



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012151205/10, 29.04.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.04.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
30.04.2010 DE 10161685.2

(43) Дата публикации заявки: 10.06.2014 Бюл. № 16

(45) Опубликовано: 20.12.2016 Бюл. № 35

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: NG EUGENE W.M. ET AL., Anti-VEGF aptamer (pegaptanib) therapy for ocular vascular diseases, NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, no. 1082, p. 151-171. STUMPP M.T. ET AL., DARPinS: A new generation of protein therapeutics, DRUG DISCOVERY TODAY, v. 13, no. 15-16, p. 695-701. WO 2000075319 A1, 14.12.2000. US 20080103098 A1, 01.05.2008. EA 12622 B1, 30.10.2009.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 30.11.2012

(86) Заявка РСТ:
EP 2011/056824 (29.04.2011)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/135067 (03.11.2011)

Адрес для переписки:

105082, Москва, Спартаковский пер., д. 2, стр. 1,
этаж 3, "ЕВРОМАРКПАТ"

(72) Автор(ы):

Ханс Каспар БИНЦ (CH),
Патрик ФОРРЕР (CH),
Михаэль Тобиас ШТУМПП (CH)

(73) Патентообладатель(и):

МОЛЕКЬЮЛЕР ПАРТНЕРС АГ (CH)

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, ИНГИБИРУЮЩИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ VEGF-A РЕЦЕПТОРА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Представленное изобретение касается связывающих белков, специфичных для VEGF-A, в частности рекомбинантных связывающих белков, содержащих полиэтиленгликолевый фрагмент и связывающий домен, которые ингибируют связывание VEGF-Axxx с VEGFR-2. Примерами таких

рекомбинантных связывающих белков являются белки, которые содержат анкириновый повторяющийся с желаемой специфичностью связывания домен и полиэтиленгликолевый фрагмент. Связывающие белки являются полезными при лечении рака и других патологических состояний, например глазных болезней, таких как возрастная дегенерация

желтого пятна. 6 н. и 12 з.п. ф-лы, 8 ил., 5 пр.

R U 2 6 0 5 3 0 9 C 2

R U 2 6 0 5 3 0 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)*A61K* 47/48 (2006.01)*A61P* 9/00 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2012151205/10, 29.04.2011**(24) Effective date for property rights:
29.04.2011

Priority:

(30) Convention priority:
30.04.2010 DE 10161685.2(43) Application published: **10.06.2014** Bull. № 16(45) Date of publication: **20.12.2016** Bull. № 35(85) Commencement of national phase: **30.11.2012**(86) PCT application:
EP 2011/056824 (29.04.2011)(87) PCT publication:
WO 2011/135067 (03.11.2011)

Mail address:

**105082, Moskva, Spartakovskij per., d. 2, str. 1, etazh
3, "EVROMARKPAT"**

(72) Inventor(s):

**KHans Kaspar BINTS (CH),
Patrik FORRER (CH),
Mikhael Tobias SHTUMPP (CH)**

(73) Proprietor(s):

MOLECULAR PARTNERS AG (CH)(54) **MODIFIED BINDING PROTEINS, INHIBITING INTERACTION OF VEGF-A RECEPTOR**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology. Present invention relates to binding proteins, specific to VEGF-A, in particular to recombinant binding proteins, containing polyethyleneglycol fragment and binding domain, which inhibit binding of VEGF-Axxx with VEGFR-2. Examples of such recombinant binding

proteins are proteins, which contain anchored binding domain, repeated with desired specificity, and polyethyleneglycol fragment.

EFFECT: binding proteins are effective in treating cancer and other pathological states, for example eye diseases, such as age related macular degeneration.

18 cl, 8 dwg, 5 ex

Область изобретения

Настоящее изобретение касается модифицированных рекомбинантных белков, специфичных к VEGF-A, а также фармацевтических композиций, содержащих такие белки, и применения таких белков в лечении опухолей и заболеваний глаз.

5 Предпосылки создания изобретения

Ангиогенез, рост новых кровеносных сосудов из уже существующих сосудов, является ключевым процессом при некоторых патологических состояниях, в том числе росте опухолей и заболеваниях глаз, в частности при глазных неоваскулярных заболеваниях, таких как возрастная дегенерация желтого пятна (AMD) или диабетический макулярный отек (DME) (Carmeliet, P., *Nature* 438, 932-936, 2005). Факторы роста эндотелия сосудов (VEGFs) стимулируют ангиогенез и лимфангиогенез путем активации рецептора VEGF (VEGFR) тирозинкиназ в клетках эндотелия (Ferrara, N., Gerber, H.P. and LeCouter, J., *Nature Med.* 9, 669-676, 2003).

Семейство VEGF млекопитающих состоит из пяти гликопротеинов, носящих названия VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D (также известный как FIGF) и фактор роста плаценты (PlGF, также известный как PGF). Было показано, что VEGF-A является эффективной мишенью для антиангиогенной терапии (Ellis, L.M. and Hicklin, D.J., *Nature Rev. Cancer* 8, 579-591, 2008). Лиганды VEGF-A связываются с и активируют три структурно подобные типа III рецептора тирозинкиназ, которые называются VEGFR-1 (также известный как FLT1), VEGFR-2 (также известный как KDR) и VEGFR-3 (также известный как FLT4). Лиганды VEGF имеют отличительные особенности, присущие каждому из этих рецепторов тирозинкиназы, которые способствуют разнообразию их функций. В ответ на связывание лигандов VEGFR тирозинкиназы активируют сеть различных нисходящих сигнальных путей. VEGFR-1 и VEGFR-2 являются в первую очередь найденными на эндотелии сосудов, тогда как VEGFR-3 встречается в основном на лимфатическом эндотелии. У всех данных рецепторов есть внеклеточный домен, одна трансмембранная область и общий типичный элемент структуры последовательности тирозинкиназ, прерванной за счет домена вставки киназы. Совсем недавно нейропиплин (NRP-1), первоначально определенный как рецептор для семейства семафорин/коллапсин нейрональных медиаторов ведения, был показан как изоформный специфический рецептор VEGF-A.

Различные изоформы VEGF-A, как известно, являются образованными альтернативным сплайсингом из восьми экзонов с VEGF-A геном. Все изоформы содержат экзоны 1-5 и терминальный экзон, экзон 8. Экзоны 6 и 7, которые кодируют гепарин-связывающие домены, могут быть включены или исключены. Это дает начало семейству белков, названных в соответствии с их аминокислотным порядковым номером: VEGF-A165, VEGF-A121, VEGF-A189 и так далее. Экзон 8, однако, содержит два 3' сайта сплайсирования в нуклеотидных последовательностях, которые могут быть использованы клеткой для создания двух семейств изоформ с одинаковой длиной, но отличающихся С-терминальными аминокислотными последовательностями (Varey, A.H.R. et al., *British J. Cancer* 98, 1366-1379, 2008). VEGF-A_{xxx} ("XXX" обозначает порядковый номер аминокислоты зрелого белка), проангиогенное семейство изоформ, является созданным путем использования наиболее проксимальной последовательности в экзоне 8 (в результате включения экзона 8а). Совсем недавно описанные антиангиогенные VEGF-A_{xxx}b изоформы создаются путем использования дистального сайта сплайсирования, 66 базовая точка далее за геном от проксимального сайта сплайсирования. Это в результате приводит к сплайсингу экзона 8а и продуцированию последовательности мРНК, которая кодирует VEGF-A_{xxx}b семейство. VEGF-A165

является доминирующей проангиогенной изоформой и обычно избыточно экспрессируется в различных солидных опухолях человека. VEGF-A165b был первым из определенных экзон-8b-кодированных изоформ и было показано, что они имеют анти-ангиогенные эффекты (Varey et al., loc. cit; Konopatskaya, O. et al., Molecular Vision 12, 626-632, 2006). Это эндогенная ингибирующая форма VEGF-A, которая уменьшает VEGF-A, индуцировавшую пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток. Хотя он может связываться с VEGFR-2, VEGF-A165b, связывание в результате не приводит к фосфорилированию рецептора или активации нисходящих сигнальных путей.

Существует несколько подходов к ингибированию VEGF-A сигнальной системы, в том числе нейтрализация лиганда или рецептора антител и блокирование активации VEGF-рецептора и сигнальной системы ингибиторами тирозинкиназы. Показано, что VEGF-направленная терапия является эффективной как ионотерапия при AMD, DME, почечно-клеточной карциноме и гепатоцеллюлярной карциноме исходя из того, что это является преимуществом только в сочетании с химиотерапией у пациентов с метастатическим колоректальным раком, не-мелкоклеточным раком легких и метастатическим раком молочной железы (Narayanan, R. et al., Nat Rev. Drug Discov. 5, 815-816, 2005; Ellis and Hicklin, в цитируемом месте).

Помимо антител, другие связывающие домены могут быть использованы для нейтрализации лиганда или рецептора (Skerra, A., J. Mol. Recog. 13, 167-187, 2000; Binz, H.K., Amstutz, P. and Pluckthun, A., Nat. Biotechnol. 23, 1257-1268, 2005). Один такой новый класс связывающих доменов основывается на сконструированных повторяющихся доменах (WO 02/20565; Binz, H.K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M. T., Briand, C., Forrer, P., Grutter, M. G., and Pluckthun, A., Nat. Biotechnol. 22, 575-582, 2004). WO 02/20565 описывает, как могут быть сконструированы большие библиотеки повторяющихся белков и их общее применение. Тем не менее, WO 02/20565 совсем не раскрывает выбор повторяющихся доменов со специфичностью связывания для VEGF-Axxx, ни конкретных мотивов повторяющейся последовательности повторяющихся доменов, которые специфически связываются с VEGF- Axxx.

Направленный VEGF-A с текущей доступной терапией не является эффективным у всех больных или для всех заболеваний (например, EGFR-экспрессирующего рака). Стало даже все в большей степени очевидным, что терапевтический эффект, связанный с VEGF-направленной терапией, является сложным и, вероятно, включает разнообразные механизмы (Ellis and Hicklin, цит. место). Например, существующие на рынке анти-VEGF лекарственные средства, такие как бевацизумаб (Авастин®) или ранибизумаб (Луцентис®) (смотри WO 96/030046, WO 98/045331 и WO 98/045332) или лекарственные средства, находящиеся в клинической разработке, такие как VEGF-Trap® (WO 00/075319) не делают различия между про- и анти-ангиогенными формами VEGF-A, таким образом они ингибируют обе формы. В результате, они ингибируют ангиогенез, но, кроме того, лишают здоровые ткани существенного фактора выживания, а именно VEGF-Axxx, что в результате приводит к цитотоксичности и ограничивающим дозу побочным эффектам, которые, в свою очередь, ограничивают эффективность. Побочными эффектами, общими для существующих анти-VEGF терапий, являются желудочно-кишечные перфорации, кровотечения, артериальная гипертензия, случаи тромбоэмболии и протеинурия (Kamba, T. and McDonald, D.M., Br. J. Cancer 96, 1788-95, 2007). Другое существующее на рынке анти-VEGF лекарственное средство для лечения AMD является пегаптанибом (WO 98/018480; Макуген®, зарегистрированная торговая марка компании Pfizer). Пегаптаниб является пегилированным анти-VEGF аптамером, одна молекулярная цепь нуклеиновой кислоты, которая специфично связывается с белком-мишенью. Для

лечения неоваскулярной AMD существует достаточно доказательств того, что наблюдаемые результаты с Луцентис® превосходят те, что с Макуген®, и нет определенных доказательств, которые предполагают разницу в безопасности между препаратами. В результате, Макуген® не является часто используемым в терапии

данного заболевания.

В целом, существует потребность в улучшенных анти-ангиогенных агентах для лечения рака и других патологических состояний.

Техническая проблема, лежащая в основе настоящего изобретения, - определение новых анти-ангиогенных агентов, таких как повторяющиеся домены со специфичностью связывания с VEGF-Axxx, для улучшения лечения рака и других патологических состояний, например глазных болезней, таких как AMD или DME. Решение данной технической проблемы достигается путем обеспечения вариантов осуществления, представленных в формуле изобретения.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение касается рекомбинантных связывающих белков, которые содержат анкириновый повторяющийся домен и часть полиэтиленгликоля молекулярной массой не менее 5 кДа, в котором указанный анкириновый домен связывает VEGF-Axxx с K_d меньше 10^{-9} М и ингибирует VEGF-Axxx связывание с VEGFR-2.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения часть полиэтиленгликоля связана с одним остатком Cys связывающего домена.

Кроме того, изобретение касается фармацевтической композиции, содержащей один или более из указанных выше связывающих белков или молекул нуклеиновых кислот.

Кроме того, изобретение касается способа лечения рака и других патологических состояний, например глазных заболеваний, таких как AMD или DME, с использованием связывающих белков изобретения.

Краткое описание чертежей

Фигура 1. Специфический VEGF-A164 собаки связывания выбранных сконструированных анкириновых повторяющихся белков.

Взаимодействие выбранных клонов с VEGF-A164 (VEGF) собаки и отрицательным контрольным белком (MBP, Escherichia coli мальтоза связывающий белок) показывают с помощью сырого экстракта ИФА. Биотинилированные VEGF-A164 и MBP собаки были иммобилизованы на нейтравидине. Числа относятся к единичным DARPin клонам, выбранным в рибосоме, проявляемым по отношению к VEGF-A164 собаки или соответствующего VEGF-A165 человека.

A = Поглощение. Белые столбцы показывают связывание с VEGF-A164 собаки, черные столбцы показывают неспецифический фон связывания с MBP.

Фигура 2. Ингибирование разрастания сфероидов с помощью выбранных DARPin.

Длина отростков при ингибировании сфероидного разрастания демонстрируется в присутствии различных концентраций (a) DARPin #30 (аминокислоты с 1 по 126 из SEQ ID NO:4), DARPin со специфичностью к VEGF-Axxx, или (b) DARPin NC, отрицательного контроля DARPin без специфичности к VEGF-Axxx.

Фигура 3. Специфическое распознавание VEGF-A изоформ.

Поверхностно-плазменный резонансный (SPR) анализ связывающих белков на VEGF-A изоформы.

(a) и (b): SPR анализ Авастин®. 250 нМ Авастина® был применен к проточной ячейке с иммобилизованными VEGF-A164 собаки (a) или VEGF-A164b собаки (b) в течение 100 секунд, с последующим промыванием буферным потоком.

(c) и (d): SPR анализ DARPin #27 (аминокислоты с 1 по 159 из SEQ ID NO:1). 250 нМ

DARPin #27 применяли к проточной ячейке с иммобилизованными VEGF-A164 собаки (с) или VEGF-A164b собаки (г) в течение 100 секунд, с последующим промыванием буферным потоком.

РЕ = Резонансные единицы.

5 Фигура 4. Эффективное ингибирование VEGF-A165 человека в глазу кролика.

