

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036257**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.20

(21) Номер заявки
201790790

(22) Дата подачи заявки
2015.10.07

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ VEGFR-2/KDR**

(31) **62/061,097**

(32) **2014.10.07**

(33) **US**

(43) **2017.08.31**

(86) **PCT/US2015/054569**

(87) **WO 2016/057726 2016.04.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КАДМОН КОРПОРЕЙШН, ЭлЭлСи
(US)

(72) Изобретатель:
Лу Дэн, Чжу Чжэньпин (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2014055998**
WO-A2-2014055999
WO-A2-2014055996
US-A1-20120316071
WO-A1-2015054317

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с VEGFR-2. Эти антитела используются для лечения неопластических заболеваний, гиперпролиферативных нарушений и ангиогенных заболеваний и могут быть использованы отдельно или в комбинации с другими агентами.

B1

036257

036257

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с VEGFR-2. Эти антитела используются для лечения неопластических заболеваний и гиперпролиферативных нарушений и могут быть использованы отдельно или в комбинации с другими агентами.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Эта заявка притязает на приоритет заявки на патент США с № 62/061097, поданной 7 октября 2014 года, которая включена сюда посредством ссылки во всей ее полноте. Эта заявка также относится к заявке PCT/US 2013/063754, поданной 7 октября 2013, и заявке на патент США с № 61/710420, поданной 5 октября 2012, обе из которых включены сюда посредством ссылки во всей их полноте.

Предпосылки создания изобретения

Ангиогенез представляет собой очень сложный процесс развития новых кровеносных сосудов, который включает в себя пролиферацию и миграцию капиллярных эндотелиальных клеток из ранее существовавших сосудов и инфильтрацию ими ткани, сборку клеток в трубчатые структуры, соединение новообразующихся трубчатых сборок с замкнутой сосудистой системой и созревание новообразованных капиллярных сосудов.

Ангиогенез имеет большое значение в нормальных физиологических процессах, в том числе эмбриональном развитии, росте фолликулов и заживлении ран. Чрезмерный ангиогенез также приводит к неоваскуляризации в случае неопластических заболеваний и в случае не являющихся неопластическими заболеваниями, таких как возрастная дегенерация желтого пятна (AMD), диабетическая ретинопатия и неоваскулярная глаукома. Было установлено, что антиангиогенная терапия, которая воздействует на фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), вместе с ранибизумабом (Lucentis®) является эффективной в замедлении прогрессирования AMD. Однако неоваскуляризация является сложным процессом, и множество ангиогенных механизмов, вероятно, вносят свой вклад. Остается потребность в разработке агентов и терапий для лечения заболеваний, связанных с неоваскуляризацией.

Сущность изобретения

Настоящим изобретением обеспечиваются антитела человека и их фрагменты, которые связываются с VEGFR-2 (KDR). В некоторых вариантах осуществления антитела блокируют связывание лиганда (например, одного или более из VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D или VEGF-E) с VEGFR-2. В некоторых вариантах осуществления антитела подавляют активацию VEGFR-2. Эти антитела используются для лечения неопластических заболеваний, в том числе, например, солидных и несоллидных опухолей и гиперпролиферативных нарушений. Соответственно настоящим изобретением обеспечиваются способы подавления активации KDR, способы угнетения роста опухоли, в том числе ингибирования связанного с опухолью ангиогенеза, и способы лечения связанных с ангиогенезом нарушений. Настоящим изобретением обеспечиваются наборы, содержащие антитела человека или фрагменты антител, которые связываются с рецепторами VEGFR.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается выделенное антитело или его фрагмент, которое(ый) связывается с VEGFR2 человека, включающее(ий) переменный домен тяжелой цепи, который включает последовательность CDR1, CDR2 и CDR3, причем

(i) последовательность CDR1 представляет собой GFTFSWYVMG (SEQ ID NO:237),

(ii) последовательность CDR2 выбирают из группы, состоящей из

SIYPQGGATSYADSVKG (SEQ ID NO:238),

SIYPQGGATNYADSVKG (SEQ ID NO:239) и

SIYPSGGATNYADSVKG (SEQ ID NO:240); и

(ii) последовательность CDR3 выбирают из группы, состоящей из

GNYFDY (SEQ ID NO:241),

GNYLDY (SEQ ID NO:242),

GPYLDY (SEQ ID NO:243) и

GSYLDY (SEQ ID NO:244),

с условием, что переменный домен тяжелой цепи не включает вместе и последовательность CDR2 SEQ ID NO:240, и последовательность CDR3 SEQ ID NO:241.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается выделенное антитело или его фрагмент, которое(ый) связывается с VEGFR2 человека, включающее(ий) переменный домен легкой цепи, который включает последовательность CDR1, CDR2 и CDR3, причем

(i) последовательность CDR1 представляет собой RASQSVSSNYFG (SEQ ID NO:245),

(ii) последовательность CDR2 представляет собой GASSRAT (SEQ ID NO:246) и

(iii) последовательность CDR3 выбирают из группы, состоящей из

QQFDSLPLT (SEQ ID NO:247),
 QQHDSSPLS (SEQ ID NO:248),
 QQFDSSPLS (SEQ ID NO:249) и
 QQFDSSPLT (SEQ ID NO:250).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения CDR2 переменного домена тяжелой цепи имеет последовательность SIYPQGGATSYADSVKG (SEQ ID NO:238), а CDR3 переменного домена тяжелой цепи имеет последовательность GNYFDY (SEQ ID NO:241).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения CDR3 переменного домена легкой цепи имеет последовательность QQFDSLPLT (SEQ ID NO:247).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения переменный домен тяжелой цепи имеет последовательность, выбираемую из группы, состоящей из

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYVMGWVRQAPGKGLEWVSSIYPQGGATS
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGNYFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID
 NO:200),

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYVMSWVRQAPGKGLEWVSSIYPQGGATN
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGNYFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID
 NO:208),

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYVMGWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGATN
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGNYLDYWGQGLVTVSS (SEQ ID
 NO:216),

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYVMGWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGATN
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGPYLDYWGQGLVTVSS (SEQ ID
 NO:224), и

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYVMGWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGATN
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGSYLDYWGQGLVTVSS (SEQ ID
 NO:232).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения переменный домен легкой цепи имеет последовательность, выбираемую из группы, состоящей из

DIQMTQSPGTLSPGEGATLSCRASQSVSSNYFGWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI
 PDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDSAVYYCQQFDSLPLTFGGGTKVEIKR (SEQ ID
 NO:204),

DIQMTQSPGTLSPGEGATLSCRASQSVSSNYFGWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI
 PDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDSAVYYCQQHDSSPLSFGGGTKVEIKR (SEQ ID
 NO:212),

DIQMTQSPGTLSPGEGATLSCRASQSVSSNYFGWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI
 PDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDSAVYYCQQFDSSPLSFGGGTKVEIKR (SEQ ID
 NO:220),

DIQMTQSPGTLSPGEGATLSCRASQSVSSNYFGWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI
 PDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDSAVYYCQQFDSSPLTFGGGTKVEIKR (SEQ ID
 NO:228) и

DIQMTQSPGTLSPGEGATLSCRASQSVSSNYFGWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI
 PDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDSAVYYCQQFDSSPLTFGGGTKVEIKR (SEQ ID
 NO:236).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения переменный домен тяжелой цепи имеет последовательность, которая представляет собой

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYVMGWVRQAPGKGLEWVSSIYPQGGATSYADSV
 KGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGNYFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID
 NO:200),

а переменный домен легкой цепи имеет последовательность, которая представляет собой

DIQMTQSPGTLTSLSPGEGATLSCRASQSVSSNYFGWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS

GSGSGTDFLTISRLEPEDSAVYYCQQFDSLPLTFGGGKTKVEIKR (SEQ ID NO:204).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент имеет изотип IgG.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент представляет собой scFv, Fv, Fab', Fab, F(ab')₂ или диатело.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело или фрагмент связывается с человеческим VEGFR2 и мышинным VEGFR2.

Настоящим изобретением обеспечивается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его фрагмент по настоящему изобретению.

Настоящим изобретением обеспечивается НК-вектор, включающий выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его фрагмент по настоящему изобретению.

Настоящим изобретением обеспечивается прокариотическая или эукариотическая клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или фрагмент по настоящему изобретению.

Настоящим изобретением обеспечивается композиция, содержащая антитело или его фрагмент по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящим изобретением обеспечивается способ подавления активации человеческого VEGFR2 или мышинного VEGFR2, включающий приведение клетки в контакт с эффективным количеством антитела или фрагмента по настоящему изобретению.

Настоящим изобретением обеспечивается способ ингибирования ангиогенеза, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или фрагмента по настоящему изобретению.

Настоящим изобретением обеспечивается способ уменьшения роста опухоли, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или фрагмента по настоящему изобретению.

Настоящим изобретением обеспечивается способ лечения неопластических заболеваний у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или фрагмента по настоящему изобретению, причем неопластические заболевания выбирают из группы, состоящей из рака легкого, колоректального рака, почечно-клеточного рака, глиобластомы, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака желудка, множественной миеломы, немелкоклеточного рака легкого и рака поджелудочной железы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ, кроме того, включает введение субъекту эффективного количества антагониста рецептора эпидермального фактора роста (EGFR).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ, кроме того, включает введение субъекту эффективного количества антагониста рецепторной fms-подобной тирозинкиназы (flt-1).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ, кроме того, включает введение субъекту эффективного количества антагониста rho-ассоциированной киназы 2 (ROCK2).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ, кроме того, включает введение субъекту эффективного количества антагониста матриксных металлопротеиназ.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ, кроме того, включает введение субъекту эффективного количества антитела против PDGFRβ.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ, кроме того, включает введение субъекту эффективного количества антитела против PD-L1.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения пациентом является человек.

Краткое описание фигур

На фиг. 1A-C продемонстрированы человеческие последовательности переменных областей тяжелой цепи, легкой цепи лямбда и легкой цепи каппа соответственно, антител против VEGFR2 по настоящему изобретению, идентифицированных с помощью фагового дисплея.

На фиг. 2 продемонстрировано связывание антител по настоящему изобретению с hVEGFR2 (наверху) и конструкцией, содержащей домены 2 и 3 hVEGFR2 (посередине). Нижняя панель демонстрирует блокирование лиганда (VEGF₁₆₅).

На фиг. 3 показано, что мАт 101 и 102 по настоящему изобретению ингибируют VEGFA-стимулируемое фосфорилирование VEGFR2, АКТ и MAPK в свиных эндотелиальных клетках аорты (PAE) со сверхэкспрессией KDR (VEGFR2 человека).

На фиг. 4 продемонстрировано связывание с hVEGFR2 и блокирование лиганда VEGF₁₆₅ с помощью мАт 104, 105, 106 и 108. Схожие результаты были получены для мАт 103, 107, 109 и 110 в отдельном эксперименте. Эти мАт содержат переменный домен тяжелой цепи из мАт101, рекомбинированный с различными переменными доменами легкой цепи.

На фиг. 5 показано, что мАт 105 и 106 по настоящему изобретению ингибируют VEGFA-стимулируемое фосфорилирование VEGFR2, АКТ и MAPK в свиных эндотелиальных клетках аорты (PAE) со сверхэкспрессией KDR (VEGFR2 человека).

На фиг. 6A представлены аминокислотные последовательности тяжелых цепей пяти антител с созревшей аффинностью, происходящих от мАт138, которое содержит V_H-домен, имеющий последовательность SEQ ID NO:4 (последовательность, также представленную на этой фигуре).

На фиг. 6B представлены аминокислотные последовательности легкой цепи тех же пяти антител с созревшей аффинностью, происходящих из SEQ ID NO:160 (последовательности, также представленной на этой фигуре).

На фиг. 7A представлено связывание антител по настоящему изобретению с растворимым человеческим и мышинным VEGFR2 по сравнению с DC101 (мышинным моноклональным Ат, которое связывается с мышинным VEGFR2) и контрольным антителом, которое связывается только с человеческим VEGFR2. mAt147 связывается как с человеческим, так и с мышинным VEGFR2. mA106 связывается с человеческим VEGFR2, но не с мышинным VEGFR2.

