунный ответ наблюдали для лам, иммунизированных ДНК. Чрезвычайно низкий иммунный ответ наблюдали для иммунизации клетками. Дополнительно, также исследовали синтетические библиотеки. Тем не менее, в конце концов, удалось достичь разнообразия репертуаров для продолжения на следующих этапах, как изложено в примере 2.

Пример 2: Выделение моновалентных VHH доменов (VHH), связывающих LRP5.

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 BstEII и вшивали в соответствующие сайты рестрикции фагмидного вектора pAX50. Сшитые

смеси электропорацией вводили в *Escherichia coli* TG-1. Полученный пул трансформантов составил генетическое разнообразие библиотеки фаг-дисплея.

pAX50 - это вектор экспрессии, полученный из pUC119, содержащий ген резистентности к ампициллину и промотор/as, 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 pAX50 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 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:

Изменение виде-источника (то есть, инструменты, полученные от человеческого и мышиноного LRP5) для усиления шансов идентификации перекрестно реагирующих VHH доменов LRP5 видов человека /мышь, например, отбор по библиотекам из лам, иммунизированных LRP5 человека, с НЕК293, стабильно экспрессирующих мышинный LRP5 или применение НЕК293 клеточные линии, экспрессирующих как LRP5 мыши, так и человека, во время отбора на синтетических библиотеках (мышинная перекрестная реактивность такого LRP5 антагониста предоставляет возможность оценки эффективности, то есть, ингибирование роста опухоли, и профили безопасности, необходимые для оценки терапевтического окна, в тех же самых доклинических моделях (то есть, в ксенотрансплантатных моделях опухолей на мышах)).

Отборы "в растворе" с применением рекомбинантного белка LRP5 для удерживания эпитопов в их нативной конформации: Дополнительное препятствие заключалось в том, что было обнаружено, что рекомбинантный белок LRP5 теряет надлежащую укладку при непосредственном нанесении на планшеты ELISA для связывания. Поэтому, рекомбинантный белок биотинилировали и, после подтверждения надлежащей укладки в функциональных анализах, использовали для отбора "в растворе".

Отборы с использованием клеток, сверхэкспрессирующих LRP5, с целью обеспечить природную конформацию рецепторов. Это неожиданно оказалось важным приемом, особенно необходимым для улучшения отбора структур, связывающихся с доменом LRP5 класса Wnt3a, поскольку функциональные данные по рекомбинантному белку показали отсутствие правильной укладки Wnt3a-связывающего эпитопа.

Отрицательный отбор с использованием клеток, сверхэкспрессирующих LRP6, для идентификации LRP5-селективных структур.

Пример 3: Скрининг моновалентных VHH.

После отбора клоны выращивали в 96-луночных планшетах с глубокими лунками (объемом 1 мл) и индуцировали экспрессию VHH добавлением ИПТГ. Согласно стандартной методике, описанной, напр., в WO2011/107507, готовили периплазматические экстракты отдельных клонов и проводили их скрининг на связывание с человеческими LRP5. Изначально скрининг периплазматических экстрактов осуществляли анализом связывания ELISA с рекомбинантными и LRP5, который является чувствительным, помехоустойчивым и высокопродуктивным анализом по сравнению с анализом связывания на основе FACS. После очистки VHH, идентифицированным анализом ELISA, давали дополнительную характеристику с помощью анализа связывания FACS, чтобы подтвердить связывание очищенных VHH с рецептором LRP5 в его естественной конформации.

Обычно ожидается хорошая корреляция анализов связывания по методам ELISA и FACS. Однако в данном случае VHH, лучше всего связывающиеся с LRP5 в анализе ELISA (т.е., с высокой аффинностью к рекомбинантному внеклеточному домену LRP5), не проявили вовсе никакого или очень слабое связывание с человеческим LRP5 в анализе связывания FACS. Использование разных буферов покрытия (фосфатно-солевого буфера Дульбекко и бикарбонатного буфера) и блокирующих растворов при постановке ELISA (Marvel и BCA) не устранило наблюдаемое расхождение. Вместо этого было обнаружено, что очень слабые согласно ELISA связыватели показали высокую аффинность к LRP5 в анализах связывания FACS при использовании клеток НЕК293, экспрессирующих LRP5. 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 белке LRP5 зависящий от конформации эпитоп, а не линейный эпитоп. Эти дополнительные нестандартные данные и эксперименты сделали возможным отбор терапевтически важных веществ, связывающих LRP5, которые должны обладать высокой аффинностью к LRP5, 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 ис-

пользовали для последующего отбора и характеристики высокоаффинных VHH-связывателей. Если вкратце, клетки инкубировали с разведениями очищенных VHH (серийные разведения 1:5 от 1 мкМ до 1 пМ в конечной концентрации) на протяжении 1,5 часов при 4°C на планшетном шейкере. После 5-кратной промывки клеток буфером FACS, состоящим из 1х фосфатно-солевого буфера (ФСБ) + 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) + 0,05% азида натрия, их инкубировали на протяжении от 30 минут до 1 часа при 4°C с поликлональным мышинным антителом, связывающимся с каркасным участком VHH, а значит, связывающимся со всеми проверяемыми связывателями LRP5.

После трехкратного промывания клеток буфером FACS их инкубировали на протяжении от 30 минут до 1 часа при 4°C с меченым вторичным антителом (противомышинное, ФЭ) с последующим трехкратным промыванием буфером FACS. Флюоресценцию 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 около пятидесяти селективных для LRP5 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 конструкции, выращивали (37°C, 250 об/мин) во встряхиваемых колбах на среде ТВ 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 конструкции, 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 секретируемые VHH).

Очистка VHH:

VHH с гексагистидиновой меткой очищали на Tecan EVO150 аффинной хроматографией с иммобилизованным металлом (RoboColumns 100ul 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, давали характеристику при помощи ряда функциональных и биофизических анализов, описанных ниже:

4.1 Эффективность селективного связывания с LRP5, перекрестная реактивность: Анализ конкуренции с DKK1 на основе FACS.

Во время характеристики LRP5 селективных 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 конкуренции с DKK1), который показал себя более надежным в отношении селективности и определения силы связывания, включая связывание с LRP5 и отсутствие связывания с LRP. Целью был отбор функциональных VHH, которые селективно связываются с LRP5 с отсутствием связывания с LRP6, определяемом при концентрации вплоть до 1 мкМ. 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 разведениями rhDKK1 и LRP5-связывателя (серийные разведения очищенных VHH 1:5) на протяжении 1,5 часа при 4°C на планшетном шейкере. После трехкратного промывания клеток буфером FACS их инкубировали с биотинилированным козлинным антителом против человеческого DKK1 (R&D Systems, кат. BAF1096) на протяжении 30 минут при 4°C на планшетном шейкере. После трехкратного промывания клеток буфером FACS их инкубировали со стрептавидином ФЭ (BD Biosciences, кат. 554061) на протяжении от 30 минут до 1 часа при 4°C на планшетном шейкере в темноте. Клетки дважды промывали буфером FACS, измеряли флюоресценцию с помощью FACS Array (BD) и отмечали значения средней канальной флюоресценции (MCF).

Полагают, что LRP5 селективные VHN будут конкурировать с человеческим DKK1 за связывание с HEK293 клетками, сверхэкспрессирующими LRP5 человека, но не будут конкурировать, или с чрезвычайно низкой эффективностью ( $>1$  мкМ) за связывание с HEK293 клетками, сверхэкспрессирующими LRP6 человека (и, наоборот, аналогичное будет применяться к LRP6 специфическим VHN). В отличие от этого, LRP5/LRP6 перекрестнореактивные VHN будут конкурировать с DKK1 человека за связывание с HEK293, сверхэкспрессирующими LRP5 человека, а также за связывание с HEK293, сверхэкспрессирующими LRP6 человека. В результате этого эксперимента было продемонстрировано, что присутствующие LRP5 селективные VHN конкурируют с DKK1 человека за связывание с HEK293 клетками, сверхэкспрессирующими LRP5 человека (то есть, снижение значения MCF при повышении концентрации связывателя, где полному ингибированию DKK1-связывания соответствовали значения  $\leq 60$  MCF при наивысшей тестируемой концентрации).

4.2 Межвидовая перекрестная реактивность: мышь и яванская макака.