Сосудистые модели блокирования биохимического процесса мутацией на кроликах, чтобы показать эффективность DARPIn в ингибировании VEGF-A165 человека в глазу по сравнению с Луцетисом®. В 1-й день либо PBS, DARPIn #30 или Луцетисом® применяют путем инъекции в стекловидное тело в один глаз каждого кролика
10 (обработанный глаз). На 4-й день или 30 день делали инъекции в стекловидное тело обоих глаз каждого кролика по 500 нг VEGF-A165 человека. Все глаза были оценены через 48 часов после инъекций VEGF-A165 путем измерения содержания флуоресцеина в стекловидном теле и сетчатке всех глаз через один час после внутривенного инъекционного введения флуоресцеина натрия.

15 R = отношение измеренного количества флуоресцеина в обработанном глазу/ необработанном глазу. Стандартные отклонения показаны с помощью величины погрешности. 4-PBS = соотношение через 4 дня после инъекции PBS (контроль); 4-D = соотношение через 4 дня после инъекции DARPIn #30, 30-D = соотношение через 30 дней после инъекции DARPIn #30, 4-L = соотношение через 4 дня после введения Луцетиса®;
20 30-L = соотношение через 30 дней после инъекции Луцетиса®.

Детальное описание изобретения

VEGF-A млекопитающих существует в виде двух семейств альтернативных сплайсированных изоформ: (i) про-ангиогенных "VEGF-Axxx" изоформ, образованных путем проксимального сплайсинга экзона 8 и (ii) анти-ангиогенных "VEGF-Axxxh"
25 изоформ, образованных путем дистального сплайсинга экзона 8. Предпочтительно, связывающий домен в соответствии с изобретением является специфическим для про-ангиогенных VEGF-Axxx происхождения от собаки, кролика, обезьяны или человека. Более предпочтительно, связывающий домен в соответствии с изобретением является специфическим для про-ангиогенных VEGF-Axxx человеческого происхождения.
30 Наиболее предпочтительно, связывающий домен в соответствии с изобретением является специфическим для VEGF-A165 человека.

Термин "белок" относится к полипептиду, в котором по меньшей мере часть полипептида имеет или способна приобретать определенное трехмерное расположение путем образования вторичных, третичных или четвертичных структур внутри и/или
35 между его полипептидной(ыми) цепь(ями). Если белок содержит два или более полипептида, отдельные полипептидные цепи могут быть нековалентно или ковалентно связаны, например, за счет дисульфидной связи между двумя полипептидами. Часть белка, каждая из которых индивидуально имеет или способна приобрести определенное трехмерное расположение путем образования вторичных или третичных структур,
40 называется "доменом белка". Такие домены белка хорошо известны практикующим квалифицированным специалистам в данной области из уровня техники.

Термин "рекомбинантный", как например в словосочетаниях рекомбинантный белок, рекомбинантный домен белка и тому подобных, означает, что указанные полипептиды продуцируются путем использования технологий рекомбинантных ДНК, хорошо
45 известных практикующим квалифицированным специалистам в данной области из уровня техники. Например, рекомбинантные молекулы ДНК (например, продуцированные путем генного синтеза), кодирующие полипептид, могут быть клонированы в бактериальный экспрессионный плазмид (например, pQE30, Qiagen).

Когда такой сконструированный рекомбинантный экспрессионный плазмид вводится в бактерии (например, *E. coli*), эти бактерии могут продуцировать полипептид, кодируемый этой рекомбинантной ДНК. Соответственно, продуцированный полипептид называется рекомбинантным полипептидом.

5 Термин "полипептидная метка" относится к аминокислотной последовательности, присоединенной к полипептиду/белку, в котором указанную аминокислотную последовательность используют для очистки, обнаружения или нацеливания указанного полипептида/белка, или в котором указанная аминокислотная последовательность совершенствует физико-химическое поведение полипептида/белка, или в котором
10 указанная аминокислотная последовательность обладает эффекторной функцией. Отдельные полипептидные метки, фрагменты и/или домены связывающего белка могут быть связаны друг с другом непосредственно или через полипептидные линкеры. Данные полипептидные метки всецело хорошо известны в данной области из уровня техники и являются полностью доступными для квалифицированного специалиста в
15 данной области с уровня техники. Примерами полипептидных меток являются небольшие полипептидные последовательности, например His, myc, FLAG или Strep-метки или фрагменты, такие как ферменты (например, ферменты, такие как щелочная фосфатаза), которые позволяют обнаружение указанного полипептида/белка, или фрагменты, которые могут быть использованы для маркирования (например,
20 иммуноглобулины или их фрагменты) и/или как эффекторные молекулы.

Термин "полипептидный линкер" относится к аминокислотной последовательности, которая способна связывать, например, два белковых домена, полипептидную метку и белковый домен, белковый домен и неполипептидный фрагмент, такой как
25 полиэтиленгликоль, или две метки последовательностей. Такие дополнительные домены, метки, неполипептидные фрагменты и линкеры известны квалифицированным специалистам в данной области из уровня техники. Список примеров приводится в описании патентной заявки WO 02/20565. Конкретными примерами таких линкеров являются глицин-серин-линкеры и пролин-треонин-линкеры переменной длины, предпочтительно указанные линкеры имеют длину от 2 до 24 аминокислот, более
30 предпочтительно указанные линкеры имеют длину от 2 до 16 аминокислот.

В контексте настоящего изобретения термин "полипептид" относится к молекуле, состоящей из одной или нескольких цепей со сложной структурой, то есть две или более аминокислоты, связанные посредством пептидных связей. Предпочтительно, полипептид состоит из более чем восьми аминокислот, связанных посредством пептидных связей.

35 Термин «полимерный фрагмент» относится или к белковому полимерному фрагменту или небелковому полимерному фрагменту. "Белковый полимерный фрагмент" предпочтительно представляет собой полипептид, который не образует стабильной третичной структуры, в то же время не образует более чем на 10% (предпочтительно, не более чем на 5%, также предпочтительно, не более чем на 2%, еще более
40 предпочтительно, не более 1%, и наиболее предпочтительно необнаруживаемые количества, как определено с помощью размерной эксклюзионной хроматографии (гель-хроматографии SEC)) олигомеров или агрегатов в процессе хранения при концентрации около 0,1 мМ в PBS при комнатной температуре в течение одного месяца. Такие белковые полимерные фрагменты протекают при средней (кажущейся)
45 молекулярной массе в SEC, которая является более высокой, чем их эффективная молекулярная масса, когда используются глобулярные белки как стандарты молекулярной массы для SEC. Предпочтительно, средняя молекулярная масса указанных белковых полимерных фрагментов, определенных с помощью SEC, является в 1,5х, 2х

или 2,5х выше, чем их эффективная молекулярная масса, рассчитанная по их аминокислотной последовательности. Также предпочтительно, средние молекулярные массы указанных небелковых полимерных фрагментов, определенных с помощью SEC, является в 2х, 4х или 8х выше, чем их эффективная молекулярная масса, рассчитанная исходя из их молекулярного состава. Предпочтительно, более чем 50%, 70% или даже 90% аминокислот указанного белкового полимерного фрагмента не образуют стабильных вторичных структур при концентрации около 0,1 мМ в PBS при комнатной температуре, как это определено путем измерений кругового дихроизма (КД). Наиболее предпочтительно, указанный белковый полимер показывает типичные в ближней УФ КД-спектры случайной конформации спирали. Такие анализы КД хорошо известны квалифицированным специалистам в данной области из уровня техники. Также предпочтительными являются белковые полимерные фрагменты, которые состоят из более чем 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 аминокислот. Примерами белковых полимерных фрагментов являются XTEN® (зарегистрированный товарный знак Амуникс, WO 07/103515) полипептиды или полипептиды, содержащие остатки пролина, аланина и серина, как описано в WO 08/155134. Такие белковые полимерные фрагменты могут быть ковалентно связаны, например, со связывающим доменом изобретения путем образования генетических слитых полипептидов с использованием стандартных технологий клонирования ДНК, с последующей их стандартной экспрессией и очисткой. Примеры связывающих белков, содержащих повторяющиеся домены, связывающие VEGF-Аххх и такой белковый полимерный фрагмент, представлены в SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:4. Положения аминокислот с 1 по 159 в SEQ ID NO:1 соответствуют повторяющемуся домену, и положения аминокислот с 161 до 1'025 в SEQ ID NO:1 соответствуют белковому полимерному фрагменту. Положения аминокислот с 1 по 126 в SEQ ID NO:4 соответствуют повторяющемуся домену, и положения аминокислот с 131 по 640 в SEQ ID NO:4 соответствуют белковому полимерному фрагменту.

Полимерный фрагмент изобретения может варьировать в широких пределах молекулярной массы (то есть от примерно 1 кДа до примерно 150 кДа). Предпочтительно, полимерный фрагмент имеет молекулярную массу по меньшей мере 2, 5, 10, 20, 30, 50, 70 или 100 кДа.

Предпочтительно, указанный полимерный фрагмент является связанным посредством полипептидного линкера со связывающим доменом. Примерами таких полипептидных линкеров являются аминокислоты с 1 по 8 из SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9.

Примерами небелковых полимерных фрагментов являются гидроксипропиладекстрин (HES), полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль или полиоксипропилен. Термин "ПЭГилированный" означает, что ПЭГ-фрагмент ковалентно связан, например, с полипептидом данного изобретения. Примерами повторяющихся белков, содержащих полипептидный линкер между повторяющимся доменом и С-терминальным Cys остатком, пригодным для связывания небелкового полимерного фрагмента, являются SEQ ID NO:2, 3, 5, 6 и 7.

В конкретном варианте осуществления изобретения ПЭГ фрагмент или какой-либо другой небелковый полимер может, например, связывать тиол цистеина посредством малеимидного линкера с цистеином, который соединен посредством пептидного линкера с N- или С-концом связывающего домена, как описано в данном документе (например, SEQ ID NO:3).

Термин "связывающий белок" относится к белку, содержащему один или более связывающих доменов и один или более полимерные фрагменты, как далее объясняется. Предпочтительно, указанный связывающий белок содержит до четырех связывающих

доменов. Более предпочтительно, указанный связывающий белок содержит до двух связывающих доменов. Наиболее предпочтительно, указанный связывающий белок содержит только один связывающий домен. Кроме того, какой-либо такой белок может содержать дополнительные белковые домены, которые не являются связывающими доменами, мультимеризационными фрагментами, полипептидными метками, полипептидными линкерами и/или одним Cys остатком. Примерами мультимеризационных фрагментов являются константные области тяжелой цепи иммуноглобулина, которые спариваются, чтобы обеспечить функциональные Fc домены иммуноглобулина и лейциновые zipper или полипептиды, содержащие свободный тиол, который образует межмолекулярные дисульфидные связи между двумя такими полипептидами. Единственный Cys остаток может быть использован для сопряжения других фрагментов с полипептидами, например, путем использования малеимидной химии, хорошо известной квалифицированному специалисту в данной области из уровня техники.

Предпочтительно, указанный связывающий белок содержит до четырех полимерных фрагментов. Более предпочтительно, указанный связывающий белок содержит до двух полимерных фрагментов. Наиболее предпочтительно, указанный связывающий белок содержит только один полимерный фрагмент.

Также предпочтительно, указанный связывающий белок имеет среднюю молекулярную массу по меньшей мере 70, 100, 200, 300, 500 или 800 кДа, когда анализировали при концентрации 0,1 мМ в PBS при комнатной температуре с помощью SEC, с использованием глобулярных белков как стандартов молекулярной массы.

Термин «связывающий домен» означает белковый домен, демонстрирующий один и тот же "изгиб" (трехмерное расположение), как и белковый скаффолд и имеющий предопределенное свойство, как определено ниже. Такой связывающий домен может быть получен путем рациональных или, чаще всего, комбинаторных методов белковой инженерии, которые известны квалифицированному специалисту в данной области из уровня техники (Skerra, 2000, цит. месте; Binz et al., 2005, цит. месте). Например, связывающий домен, имеющий предопределенное свойство, может быть получен способом, который включает следующие стадии: (а) получение разнообразной коллекции белковых доменов, демонстрирующих один и тот же изгиб, как и белковый скаффолд, как далее определено ниже, и (б) скрининг указанной разнообразной коллекции и/или отбор из указанной разнообразной коллекции, чтобы получить по меньшей мере один белковый домен, имеющий указанное предопределенное свойство. Разнообразная коллекция белковых доменов может быть обеспечена несколькими методами в соответствии со скринингом и/или используемой системой отбора и может включать использование методов, хорошо известных квалифицированному специалисту в данной области из уровня техники, таких как отображение фагов или рибосомный дисплей.

Термин "белковый скаффолд" означает белок с открытыми областями поверхности, в которых аминокислотные включения, замещения или удаления являются весьма приемлемыми. Примерами белковых скаффолдов, которые могут быть использованы для создания связывающих доменов настоящего изобретения, являются антитела или их фрагменты, такие как одноцепочечные Fv или Fab фрагменты, белок А из *Staphylococcus aureus*, билиновый связывающий белок из *Pieris brassicae* или другие липокалины, анкириновые повторяющиеся белки или другие повторяющиеся белки и фибронектин человека. Белковые скаффолды известны квалифицированным специалистам в данной области из уровня техники (Binz et al., 2005, цит. место; Binz et al., 2004, цит. мест.).

Термин "предопределенное свойство" относится к свойству, такому как связывание с мишенью, блокирование мишени, активация мишень опосредованной реакции, ферментативная активность, и связанные с ними дополнительные свойства. В зависимости от типа требуемого свойства квалифицированный специалист сможет
 5 определить формат и необходимые стадии для проведения скрининга и/или отбора связывающего домена с требуемым свойством. Предпочтительно, предопределенным свойством является связывание с мишенью.

Предпочтительно, связывающий белок данного изобретения не является антителом или его фрагментом, таким как Fab или ScFv фрагментами. Антитела и их фрагменты
 10 хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области из уровня техники.

Также предпочтительно, связывающий домен данного изобретения не содержит иммуноглобулиновую складку, как таковой, что присутствует в антителах и/или фибронектиновом домене типа III. Иммуноглобулиновая складка является общей для
 15 всей- β белковой складки, которая состоит из двухслойного сэндвича около 7 антипараллельных β -нитей, расположенных в двух β -листах. Иммуноглобулиновые складки хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области из уровня техники. Например, такие связывающие домены, содержащие иммуноглобулиновую складку, описаны в WO 07/080392 и WO 08/097497.

Кроме того, предпочтительно, связывающий домен данного изобретения не содержит
 20 иммуноглобулин-подобный домен, которые найдены в VEGFR-1 или VEGFR-2. Такие связывающие домены описаны в WO 00/075319.

Предпочтительным связывающим доменом является связывающий домен, имеющий анти-ангиогенного эффекты. Анти-ангиогенный эффект связывающего домена может быть определен путем анализа, как хорошо известно квалифицированному специалисту
 25 в данной области из уровня техники, такого как анализ прорастания HUVEC сфероидов, описанного в примере 2.

Кроме того, предпочтительным является связывающий домен, содержащий от 70 до 300 аминокислот, в частности от 100 до 200 аминокислот.