На фиг. 7B представлены данные из экспериментов по блокированию лиганда. mAt147 блокирует связывание человеческого VEGF с человеческим VEGFR2 и связывание мышинового VEGF с мышинным VEGFR2. mA106 блокирует связывание человеческого VEGF с человеческим VEGFR2, но не связывание мышинового VEGF с мышинным VEGFR2.

На фиг. 8A продемонстрировано связывание mAt106 и mAt147 с человеческим VEGFR2 на клетках HUVEC (эндотелиальных клетках пупочной вены человека) и свиных эндотелиальных клетках аорты (PAE) со сверхэкспрессией KDR (KDR-PAE).

На фиг. 8B показано, что mAt147, но не mA106, связывается с VEGFR2 на мышинных эндотелиальных клетках MS1.

На фиг. 8A и 8B контроль представляет собой антитело, которое связывается с hVEGFR2, но не с mVEGFR2.

На фиг. 9 показано ингибирование VEGFR2-опосредованной передачи сигнала с помощью mAt106 и mAt147. mAt106 и mAt147 ингибируют фосфорилирование KDR и p44/42 в клетках KDR-PAE (фиг. 9A) и в клетках HUVEC (фиг. 9B) в зависимости от дозы.

На фиг. 10A представлено ингибирование пролиферации клеток KDR-PAE с помощью mAt106, mAt147 и контрольного антитела, которое связывается с hVEGFR2.

На фиг 10B продемонстрировано ингибирование индуцированной миграции клеток. Миграция клеток KDR-PAE была индуцирована градиентом VEGF (50 нг/мл VEGF (наверху), 100 нг/мл VEGF (внизу)). Диаграмма изображает количество клеток в присутствии 0,6, 3 или 15 мкг/мл антитела mAt106 или mAt147.

На фиг. 11 представлено ингибирование VEGF-индуцированной миграции клеток KDR-PAE с помощью mAt147.

На фиг. 12A представлено ингибирование VEGFR2-опосредованной передачи сигнала в мышинных клетках EOMA с помощью mAt147.

А на фиг. 12B представлены исследования с использованием FACS, демонстрирующие, что mAt147 характеризуется увеличенным связыванием с клетками EOMA по сравнению с контрольными антителами.

Подробное описание изобретения

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются новые антитела против VEGFR2 или используются антигенсвязывающие фрагменты таких антител, которые являются эффективными для ингибирования VEGFR2-зависимой передачи сигнала. Используемый здесь термин "ингибирующий рецептор" означает уменьшение и/или инактивацию внутренней киназной активности рецептора, который передает сигнал. Надежным анализом ингибирования VEGFR2 является уменьшение фосфорилирования рецептора.

Настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным механизмом ингибирования VEGFR2. Механизм, сопровождаемый одним антителом, является необязательно одинаковым с таковым, сопровождаемым другим антителом. Некоторые возможные механизмы включают предотвращение связывания лиганда VEGF с экстраклеточным связывающим доменом VEGFR2, а также предотвращение димеризации или олигомеризации рецепторов. Однако нельзя исключить другие механизмы.

Антитела представляют собой белки, которые распознают и связывают специфический антиген или вещество. В предпочтительных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению связываются с KDR по крайней мере так же сильно, как и природный лиганд. Аффинность, представленная константой равновесия для диссоциации комплекса антигена с антителом (K_d), определяет силу связывания между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим сайтом. Авидность является мерой силы связывания между антителом и его антигеном. Авидность связана как с аффинностью между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим сайтом антитела, так и с количеством сайтов связывания (валентностью) на антитело. Так, например, одновалентное антитело (например, Fab) имеет один сайт связывания для конкретного эпитопа. Антитело IgG имеет два антигенсвязывающих сайта. Типичные значения K (обратной величины константы диссоциации K_d) составляют от 10^5 до 10^{11} л/моль. Считается, что любое значение K ниже 10^4 л/моль означает связывание, которое является неспецифическим.

Антитело по настоящему изобретению подавляет активацию VEGFR2. Одним из показателей ингибирования VEGFR2 является уменьшение тирозинкиназной активности рецептора. Ингибирование тирозинкиназы может быть определено с использованием хорошо известных методов, таких как измерение уровня аутофосфорилирования рецептора. Ингибирование VEGFR2 можно также наблюдать по ингибированию или регулированию событий фосфорилирования природных или синтетических субстратов

VEGFR2 и других компонентов пути передачи сигнала от VEGFR2. Фосфорилирование может быть обнаружено, например, с использованием антитела, специфического для фосфотирозина, в анализе ELISA или на Вестерн-блоте. Некоторые анализы для тирозинкиназной активности описаны в Panek et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 283: 1433-44 (1997) и Batley et al., *Life Sci.*, 62: 143-50 (1998).

In vivo анализы также могут использоваться. Например, ингибирование тирозинкиназной активности можно наблюдать с помощью анализов митогенной активности с использованием клеточных линий, стимулированных лигандом рецептора в присутствии и в отсутствие ингибитора. Например, клетки HUVEC (ATCC), стимулированные VEGF, могут быть использованы для анализа ингибирования VEGFR. Другой способ включает тестирование на угнетение роста VEGF-экспрессирующих опухолевых клеток с использованием, например, опухолевых клеток человека, инъецированных в мышь. См. патент США с № 6365157 (Rockwell et al.).

Настоящим изобретением обеспечиваются антитела против VEGFR2, в том числе нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела, и композиции, содержащие такие антитела. В одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается варибельная область тяжелой цепи выделенного антитела, включающая последовательность CDR-1H, CDR-2H и CDR-3H, причем

(i) последовательность CDR-1H представляет собой GFTFSWYX₁MX₂ (SEQ ID NO:185), где X₁ представляет собой V или I, X₂ представляет собой G или L;

(ii) последовательность CDR-2H представляет собой SIX₁X₂SGGX₃TX₄YADSVKG (SEQ ID NO:186), где X₁ представляет собой Y или G, X₂ представляет собой P или S, X₃ представляет собой A или F, X₄ представляет собой N или D; и

(iii) последовательность CDR-3H представляет собой GNYFDY (SEQ ID NO:3) или GLAAPRS (SEQ ID NO:11).

В одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается выделенная варибельная область легкой цепи, включающая CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, причем

(i) последовательность CDR-L1 представляет собой

X₁GX₂X₃LX₄X₅X₆X₇X₈S (SEQ ID NO:187), где X₁ представляет собой S, Q или T, X₂ представляет собой D, E или Q, X₃ представляет собой K, S, N, I или A, X₄ представляет собой G или R, X₅ представляет собой D, S, H, E или N, X₆ представляет собой E, Y, Q, R или N, X₇ представляет собой Y, F или S и X₈ представляет собой A или S,

или SGSX₁SNX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO:188), где X₁ представляет собой S или T, X₂ представляет собой I или L, X₃ представляет собой E или G, X₄ представляет собой T, S или N, X₅ представляет собой N или Y, X₆ представляет собой T, P, A или Y, X₇ представляет собой V или L и X₈ представляет собой N, I или Y,

или X₁GX₂SX₃DX₄GX₅YDYVS (SEQ ID NO:189), где X₁ представляет собой A или T, X₂ представляет собой S или T, X₃ представляет собой H, S или N, X₄ представляет собой I или V и X₅ представляет собой S или A;

(ii) последовательность CDR-L2 представляет собой X₁X₂X₃X₄X₅PS (SEQ ID NO:190), где X₁ представляет собой Q, D, T, Y, S или A, X₂ представляет собой D, N, S, T или V, X₃ представляет собой D, N, S, T или Y, X₄ представляет собой Q, K, N или L и X₅ представляет собой R или L;

(iii) причем последовательность CDR-L3 представляет собой QX₁WX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO:191), где X₁ представляет собой A или T, X₂ представляет собой D или G, X₃ представляет собой R, или аминокислота отсутствует, X₄ представляет собой S, F или N, X₅ представляет собой S, T или N, X₆ представляет собой S, T или P, X₇ представляет собой A, V, L, I или Y и X₈ представляет собой V или L,

или AX₁WDDX₂LX₃X₄X₅X₆ (SEQ ID NO:192), где X₁ представляет собой A, S или T, X₂ представляет собой N или S, X₃ представляет собой N, I или G, X₄ представляет собой G или S, X₅ представляет собой P, W или V и X₆ представляет собой V или L,

или MYSTITX₁LL (SEQ ID NO:193), где X₁ представляет собой A или T.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается выделенная варибельная область легкой цепи, включающая CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, причем

(i) последовательность CDR-L1 представляет собой RASX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇YX₈X₉ (SEQ ID NO:194), где X₁ представляет собой Q, E или H, X₂ представляет собой S, R или N, X₃ представляет собой V, I или L, X₄ представляет собой S, R, G или N, X₅ представляет собой S или N, X₆ представляет собой S, N, W или D, X₇ представляет собой G, или аминокислота отсутствует, X₈ представляет собой L или F и X₉ представляет собой A, G, M или S;

(ii) последовательность CDR-L2 представляет собой GASX₁RAT (SEQ ID NO:195), где X₁ представляет собой S, T, I или N;

(iii) последовательность CDR-L3 представляет собой QQX₁X₂X₃X₄X₅X₇X₈ (SEQ ID NO:196), где X₁ представляет собой F или Y, X₂ представляет собой D, G или Y, X₃ представляет собой S, T или N, X₄ представляет собой S, L или W, X₅ представляет собой P, или аминокислота отсутствует, X₆ представляет собой P или T, X₇ представляет собой L, I, V, P, W или Y и X₈ представляет собой T или S.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается антитело, которое включает варибельный домен тяжелой цепи, включающий одну, две, три, четыре, пять или шесть по-

следовательностей CDR из варибельного домена легкой цепи и варибельного домена тяжелой цепи, представленных выше.

Предоставляются неограничивающие примеры последовательностей VEGFR2-связывающих антител. Как здесь описано, исходя из библиотек фагового дисплея Fab человека, были идентифицированы два нейтрализующих антитела, которые связываются с VEGFR2 человека, блокируют связывания лиганда VEGFA с hVEGFR2 и ингибируют фосфорилирование VEGFR2 и последующую передачу сигнала, стимулированную VEGFA. Табл. 1 показывает аминокислотные последовательности CDR и варибельных доменов антител. K_d МАТ101 и МАТ102 составляют приблизительно 6,6 нМ и 1,7 нМ соответственно.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности антител в соответствии с SEQ ID NO

ID NO								
МАТ	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	V _H - домен	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	V _L - домен
101	1	2	3	4	5	6	7	8
102	9	10	11	12	13	14	15	16

Тяжелая цепь МАТ101 была подвергнута перетасовке с генами легкой цепи к (к-библиотекой) и генами легкой цепи λ (λ-библиотекой). 20 уникальных вариантов легкой цепи λ были найдены в результате пэннинга λ-библиотеки как через сорбент с человеческим VEGFR2, так и через сорбент с мышинным VEGFR2. 22 уникальных варианта легкой цепи к были найдены в результате пэннинга к-библиотеки как через сорбент с человеческим VEGFR2, так и через сорбент с мышинным VEGFR2. Табл. 2 показывает аминокислотные последовательности CDR и варибельных доменов легких цепей. K_d МАТ 105, 106 и 107 были увеличены приблизительно в 10 раз (0,24 нМ, 0,22 нМ и 0,12 нМ соответственно). Как и исходное антитело, эти антитела связываются с VEGFR2, блокируют связывания VEGFA с VEGFR2 и ингибируют VEGFA-стимулируемое фосфорилирование VEGFR2, АКТ и MAPK (фиг. 4).

Некоторые из антител, в том числе МАТ 138, 139, 140 и 146, также обладают перекрестной реактивностью с мышинным VEGFR2. Эти антитела также ингибировали VEGFA-стимулируемое фосфорилирование VEGFR2 и последующих молекул в пути передачи сигнала, в том числе MAPK.

