

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201991788** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2020.02.28

(22) Дата подачи заявки  
2018.02.14

(51) Int. Cl. *C07K 16/22* (2006.01)  
*C12N 15/12* (2006.01)  
*G01N 33/577* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 27/02* (2006.01)

---

(54) **УЛУЧШЕННЫЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИ-VEGR-2 АНТИТЕЛА**

---

(31) 201710130518.0

(32) 2017.03.07

(33) CN

(86) PCT/CN2018/076847

(87) WO 2018/161798 2018.09.13

(71) Заявитель:  
**БЕЙДЗИН ДУНФАН БАЙОТЕК КО.,  
ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:  
**Бай И, Гу Сянго (CN)**

(74) Представитель:  
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к технической области биомедицины. Предложено улучшенное моноклональное анти-VEGFR-2 (рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов) и его применение. Посредством метода компьютерного моделирования разработана новая фаговая библиотека антител, и после нескольких раундов скрининга получено улучшенное моноклональное анти-VEGR-2 антитело. И аффинность, и биологическая активность указанного антитела выше, чем у исходного антитела. Указанное антитело способно эффективно ингибировать связывание VEGFR-2 и его лиганда, VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), *in vitro* и может быть использовано в лечении опухоли и заболевания, вызванного ангиогенезом, такого как макулярная дегенерация.

---

**201991788**  
**A1**

**201991788**  
**A1**

## УЛУЧШЕННЫЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИ-VEGR-2 АНТИТЕЛА

### Область техники

Раскрытое изобретение относится к технической области биофармацевтических средств и, в частности, к улучшенному моноклональному антителу против рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR-2)

### Предшествующий уровень техники

Ситуация, когда рост опухоли зависит от образования новых сосудов, уже активно изучается в биологии опухолей. Кислород, питательные вещества, факторы роста, гормоны и протеолитические ферменты могут быть обеспечены посредством ангиогенеза, после чего клетки могут быть простимулированы диффундировать и перемещаться на большое расстояние, и рост и прогрессирование опухоли могут ускоряться. Ангиогенез является очень сложным динамическим процессом и регулируется многими молекулами промотирования/антиангиогенеза. Включение/выключение ангиогенеза рассматривается как злокачественный маркер, который способствует превалированию ангиогенеза над антиангиогенезом. Ось сосудистый эндотелиальный фактор роста/рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF/VEGFR) запускает несколько сигнальных сетей и, таким образом, выживание эпителиальных клеток, их митоз, перемещение и дифференцировку, сосудистую проницаемость, VEGF и их рецепторы играют центральную роль в нормальном и патологическом ангиогенезе. В многочисленных опухолях человека, показано, что дополнительный ангиогенез опухоли и экспрессия фактора ангиогенеза, способствующего опухоли, связаны с классификацией и злокачественностью опухоли.

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), также называемый фактором проницаемости сосудов, является специфической причиной митоза эндотелиальных клеток, а также является эффективным фактором индукции ангиогенеза и проницаемости, идентифицированные соответствующие рецепторы представляют собой VEGFR-1 (Flt-1, FMS-подобный тирозин 1), VEGFR-2 (который также называется KDR/Flk-1; рецептор, содержащий домен киназной вставки; киназа-1 фетальной печени), VEGFR-3(Flt4), белок нейрофиламентов-1 (нейропилин-1), белок нейрофиламентов-2. VEGFR-2 представляет собой основной рецептор VEGF на сосудистых эндотелиальных клетках и является гликопротеином, внеклеточная область этого рецептора имеет семь иммуноглобулин-подобных областей (включающих лиганд-связывающие домены и структурные домены димеризации рецептора), структурный домен тирозинкиназного катализа является внутриклеточным и рецептор в основном экспрессируется на эндотелиальных клетках и других клетках, таких как мегакарициты, клетки-предшественники сетчатки, мезенхимальные стволовые клетки и опухолевые клетки, такие как клетки меланомы, опухоли мозга и лейкозные клетки. В качестве ключевых молекул в пути передачи сигнала через конкретный фактор сосудистых эндотелиальных клеток, рецепторы VEGF и VEGFR-2 участвуют в образовании новых сосудов опухолей, главные биологические функции VEGF осуществляются посредством VEGFR-2, VEGFR-2 и VEGF превращаются в димеры после связывания, и внутриклеточные тирозиновые остатки в VEGFR-2 подвергаются самофосфорилированию, так что сигналы каскадных реакций цитомембранной/цитоплазматической киназы активируются и передаются в клеточное ядро, может быть получен ряд изменений эндотелиальных клеток, включающих

пролиферацию сосудистых эндотелиальных клеток, выживаемость, реорганизацию цитоскелета, миграцию клеток, экспрессию генов и тому подобное и, в конечном счете, вызывают гиперплазию кровеносных сосудов.