Кроме того, предпочтительным является связывающий домен, лишенный свободного
 30 Cys остатка. Свободный Cys остаток не участвует в формировании дисульфидных связей. Еще более предпочтительным является связывающий домен, не имеющий какого-либо Cys остатка.

Предпочтительным связывающим доменом данного изобретения является повторяющийся домен или сконструированный повторяющийся домен,
 35 предпочтительно, как описано в WO 02/20565.

Особенно предпочтительным связывающим доменом является сконструированный анкириновый повторяющийся домен (Binz, H.K. et al., 2004, цит. мест.), предпочтительно, как описано в WO 02/20565. Примеры сконструированных анкириновых повторяющихся доменов показаны в примерах.

40 Определения в дальнейшем для повторяющихся белков основываются на тех, что приведены в заявке на патент WO 02/20565. Кроме того, заявка на патент WO 02/20565 содержит общее описание особенностей повторяющегося белка, методов и применений.

Термин "повторяющиеся белки" относится к белку, содержащему один или более повторяющихся доменов. Предпочтительно, каждый из указанных повторяющихся
 45 белков содержит до четырех повторяющихся доменов. Более предпочтительно, каждый из указанных повторяющихся белков содержит до двух повторяющихся доменов. Наиболее предпочтительно, каждый из повторяющихся белков содержит только один повторяющийся домен. Кроме того, указанный повторяющийся белок может содержать

дополнительные неповторяющиеся белковые домены, полипептидные метки и/или полипептидные линкеры.

Термин "повторяющийся домен" относится к белковому домену, содержащему две или более последовательных повторяющихся единицы (модуля), как структурные единицы, в которых указанные структурные единицы имеют одинаковую складку и складываются плотно, чтобы создать, например, сверхспиралевидные структуры, имеющие совместный гидрофобный центр.

Термины "сконструированный повторяющийся белок" и "сконструированный повторяющийся домен" относятся к повторяющемуся белку или повторяющемуся домену, соответственно, полученному как результат по методикам изобретения, описанный в заявке на патент WO 02/20565. Сконструированные повторяющиеся белки и сконструированные повторяющиеся домены являются синтетическими, а не полученными природным путем. Они являются созданными человеком белками или доменами, соответственно, полученными путем экспрессии соответствующих сконструированных нуклеиновых кислот. Предпочтительно, экспрессию осуществляют в эукариотических или прокариотических клетках, таких как бактериальные клетки, или путем использования бесклеточной *in vitro* экспрессионной системы.

Термин "структурная единица" относится к локально упорядоченной части полипептида, образованной трехмерными взаимодействиями между двумя или более сегментами вторичной структуры, которые находятся вблизи друг от друга вдоль полипептидной цепи. Такая структурная единица демонстрирует структурный мотив. Термин «структурный мотив» относится к трехмерному расположению элементов вторичной структуры, присутствующему по меньшей мере в одной структурной единице. Структурные мотивы хорошо известны квалифицированным специалистам в данной области из уровня техники. Структурные единицы сами по себе не являются способными приобретать определенное трехмерное расположение, однако их последовательное расположение, например как повторяющиеся модули в повторяющихся доменах, приводит к взаимной стабилизации соседних единиц, что в результате приводит к сверхспиралевидной структуре.

Термин "повторяющаяся единица" относится к аминокислотным последовательностям, содержащим повторяющиеся мотивы последовательности одного или более встречающихся в природе белков, в которых указанные "повторяющиеся единицы" встречаются в нескольких экземплярах и которые демонстрируют определенную топологию складывания, общую для всех указанных мотивов, определяющих складку белка. Примерами таких повторяющихся единиц являются повторяющиеся единицы броненосца, богатые лейцином повторяющиеся единицы, анкириновые повторяющиеся единицы, тетра-три-со-пептидные повторяющиеся единицы, НЕАТ повторяющиеся единицы и богатые лейцином варианты повторяющиеся единицы. Встречающиеся в природе белки, содержащие две или более таких повторяющихся единиц, называют "встречающимся в природе повторяющимся белком". Аминокислотные последовательности отдельных повторяющихся единиц повторяющегося белка могут иметь значительное число мутаций, замещений, добавлений и/или удалений, когда сравниваются друг с другом, в то же время существенно сохраняя общую картину, или мотив, из повторяющихся единиц.

Предпочтительно, повторяющиеся единицы, использованные для вычитания повторяющихся мотивов последовательности, являются гомологичными повторяющимися единицами, полученными из повторяющихся доменов, которые выбирают на мишени, например, как описано в примере 1 и имеющими такую же

специфичность к мишени.

Термин "повторяющийся мотив последовательности" относится к аминокислотной последовательности, которую выводят из одной или более повторяющихся единиц.

Предпочтительно, указанные повторяющиеся единицы являются от повторяющихся доменов, имеющих специфичность связывания для такой же мишени. Термин "топология складывания" относится к третичной структуре указанных повторяющихся единиц. Топология складывания будет определяться участками аминокислот, образующих по меньшей мере части α -спирали или β -листов, или аминокислотными участками, образующими линейные полипептиды или петли, или какую-либо комбинацию α -спиралей, β -листов и/или линейных полипептидов/петель.

Термин «последовательный» относится к расположению, в котором повторяющиеся единицы или повторяющиеся модули располагаются в тандеме. В сконструированных повторяющихся белках существует по меньшей мере 2, как правило от около 2 до 6, в частности по меньшей мере, около 6, часто 20 или более повторяющихся единиц. В большинстве случаев, повторяющиеся единицы будут демонстрировать высокую степень идентичности последовательностей (те же самые аминокислотные остатки в соответствующих положениях) или сходство последовательностей (аминокислотные остатки, будучи разными, но имеющие сходные физико-химические свойства), и некоторые из аминокислотных остатков могут быть ключевыми остатками, строго сохраняющимися в различных повторяющихся единицах, найденных в белках, встречающихся в природе. Тем не менее, высокая степень изменчивости последовательности путем аминокислотных включений и/или удалений, и/или замещений между различными повторяющимися единицами, найденными в белках, встречающимися в природе, будет возможной до тех пор, пока сохраняется общая топология складывания.

Методы прямого определения топологии складывания повторяющихся белков с помощью физико-химических методов, таких как рентгеновская кристаллография, ЯМР-спектроскопия или КД-спектроскопия (кругового дихроизма), хорошо известны практикующим квалифицированным специалистам в данной области из уровня техники. Методы идентифицирования и определения повторяющихся единиц или повторяющихся мотивов последовательности или для идентифицирования семейств родственных белков, содержащих такие повторяющиеся единицы или мотивы, такие как поиск гомологии (BLAST и т.д.), являются хорошо установленными в области биоинформатики, а также хорошо известны практикующим специалистам в данной области из уровня техники. Стадия усовершенствования исходного повторяющегося мотива последовательности может включать повторяющийся процесс.

Термин "повторяющиеся модули" относится к повторяемым аминокислотным последовательностям сконструированных повторяющихся доменов, которые изначально являются производными от повторяющихся единиц повторяющихся белков, которые встречаются в природе. Каждый повторяющийся модуль, который входит в состав повторяющегося домена, является производным от одной или более повторяющихся единиц семейства или подсемейства встречающихся в природе повторяющихся белков, например семейства повторяющихся белков броненосцев или анкириновых повторяющихся белков.

"Повторяющиеся модули" могут включать положения с аминокислотными остатками, присутствующими во всех копиях соответствующих повторяющихся модулей ("фиксированные положения") и положения с различными или "рандомизированными" аминокислотными остатками («рандомизированные положения»).

Термин «кэппирующий модуль» относится к полипептиду, слитому с N- или C-

терминальным повторяющимся модулем повторяющегося домена, в котором указанный кэспирующий модуль образует устойчивые третичные взаимодействия с указанным повторяющимся модулем, обеспечивая тем самым кэп, который защищает гидрофобный центр указанного повторяющегося модуля со стороны, которая не контактирует с последовательным повторяющимся модулем, от растворителя. Указанный N- и/или C-терминальный кэспирующий модуль может быть или может быть производным от, кэспирующей единицей или другим доменом, найденным в повторяющемся белке, который встречается в природе, расположенным рядом с повторяющейся единицей. Термин «кэспирующая единица» относится к встречающемуся в природе складчатому полипептиду, в котором указанный полипептид определяет специфическую структурную единицу, которая является N- или C-терминально слитой с повторяющейся единицей, в которой указанный полипептид образует устойчивые третичные взаимодействия с указанной повторяющейся единицей, обеспечивая тем самым кэп, который защищает гидрофобный центр указанной повторяющейся единицы с одной стороны, от растворителя. Такие кэспирующие единицы могут иметь сходства последовательности с указанным повторяющимся мотивом последовательности. Кэспирующие модули и кэспирующие повторяющиеся описаны в WO 02/020565. Например, N-терминальный кэспирующий модуль SEQ ID NO:2 кодируется посредством аминокислот от положения 1 до 32. Кроме того, предпочтительным является такой N-терминальный кэспирующий модуль, имеющий глициновый или аспартатный остаток в положении 5.

Термин «мишень» относится к индивидуальной молекуле, такой как молекула нуклеиновой кислоты, полипептид, или белок, углевод, или какая-либо другая встречающаяся в природе молекула, в том числе какая-либо часть такой индивидуальной молекулы или комплексы из двух или более таких молекул. Мишень может быть целая клетка, или образец ткани, или она может быть какая-либо не встречающаяся в природе молекула или фрагмент. Предпочтительно, мишень является встречающимся или не встречающимся в природе полипептидом или полипептидом, содержащей химические модификации, например, модифицированные путем природного или не природного фосфорилирования, ацетилирования или метилирования. В конкретном применении настоящего изобретения, мишенью является VEGF-Axxx или VEGFR-2.

Термин "согласованная последовательность" относится к аминокислотной последовательности, в которой указанную согласованную последовательность получают путем структурного и/или последовательного согласования нескольких повторяющихся единиц. Использование двух или более структурных и/или последовательно согласованных повторяющихся единиц и принятие во внимание гэпов при выравнивании, делает возможным определить наиболее частый аминокислотный остаток в каждом положении. Согласованная последовательность является такой последовательностью, которая содержит аминокислоты, которые чаще всего представлены в каждом положении. В случае, если две или более аминокислот представлены выше средних показателей на одно положение, согласованная последовательность может включать подгруппу таких аминокислот. Указанные две или более повторяющиеся единицы могут быть взяты из повторяющихся единиц, включенных в один повторяющийся белок или из двух или более различных повторяющихся белков.

Согласованные последовательности и способы, чтобы их определять, являются хорошо известными квалифицированным специалистам в данной области из уровня техники.

"Согласованный аминокислотный остаток" является аминокислотой, обнаруженной в определенном положении в согласованной последовательности. Если два или более,

например три, четыре или пять, аминокислотных остатка обнаруживают с аналогичной вероятностью в указанных двух или более повторяющихся единицах, то согласованная аминокислота может быть одной из наиболее часто обнаруживаемых аминокислот или комбинацией указанных двух или более аминокислотных остатков.

5 Далее, предпочтительными являются не встречающиеся в природе связывающие белки или связывающие домены.

Термин "не встречающиеся в природе" означает синтетические или не из природы, более конкретно, термин означает сделанные руками человека. Термин "не встречающийся в природе связывающий белок" или "не встречающиеся в природе
10 связывающий домен" означает, что указанный связывающий белок или указанный связывающий домен является синтетическим (то есть полученным путем химического синтеза из аминокислот) или рекомбинантным, а не из природы. "Не встречающийся в природе связывающий белок" или "не встречающиеся в природе связывающий домен" является сделанным человеком белком или доменом, соответственно, полученным
15 путем экспрессии соответственно сконструированных нуклеиновых кислот.

Предпочтительно, экспрессию осуществляют в эукариотических или бактериальных клетках, или путем использования бесклеточной *in vitro* экспрессионной системы. Кроме того, термин означает, что последовательность указанного связывающего белка или указанного связывающего домена не присутствует как ввод неискусственной
20 последовательности в базе данных последовательностей, например в GenBank, EMBL-банке или Swiss-Prot. Эти базы данных и другие аналогичные базы данных последовательностей хорошо известны квалифицированным специалистам в данной области из уровня техники.

Связывающий домен может ингибировать VEGF-Axxx связывание с VEGFR-2 или
25 путем связывания с VEGF-Axxx или путем связывания с VEGFR-2 до такой степени, что кажущаяся константа диссоциации (K_d) между VEGF-Axxx и VEGFR-2 увеличивается более чем в 10^2 раз, предпочтительно более чем в 10^3 раз, более предпочтительно более чем в 10^4 раз, более предпочтительно более чем 10^6 раз, и наиболее предпочтительно
30 более чем 10^6 раз. Предпочтительно, K_d для взаимодействия связывающий домен с VEGF-Axxx или VEGFR-2 составляет меньше 10^{-7} М, предпочтительно меньше 10^{-8} М, более предпочтительно, меньше 10^{-9} М, более предпочтительно меньше 10^{-10} М, и
35 наиболее предпочтительно меньше 10^{-11} М. Способы, чтобы определить константы диссоциации белок-белковых взаимодействий, такие как поверхностный плазменный резонанс (SPR) на основе технологий, хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области из уровня техники.

Предпочтительный связывающий домен связывается с VEGF-Axxx. Еще более предпочтительным является связывающий домен, который связывает VEGF-A165
40 человека.

Термин "PBS" означает фосфатный буферный водный раствор, содержащий 137 мМ NaCl, 10 мМ фосфата и 2,7 мМ KCl и имеющий pH 7,4.

Предпочтительным является связывающий белок и/или связывающий домен, который не теряет своей нативной трехмерной структуры при инкубации в PBS, содержащем
45 100 мМ дитиотреитола (ДТТ) в течение 1 или 10 часов при 37°C.

В одном конкретном варианте осуществления изобретение касается связывающего белка, который содержит связывающий домен, ингибирующий связывание VEGF-Axxx с VEGFR-2 и имеющий номинальную или предпочтительную среднюю температуру

денатурации и не агрегирующие свойства, как определено выше, где указанный связывающий белок ингибирует прорастание HUVEC сфероидов со значением IC_{50} ниже 100 нМ.

Термин "HUVEC" означает эндотелиальные клетки аллантаической вены человека, которые могут быть выделены из нормальной аллантаической вены человека и которые являются чувствительными к VEGF-A стимуляции. Анализы для измерения прорастания HUVEC сфероидов, такие как описано в примере 2, хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области из уровня техники.

Значение IC_{50} представляет собой концентрацию вещества, такого как связывающий белок или связывающий домен, которая является необходимой для 50% ингибирования *in vitro* экспериментально определяемого параметра, такого как прорастание HUVEC сфероидов. Значения IC_{50} могут быть легко определены квалифицированным специалистом в данной области из уровня техники (Korff T. and Augustin H.G., J. Cell Biol. 143(5), 1341-52, 1998).