Таблица 2. Легкие цепи к и λ в соответствии с SEQ ID NO

МАТ	Легкая цепь	SEQ ID NO				МАТ	Легкая цепь	SEQ ID NO			
		CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	V _L			CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	V _L
103	λ	17	18	19	20	124	κ	101	102	103	104
104	λ	21	22	23	24	125	κ	105	106	107	108
105	λ	25	26	27	28	126	κ	109	110	111	112
106	λ	29	30	31	32	127	κ	113	114	115	116
107	λ	33	34	35	36	128	κ	117	118	119	120
108	λ	37	38	39	40	129	κ	121	122	123	124
109	λ	41	42	43	44	130	κ	125	126	127	128
110	λ	45	46	47	48	131	κ	129	130	131	132
111	λ	49	50	51	52	132	κ	133	134	135	136
112	λ	53	54	55	56	133	κ	137	138	139	140
113	λ	57	58	59	60	134	κ	141	142	143	144

3						4					4
11 4	λ	61	62	63	64	13 5	κ	145	146	147	14 8
11 5	λ	65	66	67	68	13 6	κ	149	150	151	15 2
11 6	λ	69	70	71	72	13 7	κ	153	154	155	15 6
11 7	λ	73	74	75	76	13 8	κ	157	158	159	16 0
11 8	λ	77	78	79	80	13 9	κ	161	162	163	16 4
11 9	λ	81	82	83	84	14 0	κ	165	166	167	16 8
12 0	λ	85	86	87	88	14 1	κ	169	170	171	17 2
12 1	λ	89	90	91	92	14 2	κ	173	174	175	17 6
12 2	λ	93	94	95	96	14 3	κ	177	178	179	18 0
12 3	κ	97	98	99	100	14 4	κ	181	182	183	18 4

Настоящим изобретением обеспечивается выделенное антитело против VEGFR2 и его VEGFR2-связывающие фрагменты, которое(ые) включает один, два или три CDR тяжелой цепи и один, два или три CDR легкой цепи, выбираемые из последовательностей, приведенных в табл. 1 и 2. В случае антитела по настоящему изобретению, когда более одного CDR выбирают из последовательностей, представленных в табл. 1 и 2, различные CDR не должны выбираться из одного и того же моноклонального антитела, представленного в этих таблицах, но могут быть выбраны из двух или более переменных доменов антител, представленных в таблицах. Конкретные варианты осуществления включают, но без ограничения ими, следующее. В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенное антитело против VEGFR2 включает один, два или три CDR тяжелой цепи, имеющие SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело включает один, два или три CDR легкой цепи, имеющие SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:7. В другом варианте осуществления антитело включает один, два или три CDR легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в табл. 1 или 2. Неограничивающие примеры включают переменную область легкой цепи, включающую одну или более из SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 и SEQ ID NO:27, одну или более из SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30 и SEQ ID NO:31 или одну или более из SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34 и SEQ ID NO:35. В некоторых вариантах осуществления антитело против VEGFR2 включает переменный домен тяжелой цепи, включающий SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:12. В некоторых вариантах осуществления антитело против VEGFR2 включает переменный домен легкой цепи, включающий SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:31 или SEQ ID NO:35. В некоторых вариантах осуществления антитела включают один из указанных выше переменных доменов тяжелой цепи и один из указанных выше переменных доменов легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитела против VEGFR2 или их связывающие фрагменты включают один или более CDR или один или более переменных доменов с аминокислотной последовательностью, идентичной по крайней мере на 85%, по крайней мере 90%, по крайней мере 95%, по крайней мере 97%, по крайней мере 98% или по крайней мере 99% последовательностям CDR и переменных доменов, указанным в табл. 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению имеют аминокислотные последовательности CDR, идентичные тем, которые раскрыты здесь, и каркасные области, которые являются идентичными по крайней мере на 85%, по крайней мере 90%, по крайней мере 95%.

Термин "идентичность" относится к количеству или проценту идентичных положений, разделяемых двумя аминокислотными или нуклеотидными последовательностями, принимая во внимание количества пробелов и длину каждого пробела, которые необходимо ввести для оптимального совмещения двух последовательностей. Термин "по существу идентичные" означает аминокислотную последовательность, которая отличается только консервативными аминокислотными заменами, например заменой одной аминокислоты на другую того же класса (например, валина на глицин, аргинина на лизин и т.д.) или одной или более неконсервативных замен, делеций или вставок, находящихся в положениях аминокислот-

ной последовательности, которые не разрушают функцию белка. Предпочтительно, когда аминокислотная последовательность по крайней мере на 80%, более предпочтительно на по крайней мере 85% и наиболее предпочтительно на по крайней мере 90% схожа с другой аминокислотной последовательностью. Способы и компьютерные программы для определения сходства последовательностей, в том числе, но не только, пакет программ GCG (Devereux et al., *Nucleic Acids Research* 12: 387, 1984), BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990) и программа ALIGN (версия 2.0), являются общедоступными. Хорошо известный алгоритм Smith Waterman также может использоваться для определения сходства. Программа BLAST является общедоступной из NCBI и других источников (BLAST Manual, Altschul, et al., NCBI NLM NIH, Bethesda, Md. 20894; BLAST 2.0 at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). При сравнении последовательностей эти способы принимают во внимание различные замены, делеции и другие модификации. Консервативные замены обычно включают замены в пределах следующих групп: глицин, аланин; валин, изолейцин, лейцин; аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аспарагин, глутамин; серин, треонин; лизин, аргинин; фенилаланин, тирозин.

Антитела по настоящему изобретению также включают те, характеристики связывания которых были улучшены с помощью прямой мутации, способов созревания аффинности, фагового дисплея или перетасовки цепей. Аффинность и специфичность могут быть изменены или улучшены с помощью мутирования CDR и скрининга на предмет антигенсвязывающих сайтов, имеющих желаемые характеристики. CDR мутируют различными способами. Один из способов состоит в рандомизации отдельных остатков или комбинаций остатков таким образом, что в совокупности в остальном идентичных антигенсвязывающих сайтов все двадцать аминокислот обнаруживаются в определенных положениях. Альтернативно мутации индуцируются в диапазоне остатков CDR способами с использованием допускающих ошибки ПЦР (см., например, Hawkins et al., *J. Mol Biol*, 226: 889-896. (1992)).

Например, векторы фагового дисплея, содержащие гены варибельных областей тяжелой и легкой цепей, могут быть размножены в мутаторных штаммах *E. coli* (см., например, Low et al., *J. Mol Biol*, 250: 359-368 (1996)). Эти способы мутагенеза являются иллюстрацией множества способов, известных специалистам в данной области техники.

Чтобы свести к минимуму иммуногенность антител, которые связываются с рецепторами VEGF, настоящим изобретением обеспечиваются антитела, которые включают последовательности варибельных и константных доменов человека. Антитела могут представлять собой или могут объединять члены любого класса иммуноглобулинов, такого как IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, или его подклассов. Класс антитела может быть выбран с целью оптимизации эффекторных функций (например, комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) и антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC)) встречающихся в природе антител.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают использование VEGFR2-связывающих фрагментов антител. Fv-фрагмент является самым маленьким фрагментом, который содержит целый варибельный домен тяжелой и легкой цепи, включая все шесть гиперварибельных петлевых участков (CDR). Не имея константных доменов, варибельные домены связаны нековалентно. Тяжелая и легкая цепи могут быть соединены в одну полипептидную цепь ("одноцепочечный Fv" или "scFv"), используя линкер, который позволяет соединить V_H- и V_L-домены с образованием антигенсвязывающего сайта. В одном варианте осуществления настоящего изобретения линкер представляет собой (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃. Поскольку scFv-фрагменты не содержат константные домены целых антител, они значительно меньше целых антител. В scFv-фрагментах также отсутствуют обычные взаимодействия константных доменов тяжелой цепи с другими биологическими молекулами, которые могут быть нежелательными в некоторых вариантах осуществления.

Фрагменты антитела, содержащие V_H, V_L и необязательно C_L, C_H или другие константные домены, также могут быть использованы. Одновалентные фрагменты антител, образуемые в результате расщепления папаином, упоминаются как Fab и не имеют шарнирную область тяжелой цепи. Фрагменты, образуемые в результате расщепления пепсином, упоминаемые как F(ab')₂, сохраняют шарнирную область тяжелой цепи и являются двухвалентными. Такие фрагменты могут быть также получены рекомбинантно. Множество других полезных антигенсвязывающих фрагментов антител известно в данной области техники и включает без ограничения диатела, триатела, однодоменные антитела и другие одновалентные и поливалентные формы.

Настоящим изобретением, кроме того, обеспечиваются поливалентные антигенсвязывающие белки, которые могут быть в форме без ограничения антител, их антигенсвязывающих фрагментов и белков, включающих целые антигенсвязывающие части антител или их часть. Поливалентные антигенсвязывающие белки могут быть моноспецифическими, биспецифическими или полиспецифическими. Термин "специфичность" относится к числу различных типов антигенных детерминант, с которыми может связываться конкретная молекула. Если молекула иммуноглобулина связывается только с одним типом антигенной детерминанты, молекула иммуноглобулина является моноспецифической. Если молекула иммуноглобулина связывается с различными типами антигенных детерминант, то молекула иммуноглобулина является полиспецифической.

Например, биспецифическое поливалентное одноцепочечное антитело делает возможным распо-

знание двух различных типов эпитопов. Оба эпитопа могут находиться в одном и том же антигене (например, VEGFR2). В качестве альтернативы один эпитоп может находиться в одном антигене (например, VEGFR2), а второй эпитоп - в другом антигене.

В одном варианте осуществления поливалентное одноцепочечное антитело включает переменный фрагмент легкой цепи, связанный с переменным фрагментом тяжелой цепи (по аналогии с scFv), который, кроме того, связан с помощью другого пептидного линкера по крайней мере с одним другим антигенсвязывающим доменом. Как правило, пептидный линкер состоит из приблизительно пятнадцати аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте осуществления количество V_L - и V_H -доменов является равным. Например, двухвалентное одноцепочечное антитело может быть представлено следующим образом: $V_L L_1 V_H L_2 V_L L_3 V_H$, или $V_L L_1 V_H L_2 V_H L_3 V_L$, или $V_H L_1 V_L L_2 V_H L_3 V_L$, или $V_H L_1 V_L L_2 V_L L_3 V_H$. Поливалентные одноцепочечные антитела, которые являются трехвалентными или с большей валентностью, содержат один или более фрагментов антител, присоединенных к двухвалентному одноцепочечному антителу с помощью дополнительных пептидных линкеров. Одним из примеров трехвалентного одноцепочечного антитела является $V_L L_1 V_H L_2 V_L L_1 V_H L_2 V_L L_1 V_H$.

Два одноцепочечных антитела могут быть объединены с образованием диатела, также известного как двухвалентный димер. Диатела имеют две цепи. Каждая цепь диатела включает V_H -домен, соединенный с V_L -доменом с помощью короткого линкера приблизительно из 5-10 аминокислотных остатков, например (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser), (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂. Такие линкеры являются достаточно короткими, чтобы предотвратить внутрицепочечное спаривание между доменами в одной и той же цепи, соответственно запуская межцепочечное спаривание между комплементарными доменами в разных цепях, и воссоздают два антигенсвязывающих сайта. Структура диатела является жесткой и компактной, при этом антигенсвязывающие сайты находятся на противоположных концах молекулы. Диатела могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

Три одноцепочечных антитела могут быть объединены с образованием триатела, также известного как трехвалентные тримеры. В некоторых вариантах осуществления триатела конструируют с использованием карбоксильного конца V_L - или V_H -домена, непосредственно слитого с аминоконцом V_H - или V_L -домена, т.е. без какой-либо линкерной последовательности. Триатело имеет три Fv-головки с полипептидами, расположенными циклически, голова к хвосту. Возможная конформация молекулы триатела является плоской, с тремя сайтами связывания, расположенными в одной плоскости под углом 120° друг от друга. Триатела могут быть моноспецифическими, биспецифическими или триспецифическими.

Следует понимать, что антитела против VEGFR2 по настоящему изобретению, в случае использования для вскармливания с целью профилактики или лечения, будут вводиться в виде композиции, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, например, один или более из воды, физиологического раствора, забуференного фосфатом физиологического раствора, декстрозы, глицерина, этанола и тому подобное, а также их комбинации. Фармацевтически приемлемые носители могут, кроме того, содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие агенты или эмульгаторы, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность антител.