Чтобы определить, способна ли отобранная панель LRP5 селективных VHN связываться с LRP5 от мыши и яванской макаки, выполняли следующий FACS для конкуренции с DKK1:

Серийные разведения VHN инкубировали с клетками HEK293, стабильно экспрессирующими LRP5 мыши или LRP5 макаки в присутствии 1 и 0,3 нМ hDKK1 (концентрация ниже  $EC_{50}$  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 передачу сигналов Wnt1 LRP5 селективных VHN, чтобы определить разные эпитопные группы. В частности, отдельные VHN проверяли на способность конкурировать с другими биотинилированными VHN (так называемыми эталонными VHN) за связывание с рецепторами LRP5 с помощью анализов на основе FACS. Серийные разведения отдельных VHN инкубировали на клетках HEK293, стабильно экспрессирующих человеческие LRP5, вместе с 200 пМ или 500 пМ биотинилированных эталонных VHN (концентрации ниже значения  $EC_{50}$ ). Связывание биотинилированных эталонных VHN с клетками определяли с помощью стрептавидина-ФЭ. Конкуренция VHN с эталонными VHN за связывание с LRP5 проявляется снижением флюоресценции, измеренной FACS Array.

В результате этих опытов блокаторы Wnt1 и блокаторы Wnt3 подразделили на две и шесть групп соответственно.

4.4 Анализы по гену-репортеру Wnt1 и Wnt3a.

Способность LRP5 селективных VHN подавлять Wnt передачу сигналов 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: Ко всем сложностям с рекомбинантными белками LRP5 (см. пример 1), нет функционального рекомбинантного Wnt1-лиганда, не говоря уже о коммерчески доступном. Белки Wnt содержат много консервативных цистеинов и модифицированы мононенасыщенной жирной кислотой (пальмитинолеиновой кислотой), присоединенной к консервативному серину. Эти посттрансляционные модификации необходимы для эффективной передачи сигналов 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 рецептором на клеточной поверхности. Оказалось, что такие посттрансляционные модификации необходимы для функциональных исследований 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 VHN был разработан функциональный анализ на клеточной основе: анализ Wnt по гену-репортеру бета-лактамазы. В частности, для подавления пути Wnt1 клетки CellSensor LEF/TCF-bla FreeStyle 293F (Invitrogen, кат. 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, и за два дня до лечения с применением LRP5 селективных VHN, осуществляли временное выключение LRP6 человека с помощью миРНК (SMARTpool, ON-TARGETplus siRNA, Dharmascon, кат. L-003845-0010) в соответствии с инструкциями производителя.

Клеточная линия CellSensor® LEF/TCF - bla FreeStyle™ 293 содержит репортерный ген бета-лактамазы под контролем индуцируемого Wnt промотора LEF/TCF, который стабильно встроен в клетки FreeStyle™ 293 (Invitrogen). Таким образом, экспрессия Wnt1 или Wnt3a в этих клетках приводит к конститутивной экспрессии, а значит, и к ферментативной активности бета-лактамазы. Потому лечение с применением функциональных LRP5 селективных VHN должна привести к подавлению пути Wnt1 или Wnt3a, что приведет к подавлению ферментативной активности бета-лактамазы.

Для анализа 1Е06/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 LRP5 селективных 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 бета-лактамазы. Клетки инкубировали на протяжении ночи при 37°C. На следующий день ферментативную активность бета-лактамазы измеряли согласно инструкциям производителя (Invitrogen, кат. K1085). Для флуоресцентной эмиссии получали значения при 460 нм и 530 нм при помощи стандартного флуоресцентного планшетного ридера, и соотношение эмиссии при 460/530 нм наносили на график относительно указанной обработки. Эффективность рассчитывали относительно положительного контроля (DKK1 в конечной концентрации 200 нМ).

Было идентифицировано два Wnt1 блокатора. Всего восемь Wnt3a блокаторов проявили хорошую активность (IC<sub>50</sub> ниже 100 нМ) и полную эффективность.

#### 4.5 Анализ 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, зависящего от Wnt1 и Wnt3a. В анализах фосфорилирования использовали клетки Cellsensor LEF/TCF 293F от Invitrogen (кат. K1677), ко-трансфицированные векторами экспрессии, кодирующими либо Wnt1, либо Wnt3a. Так как образование комплекса Wnt-Frizzled-LRP5 приводит к фосфорилированию LRP5 и последующей нисходящей передаче сигнала, для измерения такой передачи можно использовать количественное определение фосфорилирования. Чтобы получить специфичные по LRP5 показания, клетки подвергали лизису и выполняли иммунопреципитацию с помощью антитела, селективного по LRP5 (направленного против внутриклеточного домена рецептора). Фосфорилированные LRP5 выявляли вестерн-блоттингом с использованием поликлонального антитела против фосфо-LRP6 (Ser1490) (Cell Signaling Technology), которое перекрестно реагирует с фосфорилированным белком LRP5. 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. Эффективность VHH, блокирующих Wnt1 или Wnt3a, при блокировании фосфорилирования LRP5 рассчитывали количественной оценкой полос вестерн-блоттинга по сравнению с положительным контролем (DKK1, финальная концентрация 1 мкМ).

#### 4.6 Биофизическая характеристика.

LRP5 селективным 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 LRP5 селективные VHH показали экспрессию в диапазоне 0,3-22,6 мг/л в *E. coli* и выше в *Pichia pastoris* (>1 мг/л). Экспрессию оценивали анализом SDS-PAGE.

Термостабильность моновалентных LRP5 селективных VHH определяли флуоресцентным анализом теплового сдвига (АТС) с помощью Lightcycler (Roche). VHH инкубировали при разных значениях pH в присутствии Syrgo Orange, применяя градиент температуры. После развертывания укладки, вызванного теплом, обнажаются гидрофобные участки белков, с которыми связывается Syrgo Orange, что приводит к повышению интенсивности флуоресценции (Возб/Эм = 465/580 нм). Точка перегиба на первой производной кривой интенсивности флуоресценции служит мерой температуры плавления (Тпл). У всех VHH Тпл повышалась при повышении pH и выравнивалась при pH 6, что является типичной для VHH схемой Тпл. Для LRP5 селективных VHH-блокаторов Wnt1 и VHH-блокаторов Wnt3a получили среднее значение больше 68°C при pH 7.

Методом аналитической эксклюзионной хроматографии исследовали потенциальную возможность агрегации и мультимеризации LRP5 селективных VHH. С этой целью 8 мкг очищенного образца VHH в концентрации 0,5 мг/мл инжигировали с помощью оборудования Dionex Ultimate 3000 в колонку Agilent SEC-3. В качестве подвижной фазы применяли L-аргининовый буфер (10 мМ фосфата, 300 мМ Arg-HCl, pH 6,0) на скорости потока 1 мл/мин. Ни один из VHH селективных к LRP5 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 конструкций с продленным периодом полувыведения.

LRP5 селективные VHH для Wnt1 и Wnt3a использовали в качестве строительных блоков для создания бипаратопной конструкции, изображенной на фиг. 1. В качестве метода продления периода полувыведения использовали генное 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 конструкции, т.е. бипаратопные LRP5 селективные VHH конструкции встраивали в вектор экспрессии pAX159 для *P.*

pastoris в виде VHH-конструкций с сМус-гексагистидиновой меткой на С-конце, согласно стандартным процедурам, описанным, напр., в WO2012/131078. Исследовали разную ориентацию строительных блоков и разные линкеры, особенно GS-линкеры. На основании данных моделирования гомологии, отражающих увеличенную площадь поверхности между потенциальными сайтами связывания Wnt1 и Wnt3a в LRP5, 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 селективными 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 конструкции с продленным периодом полувыведения, спроектированные, как показано на фиг. 1. После экспрессии в Pichiapastoris (как описано в примере 3) и последующей очистки бипаратопные конструкции 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 связывателей измерили высокую эффективность. Для дальнейшей оценки отобрали всего десять бипаратопных LRP5 селективных конструкций с продленным периодом полувыведения, принимая во внимание эффективность в обоих репортерных анализах и разном образе 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 LRP5 селективные конструкции проверяли в 12 разведениях, начиная с 2,5 мкМ.

Большинство конструкций показало высокую силу - со значениями  $IC_{50}$  ниже 1 нМ в Wnt3a и ниже 5,7 нМ в Wnt1 репортерных анализах, соответственно - и полную эффективность в обоих репортерных анализах для LRP5 зависимой Wnt передачи сигналов.

Пример 6: Оптимизация последовательностей VHH и VHH-конструкций.

Оптимизация последовательностей - это процесс, в котором родительскую последовательность подвергают мутации, чтобы сделать ее более схожей с человеческой зародышевой консенсусной последовательностьюIGHV3-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. IV 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 IV

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 конструкции ввели несколько мутаций, получив среди прочего три конструкции, показанные в табл. III выше, отобранные для дальнейшей характеристики *in vitro* и *in vivo*, как показано в дальнейших примерах.