Предпочтительным является связывающий белок и/или связывающий домен, который ингибирует прорастание HUVEC сфероида со значением IC_{50} менее 10 нМ, предпочтительно менее 1 нМ, более предпочтительно менее 0,1 нМ, и наиболее предпочтительно менее 0,05 нМ.

Кроме того, предпочтительным является мономерный связывающий белок и/или связывающий домен, который ингибирует прорастание HUVEC сфероидов со значениями IC_{50} ниже, чем соответствующие значения IC_{50} ранибизумаба (Луцетис®, зарегистрированная торговая марка компании Genentech), бевацизумаба (Авастин®, зарегистрированная торговая марка компании Genentech), афлиберцепта (VEGF Trap®, зарегистрированная торговая марка компании Regeneron) или пегаптаниба (Макуген®, зарегистрированная торговая марка компании Pfizer).

K_d для взаимодействия предпочтительного связывающего домена с VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF или PDGF составляет больше 1 нМ, предпочтительно больше 10 нМ, более предпочтительно больше 102 нМ, еще более предпочтительно больше 103 нМ и наиболее предпочтительно больше 104 нМ.

Предпочтительно, VEGF-Axxx представляет собой или VEGF-A164 собаки, или VEGF-A165 обезьяны, или VEGF-A165 человека и VEGF-Axxx_b представляет собой или VEGF-A164_b собаки, или VEGF-A165_b обезьяны, или VEGF-A165_b человека.

Другим предпочтительным вариантом осуществления является рекомбинантный связывающий белок, который содержит связывающий домен, в котором указанный связывающий домен ингибирует связывание VEGF-Axxx с VEGFR-2, и в котором указанный связывающий домен является повторяющимся доменом или сконструированным повторяющимся доменом. Такой повторяющийся домен может содержать один, два, три или более внутренних повторяющихся модуля, которые будут участвовать в связывании с VEGF-Axxx. Предпочтительно, такой повторяющийся домен содержит N-терминальный кэспирующий модуль, от двух до четырех внутренних повторяющихся модулей и C-терминальный кэспирующий модуль. Предпочтительно, указанным связывающим доменом является анкириновый повторяющийся домен или сконструированный анкириновый повторяющийся домен.

Предпочтительный рекомбинантный связывающий белок содержит связывающий домен, как описано в данном документе, сопряженный с полиэтиленгликольным (ПЭГ) фрагментом, предпочтительно, в котором указанный ПЭГ фрагмент соединен с одним Cys остатком указанного связывающего домена. Предпочтительно, указанный Cys

остаток является генетически введенным в С-терминальный конец указанного связывающего домена. Далее, ПЭГ фрагмент может быть соединен химическим способом, например, путем использования малеимидной химии, хорошо известной квалифицированному специалисту в данной области из уровня техники. Примеры таких связывающих белков, содержащих ПЭГ фрагмент, сопряженный с одним Cys остатком, представлены в примерах.

Предпочтительный вариант осуществления изобретения содержит рекомбинантный связывающий белок, содержащий связывающий домен, как описано в данном документе, в котором указанный связывающий домен конъюгирован на своем С-конце посредством пептидных связей с SEQ ID NO:8, который, в свою очередь, является конъюгированным на С-терминальном тиоле цистеина с малеимид-связанным ПЭГ, таким как α -[3-(3-малеимидо-1-оксопропил)амино]пропил-(ω -метоксиполиоксиэтилен (NOF, Sunbright ME-200 MA (20 кДа) или Sunbright ME-400MA (40 кДа)). В одном из вариантов осуществления α -[3-(3-малеимидо-1-оксопропил)амино]пропил- ω -метоксиполиоксиэтилен имеет молекулярную массу по меньшей мере около 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 70 или 100 кДа. В некоторых вариантах осуществления α -[3-(3-малеимидо-1-оксопропил)амино]пропил- ω -метоксиполиоксиэтилен имеет молекулярную массу по меньшей мере около 20 или по меньшей мере около 40 кДа.

Другим предпочтительным вариантом является рекомбинантный связывающий белок, как определено выше, содержащий по меньшей мере один повторяющийся домен со специфичностью связывания VEGF-Axxx, в котором указанный повторяющийся домен конкурирует за связывание с VEGF-Axxx с повторяющимся доменом, выбранным из группы повторяющихся доменов SEQ ID NO: от 1 до 7. Предпочтительно, повторяющийся домен конкурирует за связывание с VEGF-Axxx с повторяющимся доменом SEQ ID NO:1 или 3. Более предпочтительно, указанный повторяющийся домен конкурирует за связывание с VEGF-Axxx с повторяющимся доменом SEQ ID NO:3.

Термин "конкурируют за связывание" означает неспособность двух различных связывающих доменов изобретения связываться одновременно с одной и той же мишенью, в то время как обе способны связываться с одной и той же мишенью по отдельности. Таким образом, два таких связывающих домена конкурируют за связывание с указанной мишенью. Способы, такие как конкурентные ИФА или конкурентные SPR измерения (например, путем использования прибора Proteon от BioRad), чтобы определить, если два связывающих домена конкурируют за связывание с мишенью, хорошо известны практикующему специалисту в данной области из уровня техники.

Рекомбинантный связывающий белок, который конкурирует за связывание с VEGF-Axxx с выбранным повторяющимся белком, может быть определен методами, хорошо известными квалифицированному специалисту в данной области из уровня техники, такими как конкурентный иммуноферментный анализ (ИФА).

Другим предпочтительным вариантом осуществления изобретения является рекомбинантный связывающий белок, содержащий повторяющийся домен со специфичностью связывания для VEGF-Axxx, выбранной из группы, состоящей из повторяющихся доменов SEQ ID NO: от 1 до 7. Предпочтительно, указанные повторяющиеся домены выбраны из повторяющихся доменов SEQ ID NO:2 или 3. Более предпочтительно, указанный повторяющийся домен является повторяющимся доменом SEQ ID NO:3.

Один или более полиэтиленгликолевых фрагментов могут быть прикреплены в различных положениях в связывающем белке, и такое присоединение может быть

достигнуто путем реакции с аминами, тиолами или другими подходящими реакционно-способными группами. Присоединение полиэтиленгликолевых фрагментов (ПЭГилирование) может быть сайт-направленным, при котором подходящую реакционно-способную группу вводят в белок, чтобы создать сайт, в котором преимущественно происходит ПЭГилирование, или эта группа изначально присутствует в связывающем белке. Тиольная группа может присутствовать в остатке цистеина; и аминокислотная группа может быть, например, первичным амином, найденным на N-конце полипептида, или аминокислотной группой, присутствующей в боковой цепи аминокислоты, такой как лизин или аргинин. В предпочтительном варианте осуществления связывающий белок модифицируется таким образом, чтобы иметь остаток цистеина в нужном положении, позволяющем сайт-направленное ПЭГилирование на цистеине, например, путем взаимодействия с производным полиэтиленгликоля, несущего малеимидную функцию. Фрагмент полиэтиленгликоля может варьировать в широких пределах молекулярной массы (то есть от примерно 1 кДа до примерно 100 кДа) и может быть разветвленным или линейным. Предпочтительно, полиэтиленгликоль имеет молекулярную массу от около 1 до около 50 кДа, предпочтительно от около 10 до около 40 кДа, еще более предпочтительно от около 15 до около 30 кДа и наиболее предпочтительно около 20 кДа.

В другом варианте осуществления изобретение касается молекул нуклеиновых кислот, кодирующие частности рекомбинантные связывающие белки. Кроме того, предусматривается вектор, содержащий указанную молекулу нуклеиновой кислоты.

Кроме того, предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая один или более из указанных выше связывающих белков, в частности рекомбинантных связывающих белков, которые содержат повторяющиеся домены или молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют, в частности, рекомбинантные связывающие белки и, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель. Фармацевтически приемлемые носители и/или разбавители известны квалифицированному специалисту в данной области техники из уровня техники и описаны более подробно ниже. Еще, кроме того, предусматривается диагностическая композиция, содержащая один или более из указанных выше рекомбинантных связывающих белков, в частности связывающих белков, содержащий повторяющиеся домены.

Связывающий белок изобретения подавляет или предупреждает VEGF индуцированный патологический ангиогенез, пропотевание жидкости через сосуды (отек), легочную гипертензию, образование опухолей и/или воспалительные заболевания. Под "подавлением" следует понимать, что рекомбинантный белок предотвращает в некоторой степени указанную патологию, например до 10% или 20%, более предпочтительно 50%, в частности 70%, 80% или 90%, или даже 95%.

Термин «отек» означает состояние, которое вызвано пропотеванием жидкости через сосуды. Расширение сосудов и повышение проницаемости при воспалении может быть преобладающим патогенетическим механизмом. Например, отек способствует развитию инфаркта после инсульта и может привести к опасной для жизни внутричерепной гипертензии у больных раком. Кроме того, экстравазация белков плазмы способствует метастатическим распространениям скрытых опухолей, и закупоривание дыхательных путей может привести к смертельному исходу при астматических приступах. Повышенное пропотевание жидкости через сосуды, которое возникает при воспалении, может привести к дыхательной недостаточности, асциту, перитонеальному склерозу (у диализных пациентов), образованию спаек (абдоминальная хирургия) и

распространению метастаз.

Термин "ангиогенез" означает фундаментальный процесс, при котором образуются новые кровеносные сосуды. Первичный ангиогенный период у человека происходит в течение первых трех месяцев эмбрионального развития, но, кроме того, ангиогенез происходит как нормальный физиологический процесс в периоды роста тканей, таких как увеличение мышц или жира, и во время менструального цикла и беременности.

Термин «патологический ангиогенез» относится к образованию и росту кровеносных сосудов во время протекания и прогрессирования некоторых болезненных состояний. Конкретные примеры патологического ангиогенеза обнаружены в кровеносных сосудах (атеросклероз, гемангиома, гемангиоэндотелиома), костях и суставах (ревматоидный артрит, синовит, разрушение кости и хряща, остеомиелит, рост паннуса, образование остеофитов, новообразования и метастазы), коже (бородавки, гнойные гранулемы, рост волос, саркома Капоши, келоидные рубцы шрама, аллергические отеки, новообразования), печени, почке, легких, ухе и других эпителиальных тканях (воспалительные и инфекционные процессы, включая гепатит, гломерулонефрит, пневмонию; и астма, полипы носа, отиты, расстройства, связанные с трансплантацией, расстройства связанные с регенерацией печени, новообразования и метастазы), матке, яичниках и плаценте (дисфункциональные маточные кровотечения, связанные с применением внутриматочных противозачаточных средств, формирование фолликулярной кисты, синдром гиперстимуляции яичников, эндометриоз, новообразования), мозге, нервах и глазе (ретинопатия недоношенных, диабетическая ретинопатия, хороидаальные и другие внутриглазные расстройства, лейкомаляция, новообразования и метастазы), сердечной и скелетных мышцах в связи с работой с перегрузкой, жировой ткани (ожирение), эндокринных органов (тиреоидит, увеличение щитовидной железы, расстройства при трансплантации поджелудочной железы), при кроветворении (синдром Капоши при СПИДе), в гематологических злокачественных новообразованиях (лейкозы) и лимфатических сосудах (метастазы опухоли, лимфопролиферативные заболевания).

Термин "ишемические заболевания сетчатки" означает, что снабжение сетчатки кровью и кислородом уменьшается, периферическая часть сетчатки теряет источник питания и перестает функционировать должным образом. Конкретным примером ишемического заболевания сетчатки является ретинопатия. Общими заболеваниями, которые приводят к ретинопатии, являются диабетическая ретинопатия, окклюзия центральной вены сетчатки, стеноз сонной артерии и серповидно-клеточная ретинопатия. Диабетическая ретинопатия является основной причиной потери зрения у больных сахарным диабетом. При ишемических заболеваниях сетчатки происходит рост новых кровеносных сосудов (неоваскуляризация). Эти сосуды часто растут на поверхности сетчатки, на зрительном нерве или на передней части глаза - на радужной оболочке. Новые сосуды не могут заменить поток необходимые питательные вещества и, наоборот, могут стать причиной многих проблем, таких как кровоизлияние в стекловидное тело, отслойка сетчатки и неконтролируемая глаукома. Эти проблемы возникают из-за новых сосудов, которые являются хрупкими и подверженными кровотечениям. Если ее обнаружили на ранней стадии, то пролиферативная диабетическая ретинопатия иногда может приостанавливаться панретиальной фотокоагуляцией. Тем не менее, в некоторых случаях хирургическое удаление стекловидного тела или его части является единственным вариантом.

Кроме этих ретинопатии, сосудистые заболевания глаз также включают глазные неоваскуляризационные заболевания, такие как дегенерация желтого пятна и

диабетический макулярный отек (DME). Дегенерация желтого пятна в результате приводит к неоваскулярному росту хориоидных сосудов под желтым пятном.

Существуют два типа дегенерации желтого пятна: сухая и влажная. В то время как влажная дегенерация желтого пятна включает только 15% от всех дегенерации желтого
 5 пятна, почти вся влажная дегенерация желтого пятна приводит к слепоте. Кроме того, влажная дегенерация желтого пятна почти всегда является результатом сухой дегенерации желтого пятна. Как только один глаз является пораженным влажной дегенерацией желтого пятна, состояние почти всегда влияет на другой глазу. Влажная дегенерация желтого пятна часто называют возрастной влажной дегенерацией желтого
 10 пятна от влажной AMD, как это в основном встречается у пожилых людей.

Диабетическая ретинопатия (DR) и DME является ведущей причиной слепоты у населения трудоспособного возраста большинства развитых стран. Возрастающее число людей с диабетом во всем мире предполагает, что DR и DME будут по-прежнему оставаться основными причинами потери зрения и связанными функциональными
 15 нарушениями на протяжении долгих лет. Некоторые биохимические механизмы, в том числе активация протеинкиназы C- β , возросшее продуцирование сосудистых эндотелиальных факторов роста, окислительный стресс и накопление внутриклеточного сорбита и повышенных конечных продуктов гликозилирования, может способствовать сосудистым нарушениям, которые характеризуют DR/DME. Ингибирование этих путей
 20 поддерживает обязательство вмешательства для DR и DME.

Термин «легочная гипертензия» означает заболевание, при котором артериальное давление в легочной артерии является аномально высоким. В отсутствие других заболеваний сердца или легких, она называется первичной легочной гипертензией. Диффузное сужение легочных артериол происходит в результате патологического
 25 артериогенеза с последующей легочной гипертензией в ответ на повышенную устойчивость к кровотоку. Заболеваемость составляет 8 из 100'000 человек. Однако легочная гипертензия может, кроме того, возникать как осложнение хронических обструктивных заболеваний легких (ХОЗЛ), таких как эмфизема легких, хронический бронхит или диффузный интерстициальный фиброз, и у пациентов с астматической
 30 формой ХОЗЛ. Заболеваемость ХОБЛ составляет примерно 5 из 10'000 человек.

Кроме того, связывающие белки изобретения могут быть использованы для лечения воспаления и, в особенности воспалительных заболеваний.