В способах по настоящему изобретению терапевтически эффективное количество антитела по настоящему изобретению вводят в организм вскармливаемого, нуждающегося в этом. Используемый здесь термин "введение" означает доставку антител по настоящему изобретению вскармливаемому любым способом, который может достичь искомого результата. Они могут вводиться, например, внутривенно или внутримышечно. Хотя антитела человека по настоящему изобретению являются особенно применимыми для введения человеку, они могут вводиться также другим вскармливаемым. Используемый здесь термин "вскармливаемое", как предполагается, включает, но без ограничения, людей, лабораторных животных, домашних животных и сельскохозяйственных животных. "Терапевтически эффективное количество" означает количество антитела по настоящему изобретению, которое при введении в организм вскармливаемого является эффективным для получения желаемого терапевтического эффекта, например ингибирования киназной активности. Например, в зависимости от заболевания, в случае антитела может потребоваться 0,1, 1,0, 3,0, 6,0 или 10,0 мг/кг. В случае IgG с молекулярной массой 150000 г/моль (два связывающих сайта) эти дозы соответствуют приблизительно 18 нМ, 180 нМ, 540 нМ, 1,08 мкМ и 1,8 мкМ связывающих сайтов для оставляющего 5 л объема крови.

Антитела по настоящему изобретению применимы для угнетения роста опухоли, ангиогенеза, связанного с ростом опухоли, или других патологических состояний, сопровождающихся ангиогенезом. Опухоли, которые могут быть подвергнуты лечению, включают первичные опухоли, метастатические опухоли и резистентные опухоли. Резистентные опухоли включают опухоли, которые не реагируют на или являются резистентными к лечению только химиотерапевтическими средствами, только антителами, только облучением или их комбинациями. Резистентные опухоли также включают опухоли, которые, судя по всему, ингибируются в результате лечения такими средствами, но рецидивируют через вплоть до пяти лет, иногда до десяти лет или дольше после прекращения лечения. Антитела являются эффективными для лечения васкуляризированных опухолей и опухолей, которые не являются васкуляризированными, или пока, по существу, не являются васкуляризированными.

Примеры солидных опухолей, которые могут быть соответствующим образом подвергнуты лечению, включают карциному молочной железы, рак легкого, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, глиому и лимфому. Некоторые примеры таких опухолей включают эпидермоидные новообразования, плоскоклеточные опухоли, такие как опухоли головы и шеи, колоректальные опухоли, опухоли предстательной железы, опухоли молочной железы, опухоли легкого, в том числе мелкоклеточные и немелкоклеточные опухоли легкого, опухоли поджелудочной железы, опухоли щитовидной железы, опухоли яичников и опухоли печени. Другие примеры включают саркому Капоши, новообразования ЦНС, нейробластомы, капиллярные гемангиобластомы, менингиомы и метастазы в головной мозг, меланому, раки желудка-кишечного тракта и почек и саркомы, рабдомиосаркому, глиобластому, предпочтительно мультiformную глиобластому, и лейомиосаркому. Примеры васкуляризированных раков кожи, в случае которых антагонисты по настоящему изобретению являются эффективными, включают плоскоклеточный рак, базальноклеточный рак и раки кожи, которые можно лечить путем угнетения роста злокачественных кератиноцитов, таких как злокачественные кератиноциты человека.

Примеры несоллидных опухолей включают лейкоз, множественную миелому и лимфому. Некоторые примеры лейкозов включают острый миелолейкоз (AML), хронический миелолейкоз (CML), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хронический лимфолейкоз (CLL), эритроцитарный лейкоз или моноцитарный лейкоз. Некоторые примеры лимфом включают лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому.

Антитела по настоящему изобретению также могут использоваться для лечения или профилактики патологических состояний, характеризующихся чрезмерным ангиогенезом, включающим, например, васкуляризацию и/или воспаление, таких как атеросклероз, ревматоидный артрит (RA), гемангиомы, ангиофибромы и псориаз. Другими неограничивающимися примерами неопухолевых ангиогенных заболеваний являются ретинопатия недоношенных (ретролентальная фиброплазия), отторжение трансплантата роговицы, инсулинозависимый сахарный диабет, рассеянный склероз, тяжелая миастения, болезнь Крона, аутоиммунный нефрит, первичный билиарный цирроз печени, острый панкреатит, отторжение аллотрансплантата, аллергическое воспаление, контактный дерматит и замедленные реакции гиперчувствительности, воспалительное заболевание кишечника, септический шок, остеопороз, остеоартрит, когнитивные нарушения, вызванные нейрогенным воспалением, синдром Ослера-Вебера, рестеноз и грибковые, паразитарные и вирусные инфекции, в том числе цитомегаловирусные инфекции.

Глазные болезни, характеризующиеся чрезмерным ангиогенезом, включают неоваскулярную глаукому, пролиферативную ретинопатию, включая пролиферативную диабетическую ретинопатию, и дегенерацию желтого пятна. Настоящим изобретением обеспечиваются способы и соединения для лечения глазных болезней и нарушений. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусматривается лечение возрастной дегенерации желтого пятна (AMD), которое происходит в "сухой" и "влажной" формах. "Влажная" форма AMD является причиной потери зрения из-за аномального роста кровеносных сосудов (неоваскуляризации). Кровотечение, просачивание и рубцы от этих кровеносных сосудов сетчатки, в конечном счете, приводят к необратимому повреждению фоторецепторов. Сухая форма происходит вследствие атрофии пигментного эпителия сетчатки, что приводит к потере зрения через потерю фоторецепторов (палочек и колбочек) в центральной части глаза. В другом варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ лечения хориоидальной неоваскуляризации (CNV). Хориоидальная неоваскуляризация представляет собой процесс, в случае которого новые кровеносные сосуды растут в сосудистой оболочке глаза, через оболочку Бруха и проникают в субретинальное пространство, и является симптомом, среди других причин, возрастной дегенерации желтого пятна, миопии и травмы глаза. В другом варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ лечения диабетического макулярного отека (DME). В другом варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ лечения макулярного отека, который является вторичным по отношению к окклюзии ветки вены сетчатки (BRVO) или окклюзии центральной вены сетчатки (CRVO). Другие заболевания, которые можно лечить в соответствии с настоящим изобретением, включают, без ограничения, неоваскуляризацию радужной оболочки глаза, увеит, неоваскулярную глаукому и ретинит недоношенных (ROP). Способ лечения может быть профилактическим, например, чтобы предотвратить неоваскуляризацию роговицы после пересадки роговицы или модулировать процесс заживления ран при трабекулэктомии.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут преимущественно вводиться со вторыми агентами пациентам, нуждающимся в этом. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело против VEGFR-2 по настоящему изобретению вводят субъекту вместе с противоопухолевым средством. В некоторых вариантах осуществления антитело против VEGFR-2 вводят субъекту вместе со вторым ингибитором ангиогенеза. В некоторых вариантах осуществления антитело против VEGFR-2 по настоящему изобретению вводят вместе с противовоспалительным средством или иммунодепрессантом.

Противоопухолевые средства включают цитотоксические химиотерапевтические средства, небольшие молекулы и биологические молекулы направленного действия, а также облучение. Неограничивающиеся примеры химиотерапевтических средств включают цисплатин, дакарбазин (DTIC), дактиномицин, иринотекан, мехлорэтамин (азотистый иприт), стрептозоцин, циклофосфамид, кармустин (BCNU), лому-

стин (CCNU), доксорубин (адриамицин), даунорубин, прокарбазин, митомицин, цитарабин, этопозид, метотрексат, 5-фторурацил, винбластин, винкристин, блеомицин, паклитаксел (таксол), доцетаксел (таксотер), альдеслейкин, аспарагиназу, бусульфид, карбоплатин, кладрибин, дакарбазин, флоксурин, флударабин, гидроксимочевину, ифосфамид, интерферон-альфа, лейпролид, мегестрол, мелфалан, меркаптопурин, пликамицин, митоган, пегаспаргазу, пентостатин, пипоброман, пликамицин, стрептозоцин, тамоксифен, тенипозид, тестолактон, тиогуанин, тиотепу, урамусцин, винорелбин, хлорамбуцил, таксол и их комбинации.

Небольшие молекулы и биологические молекулы направленного действия включают без ограничения ингибиторы компонентов путей передачи сигнала, такие как модуляторы тирозинкиназ и ингибиторы рецепторных тирозинкиназ, и агенты, которые связываются со специфическим для опухоли антигенами. Неограничивающими примерами рецепторов факторов роста, участвующих в онкогенезе, являются рецепторы тромбоцитарного фактора роста (PDGFR), инсулиноподобного фактора роста (IGFR), фактора роста нервов (NGFR) и фактора роста фибробластов (FGFR), рецепторы семейства рецепторов эпидермального фактора роста, в том числе EGFR (erbB1), HER2 (erbB2), erbB3 и erbB4.

Антагонисты EGFR включают антитела, которые связываются с EGFR или лигандом для EGFR и подавляют связывание с лигандом и/или активацию рецептора. Например, агент может блокировать образование димеров рецепторов или гетеродимера с другими членами семейства EGFR. Лиганды для EGFR включают, например, EGF, амфирегулин TGF- α , гепарин-связывающий EGF (HB-EGF) и бетареккуллюлин. Антагонист EGFR может связываться снаружи с экстраклеточной частью EGFR, что может или может не ингибировать связывание лиганда, или изнутри с тирозинкиназным доменом. Антагонисты EGFR, кроме того, включают агенты, которые ингибируют EGFR-зависимую передачу сигналов, например путем ингибирования функции компонента пути передачи сигнала от EGFR. Примеры антагонистов EGFR, которые связываются с EGFR, включают, без ограничения, биологические молекулы, такие как антитела (и их функциональные эквиваленты), специфические для EGFR, а также небольшие молекулы, такие как синтетические ингибиторы киназ, которые действуют непосредственно на цитоплазматический домен EGFR.

Небольшие молекулы и биологические ингибиторы включают ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), включающие гефитиниб, эрлотиниб и цетуксимаб, ингибиторы HER2 (например, трастузумаб, трастузумаб эмтансин (трастузумаб-DM1, T-DM1) и пертузумаб), антитела против VEGF и фрагменты (например, бевацизумаб), антитела, которые ингибируют CD20 (например, ритуксимаб, ибритумомаб), антитела против VEGFR (например, рамуцирумаб (IMC-1121B), IMC-1C11 и CDP791), антитела против PDGFR и иматиниб. Являющиеся небольшими молекулами, ингибиторы киназ могут быть специфическими для конкретной тирозинкиназы или ингибиторами двух или более киназ. Так, например, соединение N-(3,4-дихлор-2-фторфенил)-7-({(3aR,6aS)-2-метилоктагидроциклопента[с]пиррол-5-ил}метил)окси)-6-(метилокси)хиназолин-4-амин (также известное как XL647, EXEL-7647 и KD-019) представляет собой *in vitro* ингибитор нескольких рецепторных тирозинкиназ (RTK), в том числе EGFR, EphB4, KDR (VEGFR), Flt4 (VEGFR3) и ErbB2, а также является ингибитором киназы SRC, которая участвует в путях, которые приводят к невосприимчивости опухолей к определенным TKI. В одном варианте осуществления настоящего изобретения лечение субъекта, нуждающегося в нем, включает введение ингибитора Rho-киназы формулы I и введение KD-019.

Дазатиниб (BMS-354825, Bristol-Myers Squibb, New York) является еще одним биодоступным при пероральном применении, АТФ-конкурентным ингибитором Src. Дазатиниб также воздействует на Src-Abl (одобренный Управлением по контролю за продуктами и лекарствами (США) для применения для пациентов с хроническим миелогенным лейкозом (СМЛ) или позитивным по филаделфийской хромосоме (Ph⁺) острым лимфобластным лейкозом (ALL)), а также c-Kit, PDGFR, c-FMS, ErbA2 и SFK. Двумя другими ингибиторами тирозинкиназы Src и Src-Abl для перорального применения являются босутиниб (SKI-606) и саракатиниб (AZD0530).

Хотя VEGFR2 опосредует большинство последующих эффектов VEGF в ангиогенезе, может быть предпочтительным введение второго ингибитора ангиогенеза. Антитела против VEGFR-2 по настоящему изобретению могут быть введены вместе с антителами, которые нейтрализуют другие рецепторы, вовлеченные в рост опухоли или ангиогенез.