Пример 7: *In vitro*-характеристика трех бипаратопных LRP5 специфических VHH-конструкций с продленным периодом полувыведения; Сравнение со связывающими LRP6 молекулами.

После оптимизации последовательностей VHH три бипаратопных LRP5 селективных VHH-конструкций (см. табл. III выше) 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 фигурах 2А и 2В соответственно. 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-связывателей (серийные разведения связывателей 1:5, соответствующие финальным концентрациям, показанным на фигурах 2А и 2В) на протяжении 1,5 часа при 4°C на планшетном шейкере. После 5-кратной промывки клеток буфером FACS, состоящим из 1x ФСБ (Invitrogen, арт. 141190-094) + 10% ЭБС (Sigma, арт. F7524) + 0,05% азида натрия, их инкубировали на протяжении 1 часа при 4°C с поликлональным мышинным антителом, связывающимся с каркасным участком VHH. После троекратного промывания клеток буфером FACS их инкубировали на протяжении 1 часа при 4°C с меченым вторичным антителом (противомышиное, ФЭ (115-116-071)) с последующим троекратным промыванием буфером FACS. Флуоресценцию измеряли с помощью FACS Array (BD). Связыванию с человеческими LRP5 и LRP6 при наивысшей проверенной концентрации соответствовали значения MCF  $\geq 3000$ . Отрицательный контроль состоял из ненацеленного связывателя (VHH-конструкция, связывающаяся с бактериальным белком, который в клетках HEK293 не экспрессируется). Как показано на фиг. 2А, связыванию с LRP5 человека соответствовали значения  $\geq 3000$  MCF при наивысших протестированных концентрациях трех бипаратопных LRP5 селективных VHH конструкций с продленным периодом полувыведения. В отличие от этого, не было обнаружено связывания с LRP6 человека (значения MCF  $\leq 300$ ), как показано на фиг. 2В. Эти данные подтверждают, что отформатированные, бипаратопные связывающие молекулы с оптимизированной последовательностью селективно связываются с рецепторами LRP5 человека в их природной конформации в системе анализа на клетках. EC<sub>50</sub> значения связывания с hLRP5 приведены в табл. V ниже.

Таблица V

EC<sub>50</sub> значения связывания с LRP5 человека, определенные анализами связывания FACS

Анализ связывания на основе FACS	F012900082	F01290135	F012900141
hLRP5, EC <sub>50</sub> (нМ)	0,21	0,042	0,2

Специфичность LRP5 селективных форматированных, бипаратопных, связывающих молекул с оптимизированной последовательностью сравнивали с описанными ранее LRP6 связывающими молекулами, раскрытыми в WO2011/138391:

В WO2011/138391 были описаны мультивалентные антитела, связывающиеся с LRP6 и ингибирующие взаимодействие как с лигандом Wnt1, так и Wnt3. Эти мультивалентные антитела, связывающиеся с LRP6, являются бипаратопными молекулами, связывающимися 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 WO2011/138391 сообщается, что все связывающие LRP6 молекулы имеют примерно одинаковую силу по репортерному анализу Wnt1 и Wnt3a (фиг. 18 WO2011/138391). Поэтому для сравнительных опытов можно выбрать любую из этих мультивалентных молекул, связывающихся с LRP6. Поэтому как первое соединение для

сравнения было решено использовать конструктор "901" (обозначенный MOR08168IgG1LALA 6475 scfv; также показан на фиг. 27 WO2011/138391).

В WO2013/067355 показаны производные этой конструкции "901". Более конкретно описаны соединения 801Т и 802Т (см. информацию на стр. 132 описания), имеющие два LRP6-связывающие 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.

Аффинности связывания бипаратопных LRP5 специфических VHH конструкций с продленным периодом полувыведения сравнивали с MOR08168IgG1LALA 6475 scfv бипаратопной LRP6 связывающей молекулой, используя анализы связывания FACS, описанные в примере 3. Как было обнаружено при осуществлении настоящего изобретения и показано на фиг. 2А и фиг. 2В, MOR08168IgG1LALA 6475 scfv бипаратопная LRP6 связывающая молекула связывается с обоими LRP5 человека и LRP6 человека, что соответствует значениям MCF  $\geq 3000$  при наивысшей тестируемой концентрации; в отличие от этого, бипаратопные LRP5 специфические VHH конструкции с продленным периодом полувыведения согласно настоящему изобретению связываются только с LRP5 человека без обнаруживаемого связывания с LRP6 человека (MCF значения  $\leq 300$ ). Эти данные свидетельствуют о том, что бипаратопные специфические VHH конструкции с продленным периодом полувыведения имеют различную связывающую специфичность (LRP5 селективные связыватели) при сравнении с описанными ранее LRP6 связывающими молекулами, описанными в WO2011/138391, которые оказались LRP5/LRP6 перекрестно-реагирующими связывающими компонентами при тестировании при осуществлении настоящего изобретения.

#### 7.2 Анализ конкуренции с DKK1 на основе FACS.

Силу и эффективность LRP5 селективных VHH конструкций дополнительно анализировали с применением анализа DKK1 - конкуренции на основе FACS, как описано в примере 4,1. НЕК293 клетки со стабильной сверхэкспрессией LRP5 человека или мышиноного LRP5 инкубировали с серийными разведениями LRP5 селективных VHH конструкций (серийные разведения 1:5, соответствующие финальным концентрациям, показанным на фиг. 3А и фиг. 3В). LRP5 селективные VHH конкурировали с DKK1 человека за связывание с НЕК293 клетками, сверхэкспрессирующими LRP5 человека, а также за связывание с НЕК293 клетками, сверхэкспрессирующими мышинный LRP5, как показано на фигурах 3А и 3В, соответственно. Полное ингибирование связывания DKK1 достигали при наивысших протестированных концентрациях ( $\geq 1$  мкМ) и это соответствовало значениям MCF  $\leq 100$ . В результате этого эксперимента было продемонстрировано, что присутствие LRP5 селективных VHH конкурирует с DKK1 человека за связывание с НЕК293 клетками, сверхэкспрессирующими LRP5 человека, а также с клетками, сверхэкспрессирующими мышинный LRP5 (то есть, снижение значения MCF при повышении концентрации связывателя, где полное ингибирование связывания DKK1 соответствовало значениям MCF  $\leq 100$  при наивысшей тестируемой концентрации). Следовательно, данные LRP5 селективные VHH являются мышинными перекрестно реактивными. Данные упрочняют позицию, что отформатированные, бипаратопные связывающие молекулы с оптимизированной последовательностью в своей природной конформации связываются с человеческими/мышинными LRP5 рецепторами.

7.3 Комбинированный анализ по гену-репортеру Wnt1 и Wnt3a Силу и эффективность отформатированных, бипаратопных LRP5 связывающих молекул с оптимизированной последовательностью анализировали с помощью анализа по гену-репортеру Wnt1 и Wnt3a, как описано в примере 4.4. На фиг. 4А, значение соотношения флюоресценции [460/535 нм], обозначенное как "Wnt1", что соответствует активации пути Wnt1, определенное на основании Wnt1 сверхэкспрессирующих клеток; полное ингибирование пути Wnt1 соответствует соотношению флюоресценции [460/535 нм]  $\leq 0,8$ . На фиг. 4В, значение соотношения флюоресценции [460/535 нм], обозначенное как "Wnt3a", что соответствует активации пути Wnt3a, определенному на основании Wnt3a сверхэкспрессирующих клеток; значение соотношения флюоресценции [460/535 нм], обозначенное как "исходная линия" на фиг. 4В соответствует полному ингибированию пути Wnt3a, определенному путем обработки с положительным контролем (DKK1; конечная концентрация 200 нМ). Как показано на фиг. 4А и 4В, полное ингибирование обоих путей Wnt1 и Wnt3a достигают путем обработки тремя LRP5 селективными, отформатированными, бипаратопными связывающими молекулами с оптимизированной последовательностью. Кроме того, отмечалась также значительная сила, как показано в табл. VI ниже на значениях IC<sub>50</sub>.

Таблица VI

Значения IC<sub>50</sub> ингибирования путей Wnt1 и Wnt3a

Анализ по гену-репортеру Wnt1 и Wnt3a	F012900082	F01290135	F012900141
IC <sub>50</sub> (нМ) Wnt1	0,37	0,37	0,3
IC <sub>50</sub> (нМ) Wnt3a	< 0,1	< 0,1	0,05

Пример 8: Влияние трех бипаратопных LRP5 селективных VHH конструкций с продленным периодом полувыведения на передачу сигнала Wnt и жизнеспособность раковых клеточных линий.