Термин "воспаление", как используется в данном документе, означает местную реакцию на повреждение живых тканей, особенно местные реакции мелких кровеносных
 35 сосудов, их содержимое, и связанных с ними структур. Прохождение компонентов крови через стенки сосуда в ткани является признаком воспаления, и, таким образом, сформированного накопления в ткани называется экссудатом или отеком. Какой-либо вредный процесс, который повреждает живые ткани, например инфекция с бактериями, чрезмерная жара, холод, механические повреждения, такие как дробление, действие
 40 кислот, щелочей, облучения или заражения вирусами, может вызвать воспаление независимо от того, какой орган или ткань при этом участвует. Должно быть ясно, что заболевания, классифицированные как "воспалительные заболевания" и тканевые реакции, выбирая с диапазона от ожогов до пневмонии, лепры, туберкулеза и ревматоидного артрита, все являются "воспалениями".

Связывающие белки согласно изобретению могут быть использованы для лечения образования опухолей. Термин "опухоль" означает массу аномальной ткани, которая возникает без видимой причины из уже существующих клеток тела, не имеет
 45 целенаправленной функции и характеризуется тенденцией к автономному и

безудержному росту. Опухоли совершенно отличаются от воспалительных или других опухолей, потому что клетки в опухоли являются аномальными по своим внешним признакам и другим характеристикам. Аномальные клетки, то есть вид клеток, которые обычно составляют опухоли, отличаются от нормальных клеток, прошедших одно или несколько из следующих изменений: (1) гипертрофия, или увеличение размеров отдельных клеток, (2) гиперплазия, или увеличение числа клеток в данной зоне; (3) анаплазия, или регресс физических характеристик клетки к более примитивным или недифференцированного типа. Опухоли могут быть доброкачественными, например липомы, ангиомы, остеомы, хондромы и аденомы. Примерами злокачественных опухолей являются карциномы (например, опухоли молочной железы, карциномы в дыхательных путях и желудочно-кишечном тракте, эндокринных желез и мочеполовой системы), саркомы (в соединительной ткани, в том числе фиброзных тканях, жировых (жир) тканях, мышцах, кровеносных сосудах, костях и хрящах), карциносаркома (как в эпителиальной так и в соединительной ткани), лейкозы и лимфомы, опухоли нервных тканях (в том числе головного мозга), и меланомы (рака пигментных клеток кожи). Использование связывающих белков согласно представленному изобретению против опухолей также может происходить в сочетании с какой-либо другой противоопухолевой терапией, известной в данной области из уровня техники, такой как облучение, фотодинамическая терапия, химиотерапия или хирургическое вмешательство.

Фармацевтическая композиция содержит связывающие белки, как описано выше, и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или стабилизатор (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]). Подходящими носителями, наполнителями или стабилизаторами, известными квалифицированному специалисту, являются физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы, раствор Хэнка, жирные масла, этилолеат, 5% раствор декстрозы в физиологическом растворе, вещества, которые увеличивают изотоничность и химическую стабильность, буферы и консерванты. Другие подходящие носители включают какой-либо носитель, который сам по себе не вызывает продуцирование антител, вредных для индивидуума, получающего композицию, такие как белки, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот. Фармацевтическая композиция, кроме того, может представлять собой комбинированный состав, включающий дополнительный активный агент, такой как противораковый агент или анти-ангиогенный агент (например, VEGF-Axxxh человека, предпочтительно, VEGF-A165b человека).

Предпочтительная фармацевтическая композиция для лечения заболеваний глаз включает связывающие белки, как описано выше, и детергенты, такие как неионогенные детергенты, в том числе, но не ограничиваясь этим, полисорбат 20 (например, около 0,04%), буфер, такой как кислотный гистидиновый, фосфатный или молочный, и сахара, такие как сахароза или трегалоза. Предпочтительно, такая композиция содержит связывающие белки, как описано выше, и PBS. Указанные или какие-либо другие фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут вводить локально, или местно на части глаза, или вводить в глаз в виде инъекции, например, субконъюнктивально, в пери- или ретробульбарное пространство или прямо в глаз. Альтернативно, указанные или такие другие фармацевтические композиции могут вводить системно путем парентерального введения. Предпочтительно, указанная или такая другая фармацевтическая композиция применяется к глазу путем инъекций в стекловидное тело. Также предпочтительно, указанная фармацевтическая композиция наносится на глаз местно и в виде глазных капель. Глазные капли могут быть применены

к роговице (прозрачная часть в центре глаза), тем самым позволяя молекулам проникать в глаз. Для лечения заболевания, влияющего на заднюю часть глаза, наиболее желательным может быть, чтобы связывающий белок проникал в склеру, когда инъекцию вводят под конъюнктиву или по всей сфере. Введение связывающего белка может быть выполнено после предварительной стадии модуляции поверхности глаза, чтобы улучшить проникновение молекул. Предпочтительно, эпителиальный слой, такой как эпителий роговицы, модулируется путем повышения проникновения для того, чтобы обеспечить достаточное и быстрое проникновение молекул, например, как описано выше. Использование связывающих белков представленного изобретения против заболеваний глаз, кроме того, может быть в комбинации с какой-либо другой терапией, известной в данной области, такой как фотодинамическая терапия.

Препараты, которые будут использоваться для введения *in vivo*, должны быть асептическими или стерильными. Это легко достигается путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

Препараты с замедленным высвобождением могут быть получены. В одном из вариантов осуществления изобретения внутриглазной имплантат может быть использован для обеспечения связывающего белка изобретения. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие полипептид данного изобретения, где матрицы находятся в виде формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды, сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетата, разлагающиеся сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT® (микросферы для инъекций, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и лейпролидацетата), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота.

Фармацевтическая композиция может быть введена с помощью какого-либо подходящего способа, известного квалифицированному специалисту. Предпочтительным путем введения является парентеральный. При парентеральном введении лекарственное средство данного изобретения будет сформулировано в единичную дозированную инъекционную форму, такую как раствор, суспензия или эмульсия, в сочетании с фармацевтически приемлемыми наполнителями, как указано выше. Дозировка и способ введения будут зависеть от конкретного индивидуума, который подвергается лечению, и конкретного заболевания. Как правило, фармацевтическую композицию вводят так, чтобы связывающий белок представленного изобретения находился в дозе от 1 мкг/кг до 20 мг/кг, более предпочтительно от 10 мкг/кг до 5 мг/кг, наиболее предпочтительно от 0,1 до 2 мг/кг. Предпочтительно, предоставляется в виде дозы шаровидной массы. Кроме того, может быть использована непрерывная инфузия и включает непрерывную подкожную доставку посредством осмотического мининасоса. Если это так, фармацевтическая композиция может вливаться в дозе от 5 до 20 мкг/кг/мин, более предпочтительно от 7 до 15 мкг/кг/мин. В частности, фармацевтическую композицию вводят путем инъекций в глаз так, чтобы связывающий белок данного изобретения предоставлялся в дозе от 0,1 мг до 10 мг на инъекцию, более предпочтительно от 0,3 до 6 мг на инъекцию, наиболее предпочтительно от 1 мг до 4 мг на инъекцию. Кроме того, фармацевтическую композицию вводят в виде глазных капель в глаза, так что одна капля раствора содержит связывающий белок изобретения в концентрации от 10 до 120 мг/мл, более предпочтительно от 20 до 100 мг/мл, наиболее предпочтительно

от 40 до 80 мг/мл, и применяется для глаза.

В другом варианте осуществления изобретения связывающий белок, ингибирующий активность VEGF-Axxx, как описано выше, может быть использован в комбинации со связывающим белком или малой молекулой, ингибирующей активности PIGF, с тем же уровнем ингибирования PIGF, как описано выше для VEGF-Axxx. Данный вариант осуществления основан на том факте, что PIGF, как обнаружено, является ангиогенным на сайтах, где уровни VEGF-Axxx являются увеличенными. Кроме того, связывающий белок, ингибирующий активность VEGF-Axxx, как описано выше, может быть использован в комбинации со связывающим белком или малой молекулой, ингибирующей активность фактора роста производных тромбоцитов (PDGF), VEGF-C или других членов VEGF семейства белков, фактора некроза опухоли альфа (TNFalpha), дельта-лиганда, такого как 4 (Dll4), интерлейкина 6 (IL-6), нейролипина или ангиопозтина 2 (Ang2).

Кроме того, изобретение предусматривает способы лечения. В одном аспекте способ лечения ретинопатии предусматривает способ, который включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества связывающего белка изобретения, в частности связывающего белка, который ингибирует взаимодействие между VEGF-Axxx человека и VEGFR-2 человека, но не взаимодействие между VEGF-Axxx человека и VEGFR-2 человека, а также связывающего белка, который ингибирует VEGFR-2 опосредованный ангиогенез.

Кроме того, изобретение касается способов использования связывающего белка, как описано, чтобы ингибировать биологическую активность VEGF-A в клетке или чтобы ингибировать биологическую активность, опосредованную VEGFR-2. Клетка может быть расположена *in vivo* или *ex vivo*, и может быть, например, клеткой живого организма, клеткой культуры или клеткой в образце ткани. Способ может включать контактирование указанной клетки с каким-либо из VEGF-A/VEGFR-2 взаимодействия, ингибируя связывающие белки, описанные в данном документе, в количестве и в течение времени, достаточного для ингибирования такой биологической активности.

Изобретение предусматривает способ лечения субъекта, который находится в состоянии, которое реагирует на ингибирование VEGF-Axxx или VEGFR-2. Такой способ включает введение указанному субъекту эффективного количества связывающего белка, описанного в данном документе. Состояние может быть таким, которое характеризуется нарушением ангиогенеза. Состояние может быть гиперпролиферативным состоянием. Примеры состояний (или нарушений), подходящих для лечения, включают аутоиммунные расстройства, воспалительные расстройства, ретинопатии (в частности, пролиферативные ретинопатии) и рак, в частности одно из заболеваний, описанных выше. Какой-либо из связывающих белков, описанных в данном документе, может быть использован для производства лекарственного средства для лечения такого расстройства, в частности расстройства, выбранного из группы, состоящей из: аутоиммунного расстройства, воспалительного расстройства, ретинопатии и рака. Предпочтительные состояния (или нарушения), подходящие для лечения, включают первую линию метастатической почечно-клеточной карциномы, рецидив мультиформной глиобластомы, адьювантный рак толстой кишки, адьювантный HER2-негативный рак молочной железы, адьювантный HER2-положительный рак молочной железы, адьювантный немелкоклеточный рак легких, диффузную большую В-клеточную лимфому, первую линию распространенного рака желудка, первую линию HER2-отрицательного метастатического рака молочной железы, первую линию HER2-положительного метастатического рака молочной железы, первую линию

метастатического рака яичников, желудочно-кишечные стромальные опухоли, высокий карциноидный риск, гормонорезистентный рак предстательной железы, недавно диагностированную мультиформную глиобластому, метастатический рак головы и шеи, рецидив чувствительного к платине рака яичников, вторую линию метастатического рака молочной железы, обширный немелкоклеточный рак легкого, неплоскоклеточный, немелкоклеточный рак легкого с ранее лечеными ЦНС метастазами и рецидивная множественная миелома, рак предстательной железы, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), колоректальный рак и рак поджелудочной железы, прогрессирующий рак яичника (AOC), AOC пациенты с симптомами злокачественной асцита и не-ходжки некая лимфома.

Рекомбинантный связывающий белок согласно изобретению может быть получен и/или в дальнейшем усовершенствован с помощью ряда методов, таких как дисплей на поверхности бактериофагов (WO 90/02809, WO 07/006665) или бактериальных клеток (WO 93/10214), рибосомный дисплей (WO 98/48008), отображение на плазмиды (WO 93/08278) или путем использования гибридных конструкций ковалентного РНК-повторяющегося белка (WO 00/32823), или внутриклеточная экспрессия и отбор/скрининг, например, путем анализа комплементации белка (WO 98/341120). Такие методы известны квалифицированному специалисту в данной области из уровня техники.

Библиотека анкириновых повторяющихся белков, использованная для отбора/скрининга рекомбинантного связывающего белка в соответствии с изобретением, может быть получена в соответствии с протоколами, известными квалифицированному специалисту в данной области из уровня техники (WO 02/020565, Binz, H.K. et al., JMB, 332, 489-503, 2003, and Binz et al., 2004, цит. месте). Использование такой библиотеки для отбора VEGF-Axxx конкретных DARPin приведены в примере 1. По аналогии, анкириновые повторяющиеся мотивы последовательности, как представлено выше, могут использоваться для создания библиотек анкириновых повторяющихся белков, которые могут быть использованы для отбора или скрининга VEGF-Axxx специфических DARPin. Кроме того, повторяющиеся домены представленного изобретения могут быть модульно собраны из повторяющихся модулей, в соответствии с настоящим изобретением, и соответствующих кэппирующих модулей (Forrer, P., et al., FEBS letters 539, 2-6, 2003) с использованием стандартных технологий рекомбинантных ДНК (например, WO 02/020565, Binz et al., 2003, цит. месте и Binz et al., 2004, цит.месте).

Изобретение не ограничивается конкретным вариантам осуществления, описанным в примерах. Другие источники могут быть использованы и обработаны, описанные далее ниже в общих чертах.

Примеры

Все исходные вещества и реагенты, описанные ниже, известны квалифицированному специалисту в данной области и являются коммерчески доступными или могут быть получены с использованием хорошо известных методов.

Материалы

Химические вещества были приобретены у компании Fluka (Швейцария). Олигонуклеотиды были от компании Microsynth (Швейцария). Если не указано другое, ДНК-полимеразы, ферменты рестрикции и буферы были от компании New England Biolabs (США) или Fermentas (Литва). Штаммом для клонирования и продуцирования белка был E. coli XL I-Blue (Stratagene, США). VEGF варианты были от компании R & D Systems (Minneapolis, США) или были продуцированы в клетках яичника китайского хомячка или в Pichia pastoris и очищали в соответствии со стандартными протоколами (Rennel, E.S. et al., European J. Cancer 44, 1883-94, 2008; Pichia экспрессионная система от

Invitrogen). Биотинилированные варианты VEGF были получены химически посредством связывания фрагмента биотина с первичными аминами очищенных VEGF вариантов с использованием стандартных реагентов и способов биотинилирования (Pierce, США).

Молекулярная биология

Если не указано иное, способы осуществляют в соответствии с описанными протоколами (Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory 1989, New York).

Библиотеки сконструированного анкиринового повторяющегося белка

Библиотеки N2C и N3C сконструированных анкириновых повторяющихся белков описаны (WO 02/20565; Binz et al. 2003, цит. мест.; Binz et al. 2004, цит. Мест.). Цифра в N2C и N3C описывает число рандомизированных повторяющихся модулей, присутствующих между N-терминальным и C-терминальным кэспирующими модулями. Номенклатура, используемая для определения положений внутри повторяющихся единиц и модулей, основана на Binz et al. 2004, цит. Мест., с тем отличием, что границы повторяющихся модулей и повторяющихся единиц сдвинуты на одно положение аминокислоты. Например, положение 1 повторяющегося модуля Binz et al. 2004 (цит. мест.) соответствует положению 2 повторяющегося модуля представленного раскрытия и, следовательно, положение 33 повторяющегося модуля Binz et al. 2004 (цит. мест.) соответствует положению 1 следующего повторяющегося модуля представленного изобретения.