Неограничивающие примеры VEGF-связывающих агентов включают антитела против VEGF и ловушки VEGF (т.е. лиганд-связывающие домены рецепторов VEGF). Двумя примерами антител (в том числе VEGF-связывающих фрагментов антител) являются бевацизумаб (Avastin), антитело, которое связывается к VEGF-A, и ранибизумаб (Lucentis), Fab, происходящий от бевацизумаба. В общем, ловушка VEGF представляет собой белок, который содержит VEGF-связывающие домены одного или более белков рецепторов VEGF. Ловушки VEGF включают без ограничения растворимый VEGFR-1, растворимый нейропилин 1 (NRP1), растворимый VEGFR-3 (который связывается с VEGF-C и VEGF-D) и афлиберцепт (Zaltrap; Eylea; VEGF Trap R1R2), состоящий из сегментов экстраклеточных доменов рецепторов фактора роста эндотелия сосудов человека VEGFR1 и VEGFR2, слитых с константной областью (Fc) IgG1 человека. Конберцепт (KH902) представляет собой слитый белок, который содержит экстраклеточный домен 2 из VEGFR-1 (Flt-1) и экстраклеточный домен 3, 4 из VEGFR2 (KDR), слитые с Fc-частью

IgG1 человека. Несколько ловушек VEGF, содержащих Ig-подобные домены KDR и FLT-1 в различных комбинациях, раскрыты в патенте США с № 8216575. Белки DARPIn (акроним для разработанных белков с анкириновым повтором) представляют собой разработанные при помощи генной инженерии белки-миметики антител, демонстрирующие, как правило, связывание с высокой степенью специфичности и высоким сродством к белку-мишени. DARPIn® MP0112 представляет собой ингибитор фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и вошел в клинические испытания для лечения влажной формы дегенерации желтого пятна и диабетического макулярного отека.

В соответствии с настоящим изобретением можно воздействовать на экспрессию VEGF. Например, ингибитор VEGF PTC299 воздействует на VEGF посттранскрипционно путем селективного связывания с 5'- и 3'-нетранслируемой областью (UTR) матричной РНК (мРНК) для VEGF, тем самым предотвращая трансляцию VEGF. Пегаптанит (Macugen) представляет собой РНК-аптамер, направленный против VEGF-165.

Плацентарный фактор роста (PIGF) был непосредственно связан с патологическим ангиогенезом. PIGF структурно родственен VEGF, а также является лигандом для VEGFR-1. Следовательно, ловушки VEGF, включающие экстраклеточный домен VEGFR1, (см. выше) могут быть использованы для нацеливания на PIGF. Антиангиогенные агенты, кроме того, включают те, которые связываются с рецептором VEGFR-1/Flt-1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки, которые связываются с экстраклеточным доменом VEGFR-1, блокируют связывания одним или обоими из его лигандов, VEGF и PIGF, и/или подавляют VEGF-индуцированную или PIGF-индуцированную активацию VEGFR-1.

PDGF состоит из четырех полипептидных цепей, которые образуют гомодимеры PDGF - AA, BB, CC и DD, а также гетеродимер PDGF-AB. Рецепторы PDGF (PDGFR) - α и - β опосредуют функции PDGF. В частности, PDGFR α связывается с PDGF-AA, -BB, -AB и -CC, в то время как PDGFR β взаимодействует с -BB и -DD. Неограничивающие примеры PDGF-связывающих агентов включают антитела против PDGF и ловушки PDGF. Агенты, которые нацелены на PDGF, включают Fovista™ (E10030, Ophthotech), пегилированные аптамеры, воздействующие на PDGF-B, и AX102 (Sennino et al., 2007, Cancer Res 75 (15): 7359-67), аптамер в виде ДНК-олигонуклеотида, который связывается с PDGF-B.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту вместе с эффективным количеством антитела против PDGFR β .

Агенты, которые нацелены на рецепторы PDGF, включают рамуцирумаб (IMC-3G3, IgG1 человека), антитело против PDGFR α , креноланиб (CP-868596), селективный ингибитор PDGFR α (IC₅₀=0,9 нМ) и PDGFR β (IC₅₀=1,8 нМ), и нилотиниб (Tasigna®), ингибитор PDGF α и PDGFR β и других тирозинкиназ.

Ингибиторы ангиогенеза включают внутриклеточные агенты, которые блокируют передачу сигнала с использованием, например, VEGF, PDGF, лигандов рецепторов VEGF или PDGF, или комплемента. Внутриклеточные агенты, которые ингибируют ингибиторы ангиогенеза, включают следующие, но без ограничения.

Сунитиниб (Sutent; SU11248) является панспецифическим ингибитором в виде небольшой молекулы VEGFR1-VEGFR3, PDGFR α и PDGFR β , фактора стволовых клеток (сKIT), Flt-3, и рецептора колониестимулирующего фактора-1 (CSF-1R). Акситиниб (AG013736; Inlyta) является еще одним являющимся небольшой молекулой ингибитором тирозинкиназ, который ингибирует VEGFR-1-VEGFR-3, PDGFR и сKIT. Цедираниб (AZD2171) является ингибитором VEGFR-1-VEGFR-3, PDGFR β и сKIT. Сорафениб (Nexavar) является еще одним являющимся небольшой молекулой ингибитором нескольких тирозинспецифических протеинкиназ, включая VEGFR, PDGFR и киназы Raf. Разопаниб (Votrient; GW786034) ингибирует VEGFR-1, -2 и -3, сKIT и PDGFR. Форетиниб (GSK1363089; XL880) ингибирует VEGFR2 и MET, как это делает кабозантиниб (Cometriq; XL184). Понатиниб (Iclusig; AP24534) ингибирует VEGFR, PDGFR и сKIT. Тивозаниб (AV-951) ингибируют VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3 в пиколярных концентрациях. CP-547632 является сильным ингибитором VEGFR-2 и киназ основного фактора роста фибробластов (FGF). E-3810 ((6-(7-((1-аминоциклопропил)метокси)-6-метоксихинолин-4-илокси)-N-метил-1-нафтамид) ингибирует киназы VEGFR-1, -2, -3 и FGFR-1 и -2 в наномолярном диапазоне. Бриваниб (BMS-582664) представляет собой ингибитор VEGFR-2, который также ингибирует передачу сигнала от рецептора FGF. CT-322 (Adnectin) представляет собой небольшой белок на основе человеческого фибронектинового домена и связывается с и подавляет активацию VEGFR2. Вандетаниб (Caprelas; Zactima; ZD6474) является ингибитором VEGFR2, EGFR и тирозинкиназ RET. X-82 (Xcovery) представляет собой являющийся небольшой молекулой индолиноновый ингибитор передачи сигнала через рецепторы факторов роста VEGFR и PDGFR.

В некоторых вариантах осуществления антитела против VEGFR по настоящему изобретению вводят вместе с ингибиторами матричных металлопротеиназ. Матричные металлопротеиназы (MMP), такие как MMP-14, MMP-16 и MMP-24, расщепляют компоненты экстраклеточного матрикса (ECM) и базальные мембраны, тем самым позволяя раковым клеткам проникать и инфильтрировать нижележащий стромальный матрикс. Кроме того, ряд рецепторов факторов роста, молекул клеточной адгезии, хемокинов, цитокинов, апоптотических лигандов и ангиогенных факторов являются субстратами MMP. Следовательно, активность MMP может вызвать активацию факторов роста, подавление апоптоза опухолевых

клеток, нарушение градиентов концентрации хемокинов, созданных в результате иммунного ответа хозяина, или высвобождение ангиогенных факторов. MMP могут способствовать росту опухоли путем стимулирования высвобождения факторов пролиферации клеток, таких как инсулиноподобные факторы роста, которые связываются со специфическими связывающими белками (IGFBP) (Manes et al., 1997, J. Biol. Chem. 272: 25706-25712).

Коллагеназы, в том числе MMP-2, были обнаружены на повышенных уровнях в случае меланоме и раков толстой кишки, молочной железы, легких, простаты и мочевого пузыря. Как правило, эти повышенные уровни коррелируют с более высокой степенью злокачественности опухоли и инвазивностью. Уровни MMP-2 значительно повышены в сыворотке пациентов с метастатическим раком легких, и у таких пациентов с высокими уровнями ответ на химиотерапии уменьшается. Уровень MMP-14, которая расщепляет ргоMMP-2 с высвобождением активной MMP-2, повышен в многочисленных раках и может способствовать росту опухолей, эмболии опухолевыми клетками и подвижности, инвазивности и метастазированию рака (например, опухолей ЦНС (например, глиом), рака головы и шеи, рака ротовой полости, рака гортани, хондросаркомы, рака молочной железы). MMP-16 и MMP-24 также повышены в многочисленных раках и могут способствовать как росту опухолей, так и инвазивности и метастазированию рака (например, рака молочной железы, рака гортани, рака яичников, карциномы яичек, меланомы, опухолей головного мозга, например, астроцитомы, глиобластомы, глиомы).

В некоторых вариантах осуществления антитела против VEGFR по настоящему изобретению вводят вместе с антагонистами MMP-1, в том числе, но без ограничения, антителами против MMP-14, раскрытыми в патентах США с № 7745587 и 8106168. В одном варианте осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело человека DX-2400 (Dyax Corp.). Совместное введение с таким антителом является подходящим для лечения карцином у человека, в том числе, но без ограничения ими, шейки матки, желудка, легких, молочной железы, толстой кишки, головы и шеи, злокачественных опухолей головного мозга и меланомы.

В другом варианте осуществления антитело против VEGFR по настоящему изобретению можно вводить в комбинации с одним или несколькими подходящими адъювантами, такими как, например, цитокины (IL-10 и IL-13, например) или другими иммуностимуляторами. Однако следует иметь в виду, что введение только антитела против KDR достаточно для предотвращения, ингибирования или уменьшения прогрессирования опухоли терапевтически эффективным образом.

Противовоспалительные средства и иммунодепрессанты включают стероидные препараты, такие как глюкокортикоиды (например, дексаметазон), FK506 (такролимус), циклоспорин, финголимод, интерферон, такой как IFN β или IFN γ , связывающийся с фактором- α некроза опухолей (TNF- α) белок, такой как инфликсимаб (Remicade), этанерцепт (Enbrel) или адалимумаб (Humira), и микофеноловую кислоту.

Некоторые варианты осуществления включают введение антитела по настоящему изобретению и второго агента, указанного ниже: доцетаксела для солидных опухолей, в том числе рака молочной железы и раков мочевыводящих путей и почки, паклитаксела (для солидных опухолей, аденокарциномы желудка), FOLFIRI (т.е. иринотекана, фолиновой кислоты, 5-фторурацила) для колоректального рака, капецитабина (для рака молочной железы), FOLFOX (т.е. оксалиплатина, лейковорина, 5-фторурацил) (для раков желудка, пищевода, гастроэзофагеального рака), эрибулина (для рака молочной железы), FOLFIRI, т.е. иринотекана, левофолината, 5-фторурацила (для колоректального рака), карбоплатина (для NSCLC), митоксантрон и преднизона (для рака предстательной железы), OFF (оксалиплатина, фолиновой кислоты, 5-фторурацила) для колоректального рака, иринотекана и цетуксимаба (для колоректального рака) и дакарбазина (для злокачественной меланомы).

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с агентом, например цитотоксическим лекарственным средством, являющимся цитотоксином ферментом или радиоизотопом. Этот способ включает введение только связывающего белка или связывающего белка, присоединенного к агенту (например, цитотоксическому лекарственному средству), субъекту, нуждающемуся в таком лечении. Например, антитела против VEGFR2 или их фрагменты могут быть использованы для доставки наночастиц, содержащих агенты, такие как токсины, в связывающиеся с VEGFR2 клетки или ткани, например опухоли.

VEGFR2-связывающие белки могут быть использованы непосредственно *in vivo* с целью элиминации экспрессирующих антиген клеток через посредство естественной комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) или антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Связывающие белки, описанные здесь, могут включать связывающийся с комплементом эффекторный домен, например Fc-части из IgG1, -2 или -3 или соответствующие части из IgM, которые связывают комплемент.

Когда антитело против VEGFR-2 по настоящему изобретению вводят со вторым агентом, первый и второй агенты могут вводиться последовательно или одновременно. Каждый агент может вводиться в однократной или многократной дозе, и дозы могут быть введены по любой схеме, в том числе, без ограничения, два раза в день, ежедневно, еженедельно, раз в две недели и ежемесячно.