Способность бипаратопных LRP5 селективных VHH конструкций с продленным периодом полувыведения подавлять активную передачу сигнала Wnt дополнительно охарактеризовали с помощью клеточных линий с активной передачей сигнала Wnt, 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, линию раковых клеток с активной передачей сигнала Wnt PA-TU-8988S, высевали на 12-луночные планшеты и обрабатывали LRP5 селективными VHH конструкциями в конечной концентрации 1 мкМ в течение ночи. Способность подавлять передачу сигнала Wnt обнаруживали 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. 5 (правая панель), PA-TU8988S раковые клетки при обработке бипаратопной LRP5 селективной VHH конструкцией с продленным периодом полувыведения показали значительное снижение относительных уровней мРНК Axin2 (то есть, нормализованных по эндогенному контролю) по сравнению с необработанными клетками или клетками, обработанными ненацеленной VHH конструкцией (отрицательный контроль). Эти данные демонстрируют способность бипаратопной LRP5 селективной VHH конструкции с продленным периодом полувыведения ингибировать передачу сигнала Wnt в раковых клеточных линиях с активной передачей сигналов Wnt. Кроме того, исследовали влияние блокады передачи сигналов Wnt на жизнеспособность клеток в раковой клеточной линии PA-TU8988S, о которой ранее сообщалось, что их пролиферация зависит от активной передачи сигналов Wnt (Jiang et al. "Inactivating mutations of RNF43 confer Wnt dependency in pancreatic ductal adenocarcinoma". *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(31): 12649-54). Жизнеспособность клеток измеряли с помощью анализа Alamar Blue (Invitrogen, № кат. DAL1100) после обработки в течение дней с применением бипаратопной LRP5 специфической VHH конструкции с продленным периодом полувыведения (конечная концентрация 1 мкМ) или ненацеленной VHH конструкции (отрицательный контроль) или с применением доксорубина (конечная концентрация 1 мкМ; положительный контроль). Как показано на фиг. 5 (левая панель), PA-TU8988S раковые клетки, обработанные бипаратопной LRP5 селективной VHH конструкцией с продленным периодом полувыведения показали значительное снижение процент жизнеспособных клеток (снижение на  $\geq 75\%$ ) по сравнению с необработанными клетками или клетками, обработанными отрицательным контролем, который не оказывал влияния на жизнеспособность клеток. Максимальное уменьшение жизнеспособности клеток соответствовало обработке с применением химиотерапевтического средства, такого как доксорубин (уменьшение на  $\geq 80\%$ ). Эти данные демонстрируют способность бипаратопных LRP5 селективных VHH конструкций с продленным периодом полувыведения ингибировать пролиферацию раковых клеток, которые зависят от активной передачи сигналов Wnt.

Пример 9: Эффективность *in vivo*.

LRP5 селективные бипаратопные VHH конструкции/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*. 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 активную передачу сигналов Wnt, оцениваемые по внутриклеточной локализации бета-катенина. В частности, опухоли молочной железы у трансгенных мышей MMTV-Wnt-1 зависят от Wnt1. 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 150-300 мм<sup>3</sup>, мышам рандомизировали по группам по 7 мышам и вводили им в/в соединения. LRP5 селективные бипаратопные VHH конструкции с продленным периодом полувыведения вводили мышам в/в три раза (F012900082) или два раза в неделю (F012900141), в дозах, показанных на фиг. 6А для F012900082 и

на фиг. 6В для F012900141. Во время опыта по эффективности отслеживали объем опухоли (левые панели) и вес тела (правые панели) и медианные объемы опухолей показаны на фигурах 6А и 6В. В конце опыта по эффективности определяли ингибирование роста опухоли (TGI). В особенности, TGI определяли для каждой группы лечения по сравнению с контрольной группой (обработка мышей гистидиновым буфером - буфером с 20 мМ гистидина и pH 6,5). 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. Ингибирование роста опухоли (TGI), результат ЖК-гистопатологического анализа в конце исследования эффективности *in vivo*, смертность, соответствующая количеству мышей, которых пришлось умертвить из-за значительной потери веса тела (>18% потерь веса 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 таблицах VIIA и VIIB, и относительно экспериментов и данные представлены также на фигурах 6А и 6В, соответственно.

Таблица VIIA

Эффективность F012900082 *in vivo* при в/в введении три раза в неделю

	Доза [мг/кг]	TGI [%]	Регрессии [x/7]	Смертность [x/7]	Гистопатологическая оценка ЖКТ
Контроль	Гистидиновый буфер	-	-	-	-
F012900082	50	128	6	0	Без особенностей

Результаты этого эксперимента показаны также на фиг. 6А.

Таблица VIIB

Эффективность F012900141 *in vivo* при в/в введении два раза в неделю

	Доза [мг/кг]	TGI [%]	Регрессии [x/7]	Смертность [x/7]	Гистопатологическая оценка ЖКТ
Контроль	Гистидиновый буфер	-	-	-	-
F012900141	50	118	7	0	Без особенностей
	Доза [мг/кг]	TGI [%]	Регрессии [x/7]	Смертность [x/7]	Гистопатологическая оценка ЖКТ
	15	115	7	0	Без особенностей
	5	98	0	0	не опр.

Результаты этого эксперимента показаны также на фиг. 6В.

Как можно понять по фигурам 6А-6В и таблицам VIIA и VIIB выше, лечение с применением LRP5 селективных бипаратопных ВНН конструкций с продленным периодом полувыведения (F012900082 в дозе 50 мг/кг по графику 3 р/неделю и F012900141 в дозе 15 и 50 мг/кг по графику 2 р/неделю) приводило к регрессии опухоли (то есть, ингибирование роста опухоли (TGI) >100%, что соответствует уменьшению опухоли; снижение объема опухоли в конце опыта по эффективности по сравнению с объемом опухоли в начале эксперимента), при этом не отмечалось значительных изменений веса тела (<10%) и на гистопатологическом анализе ЖКТ не отмечалось особенностей, что свидетельствует о хорошей переносимости лечения.

Уменьшение опухоли (т.е., регресс опухоли) является, вне всяческого сомнения, желательным терапевтическим эффектом (т.е., действительностью) при лечении больных раком пациентов. В самом деле, в клинических исследованиях лечения, вызывающие регресс опухоли, приводящий к полному патоморфологическому ответу (пПО), положительно приводят к значительному улучшению выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости в случае большой нереализованной медицинской потребности, такой, как при раке молочной железы. Кроме того, также является клинически значимым, что лечение является хорошо переносимым при отсутствии внеопухолевых - для целевых побочных эффектов при эффективных уровнях дозирования.

В качестве сравнения, далее исследовали, может ли MOR08168IgG1LALA 6475 scfv бипаратопная LRP6 связывающая молекула 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 WO2011/138391 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 веса тела. На 10-й день некоторые мыши, обрабатываемые соединением MOR08168IgG1LALA 6475 scfv, показали значительную потерю веса 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 LRP5 селективные VHH конструкции с продленным периодом полувыведения имеют преимущество в отношении терапевтического окна; т.е., они вызывают регресс опухоли без значительных изменений веса тела (<10%) и без особенностей, которые бы выявлялись гистопатологическим анализом ЖКТ.

Пример 10: Ингибирование пути передачи сигналов Wnt *in vivo*.

Чтобы дополнительно оценить влияние LRP5 селективных бипаратопных VHH конструкций/связывающих молекул с продленным периодом полувыведения на передачу сигнала Wnt, в конце описанного в примере 9 опыта по эффективности выделяли опухоли. В особенности, опухоли выделяли через 24 часа после последней инъекции соединений (F012900082 в дозе 50 мг/кг или F012900141 в дозе 15 мг/кг) или контрольной обработки. Ингибирование передачи сигналов Wnt определяли по снижению экспрессии мРНК Axin2, а также дополнительных Wnt целевых генов: RNF43 и Notum в опухолях, леченных с применением F012900082 и F012900141, соответственно, анализировали, как описано в примере 8. TaqMan праймеры/зонды использовали для анализов Notum и RNF43, (Mm01253278\_m1 Notum FAM и Mm00552558\_m1 RNF43 FAM Life Technologies). Кратность изменения экспрессии мРНК Axin2, RNF43 или Notum по сравнению с контрольной группой показана на фиг. 7 (левая часть) для эффективности *in vivo* с применением F012900082 (ср. фиг. 6A) и на фиг. 7 (правая часть) для эффективности *in vivo* с применением F012900141 (ср. фиг. 6B).