Все последовательности ДНК были подтверждены путем секвенирования, и рассчитанная молекулярная масса всех описанных белков была подтверждена методом масс-спектрометрии.

Пример 1: Выбор связывающих белков, содержащих повторяющиеся домены со специфичностью связывания VEGF-Axxx

Используя рибосомный дисплей (Hanes, J. and Pluckthun, A., *PNAS* 94, 4937-42, 1997), многие сконструированные анкириновые повторяющиеся белки (DARPin) со специфичностью связывания VEGF-Axxx были отобраны из N2C или N3C DARPin библиотек, описанных Binz et al. 2004 (цит. мест.). Связывание выбранных клонов со специфическими (VEGF-Axxx) и неспецифическими (MBP, *E. coli* мальтозный связывающий белок) мишенями оценивали путем сырой экстракции ИФА, который показывает, что VEGF-Axxx связывающие белки были успешно выбраны (ФИГ. 1). Повторяющиеся домены SEQ ID NO: от 1 до 7 представляют собой аминокислотные последовательности выбранных связывающих белков, содержащих повторяющиеся домены со специфичностью связывания VEGF-Axxx. Анализ последовательности выбранных связывающих показал специфические анкириновые повторяющиеся мотивы последовательности, присущие определенным выбранным семействам связывающих.

Выбор VEGF-Axxx специфических анкириновых повторяющихся белков путем рибосомного дисплея

Отбор VEGF-Axxx специфических анкириновых повторяющихся белков выполняли путем рибосомного дисплея (Hanes and Pluckthun, цит. мест.), используя VEGF-A164 собаки или VEGF-A165 человека в качестве белков-мишеней, библиотеку сконструированных анкириновых повторяющихся белков, как описано (WO 02/020565, Binz et al., 2003, цит. мест. и Binz et al., 2004, цит. мест.) и установленных протоколах (Zahnd, C., Amstutz, P. and Pluckthun, A., *Nat. Methods* 4, 69-79, 2007). Циклы отбора путем рибосомного дисплея проводили на вариантах VEGF собаки или человека (в том числе биотинилированных вариантах, иммобилизованных на нейтравидин или стрептавидин) как с N2C, так и N3C DARPin библиотеками с использованием установленных

протоколов (Binz et al., 2004, цит. мест.). Число обратных циклов транскрипции (RT)-PCR после каждого отборочного цикла постоянно сокращалось с 40 до 30, регулируя выход, в результате увеличения связующих. Четыре начальных цикла отбора VEGF собаки дали пулы наномодярной аффинности DARPins, как показано посредством ИФА и SPR измерений единичных клонов. Чтобы найти DARPins с дополнительно улучшенными аффинностями, дополнительные отборы по скорости диссоциации проводили на биотинилированных VEGF человека или собаки, иммобилизованных на нейтравидине или стрептавидине, беря пулы, после второго и третьего начальных циклов отбора рибосомного дисплея, с последующим циклом отбора по скорости диссоциации на VEGF человека.

Выбранные клоны специфически связываются с VEGF-Axxx, как показано, путем сырого экстрактного ИФА

Конкретно выбранный DARPins специфически связывающие VEGF-Axxx были определены путем иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием сырых экстрактов *Escherichia coli* DARPins экспрессии клеток с использованием стандартных протоколов. Выбранные клоны были клонированы в pQE30 (Qiagen) векторе экспрессии, трансформированы в *E. coli* XL1-Blue (Stratagene), а затем выращены в течение ночи при 37°C в 96-глубоко-луночном планшете (каждый клон в одной лунке), содержащим 1 мл питательной среды (2YT, содержащий 1% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина). 1 мл свежего 2YT, содержащего 50 мкг/мл ампициллина инокулировали со 100 мкл ночной культуры в свежем 96-глубоко-луночном планшете. После инкубации в течение 2 часов при 37°C, экспрессию индуцировали IPTG (1 мМ конечной концентрации) и продолжалась в течение 3 часов. Клетки собирали, снова суспендировали в 100 мкл B-PERII (Pierce) и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре при встряхивании. Затем добавляли 900 мкл PBS-ТБ (PBS дополнен 0,2% BSA, 0,1% твин 20, pH 7,4), и клеточный детрит удаляли центрифугированием. 100 мкл каждого лизированного клона применяли к лунке с нейтравидином, покрытой пластинкой MaxiSorp, содержащей или VEGF-Axxx вариант, или несвязанные MBP, иммобилизованные посредством их биотинового фрагмента, и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После тщательной промывки PBS-Т (PBS дополнен с 0,1% твин-20, pH 7,4) пластина была проявлена с использованием стандартных процедур ИФА с использованием моноклонального анти-RGS(His)₄ антитела (34650, Qiagen), как первичного антитела, и поликлонального антимышиного антитела козы, конъюгированного с щелочной фосфатазой (A3562, Sigma), как вторичного реагента. Потом, путем использования динатрия 4-нитрофенилфосфат (4NPP, Fluka) в качестве субстрата для щелочной фосфатазы, обнаруживали связывание. Проявление цвета измеряли на 405 нм. Результаты примера сырого экстрактного ИФА, использованные для идентификации DARPins связывания с VEGF-Axxx, представлены на ФИГ. 1. Скрининг несколько сотен клонов посредством такого сырого клеточно-экстрактного ИФА; показано больше чем сотня различных DARPins со специфичностью к VEGF-Axxx. Данные связывающие белки были отобраны для дальнейшего анализа. Примеры аминокислотных последовательностей выбранных анкириновых повторяющихся доменов, которые специфически связываются с VEGF-Axxx, представлены в SEQ ID NO: от 1 до 7.

Выведение повторяющихся мотивов последовательности из выбранных повторяющихся доменов со специфичностью связывания VEGF-Axxx

Аминокислотные последовательности выбранных повторяющихся доменов со специфичностью связывания VEGF-Axxx были дополнительно проанализированы с

помощью инструментальных способов анализа последовательности, известных практикующему специалисту в данной области (WO 02/020565; Forrer et al., 2003, цит. мест.; Forrer, P., Binz, H.K., Stumpp, M.T. and Plückthun, A., ChemBioChem, 5(2), 183-189, 2004). Тем не менее, в отличие от WO 02/020565, где встречающиеся в природе

повторяющиеся мотивы были использованы для выведения повторяющихся мотивов последовательности, в данном документе повторяющиеся мотивы последовательности были выведены из повторяющихся единиц выбранных повторяющихся доменов со специфичностью связывания VEGF-Axxx. В связи с этим были определены семейства выбранных повторяющихся доменов, содержащие общий повторяющийся мотив последовательности.

Высокий уровень и растворимая экспрессия DARPins

Для дальнейшего анализа отобранные клоны, демонстрирующие специфическое связывание VEGF-Axxx в сыром клеточном экстракте ИФА, как описано выше, были экспрессированы в клетках E. coli XL1-blue и очищены, используя свои His-метки с помощью стандартных протоколов. 25 мл простоявших на протяжении ночи культур (LB, 1% глюкозы, 100 мг/л ампициллина, 37°C) использовали для инокуляции 1 л культуры (такой же среды). При A (600) = 0,7, культуры были индуцированы 0,5 mM IPTG и инкубировали при 37°C в течение 4 часов. Культуры центрифугировали, и полученные в результате пеллеты снова суспендировали в 40 мл TBS500 (50 mM Трис-HCl, 500 mM NaCl, pH 8) и подвергали действию ультразвука. Лизат снова центрифугировали, и добавляли глицерин (10% (об./об.), конечная концентрация) и имидазол (конечной концентрации 20 mM) к полученному в результате супернатанту. Белки очищали на колонке с Ni-нитрилотриуксусной кислотой (объем колонки 2,5 мл) в соответствии с инструкциями производителя (Qiagen, Германия). До 200 мг хорошо растворимого DARPins со специфичностью связывания с VEGF-Axxx могло быть очищено из одного литра культуры E. coli с чистотой >95%, как установлено из SDS-15% PAGE. Такие очищенные DARPins используют для дальнейшей характеристики.

Пример 2: Определение значений IC₅₀, выбранных DARPins со специфичностью связывания с VEGF-Axxx в анализе прорастания сфероидов

Добавление VEGF-Axxx к HUVEC сфероидов, встроенным в коллагеновые матрицы, приводит к прорастанию сфероидов. Добавление ингибитора VEGF-Axxx будет блокировать формирование отростков, которое может быть статистически количественно определено по количеству и длине отростков. При добавлении различных концентраций ингибитора и постоянного количества VEGF может быть определено IC₅₀.

Ингибирование прорастания сфероидов посредством VEGF-Axxx специфического DARPins

Анализ прорастания сфероидов выполняли в соответствии со стандартными протоколами (Korff et al., цит. мест.). DARPins со специфичностью к VEGF-Axxx были отобраны и очищены до >96% чистоты, как описано в примере 1. В клетках пупочной вены человека выращивали культуру до слияния в монослой. После трипсинизации суспензию клеток помещали в висющую каплю, чтобы сформировать сфериды, то есть примерно 500 организованных агрегированных HUVECs. Сфериды были встроены в коллагеновую матрицу и стимулированы VEGF-A165, чтобы инициировать прорастание отростков. Ингибиторы прорастания дополнительно добавляли, чтобы наблюдать их воздействие на ингибирование прорастания. Количество отростков на сфероид и длины отростков были количественно определены, используя графическое программное обеспечение.

Результаты двух примеров анализов прорастания сфероидов представлены на ФИГ.2а (DARPin #30 со специфичностью связывания VEGF-Axxx) и ФИГ.2b (DARPin NC, отрицательный контроль DARPin без специфичности связывания VEGF-Axxx; например, DARPin E3_5 (Binz et al., 2005, цит. мест.)). Наиболее эффективные DARPins в данном анализе показали значения IC_{50} в диапазоне от 10 до 50 пМ, в то время как Авастин®, Луцетис® и Макуген® показали значения IC_{50} в параллельных экспериментах в диапазоне от 150 до 500 пМ.

Пример 3: Определение специфики мишени DARPin #27 по сравнению с Авастином® с помощью анализа поверхностного плазменного резонанса

VEGF-A164 собаки или VEGF-A164b собаки были иммобилизованы в проточной ячейке, и было проанализировано взаимодействие DARPin #27 (повторяющийся домен SEQ ID NO:1, соответствующий аминокислотам от 1 до 159) и Авастина® с иммобилизованными мишенями

Анализ поверхностного плазменного резонанса (SPR)

SPR измеряли, используя прибор ProteOn (BioRad). Подвижный буфер представлял собой 20 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl и 0,005% Твин 20. Около 1200 условных единиц VEGF-A164 собаки или VEGF-A164b собаки были иммобилизованы на чипе GLC (BioRad). Взаимодействия измеряли при скорости потока от 60 мкл/мин с 5 мин потоком буфера, 100 секунд инъекционного введения Авастина® или DARPin #27 в концентрации 250 нМ и измерения скорости диссоциации несколько минут с буфером потока. Сигнал, не покрытый ячейкой сравнения вычитается из измерений.

Результаты показаны на ФИГ. 3а (взаимодействие Авастина с VEGF-A164 собаки), ФИГ.3b (взаимодействие Авастина с VEGF-A164b собаки), ФИГ.3с (взаимодействие DARPin #27 с VEGF-A164 собаки) и ФИГ.3d (взаимодействие DARPin #27 с VEGF-A164b собаки). В то время как Авастин четко взаимодействует как с иммобилизованными VEGF изоформами, DARPin #27 показывает только взаимодействие с VEGF-A164, а не с VEGF-A164b.

Пример 4: In vivo эффективность DARPin #30 в ингибировании VEGF-A165 пропотевания жидкости через сосуды в модели на кролике.

Пегилированный DARPin #30 (повторяющийся домен SEQ ID NO:4, соответствующий аминокислотам от 1 до 126) или Луцетис® применяют путем инъекции в стекловидное тело в глаз кролика, чтобы проверить их эффективность для ингибирования пропотевания жидкости через сосуды, индуцированного путем последующей интравитреальной инъекции VEGF-A165 человека.

Измерения ингибирования пропотевания жидкости через сосуды у кроликов В 1-й день какой-либо из PBS, ПЭГилированного DARPin #30 (125 мкг) или эквимоллярного количества Луцетиса® (162 мкг) применяют в виде инъекции в стекловидное тело в один глаз каждого кролика (обработанный глаз). На 4-й день и 30 день в стекловидное тело обработанного глаза каждого кролика была введена инъекция 500 нг VEGF-A165 человека. Оба глаза всех животных оценивали через 48 часов после инъекции VEGF-A165 путем измерения содержания флуоресцеина во всех глазах через 1 час после внутривенного инъекционного введения флуоресцеина натрия (50 мг/кг массы тела животного, 10% (вес/объем) в 0,9% (вес/объем) солевом растворе). Соотношение количества флуоресценции в обработанных и необработанных глазах были рассчитаны для каждого животного. Соотношение, равное единице, соответствует отсутствию дополнительной утечки флуоресценции в обработанном глазу, соотношение больше единицы указывает на большую утечку флуоресценции в обработанном глазу, чем в необработанном контрольном глазу.

Получение ПЭГирированного DARPin

ПЭГирирование белка за счет использования одного Cys остатка и малеимидной химии хорошо известно квалифицированному специалисту в данной области из уровня техники и может быть выполнено в соответствии с установленными протоколами (например, от Pierce). DARPin #30, содержащий дополнительный С-терминальный линкер (GGGSGGGSC, SEQ ID NO:8) очищали почти до однородности с использованием стандартных хроматографических методов. Этот белок полностью восстанавливают, используя ДТТ, и очищают с помощью гель-фильтрации для удаления ДТТ, и заменяют буфер PBS. ПЭГ-малеимид (метокси-поли(этиленгликоль) оксипропиламинопропилмалеимид; NOF, № Sunbright ME-200MA), растворенный в PBS смешивают с DARPin в PBS при около 15% молярном избытке ПЭГ-малеимида в течение 2-4 часов при комнатной температуре. ПЭГирированный DARPin затем отделяют от нереакционно-способного DARPin и нереакционно-способных фрагментов ПЭГ путем использования стандартной анионообменной хроматографии.

Результаты показаны на ФИГ.4. Как ПЭГирированный DARPin #30, так и Луцетис® были способны защитить глаза кролика от VEGF-A165 индуцированного пропотевания жидкости через сосуды через 4 дня после того, как их применяли путем инъекций в стекловидное тело. Тем не менее, только ПЭГирированный DARPin #30, а не Луцетис®, был способен защищать глаза кролика от VEGF-A165 индуцированного пропотевания жидкости через сосуды вплоть до 30 дней после инъекции в стекловидное тело.