Настоящее изобретение также включает добавочное введение. Добавочное введение означает, что второй агент вводят пациенту в дополнение к первому агенту, который уже вводят для лечения заболевания или симптома заболевания. В некоторых вариантах осуществления добавочное введение включает

введение второго агента пациенту, у которого введение первого агента не приводит к лечению, или не в достаточной степени приводит к лечению заболевания или симптома заболевания. В других вариантах осуществления добавочное введение включает введение второго агента пациенту, заболевание которого эффективно лечилось введением первого агента.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят путем инъекции, небольшую молекулу вводят перорально. В одном таком варианте осуществления антитело вводят раз в неделю или один раз или два раза в месяц, а небольшую молекулу вводят ежедневно.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят путем инъекции, а ингибитор ROCK2 вводят перорально. В предпочтительном варианте осуществления агенты вводят один раз в день. В соответствии с настоящим изобретением, когда ингибитор ROCK, или антитело против VEGFR2, вводят субъекту для лечения глазной болезни, антагонист TGF- β может вводиться субъекту для уменьшения или предотвращения образования рубцов. Например, в одном варианте осуществления настоящего изобретения, когда ингибитор ROCK вводят для лечения глазной болезни, также вводят антагонист TGF- β . В другом варианте осуществления, когда антагонист VEGF вводят субъекту для лечения глазной болезни, также вводят антагонист TGF- β . В другом варианте осуществления настоящего изобретения, когда ингибитор ROCK и антагонист VEGF вводят субъекту для лечения глазной болезни, также вводят антагонист TGF- β . В случае глазных болезней, связанных с неоваскуляризацией, просачивание из новых кровеносных сосудов сопровождается образованием рубца (например, дископодобного рубца). Настоящее изобретение включает введение антагониста TGF- β , а также антагониста VEGF и ингибитора ROCK2 субъекту для лечения неоваскуляризации при глазной болезни.

Применимые антагонисты TGF- β включают, без имитирования, следующее: (i) антитела против TGF- β и их антигенсвязывающие фрагменты, такие как панспецифическое антитело против TGF- β GC-1008 (Genzyme), антитело против TGF- β_1 метелиумаб (CAT-192) (Cambridge Antibody Technology) и антигенсвязывающие фрагменты этих антител, (ii) растворимые рецепторы TGF- β или их лигандсвязывающие фрагменты, такие как P144, синтетический пептид, охватывающие аминокислоты 730-743 из близкого к мембране лигандсвязывающего домена рецептора TGF- β типа III (Esparza-López et al., 2001, J. Biol. Chem. 276(18):14588-96) и слитый белок рецептора TGF- β типа III-Fc (IgG₁) (Smith, J. et al., 1999, Circulation Res. 84:1212-22), (iii) пептиды, которые связываются с рецепторами TGF- β , что блокируют одну или несколько изоформ TGF- β , например, 25-аминокислотные пептиды пептиды из TGF- β_1 , TGF- β_2 и TGF- β_3 , описанные Huang et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:27155-59, которые связываются с рецепторами TGF- β , и (iv) антисмысловые агенты, которые ингибируют синтез TGF- β , такие как трабедерсен (Antisense Pharma GmbH), олигонуклеотид, который ингибирует синтез TGF- β_2 . Дополнительные антагонисты описаны в WO 2006/052568, WO 02/094833, WO 04/048382, WO 04/048381, WO 04/050659, WO 04/021989, WO 04/026871 и WO 04/026307.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту вместе с эффективным количеством антитела против PD-L1 (смотри US 61/927907 и PCT/US15/11657, которые включены сюда посредством ссылки во всей их полноте).

В некоторых вариантах осуществления дозу соединения или композиции вводят субъекту каждый день, через день, каждые два дня, каждый третий день, один раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю или раз в две недели. В других вариантах осуществления две, три или четыре дозы соединения или композиции вводят субъекту каждый день, каждые два дня, каждый третий день, раз в неделю или один раз каждые две недели. В некоторых вариантах осуществления дозу(ы) соединения или композиции вводят в течение 2, 3, 5, 7, 14 дней или 21 дня. В некоторых вариантах осуществления дозу соединения или композиции вводят в течение 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6 месяцев или более.

Способы введения включают, но без ограничения, парентеральное, внутрикожное введение, введение в стекловидное тело, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное, подкожное, интраназальное, эпидуральное, пероральное, сублингвальное, интраназальное, внутримозговое, интравагинальное, трансдермальное введение, введение через слизистую, ректально, путем ингаляции или местно, в частности, в уши, нос, глаза или на кожу. Способ введения остается на усмотрение врача. В большинстве случаев введение будет приводить к высвобождению соединения в кровотоки. Для лечения глазных болезней является предпочтительным введение биологических агентов в стекловидное тело.

В конкретных вариантах осуществления может быть желательным местное введение соединения. Это может быть достигнуто, например, а не в качестве ограничения, с помощью местной инфузии, местного нанесения, путем инъекции, с помощью катетера или с помощью имплантата, при этом указанный имплантат состоит из пористого, непористого или желеобразного материала, включая мембраны, такие как мембраны Sikalastic®, или волокна. В таких случаях введение может быть избирательно нацелено на локализованную ткань без существенного высвобождения соединения в кровотоки.

Легочное введение также может быть использовано, например, путем использования ингалятора или распылителя и препарата с распылительным агентом, или с помощью перфузии в фторуглероде или

синтетическом легочном сурфактанте. В некоторых вариантах осуществления соединения готовят в виде суппозитория с традиционными связующими веществами и носителями, такими как триглицериды.

В другом варианте осуществления соединения доставляется в везикуле, в частности липосоме (смотрите Langer, 1990, Science 249: 1527-1533; Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Bacterial infection, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; см. в основном там же).

В другом варианте осуществления соединения доставляется в системе с контролируемым высвобождением (см., например, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Примеры систем с контролируемым высвобождением, которые обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science 249: 1527-1533, могут использоваться. В одном варианте осуществления может использоваться насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). В другом варианте осуществления могут быть использованы полимерные материалы (см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; смотрите также Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105).

Описанные выше схемы введения представлены только с иллюстративной целью и не должны рассматриваться как ограничивающие. Специалист со средним уровнем компетентности в данной области техники без труда поймет, что все дозы находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Следует понимать, и ожидается, что изменения принципов настоящего изобретения, раскрытого здесь, могут быть осуществлены квалифицированным специалистом в данной области техники, и предполагается, что такие модификации должны быть включены в объем настоящего изобретения.

На протяжении этой заявки упоминаются различные публикации. Эти публикации включены, таким образом, в эту заявку посредством ссылки во всей их полноте для более полного описания состояния области техники, к которой относится это изобретение. Следующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, но не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения каким-либо образом.

Примеры

Пример 1.

Идентификация антител, которые связываются с доменами 2 и 3 VEGFR и блокируют связывание лиганда.

Два антитела, связывающиеся с VEGFR2 человека и нейтрализующие его, которые определены в табл. 1, были выделены из библиотек фагового дисплея Fab человека. Антитела блокируют связывание лиганда VEGFA с hVEGFR2 (фиг. 2). Антитела также связываются с эндотелиальными клетками аорты свиньи (PAE), экспрессирующими KDR, и ингибируют VEGFA-стимулируемое фосфорилирование VEGFR2, АКТ и MAPK. (фиг. 3). Табл. 1 показывает аминокислотные последовательности CDR и переменных доменов антител. K_d мАт101 и мАт102 составляют приблизительно 6,6 нМ и 1,7 нМ соответственно.

Тяжелая цепь мАт101 была подвергнута перетасовке с генами легкой цепи κ (κ -библиотекой) и генами легкой цепи λ (λ -библиотекой). 20 уникальных вариантов легкой цепи λ были найдены в результате пэннинга λ -библиотеки как через сорбент с человеческим VEGFR2, так и через сорбент с мышинным VEGFR2. 22 уникальных варианта легкой цепи κ были найдены в результате пэннинга κ -библиотеки как через сорбент с человеческим VEGFR2, так и через сорбент с мышинным VEGFR2. Табл. 2 показывает аминокислотные последовательности CDR и переменных доменов легких цепей. K_d мАт 105, 106, и 107 были увеличены приблизительно в 10 раз (0,24 нМ, 0,22 нМ и 0,12 нМ соответственно) (табл. 3). Эти антитела и антитело мАт101, из которого они получены, связываются с доменами 2 и 3 VEGFR и конструкциями, содержащими эти домены.

Таблица 3. Данные, относящиеся к связыванию антител

Антитело	k_a $10^4 \text{M}^{-1} \text{сек}^{-1}$	k_d 10^{-4}сек^{-1}	KD нМ
107	55,8	0,934	0,167
109	30,6	3,80	1,24
104	79,2	1,13	0,165
110	44,9	3,10	0,69

108	71,9	1,75	0,244
105	24,3	0,591	0,243
101	29,8	5,93	1,81

Как и родительское антитело, эти антитела связываются с VEGFR2, блокируют связывание VEGFA с VEGFR2 (фиг. 4) и ингибируют VEGFA-стимулируемое фосфорилирование VEGFR2, АКТ и MAPK (фиг. 5).

Некоторые из антител, в том числе мАТ 138, 139, 140 и 146, также вступают в перекрестную реакцию с VEGFR2 мыши.

Таблица 4. Перекрестная реактивность

Антитело	VEGFR2 человека			VEGFR2 мыши		
	ka $10^4\text{M}^{-1}\text{сек}^{-1}$	kd 10^{-4}сек^{-1}	KD нМ	ka $10^4\text{M}^{-1}\text{сек}^{-1}$	kd 10^{-4}сек^{-1}	KD нМ
138	19,7	1,42	0,72	23,4	5,90	2,55
139	14,6	1,75	1,20	13,0	3,17	2,44
106	35,6	0,512	0,144			

мАТ 138, 139 и 140 ингибируют VEGFA-стимулируемое фосфорилирование VEGFR2 и последующих молекул в пути передачи сигнала, в том числе MAPK.

Пример 2.

Угнетение роста опухоли *in vivo*.

Мышей NOD-SCID 6-8-недельного возраста, подобранных по полу (самок), облучали 3,5 Гр от источника гамма-излучения ^{137}Cs при мощности дозы, составляющей приблизительно 0,9 Гр/мин, и внутривенно инокулировали 2×10^7 клеток HL60. Через три дня после инокуляции опухоли группы мышей подвергали лечению дважды в неделю различными дозами мАТ106 и регистрировали время их выживания.

Все не подвергнутые лечению мыши умерли в течение двух недель. Даже при большой массе опухоли, время выживаемости мышей, подвергнутых лечению 10 мг/кг мАТ106, удлинится на целых 28 дней.

Пример 3.

Лечение рака толстой кишки у больного человека.

Являющихся людьми субъектов с диагнозом рак толстой кишки делят на группы лечения и с учетом стандартной химиотерапевтической схемы. Две группы пациентов лечат еженедельно 5 или 15 мг/кг/неделю в течение 4 месяцев. Контрольная группа получает только стандартную химиотерапевтическую схему. Массу опухоли оценивают периодически с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ). Ожидается, что, по сравнению с контрольной группой, пациенты, которые получали еженедельно лечение антителом, будут демонстрировать значительное уменьшение роста опухоли или размера опухоли, усиление замедления прогрессирования или удлинение времени выживаемости по сравнению с пациентами, которые не получают лечение антителом.

Для созревания аффинности было выбрано мАТ138 (табл. 2), содержащее тяжелую цепь мАТ101 (SEQ ID NO:4, см. фиг. 6A). Мутации были введены в CDR3 легкой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи. Полученная библиотека была подвергнута пэннингу через сорбент с человеческим и мышинным VEGFR2. Табл. 5 показывает аминокислотные последовательности CDR и вариабельные домены тяжелой и легкой цепи пяти из полученных антител. На фиг. 6 приведено сравнение последовательностей с тяжелой цепью (SEQ ID NO:4) и легкой цепью каппа (т.е. SEQ ID NO:160) мАТ138.