Как видно из фиг. 7, наблюдали существенное уменьшение экспрессии мРНК Axin2, RNF43 и Notum мРНК в опухолях, обработанных LRP5 селективными связывающими молекулами, по сравнению с контрольной группой. Эти результаты позволяют предположить, что LRP5 селективные связывающие молекулы способны ингибировать рост опухоли путем подавления передачи сигналов Wnt в опухолевых клетках.

Пример 11: Способ промышленного производства.

11.1 Ферментация: Любой из полипептидов, перечисленных в Таблице III 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. Среды культивирования предпочтительно полностью определены по Wilms и др., 2001 (Wilms B., Hauck A., Reuss M., Sylatk 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 (напр., 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 часов. 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 (напр., 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 остат-

ками. После дальнейшего добавления 0,8-1 М сульфата аммония или 2-3 М NaCl раствор разделяют гидрофильной хроматографией (напр., 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 (напр., 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 конструкций 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
Трегалоza:	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, большой 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 ингибирования передачи сигналов Wnt3a на высвобождение провоспалительных цитокинов дендритными клетками в анализе ex-vivo.

У здоровых доноров с их информированного согласия брали PBMC. Человеческие дендритные клетки моноцитарного происхождения (Мо-ДК) создавали следующим образом: PBMC культивировали в среде X-VIVO с добавлением 50 нг/мл GM-CSF и 50 нг/мл IL-4. После культивирования в течение 24 часов, супернатант осторожно удаляли и заменяли средой X-VIVO с добавлением тех же GM-CSF и IL-4. На четвертый день, аликвоту клеток отбирали для анализа FACS экспрессии LRP5 и LRP6, и супернатант оставшихся клеток осторожно удаляли и заменяли на среду X-VIVO в присутствии только LPS или в комбинации с Wnt3a человека или с Wnt3a человека и LRP5 селективными связывающими молекулами. На следующий день, супернатанты собирали и подвергали анализу ФНО-альфа по методу ELISA согласно инструкциям производителя.

Осуществляли анализ FACS дифференцированных дендритных клеток (ДК), как описано в примере 7.1 используя следующие антитела:

LRP5 специфическое моноклональное антитело: мышинное IgG1 анти-LRP5 человека - клон 1E9 (Sigma № WH0004041M1) при серийных разведениях 1:100 от 1 мг/мл до 10 мкг/мл.

LRP6 специфическое моноклональное антитело: мышинное IgG2a анти-LRP6 человека (R&D № Mab1505); при серийных разведениях 1:50 от 500 мкг/мл до 10 мкг/мл).

Контроль: мышинный IgG2a изотипичный контроль (Dako № X0943); при серийных разведениях 1:10.

Вторичное меченное поликлональное антитело: козье анти-мышинное IgG/Fc - PE (Dianova № 115-115-164); разведение 1:100.

Как показано на фиг. 8 (левая панель), с помощью анализа FACS дифференцированных ДК обнаружили высокую экспрессию LRP5 (высокие значения PE-A) по сравнению с контролем. Также была обнаружена экспрессия LRP6, но менее выраженная по сравнению с LRP5 (PE-A значения LRP6 <PE-A значения LRP5).

Как сообщалось ранее (Oderup и др. "Canonical and noncanonical Wnt proteins program dendritic cell responses for tolerance". J Immunol. 2013; 190(12): 6126-344), и как показано на фиг. 8, Wnt3a непосредственно ингибирует секрецию провоспалительных цитокинов (то есть, высвобождение ФНО-альфа) дифференцированными ДК. Вызванное Wnt3a подавление высвобождения ФНО-альфа из ДК возобновлялось при доставлении LRP5 селективных связывающих молекул.

Эти данные свидетельствуют о том, что отформатированные, бипаратопные, связывающие молекулы с оптимизированной последовательностью способны восстановить секрецию ФНО-альфа с помощью

Wnt3a обработанных дендритных клеток, таким образом подавляя ингибирующее влияние Wnt на дендритные клетки.

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

Чтобы исследовать влияние ДК на Т-клетки (эффекторные Т-клетки), предварительно обработанные Wnt3a ДК, с или без молекул, селективно связывающих LRP5, культивировали совместно с Т-клетками, выделенными из РВМС, как описывалось ранее (Oderup и др. "Canonical and noncanonical 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-гамма по методу ELISA согласно инструкциям производителя.

Секреция ИФН-гамма является маркером активации Т-клеток. Как показано на фиг. 8 (центральная и правая панели), Wnt3a-опосредованное подавление ДК приводит к сниженной секреции ИФН-гамма Т-клетками (подавление функции Т-клеток), которая восстанавливается обработкой молекулами, селективно связывающими LRP5.

В итоге эти данные показывают, что молекулы, селективно связывающие LRP5, 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, селективно связывающих LRP5, на Т-клетки, опосредованное активацией ДК, может быть ограничено истощением Т-клеток. Поэтому ожидается, что комбинированное лечение, в котором введение молекул, селективно связывающих LRP5, объединено с 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.

Пример 15: Влияние трех бипаратопных LRP5 селективных VHH конструкций с продленным периодом полувыведения на передачу сигнала Wnt и жизнеспособность в RNF43 мутантных CRC органоидах.

Была охарактеризована способность бипаратопных LRP5 селективных VHH конструкции с продленным периодом полувыведения селективно ингибировать пролиферацию (определяемую путем ингибирования жизнеспособности клеток), и активной передачи сигналов Wnt (определяемую путем уменьшения уровня мРНК Axin2), используя органоиды RNF43 мутантного рака ободочной и прямой кишки (CRC). CRC органоиды получали, как было описано ранее (van de Wetering и др.. "Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer кишки patients. *Cell* 2015;161(4):933-45). Вкратце, для осуществления анализа жизнеспособности клеток, каждый из трех CRC органоидов, полученных от пациентов, (RNF43 mut1, RNF43 mut2 и RNF43 WT) фильтровали через фильтр 40 мкм и высевали в планшеты на 384 лунок (покрытые матриксом базальной мембраны -BME). В особенности, ~500 органоидов ресуспендировали в общем объеме 40 мкл среды (с 5% BME) на лунку. Культуральная среда не содержала Wnt лигандов. Соединения распределяли с помощью Tecan D300 Digital Dispenser. Органоиды подвергали воздействию 8-точковых серийных разведений LRP5 селективной VHH конструкции или контрольного соединения и одной фиксированной концентрации стауроспорина (2 мкМ). Свежие соединения добавляли в день 0 и день 3 после высевания органоидов. Через 5 дня, использовали анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay (Promega) для определения жизнеспособности клеток органоидов, полученных от CRC пациентов. CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay представляет собой гомогенный метод для определения количества жизнеспособных клеток в 3D культуре на основании количественного определения присутствующего АТФ, который является маркером наличия метаболически активных клеток. В каждом эксперименте, обработку с применением бипаратопной LRP5 селективной VHH конструкции с продленным периодом полувыведения и контрольных соединений осуществляли в трех повторах на органоидную линию. В качестве внутренних контролей, три органоида, полученные от CRC пациентов, также обрабатывали с применением ДМСО и Стауроспорина и соответствующие данные жизнеспособности клеток использовали в качестве эталона: значения ДМСО в качестве 100% выживания и значения Стауроспорина в качестве 0% выживания. ДМСО добавляли во всех лунки для нормирования к наиболее высокой концентрации (0,1% для ДМСО в Стауроспорине).

Для анализа уровней мРНК Axin2 с использованием количественной ПЦР с детекцией в реальном времени, каждый из трех органоидов, полученных от пациентов с CRC (RNF43 mut1, RNF43 mut2 и RNF43 WT), фильтровали через фильтр 40 мкм и высевали в планшеты на 384 лунок (покрытые с помощью BME). В особенности, ~500 органоидов ресуспендировали в общем объеме 40 мкл среды (с 5% BME) на лунку. Культуральная среда не содержала Wnt лигандов. Соединения распределяли с использованием Tecan D300 Digital Dispenser. Органоиды подвергали воздействию бипаратопной LRP5 селективной VHH конструкции с продленным периодом полувыведения в конечной концентрации 62 нМ или 1 мкМ контрольное соединение). Соединения добавляли в день 0 и через 24 часа после обработки органоиды собирали для осуществления анализа кРВ-ПЦР и определяли уровни мРНК Axin2 в качестве биомаркера ин-

гибирования активной передачи сигналов Wnt.