В других экспериментах терминальный полураспад различных связывающих белков изобретения в стекловидном теле был измерен после инъекций в стекловидное тело глаз кроликов. DARPin #30, содержащий дополнительный С-терминальный линкер (GGGSGGGSC, SEQ ID NO:8), был конъюгирован с 20 кДа и 40 кДа небелковым ПЭГ фрагментом, используя соответствующие ПЭГ малеимиды от NOF (смотри Пример 5). Определено, что терминальный полураспад составлял 3,5 дня (+/-0,3 дня), 6,1 дней (+/-1,0 день) и 5,4 дней (+/-0,8 дней) для DARPin #30, DARPin #30, конъюгированные с 20 кДа фрагментом ПЭГ, и DARPin #30, конъюгированные с 40 кДа фрагментом ПЭГ. Удивительно, увеличение молекулярной массы небелкового фрагмента ПЭГ от 20 кДа до 40 кДа в результате не приводило к увеличению терминального полураспада. Такая же тенденция наблюдалась в соответствующих экспериментах, в которых использовали связывающие белки, содержащие повторяющийся домен SEQ ID NO:1 (аминокислоты от 1 до 159) или SEQ ID NO:3 (аминокислоты 1 до 126), вместо повторяющегося домена SEQ ID NO:4.

Пример 5: Рекомбинантные связывающие белки

Примерами рекомбинантных связывающих белков, содержащих повторяющиеся домены связывающего VEGF-Axxx и белковый полимерный фрагмент, являются SEQ ID NO:1 и 4. Повторяющийся домен SEQ ID NO:1 соответствует аминокислотам с 1 по 159 и белковый полимерный фрагмент SEQ ID NO:1 соответствует аминокислотам от 160 до 1'024. Повторяющийся домен SEQ ID NO:4 соответствует аминокислотам от 1 до 126, и белковый полимерный фрагмент SEQ ID NO:4 соответствует аминокислотам с 127 до 536.

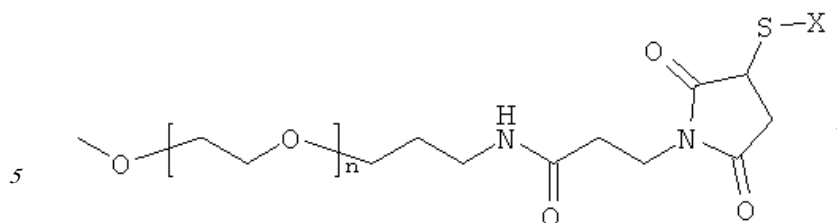
Связывающие белки SEQ ID NO:1 и 4 были экспрессированы в цитоплазме Escherichia coli, используя стандартные методики, известные квалифицированному специалисту в данной области из уровня техники (смотри, например, pQE система экспрессии от Qiagen (Германия)). Met остаток, дополнительно закодированный с помощью вектора экспрессии, эффективно отщеплялся в цитоплазме E. coli из экспрессированного полипептида с самого начала Met сопровождается небольшим Gly остатком (то есть

аминокислота в положении 1 SEQ ID NO:1 и 4). Клетки лизировали (например, путем использования французского пресса) и связывающие белки очищали почти до однородности из сырого экстракта клеток путем использования стандартных хроматографических методов, известных квалифицированному специалисту в данной области из уровня техники.

Примеры рекомбинантных связывающих белков, содержащие один повторяющийся домен, связывающий VEGF-Axxx, и один небелковый полимерный фрагмент, были получены, используя повторяющиеся белки SEQ ID No:2, 3, 5, 6 и 7. Эти повторяющиеся белки содержат N-терминальный повторяющийся домен с последующим полипептидным линкером и C-терминальным Cys. Соответствующие повторяющиеся домены соответствуют аминокислотам от 1 до 159 для SEQ ID NO:2 и 7, и аминокислотам от 1 до 126 для SEQ ID NO: от 3 до 6. Повторяющиеся белки SEQ ID NO:2, 3, 5, 6 и 7 были экспрессированы в цитоплазме *Escherichia coli*, используя стандартные методики, известные квалифицированному специалисту в данной области из уровня техники (смотри, например, Expressionist от Qiagen (Германия)). Met остаток, дополнительно кодированный с помощью вектора экспрессии, эффективно отщепляется в цитоплазме *E. coli* от экспрессированного полипептида, с самого начала Met сопровождается небольшим остатком Gly (то есть аминокислота в положении 1 SEQ ID NO:2, 3, 5, 6 и 7). Клетки лизировали (например, путем использования французского пресса) и связывающие белки очищали до почти однородности из сырого экстракта клеток путем использования стандартных хроматографических методов, известных квалифицированному специалисту в данной области из уровня техники.

Очищенные повторяющиеся белки, содержащие один Cys остаток, потом были конъюгированы с небелковым полимерным фрагментом, используя стандартную малеимидную химию, как описано в примере 4. Таким образом, были получены связывающий белок изобретения, содержащий повторяющийся белок SEQ ID NO:2 и 40 кДа небелковый ПЭГ фрагмент (например, 40 кДа малеимид-ПЭГ-(α -[3-(3-малеимидо-1-оксопропил)амино]пропил- ω -метоксиполиоксиэтилен) от NOF, продукт № Sunbright ME-400 MA), повторяющийся белок SEQ ID NO:3 и 20 кДа небелковый ПЭГ фрагмент (например, 20 кДа малеимид-ПЭГ-(α -[3-(3-малеимидо-1-оксопропил)амино]пропил- ω -метоксиполиоксиэтилен) от NOF, продукт № Sunbright ME-200 MA), повторяющийся белок SEQ ID NO:5 и 12 кДа небелковый ПЭГ фрагмент (например, 12 кДа малеимид-ПЭГ-(α -[3-(3-малеимидо-1-оксопропил)амино]пропил- ω -метоксиполиоксиэтилен) от NOF, продукт № Sunbright ME-120 MA), повторяющийся белок SEQ ID NO:6 и 5 кДа небелковый ПЭГ фрагмент (например, 5 кДа малеимид-ПЭГ-(α -[3-(3-малеимидо-1-оксопропил)амино]пропил- ω -метоксиполиоксиэтилен) от NOF, продукт № Sunbright ME-050MA) и повторяющийся белок SEQ ID NO:7 и 2 кДа небелковый ПЭГ фрагмент (например, 2 кДа малеимид-ПЭГ-(α -[3-(3-малеимидо-1-оксопропил)амино]пропил- ω -метоксиполиоксиэтилен) от NOF, продукт № Sunbright ME-020MA). ПЭГилированные повторяющиеся белки затем были отделены от непегилированных повторяющихся белков и избытка ПЭГ стандартными хроматографическими методами, известными квалифицированному специалисту в данной области из уровня техники.

Таким образом, SEQ ID NO:2, 3, 5, 6 и 7 были сопряженными с тиолом их C-терминального цистеина к малеимиду ПЭГ (α -[3-(3-малеимидо-1-оксопропил)амино]пропил- ω -метоксиполиоксиэтилен). Следующая структура была, таким образом, получена:



в которой

X представляет собой SEQ ID NO:2, 3, 5, 6 или 7, и n является положительным целым числом.

10

Формула изобретения

1. Рекомбинантный связывающий белок для специфического связывания с VEGF-A165, где указанный связывающий белок включает анкириновый повторяющийся домен и полиэтиленгликолевый фрагмент, где указанный анкириновый повторяющийся домен связывает VEGF-A165 и ингибирует связывание VEGF-A165 с VEGFR-2, где указанный анкириновый повторяющийся домен включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из аминокислот 1-159 SEQ ID NO: 1, аминокислот 1-159 SEQ ID NO: 2, аминокислот 1-126 SEQ ID NO: 3, аминокислот 1-126 SEQ ID NO: 4, аминокислот 1-126 SEQ ID NO: 5, аминокислот 1-126 SEQ ID NO: 6 и аминокислот 1-159 SEQ ID NO: 7 и где указанный полиэтиленгликолевый фрагмент имеет молекулярную массу от приблизительно 2 кДа до приблизительно 40 кДа.

2. Связывающий белок по п. 1, в котором N-терминальный кэспирующий модуль указанного анкиринового повторяющегося домена содержит Asp остаток в положении 5.

3. Связывающий белок по любому из п. 1 или 2, в котором указанный анкириновый повторяющийся домен конъюгирован на своем С-конце посредством пептидной связи с полипептидным линкером и С-терминальным Cys остатком, в котором тиол указанного С-терминального Cys остатка конъюгирован с указанным полиэтиленгликолевым фрагментом, где указанный полиэтиленгликолевый фрагмент является малеимид-связанным полиэтиленгликолем.

4. Связывающий белок по п. 3, в котором указанный малеимид-связанный полиэтиленгликоль представляет собой α -[3-(3-малеимидо-1-оксипропил)амино]пропил- ω -метоксиполиоксиэтилен.

5. Связывающий белок по п. 1, где указанный связывающий белок является анкириновым повторяющимся белком, выбранным из группы, состоящей из анкириновых повторяющихся белков SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 или 7.

6. Связывающий белок по любому из пп. 3-5, где указанный полиэтиленгликолевый фрагмент имеет молекулярную массу около 20 кДа.

7. Связывающий белок по п. 1, содержащий анкириновый повторяющийся белок SEQ ID NO: 3, в котором тиол С-терминального Cys остатка указанного анкиринового повторяющегося белка конъюгирован с указанным полиэтиленгликолевым фрагментом, где указанный полиэтиленгликолевый фрагмент является малеимид-связанным полиэтиленгликолем.

8. Связывающий белок по п. 7, в котором указанный малеимид-связанный полиэтиленгликоль представляет собой α -[3-(3-малеимидо-1-оксипропил)амино]пропил- ω -метоксиполиоксиэтилен и в котором полиэтиленгликолевый фрагмент имеет молекулярную массу по меньшей мере 10 кДа.

9. Фармацевтическая композиция для лечения патологического ангиогенеза,

содержащая эффективное количество связывающего белка по любому из пп. 1-8 и необязательно фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель.

10. Фармацевтическая композиция по п. 9 для применения в лечении глазных заболеваний.

5 11. Фармацевтическая композиция по п. 9 для применения в лечении глазных заболеваний путем инъекционного введения в стекловидное тело.

12. Способ лечения патологического ангиогенеза у млекопитающих, в том числе человека, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества связывающего белка по любому из пп. 1-8.

10 13. Рекомбинантный связывающий белок для специфического связывания с VEGF-A165, где указанный связывающий белок включает анкириновый повторяющийся домен, включающий аминокислоты 1-126 SEQ ID NO: 3 и полиэтиленгликолевый фрагмент, где указанный анкириновый повторяющийся домен связывает VEGF-A165 и ингибирует связывание VEGF-A165 с VEGFR-2, где указанный полиэтиленгликолевый
15 фрагмент имеет молекулярную массу от 2 кДа до 40 кДа, в котором указанный анкириновый повторяющийся домен конъюгирован на своем С-конце посредством пептидной связи с полипептидным линкером, имеющим С-терминальный Cys остаток, в котором указанный полипептидный линкер конъюгирован на тиоле указанного С-терминального Cys остатка с указанным полиэтиленгликолевым фрагментом, где
20 указанный полиэтиленгликолевый фрагмент является малеимид-связанным полиэтиленгликолем и где указанный малеимид-связанный полиэтиленгликоль представляет собой α -[3-(3-малеимидо-1-оксопропил)амино]пропил- ω -метоксиполиоксиэтилен.

25 14. Рекомбинантный связывающий белок по п. 13, где указанный полипептидный линкер включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

15. Фармацевтическая композиция для лечения патологического ангиогенеза, содержащая эффективное количество связывающего белка по п. 14 и необязательно фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель.

30 16. Фармацевтическая композиция по п. 15 для применения в лечении глазных заболеваний.

17. Фармацевтическая композиция по п. 15 для применения в лечении глазных заболеваний путем инъекционного введения в стекловидное тело.

18. Способ лечения патологического ангиогенеза, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества связывающего белка по п. 14.

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> МОЛЕКУЛЯР ПАРТНЕРС АГ
 <120> МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, ИНГИБИРУЮЩИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ VEGF-A РЕЦЕПТОРА
 <130> P384A
 <150> EP10161685.2
 <151> 2010-04-30
 <160> 9
 <170> PatentIn версия 3.5
 <210> 1
 <211> 1025
 <212> PRT
 <213> Искусственный
 <220>
 <223> Анкириновый повторяющийся белок
 <400> 1
 Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15
 Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30
 Phe Asp Trp Met Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala His Glu Gly
 35 40 45
 His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60
 Ala Thr Asp Val Ser Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Asp
 65 70 75 80
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val
 85 90 95
 Asn Thr Lys Asp Asn Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ser Ala Asp
 100 105 110
 Leu Gly Arg Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp
 115 120 125
 Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile
 130 135 140
 Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Ser
 145 150 155 160
 Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu
 165 170 175
 Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
 180 185 190

Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
 195 200 205
 Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
 210 215 220
 Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
 225 230 235 240
 Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
 245 250 255
 Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala
 260 265 270
 Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
 275 280 285
 Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
 290 295 300
 Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala
 305 310 315 320
 Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
 325 330 335
 Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
 340 345 350
 Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr
 355 360 365
 Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
 370 375 380
 Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
 385 390 395 400
 Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
 405 410 415
 Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
 420 425 430
 Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
 435 440 445
 Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu
 450 455 460
 Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly
 465 470 475 480
 Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
 485 490 495
 Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
 500 505 510

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
 515 520 525
 Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
 530 535 540
 Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
 545 550 555 560
 Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
 565 570 575
 Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
 580 585 590
 Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
 595 600 605
 Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
 610 615 620
 Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
 625 630 635 640
 Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr
 645 650 655
 Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
 660 665 670
 Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
 675 680 685
 Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala
 690 695 700
 Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
 705 710 715 720
 Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
 725 730 735
 Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
 740 745 750
 Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
 755 760 765
 Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
 770 775 780
 Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr
 785 790 795 800
 Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
 805 810 815
 Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
 820 825 830
 Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu

835 840 845
 Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
 850 855 860
 Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
 865 870 875 880
 Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu
 885 890 895
 Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
 900 905 910
 Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
 915 920 925
 Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro
 930 935 940
 Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
 945 950 955 960
 Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
 965 970 975
 Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro
 980 985 990
 Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
 995 1000 1005
 Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala
 1010 1015 1020
 Pro Gly
 1025
 <210> 2
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Искусственный
 <220>
 <223> Анкириновый повторяющийся белок
 <400> 2
 Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15
 Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30
 Phe Asp Trp Met Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala His Glu Gly
 35 40 45
 His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60
 Ala Thr Asp Val Ser Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Asp

<210>	3
<211>	135
<212>	PRT
<213>	Искусственный
<220>	
<223>	Анкириновый повторяющийся белок
<400>	3