Таблица 5. Аминокислотные последовательности антител в соответствии с SEQ ID NO

МАТ#	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	V _H - домен	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	V _L - домен
147 (B1C4_A 7)	197	198	199	200	201	202	203	204
148 (B1C4_H 9)	205	206	207	208	209	210	211	212
149 (B1C4_E 5)	213	214	215	216	217	218	219	220
150 (B1C4_A 6)	221	222	223	224	225	226	227	228
151 (B1C4_G 3)	229	230	231	232	233	234	235	236

Константы связывания МАТ147 и МАТ149, а также родительского МАТ138 для VEGFR2 человека, мыши и крысы определяли с помощью анализа Bioscore (табл. 6).

Таблица 6. Анализ Bioscore связывания с VEGFR2 человека, мыши и крысы

МАТ	антиген	K _a	K _d	K _D
138	крысы	4,30E+04	1,34E-03	3,12E-08
	мыши	2,86E+04	2,33E-03	8,17E-08
	человека	8,98E+04	6,00E-04	6,68E-09
147	крысы	6,45E+04	8,99E-04	1,39E-08
	мыши	4,38E+04	1,28E-03	2,94E-08
	человека	1,13E+05	2,82E-04	2,51E-09
149	крысы	3,32E+04	1,43E-03	4,31E-08
	мыши	2,29E+04	1,81E-03	7,92E-08
	человека	8,62E+04	6,59E-04	7,65E-08

МАТ147 исследовали с помощью ELISA на свойства связывания со своим рецептором и блокирования лиганда. МАТ147 связывается как с растворимым hVEGFR2, так и с растворимым mVEGFR2 со схожей аффинностью (фиг. 7А). МАТ147 блокирует связывание лиганда с hVEGFR2 подобно специфическому для hVEGFR контрольному антителу, а также блокирует связывание лиганда с mVEGFR2 подобно mVEGFR2-специфическому контрольному антителу (фиг. 7В).

Связывание МАТ147 с hVEGFR2 и mVEGFR2, представленными на клеточных мембранах, было также подтверждено. На фиг. 8А продемонстрировано связывание с hVEGFR2, экспрессируемым эндотелиальными клетками пупочной вены человека (HUVES), а также эндотелиальными клетками аорты свиньи (PAE) со сверхэкспрессией KDR (т.е. VEGFR2 человека). МАТ147 также связывалось с mVEGFR, экспрессируемым мышинными эндотелиальными клетками MS1 (фиг. 8В).

МАТ147 ингибируют VEGFR-2-опосредуемую передачу сигнала, на что указывает уменьшение фосфорилирования KDR и p42/44 в клетках KDR-PAE (фиг. 9А) и в клетках HUVES (фиг. 9В). МАТ106 и МАТ147 ингибируют пролиферацию клеток KDR-PAE (фиг. 10А), а также ингибируют VEGF-индуцируемую миграцию клеток KDR-PAE (фиг. 10В). Эффект МАТ147 на ингибирование VEGF-индуцируемой миграции клеток KDR-PAE также продемонстрирован на фиг. 11.

МАТ147 также ингибирует VEGFR-2-опосредованную передачу сигнала в мышинных клетках EOMA, на что указывает уменьшение фосфорилирования mVEGFR2 (фиг. 12А). Исследования с использованием FACS показали, что МАТ147 характеризуется увеличенным связыванием с клетками EOMA по сравнению с контрольными антителами (фиг. 12В).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его фрагмент, которое связывается с VEGFR2 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит последовательности CDR1H, CDR2H и CDR3H, и

вариабельную область легкой цепи, которая содержит последовательности CDR1L, CDR2L и CDR3L, где:

- (i) последовательность CDR1H представляет собой GFTFSWYVMG (SEQ ID NO:237);
- (ii) последовательность CDR2H выбрана из группы, состоящей из SIYPQGGATSYADSVKG (SEQ ID NO:238), SIYPQGGATNYADSVKG (SEQ ID NO:239), SIYPSGGATNYADSVKG (SEQ ID NO:240);
- (iii) последовательность CDR3H выбрана из группы, состоящей из GNYFDY (SEQ ID NO:241), GNYLDY (SEQ ID NO:242), GPYLDY (SEQ ID NO:243) и GSYLDY (SEQ ID NO:244);
- (iv) последовательность CDR1L представляет собой RASQSVSSNYFG (SEQ ID NO:245);
- (v) последовательность CDR2L представляет собой GASSRAT (SEQ ID NO:246);
- (vi) последовательность CDR3L выбрана из группы, состоящей из QQFDSLPLT (SEQ ID NO:247), QQHDSPLS (SEQ ID NO:248), QQFDSPLS (SEQ ID NO:249) и QQFDSPLT (SEQ ID NO:250),
- при условии, что последовательности CDR2 и CDR3 с SEQ ID NO:240 и SEQ ID NO:241 соответственно не содержатся в варибельной области тяжелой цепи одновременно.
2. Антитело или фрагмент по п.1, в котором CDR2 варибельной области тяжелой цепи имеет последовательность SIYPQGGATSYADSVKG (SEQ ID NO:238);
- CDR3 варибельной области тяжелой цепи имеет последовательность GNYFDY (SEQ ID NO:241);
- CDR3 варибельной области легкой цепи имеет последовательность QQFDSLPLT (SEQ ID NO:247).
3. Антитело или фрагмент по п.1, в котором варибельная область тяжелой цепи имеет последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:200, SEQ ID NO:208, SEQ ID NO:216, SEQ ID NO:224 и SEQ ID NO:232; и
- варибельная область легкой цепи имеет последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:228 и SEQ ID NO:236.
4. Антитело или фрагмент по п.3, в котором варибельная область тяжелой цепи имеет последовательность SEQ ID NO:200,
- варибельная область легкой цепи имеет последовательность SEQ ID NO:204.
5. Антитело или фрагмент по любому из пп.1-4 с изотипом IgG.
6. Антитело или фрагмент по любому из пп.1-5, которое представляет собой scFv, Fv, Fab', Fab, F(ab')₂ или диатело.
7. Антитело или фрагмент по любому из пп.1-6, которое связывается с VEGFR2 человека и hVEGFR2 мыши.
8. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или фрагмент по любому из пп.1-7.
9. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.8.
10. Прокариотическая или эукариотическая клетка-хозяин, содержащая вектор по п.9.
11. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или фрагмент по любому из пп.1-7 и фармацевтически приемлемый носитель.
12. Способ нейтрализации активации VEGFR2 человека или VEGFR2 мыши, включающий введение клетки в контакт с эффективным количеством антитела или фрагмента по любому из пп.1-7.
13. Способ ингибирования ангиогенеза, включающий введение индивиду эффективного количества антитела или фрагмента по любому из пп.1-7.
14. Способ уменьшения роста опухоли, включающий введение индивиду эффективного количества антитела или фрагмента по любому из пп.1-7.
15. Способ лечения заболевания, связанного с неоваскуляризацией, у индивида, включающий введение индивиду эффективного количества антитела или фрагмента по любому из пп.1-7.
16. Способ по п.15, в котором заболеванием является злокачественное новообразование.
17. Способ по п.16, в котором злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из рака легкого, колоректального рака, почечно-клеточного рака, глиобластомы, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака желудка, множественной миеломы, немелкоклеточного рака легкого и рака поджелудочной железы.
18. Способ по любому из пп.13-17, который дополнительно включает введение индивиду эффективного количества антагониста рецептора эпидермального фактора роста (EGFR).
19. Способ по любому из пп.13-17, который дополнительно включает введение индивиду эффективного количества антагониста fms-подобного рецептора тирозинкиназы (flt-1).
20. Способ по любому из пп.13-17, который дополнительно включает введение индивиду эффективного количества антагониста rho-ассоциированной киназы 2 (ROCK2).
21. Способ по любому из пп.13-17, который дополнительно включает введение индивиду эффективного количества антагониста матриксной металлопротеиназы.
22. Способ по любому из пп.13-17, который дополнительно включает введение индивиду эффективного количества антитела против PDGFRβ.
23. Способ по любому из пп.13-17, который дополнительно включает введение индивиду эффективного количества антитела против PD-L1.

№ по Kabat	9									10																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9															
SEQ ID NO:																																		
8	M	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	A	W	D	S	N	T			A	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q	P		
24	M	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	A	W	D	S	S	T			V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q	P		
28	L	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	A	W	G	S	S	T			V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	R	Q	P		
32	M	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	A	W	D	S	S	T			L	L	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q	P		
36	M	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	A	W	D	S	S	T			L	L	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q	P		
40	M	D	E	A	H	Y	Y	C	Q	A	W	D	F	S	S			A	L	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q	P		
44	I	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	T	W	D	T	S			I	L	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	S	Q	P			
48	M	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	T	W	D	R	N	T	P			Y	V	F	G	A	G	T	K	V	T	V	L	G	Q	P	
16	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	S	W	D	D	N	L	N	G			P	L	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	R	Q	P
20	M	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	A	W	D	S	S	T			V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q	P		
52	D	D	E	A	D	Y	Y	C	A	T	W	D	D	S	L	I	G			P	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q	P
56	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	S	W	D	D	N	L	N	G			P	L	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	R	Q	P
60	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	A	W	D	D	S	L	N	G			W	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	S	Q	P
64	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	S	W	D	D	S	L	S	G			V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	R	Q	P
68	D	D	E	A	D	Y	F	C	M	S	Y	T	I	T	A			L	L	F	G	G	G	T	R	V	T	V	L	S	Q	P		
72	D	D	E	A	D	Y	F	C	M	S	Y	T	I	T	T			L	L	F	G	T	G	T	R	V	T	V	L	S	Q	P		
76	D	D	E	A	D	Y	F	C	M	S	Y	T	I	T	T			L	L	F	G	T	G	T	R	V	T	V	L	S	Q	P		
80	D	D	E	A	D	Y	F	C	M	S	Y	T	I	T	T			L	L	F	G	T	G	T	R	V	T	V	L	S	Q	P		
84	D	D	E	A	D	Y	F	C	M	S	Y	T	I	T	T			L	L	F	G	T	G	T	R	V	T	V	L	S	Q	P		
88	D	D	E	A	D	Y	F	C	M	S	Y	T	I	T	T			L	L	F	G	T	G	T	R	V	T	V	L	S	Q	P		
92	D	D	E	A	D	Y	F	C	M	S	Y	T	I	T	T			L	L	F	G	T	G	T	R	V	T	V	L	S	Q	P		
96	D	D	E	A	D	Y	F	C	M	S	Y	T	I	T	T			L	L	F	G	T	G	T	R	V	T	V	L	S	Q	P		

Фиг. 1В (продолжение)

№ по Kabat	1									2									3																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9										
SEQ ID NO:																																							
100	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	
104	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	V	L	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	E	R	I	S	S	N	Y	L	M	W	Y	Q	
108	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	I	S	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	
112	D	I	Q	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	I	R	S	S	G	Y	L	S	W	F	Q
116	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	N	Y	L	G	W	Y	Q	
120	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	
124	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	
128	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	W	Y	L	A	W	Y	Q	
132	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	N	V	G	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	
136	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	
140	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	
144	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	
148	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	
152	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	G	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	N	Y	F	G	W	Y	Q	
156	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	
160	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	D	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	
164	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	L	N	N	N	Y	L	A	W	Y	Q	
168	D	I	Q	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	H	S	V	S	S	D	Y	L	A	W	Y	Q	
172	D	I	Q	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	H	S	V	S	S	D	Y	L	A	W	Y	Q	
176	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	H	S	V	S	S	D	Y	L	A	W	Y	Q	
180	D	I	Q	M	T	Q	S	P	D	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	H	S	V	S	S	D	Y	L	A	W	Y	Q	
184	D	I	Q	M	T	Q	S	P	D	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	H	S	V	S	S	D	Y	L	A	W	Y	Q	