Как показано на фиг. 9, RNF43 мутантные CRC органоиды (RNF43 mut1, RNF43 mut2), обработанные с применением бипаратопной LRP5 селективной VHH конструкции с продленным периодом полувыведения, показали значительное снижение процента жизнеспособных клеток (уменьшение на  $\geq 50\%$ ) по сравнению с клетками, обработанными ненацеленной VHH конструкцией (контроль), которая не оказывала влияния на жизнеспособность клеток. RNF43 дикого типа CRC органоид (RNF43 WT), обработанные с применением LRP5 селективной VHH конструкции с продленным периодом полувыведения, не проявляли влияния на жизнеспособность клеток по сравнению с клетками, обработанными контрольным соединением. Эти данные демонстрируют способность бипаратопных LRP5 селективных VHH конструкций с продленным периодом полувыведения селективно ингибировать пролиферацию раковых клеток, несущих мутации в RNF43 гене, которые зависят от активной передачи сигнала Wnt.

Как показано на фиг. 10, RNF43 мутантные CRC органоиды (RNF43 mut1, RNF43 mut2), обработанные с применением бипаратопной LRP5 селективной VHH конструкции с продленным периодом полувыведения (конечная концентрация 62 нМ), показали значительное снижение относительных уровней мРНК Axin2 (то есть, нормализованных по эндогенному контролю) по сравнению с клетками, обработанными с применением контроля (конечная концентрация 1 мкМ). RNF43 дикого типа CRC органоид (RNF43 WT), обработанные с применением бипаратопной LRP5 селективной VHH конструкции с продленным периодом полувыведения (конечная концентрация 62 нМ) не продемонстрировали существенного влияния на уровни мРНК Axin2, по сравнению с клетками, обработанными контрольным соединением (конечная концентрация 1 мкМ). Эти данные демонстрируют способность бипаратопной LRP5 селективной VHH конструкции с продленным периодом полувыведения селективно ингибировать передача сигналов Wnt раковыми клетками, несущими мутации в RNF43 гене.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, который связывается с белком 5, родственным белкам семейства рецептора липопротеинов низкой плотности (LRP5), где полипептид содержит первый вариабельный домен иммуноглобулина (ISVD) и второй ISVD, где первый ISVD представляет собой (I) ISVD, содержащий следующие последовательности участка, определяющего комплементарность (CDR):

CDR1: TYVMG (SEQ ID NO:1)

CDR2: AISWSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)

CDR3: SRGTSTPSRASGVSRDY (SEQ ID NO:3), и второй ISVD, выбранный из (III) ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: IGAMG (SEQ ID NO:7)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGGPKRDY (SEQ ID NO:9), и

(IV) ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: INAMG (SEQ ID NO:10)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGGPKRDY (SEQ ID NO:9).

2. Полипептид по п.1, где первый ISVD представляет собой ISVD (I) и второй ISVD представляет собой ISVD (III).

3. Полипептид по п.1, где первый ISVD представляет собой ISVD (I) и второй ISVD представляет собой ISVD (IV).

4. Полипептид, который связывается с белком 5, родственным белкам семейства рецептора липопротеинов низкой плотности (LRP5), где полипептид содержит первый вариабельный домен иммуноглобулина (ISVD) и второй ISVD, где первый ISVD представляет собой

(II) ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: RYAVA (SEQ ID NO:4)

CDR2: AITWSSGRIDYADSVKG (SEQ ID NO:5)

CDR3: DRRPRSTGRSGTGSPSTYDY (SEQ ID NO:6), и второй ISVD, выбранный из:

(III) ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: IGAMG (SEQ ID NO:7)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGGPKRDY (SEQ ID NO:9), и

(IV) ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: INAMG (SEQ ID NO:10)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGGPKRDY (SEQ ID NO:9).

5. Полипептид по п.4, где первый ISVD представляет собой ISVD (II) и второй ISVD представляет собой ISVD (III).

6. Полипептид по п.4, где первый ISVD представляет собой ISVD (II) и второй ISVD представляет

собой ISVD (IV).

7. Полипептид по любому из пп.1-6, где указанные ISVD представляют собой VHH домены, предпочтительно гуманизированные VHH домены.

8. Полипептид по п.1 или п.4, где  
ISVD (I) содержит последовательность SEQ ID NO:11 или последовательность SEQ ID NO:23,  
ISVD (II) содержит последовательность SEQ ID NO:12  
ISVD (III) содержит последовательность SEQ ID NO:13 или последовательность SEQ ID NO:22, и/или  
ISVD (IV) содержит последовательность SEQ ID NO:14.

9. Полипептид по п.8, содержащий первый ISVD и второй ISVD, где указанный первый ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:23, и указанный второй ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:22.

10. Полипептид по п.9, где указанный первый ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:11 и указанный второй ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:22.

11. Полипептид по п.9, где указанный первый ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:12 и указанный второй ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:13.

12. Полипептид по п.9, где указанный первый ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:23, и указанный второй ISVD содержит последовательность SEQ ID NO:14.

13. Полипептид по любому из пп.1-12, где указанный первый ISVD и указанный второй ISVD ковалентно связаны линкерным пептидом, где указанный линкерный пептид необязательно содержит или состоит из третьего ISVD.

14. Полипептид по любому из пп.1-13, где указанный полипептид дополнительно содержит компонент, увеличивающий период полужизни, где указанный компонент, увеличивающий период полужизни, ковалентно связан с указанным полипептидом и необязательно, выбран из группы, включающей альбуминсвязывающий компонент, такой как альбуминсвязывающий пептид или альбуминсвязывающий домен иммуноглобулина, трансферринсвязывающий компонент, такой как анти-трансферриновый домен иммуноглобулина, молекула полиэтиленгликоля, сывороточный альбумин человека и фрагмент сывороточного альбумина человека.

15. Полипептид по п.14, где указанный компонент, увеличивающий период полужизни, представляет собой альбуминсвязывающий компонент, предпочтительно альбуминсвязывающий ISVD, более предпочтительно Alb11 домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:21.

16. Полипептид, содержащий первый и второй ISVD, связывающие LRP5, и один альбуминсвязывающий ISVD,

указанный первый ISVD, связывающий LRP5, представляет собой

(I) ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: TYVMG (SEQ ID NO:1)

CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)

CDR3: SRGTSTPSRASGVSRDY (SEQ ID NO:3)

указанный второй ISVD, выбранный из группы, включающей ISVD (III) и (IV):

(III) ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: IGAMG (SEQ ID NO:7)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGGPKRDY (SEQ ID NO:9), и

(IV) ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: INAMG (SEQ ID NO:10)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGGPKRDY (SEQ ID NO:9),

указанный альбуминсвязывающий ISVD определяется как содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: SFGMS (SEQ ID NO:15)

CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO:16)

CDR3: GGSLSR (SEQ ID NO:17).

17. Полипептид по п.16, где первый ISVD представляет собой ISVD (I) и второй ISVD представляет собой ISVD (III).

18. Полипептид по п.16, где первый ISVD представляет собой ISVD (I) и второй ISVD представляет собой ISVD (IV).

19. Полипептид, содержащий первый и второй ISVD, связывающие LRP5, и один альбуминсвязывающий ISVD,

указанный первый ISVD, связывающий LRP5, представляет собой

(II) ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: RYAVA (SEQ ID NO:4)

CDR2: AITWSSGRIDYADSVKG (SEQ ID NO:5)

CDR3: DRRPRSTGRSGTGPSTYDY (SEQ ID NO:6),

указанный второй ISVD, выбранный из группы, включающей ISVD (III) и (IV):

(III) ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: IGAMG (SEQ ID NO:7)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGPCKRDY (SEQ ID NO:9), и

(IV) ISVD, содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: INAMG (SEQ ID NO: 10)

CDR2: AVSSGGSTYYVDSVKG (SEQ ID NO:8)

CDR3: ETGPYGPCKRDY (SEQ ID NO:9),

указанный альбуминсвязывающий ISVD определяется как содержащий следующие CDR последовательности:

CDR1: SFGMS (SEQ ID NO:15)

CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO:16)

CDR3: GGSLSR (SEQ ID NO:17).

20. Полипептид по п.19, где первый ISVD представляет собой ISVD (II) и второй ISVD представляет собой ISVD (III).

21. Полипептид по п.19, где первый ISVD представляет собой ISVD (II) и второй ISVD представляет собой ISVD (IV).

22. Полипептид, который связывается с LRP5, содержащий или состоящий из последовательности, выбранной из SEQ ID NO:18, 19 и 20.

23. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по любому из пп.1-22.

24. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.23.

25. Клетка-хозяин, несущая экспрессионный вектор по п.24.