Gly 1	Ser	Asp	Leu	Asp 5	Lys	Lys	Leu	Leu	Glu 10	Ala	Ala	Arg	Ala	Gly 15	Gln
Asp	Asp	Glu	Val 20	Arg	Ile	Leu	Met 25	Ala	Asn	Gly	Ala	Asp	Val 30	Asn	Ala
Arg	Asp	Ser 35	Thr	Gly	Trp	Thr	Pro 40	Leu	His	Leu	Ala	Ala 45	Pro	Trp	Gly
His 50	Pro	Glu	Ile	Val	Glu 55	Val	Leu	Leu	Lys	Asn	Gly 60	Ala	Asp	Val	Asn
Ala 65	Ala	Asp	Phe	Gln	Gly 70	Trp	Thr	Pro	Leu	His 75	Leu	Ala	Ala	Ala	Val 80
Gly	His	Leu	Glu 85	Ile	Val	Glu	Val	Leu	Leu 90	Lys	Tyr	Gly	Ala 95	Asp	Val
Asn	Ala	Gln 100	Asp	Lys	Phe	Gly	Lys	Thr 105	Ala	Phe	Asp	Ile	Ser 110	Ile	Asp
Asn	Gly 115	Asn	Glu	Asp	Leu	Ala	Glu 120	Ile	Leu	Gln	Lys	Ala 125	Ala	Gly	Gly
Gly 130	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser 135	Cys									

<210>	4
<211>	540
<212>	PRT
<213>	Искусственный

<220>

<223> Анкириновый повторяющийся белок

<400> 4

Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15
 Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Thr
 20 25 30
 Ala Asp Ser Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Val Pro Trp Gly
 35 40 45
 His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60
 Ala Lys Asp Phe Gln Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Ile
 65 70 75 80
 Gly His Gln Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val
 85 90 95
 Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp
 100 105 110
 Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser
 115 120 125
 Gly Ser Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro
 130 135 140
 Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser
 145 150 155 160
 Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro
 165 170 175
 Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser
 180 185 190
 Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala
 195 200 205
 Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro
 210 215 220
 Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser
 225 230 235 240
 Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro
 245 250 255
 Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser
 260 265 270
 Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala
 275 280 285
 Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro

290 295 300
 Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser
 305 310 315 320
 Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser
 340 345 350
 Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala
 355 360 365
 Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro
 370 375 380
 Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser
 385 390 395 400
 Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro
 405 410 415
 Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser
 420 425 430
 Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala
 435 440 445
 Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro
 450 455 460
 Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser
 465 470 475 480
 Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro
 485 490 495
 Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser
 500 505 510
 Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala
 515 520 525
 Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser
 530 535 540

<210> 5

<211> 135

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Анкириновый повторяющийся белок

<400> 5

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

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asp Gly Ala Asp Val Asn Ala

<210>	6
<211>	130
<212>	PRT
<213>	Искусственный
<220>	
<223>	Анкириновый повторяющийся белок
<400>	6

[illegible]

<211> 168
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> Анкириновый повторяющийся белок

<400> 7

```
Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
1          5          10          15
Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
20          25          30
Val Asp Tyr Ile Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Tyr Gly
35          40          45
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Ser Ala Asp Val Asn
50          55          60
Ala Glu Asp Phe Ala Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ser Asn
65          70          75          80
Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val
85          90          95
Asn Thr Lys Asp Asn Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ser Ala Asp
100         105         110
Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp
115         120         125
Val Asn Thr Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile
130         135         140
Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Gly
145         150         155         160
Ser Pro Ser Thr Ala Asp Gly Cys
165
```

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> Полипептидный линкер

<400> 8

```
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Cys
1          5
```

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>

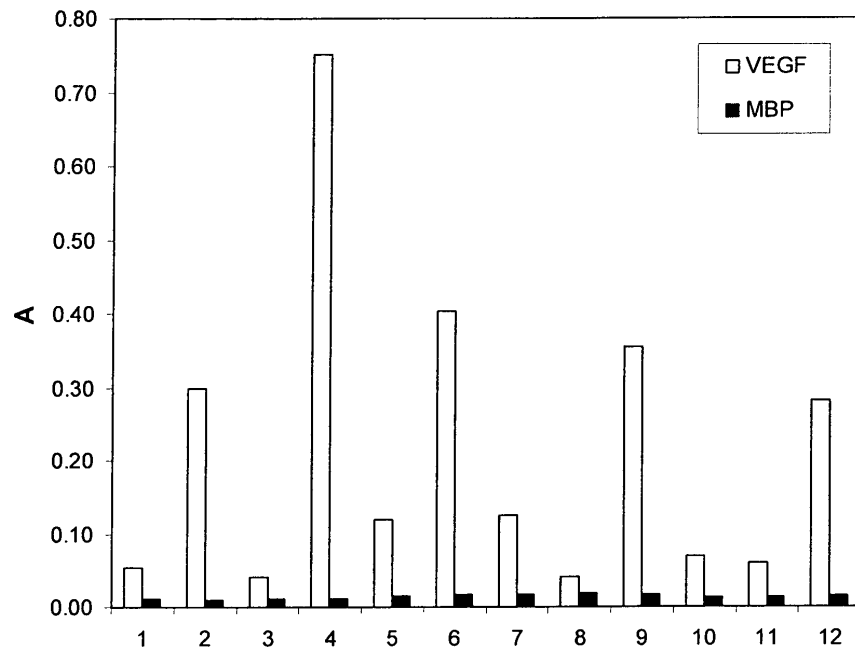
<223> Полипептидный линкер

<400> 9

Gly Ser Pro Ser Thr Ala Asp Gly Cys
1 5

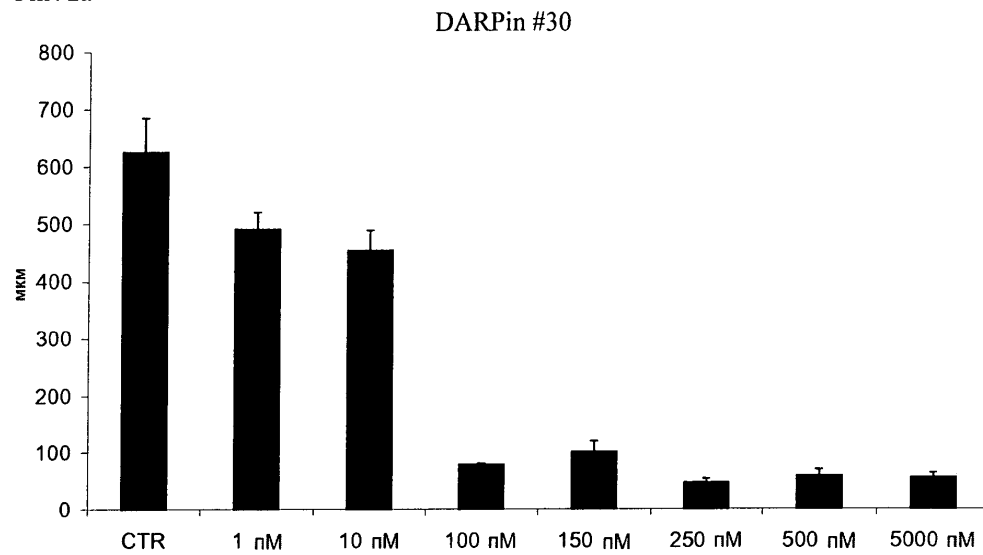
1/5

Фиг. 1

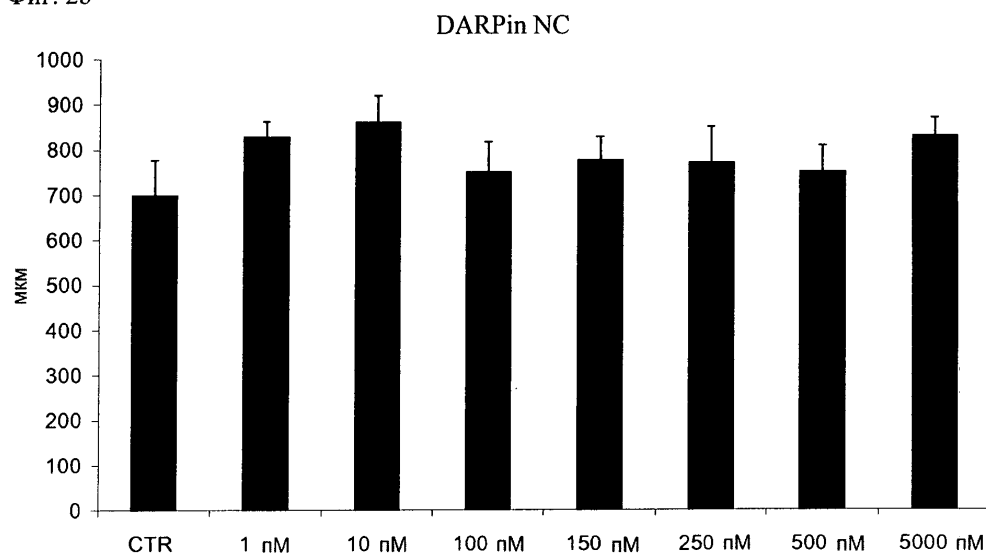


2/5

Фиг. 2а

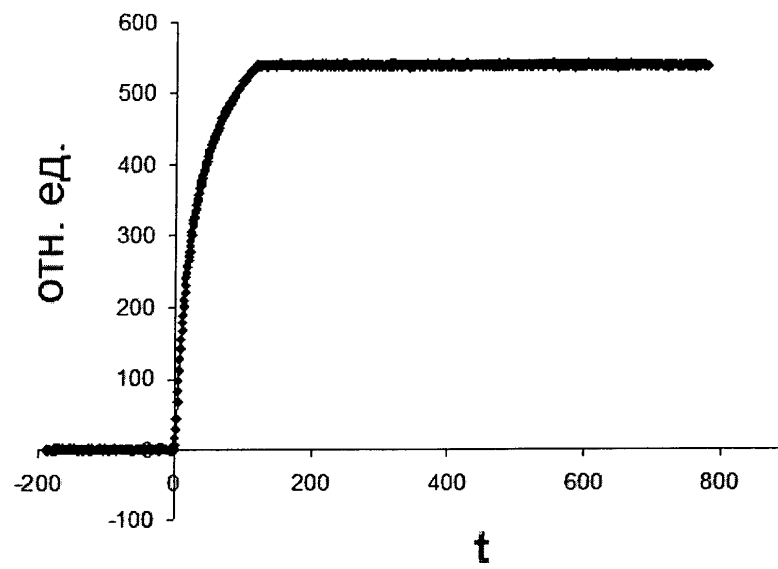


Фиг. 2b

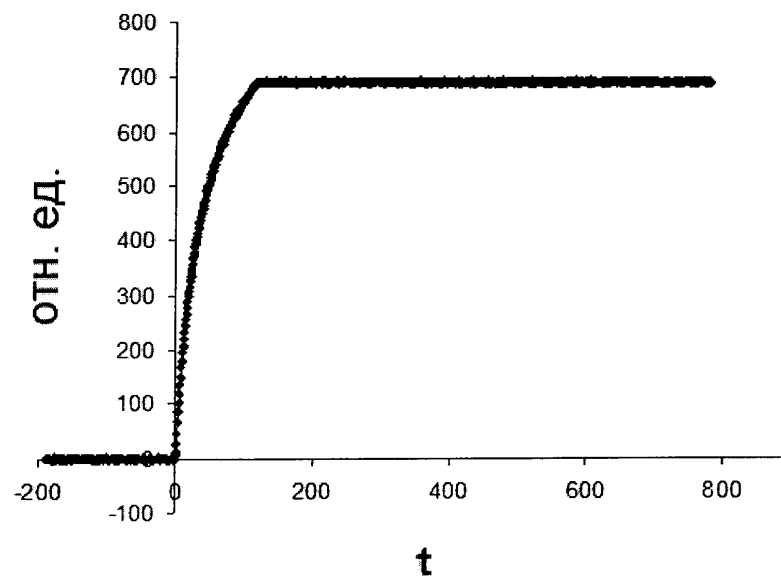


3/5

Фиг. 3а

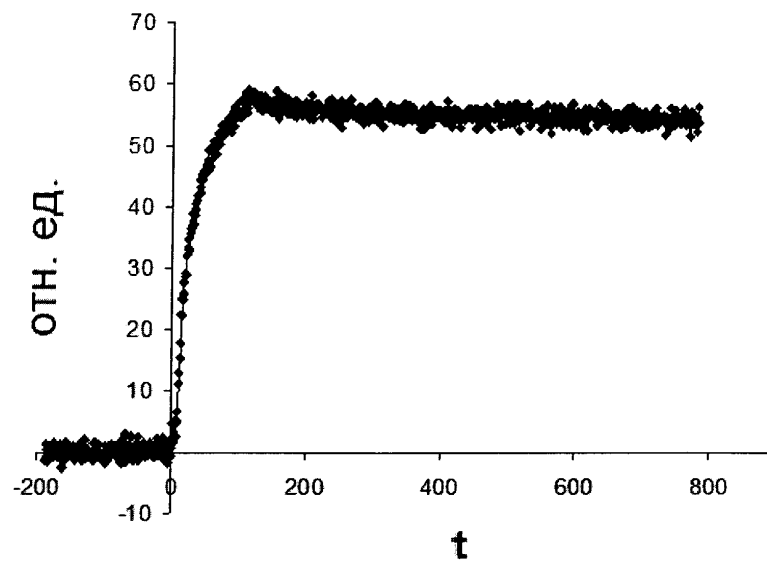


Фиг. 3б

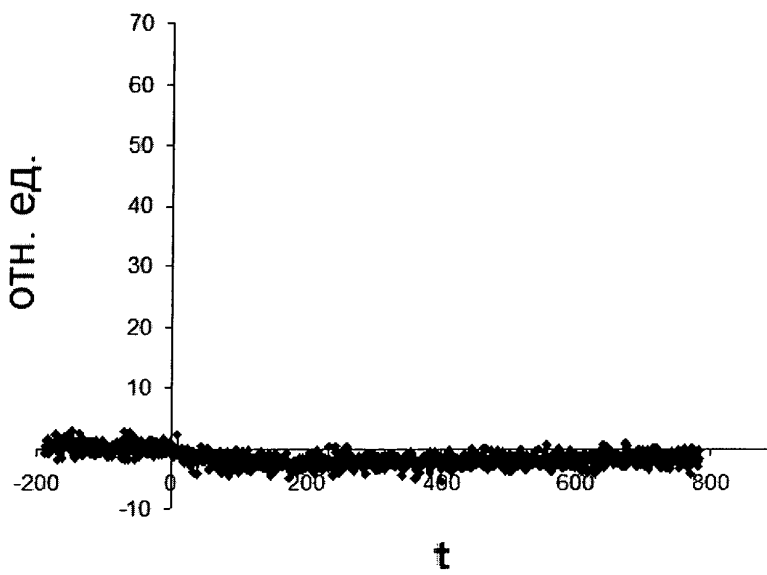


4/5

Фиг. 3с



Фиг. 3d



5/5

Фиг. 4