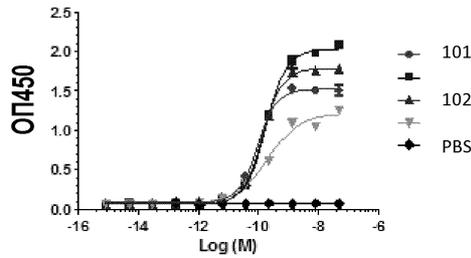
Фиг. 1С

№ по Kabat	4									5						6									7									8									
	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SEQ ID NO:																																											
100	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	M	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	F	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	S	L	T	I	S	R	L	E	P
104	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	M	Y	G	A	S	I	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	E	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	V	E	P
108	Q	R	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	S	T	G	T	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P
112	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	A	S	T	R	A	T	G	T	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	D	R	L	E	S
116	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P
120	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P
124	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	S	L	T	I	S	R	L	E	P
128	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	M	Y	G	A	S	N	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P
132	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	M	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	F	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	S	L	T	I	S	R	L	E	P
136	Q	K																																									

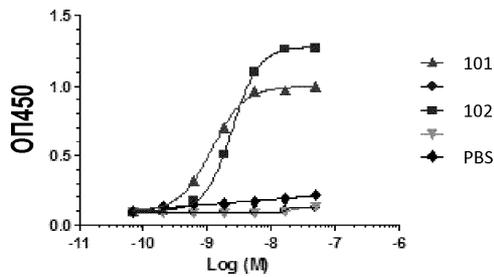
№ по Kabat SEQ ID NO:									9																10															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	A	B	C	D	E	F	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8						
100	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	D	S	S	P	P	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R												
104	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	S	P	L	T	F	G	G	G	T	K	V	E	M	K	R												
108	E	D	F	A	I	Y	Y	C	Q	Q	F	D	T	L	P	I	T	F	G	Q	G	T	R	L	D	I	K	R												
112	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	G	S	S	T	I	T	F	G	Q	G	T	R	L	E	I	K	R												
116	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	D	N	L	P	V	T	F	G	G	G	T	K	V	E	M	K	R												
120	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	D	T	S	P	L	T	I	G	G	G	T	R	V	D	I	K	R												
124	E	D	S	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	D	S	S	P	L	S	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R												
128	E	D	S	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	D	S	S	P	L	T	I	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R												
132	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	D	S	S	P	P	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R												
136	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	D	S	S	P	P	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R												
140	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	D	S	S	P	P	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R												
144	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	G	S	S	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R												
148	E	D	F	A	I	Y	Y	C	Q	Q	F	D	N	W	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R												
152	E	D	S	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	D	S	S	P	L	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R												
156	E	D	S	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	D	S	S	P	L	S	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R												
160	E	D	S	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	D	S	S	P	L	S	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R												
164	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	D	S	S	P	P	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R												
168	E	D	F	A	M	Y	Y	C	Q	Q	F	D	S	S	P	P	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R												
172	E	D	F	A	M	Y	Y	C	Q	Q	F	D	S	S	P	P	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R												
176	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	D	S	S	P	P	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R												
180	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	D	S	S	P	P	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R												
184	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	F	D	S	S	P	P	T	F	G	G	G	T	R	I	D	I	K	R												

Фиг. 1С (продолжение)

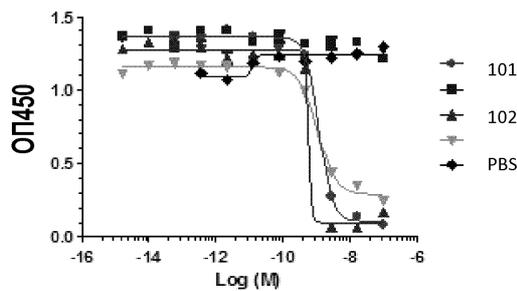
Связывание с hVEGFR2



Связывание с D2-3_Fc VEGFR2

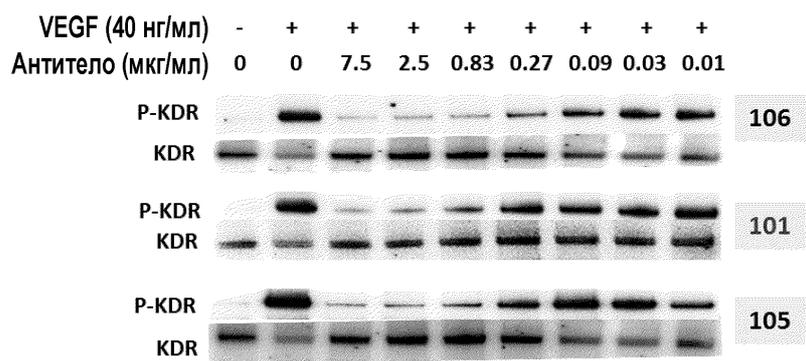


Блокирование связывания VEGF-165 с VEGFR2

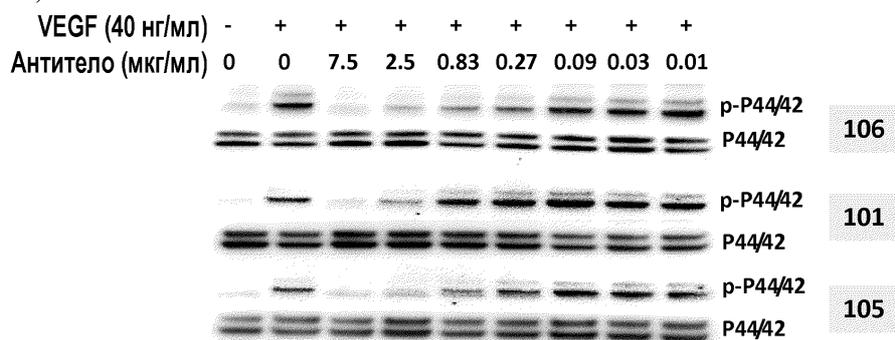


Фиг. 2

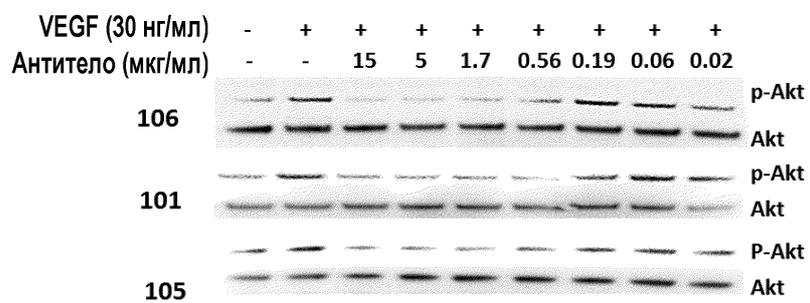
A)



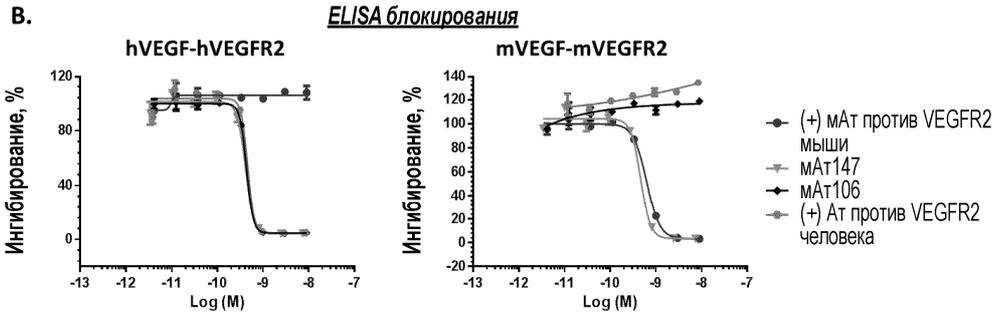
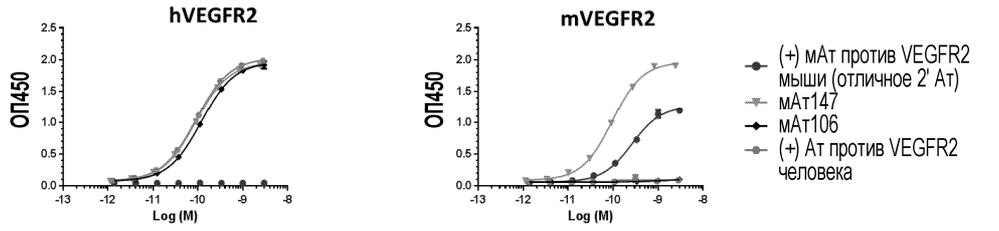
B)



C)

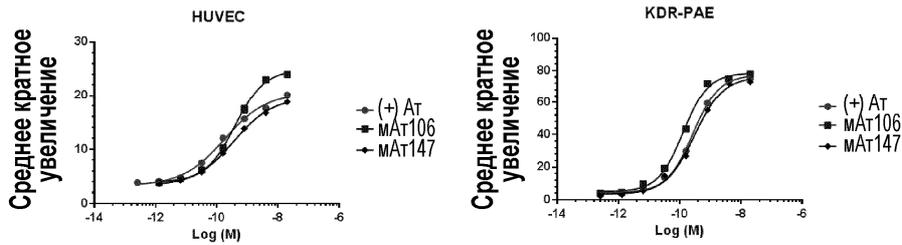


Фиг. 5

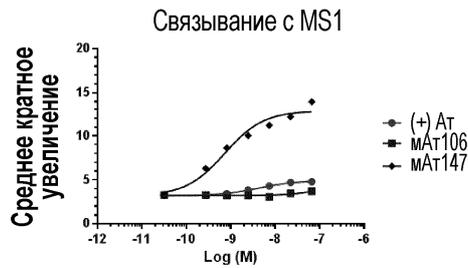


Фиг. 7

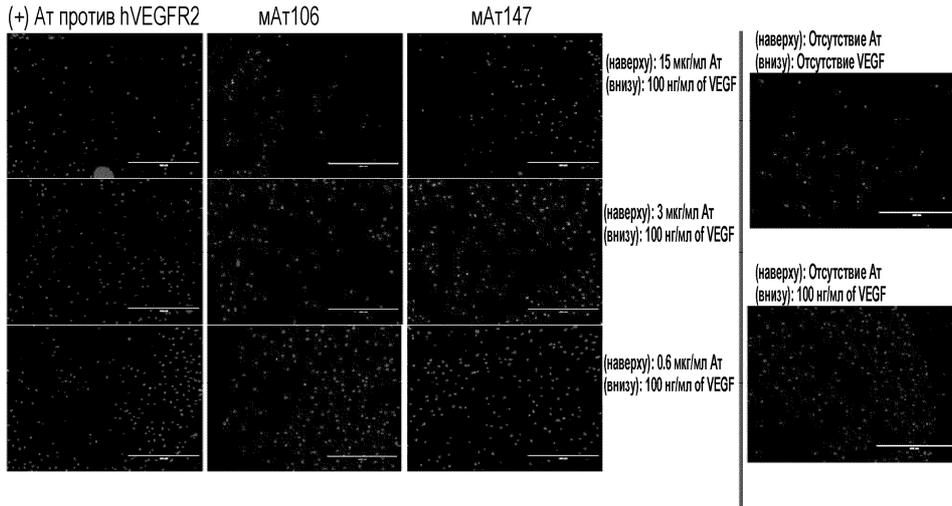
А. Связывание с hVEGFR2 на HUVEC и KDR-PAE



В. Связывание с mVEGFR2 на клетках MS1

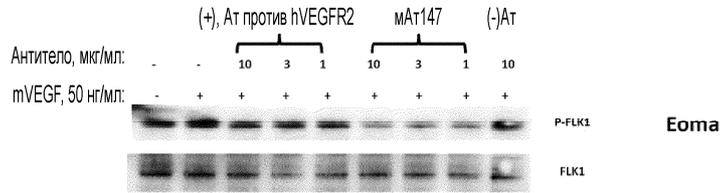


Фиг. 8

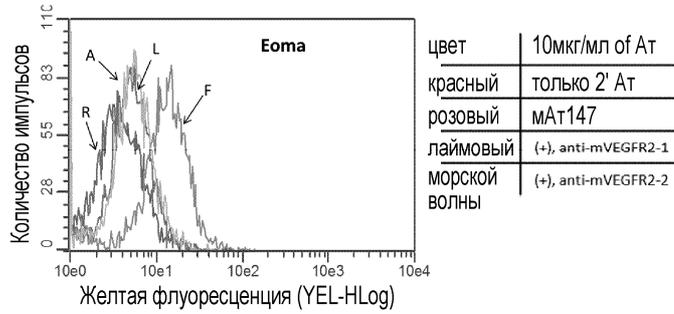


Фиг. 11

A.



B.



Фиг. 12