26. Способ приготовления полипептида по любому из пп.1-22, который включает стадии культивирование клетки-хозяина по п.25 в условиях, которые предоставляют возможность экспрессии полипептида по любому из пп.1-21; и восстановление указанного полипептида.

27. Способ по п.26, который дополнительно включает стадию очистки указанного полипептида.

28. Фармацевтическая композиция для лечения, предотвращения или ослабления заболевания, вызванного аномальной передачей сигналов Wnt, содержащая (I) в качестве активного компонента, полипептид по любому из пп.1-22, и (II) фармацевтически приемлемый носитель.

29. Применение полипептида по любому из пп.1-22 в качестве лекарственного средства в способе лечения, предотвращения или ослабления заболевания, вызванного аномальной передачей сигналов Wnt, у человека или животного.

30. Применение полипептида по любому из пп.1-22 для лечения злокачественного новообразования, вызванного аномальной передачей сигналов Wnt.

31. Применение по п.30 для лечения рака молочной железы, рака легких, специфически немелкоклеточной карциномы легких (NSCLC), рака поджелудочной железы, рака ободочной и прямой кишки, сарком, рака яичников или гепатоклеточной карциномы.

32. Применение по п.31 в комбинации с химиотерапевтическим средством, терапевтически активным соединением, которое ингибирует ангиогенез, ингибитором пути передачи сигнала, ингибитором EGFR, иммуномодулятором, ингибитором контрольной точки иммунного ответа, или средством для гормональной терапии.

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

34. Применение терапевтического средства, выбранного из группы, включающей химиотерапевтические средства, терапевтически активные соединения, которые ингибируют ангиогенез, ингибиторы путей передачи сигналов, ингибиторы EGFR, иммуномодуляторы, ингибиторы контрольных точек иммунного ответа и средства для гормональной терапии в комбинации с полипептидом по любому из пп.1-22 для лечения, предотвращения или ослабления заболевания, вызванного аномальной передачей сигналов Wnt.

35. Способ лечения злокачественного новообразования или идиопатического заболевания легких или ретинопатии, вызванных аномальной передачей сигналов Wnt, у пациента, который в этом нуждается, включающий введение указанному пациенту эффективного количества полипептида по любому из пп.1-22, или фармацевтической композиции по п.28.

36. Применение полипептида по любому из пп.1-22 для модификации микроокружения опухоли путем ингибирования Wnt1- и Wnt3a-опосредованной транскрипции целевого гена в дендритных клетках.

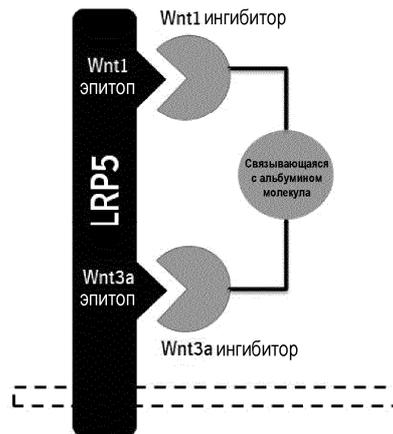
37. Применение по п.36, где указанное применение представляет собой применение в условиях in

vitro.

38. Применение полипептида по любому из пп.1-22 для лечения злокачественного новообразования, вызванного аномальной передачей сигналов Wnt, в комбинации с ингибитором контрольной точки иммунного ответа, выбранным из группы, включающей анти-PD1 антитела, анти-PDL1 антитела, анти-CTLA4 антитела, анти-BTLA антитела, анти-LAG3 антитела, и анти-TIM3 антитела, или в комбинации с противораковой вакциной.

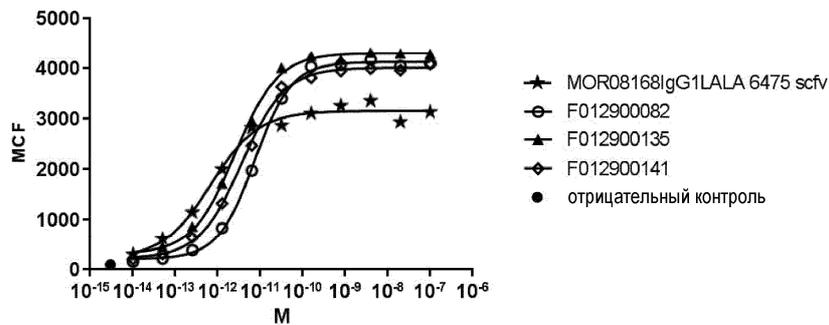
39. Применение полипептида по любому из пп.1-22 для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования, вызванного аномальной передачей сигналов Wnt.

40. Применение полипептида по любому из пп.1-22 для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования, вызванного аномальной передачей сигналов Wnt, в комбинации с ингибитором контрольной точки иммунного ответа, выбранным из группы, включающей анти-PD1 антитела, анти-PDL1 антитела, анти-CTLA4 антитела, анти-BTLA антитела, анти-LAG3 антитела, и анти-TIM3 антитела, или в комбинации с противораковой вакциной.

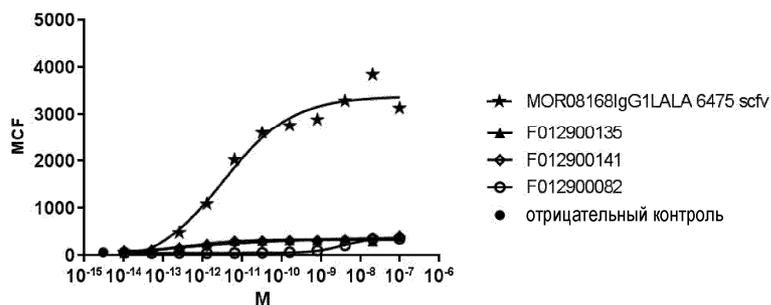


Фиг. 1

2A

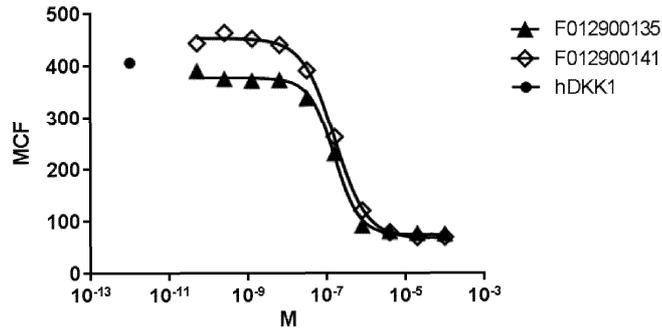


2B

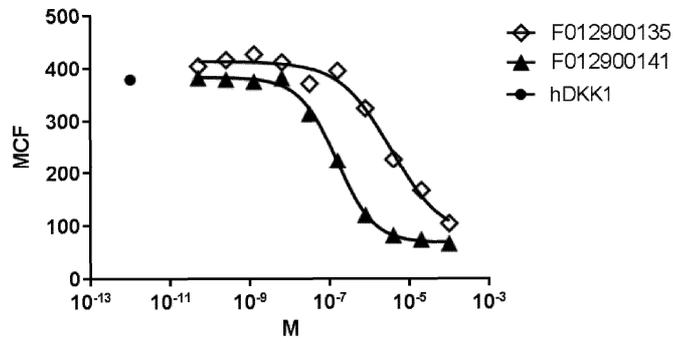


Фиг. 2

3А- человека

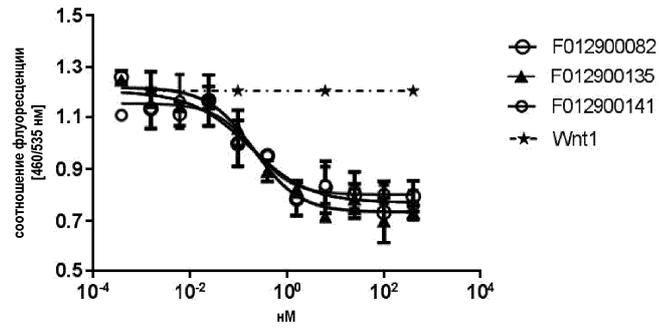


3В- мыши

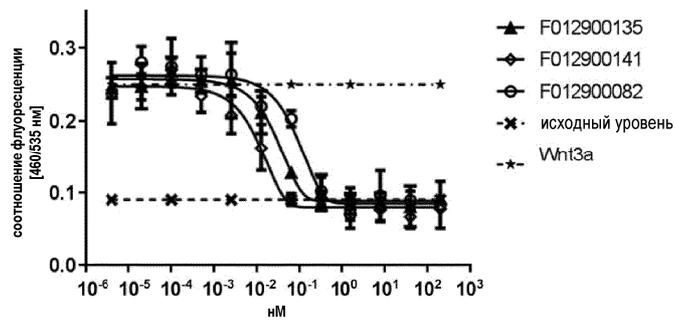


Фиг. 3

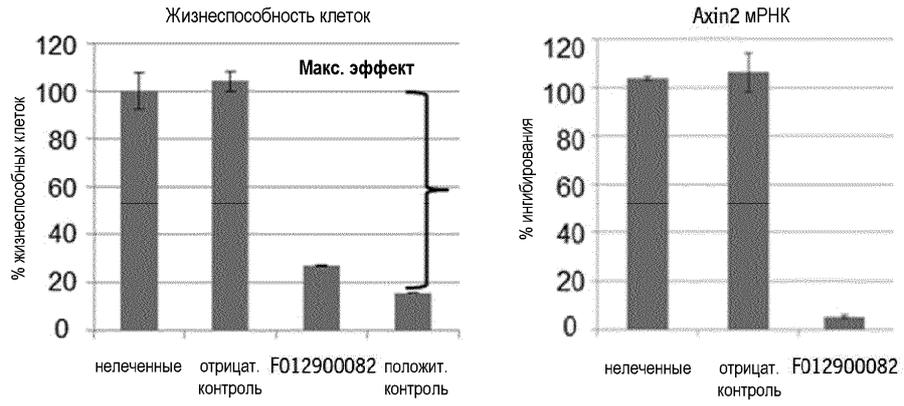
4А



4В

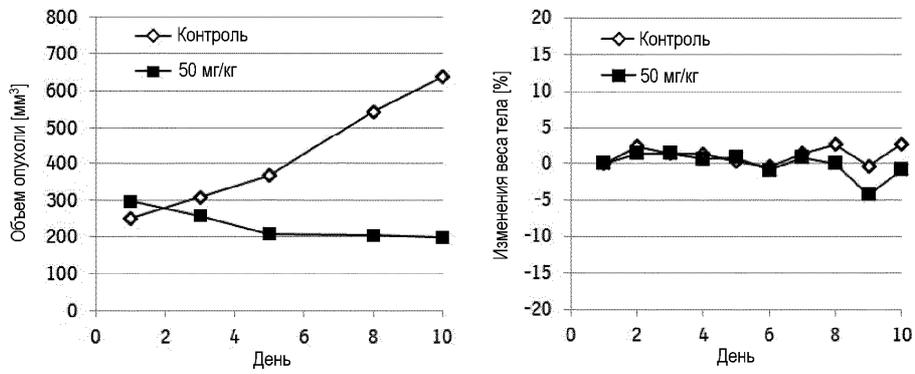


Фиг. 4

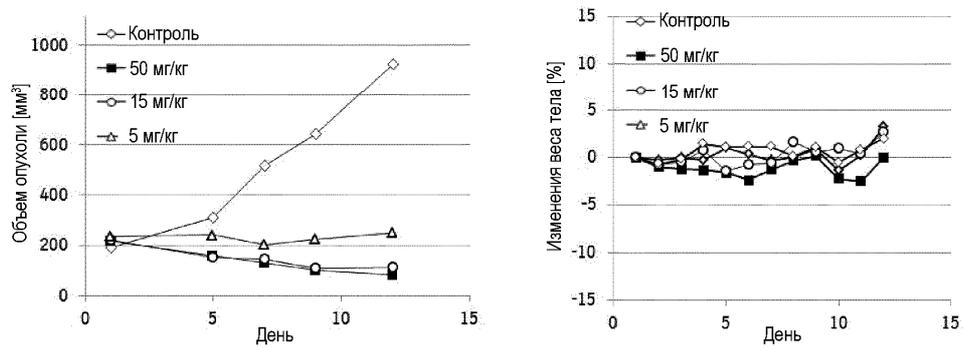


Фиг. 5

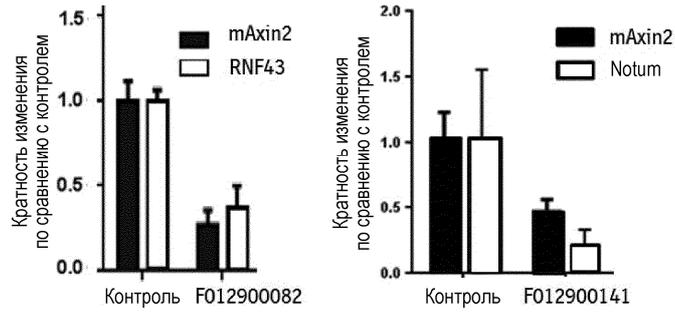
6A



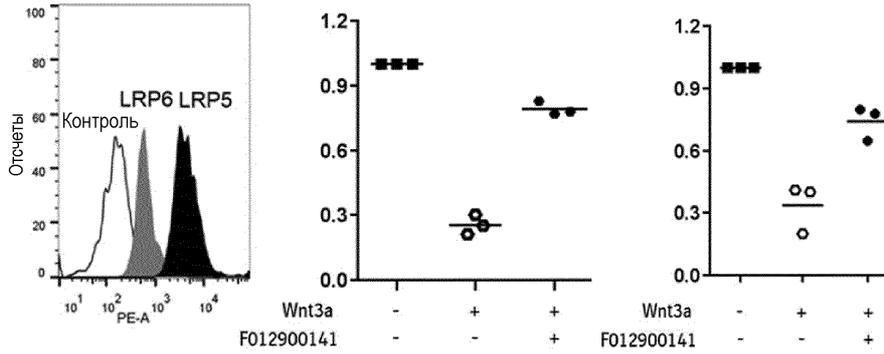
6B



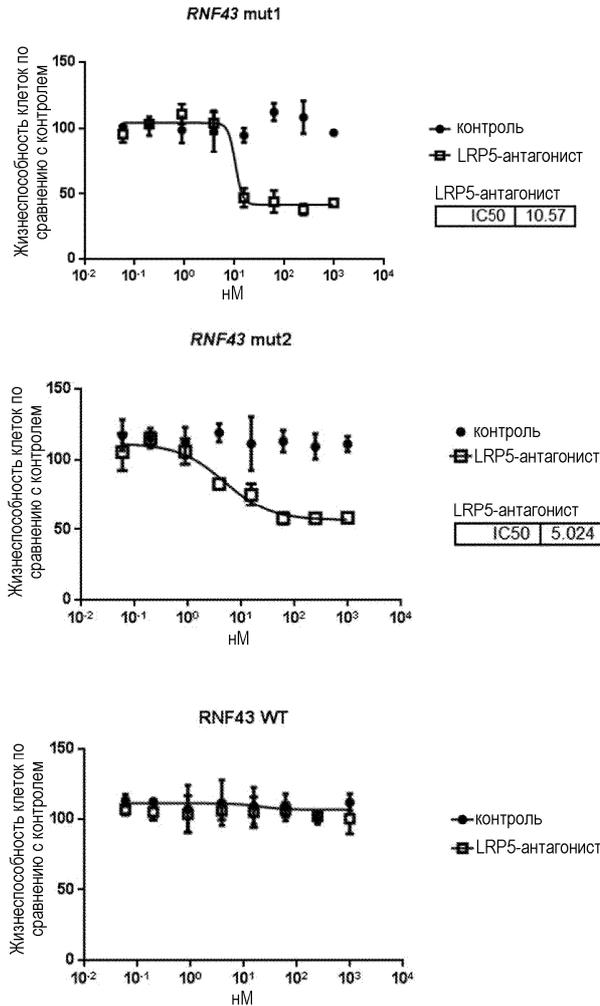
Фиг. 6



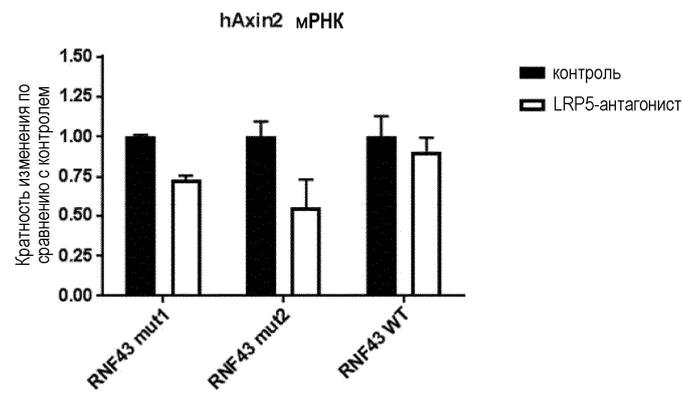
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