Из-за ключевой функции сигнального пути VEGF/VEGFR2 в возникновении и развитии опухолей имеется большое количество лекарственных средств для сигнального пути VEGF/VEGFR2, таких как анти-VEGF антитело бевацумаб и анти-VEGFR-2 антитело рамусирумаб.

Антитела представляют собой высокотехнологичные лекарственные средства и наибольшие сложности в биомедицине и, начиная с 2012 года, шесть из десяти лучших однокомпонентных лекарственных средств в мировых продажах являются лекарственными средствами на основе антител, так что лекарственные средства на основе антител имеют большой потенциал для развития на рынке. Технология фаговой библиотеки антител является наиболее распространенной технологией в медицинском скрининге на основе антител, технология фаговой библиотеки антител представляет собой новую технологию, разработанную на основе технологии фагового дисплея в генной инженерии антител, генный пул со всеми генами переменных областей антител различных видов может быть преобразован в белковую библиотеку, экспонируемую на поверхности фага, при этом не только удобно, быстро и эффективно получают моноклональное антитело *in vitro*, но также разработан новый способ гуманизации моноклональных антител и стимулируется развитие продуцирования моноклональных антител человека. В патенте CN10333247 В компании заявителя ряд VEGFR-2-антител подвергали скринингу и получали с использованием системы автоматизированного проектирования и технологии фаговых антител, таким образом, сделана основа для получения лекарственных средств на основе анти-VEGFR-2 антител и дальнейшие исследования компании заявителя показали, что аффинность, биологическая активность и т.п. антител, представленных в патенте, могут быть дополнительно улучшены, так что на этой основе антитела улучшены и оптимизированы на исходной основе.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

В изобретении предложено улучшенное моноклональное антитело против рецептора 2 васкуло-эндотелиального фактора роста (VEGFR-2); согласно раскрытию два высокоаффинных антитела в патенте CN10333247В используют в качестве шаблонов для компьютерного моделирования, разработана новая фаговая библиотека антител и путем многократного скрининга получено новое моноклональное анти-VEGFR-2 антитело, у которого и аффинность, и биоактивность лучше, чем у исходных запатентованных антител.

Для достижения вышеуказанной цели в изобретении предложено улучшенное моноклональное анти-VEGFR-2 антитело, включающее:

легкую цепь и тяжелую цепь, где аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи включает любую из SEQ NO.1, SEQ NO.2 или SEQ NO.3; аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи включает SEQ NO.4.

В изобретении также предложены антитело, полипептид или белок, содержащий переменную область легкой цепи или переменную область тяжелой цепи.

В изобретении также предложена полинуклеотидная последовательность или комбинация, содержащая аминокислотные последовательности переменной области легкой цепи или переменной области тяжелой цепи.

В изобретении также предложен экспрессионный вектор на основе рекомбинантной

дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), содержащей указанную полинуклеотидную последовательность или комбинацию; ДНК-последовательность экспрессионного вектора на основе рекомбинантной ДНК включает нуклеотидные последовательности для кодирования аминокислотных последовательностей переменной области тяжелой цепи, константной области тяжелой цепи, переменной области легкой цепи и константной области легкой цепи моноклонального анти-VEGFR-2 антитела.

В изобретении также предложена клетка-хозяин для трансфекции экспрессионного вектора на основе рекомбинантной ДНК, и эта клетка-хозяин включает клетку млекопитающего, клетку насекомого, клетку *Escherichia coli* или клетку дрожжей, предпочтительно клетку млекопитающего и более предпочтительно клетку HEK293E, клетку яичника китайского хомячка (CHO) или клетку NS0.

Константная область тяжелой цепи по изобретению выбрана из группы, состоящей из человеческого IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, или из группы, состоящей из мышиного IgG1, IgG2a и IgG2b.

В изобретении также предложено полное антитело, содержащее переменную область легкой цепи или переменную область тяжелой цепи и фрагмент моноклонального анти-T1h антитела, и фрагмент включает, без ограничения ими, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv или ScFv.

В изобретении также предложено одноцепочечное антитело, однодоменное антитело, биспецифическое антитело, конъюгат антитела с лекарственным средством и иммунотерапевтическое средство с использованием Т-клеток с химерными антигенными рецепторами, включающие указанную аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи или переменной области тяжелой цепи.

В изобретении также предложено моноклональное антитело, искусственный вектор, лекарственное средство или фармацевтическая композиция, содержащие указанную переменную область легкой цепи или переменную область тяжелой цепи.

В изобретении также предложен реагент для выявления или набор для выявления, содержащий указанную переменную область легкой цепи или переменную область тяжелой цепи.

Антитело может быть использовано для лечения заболеваний, вызванных ангиогенезом, и эти заболевания включают, без ограничения ими, опухоли и макулярную дегенерацию.

Когда ScFv представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент; клетки HEK293E представляют собой клетки 293E человеческих эмбриональных почек; клетки CHO представляют собой клетки яичника китайского хомячка; клетки NS0 представляют собой мышечные клетки тимомы NS0.

По сравнению с предшествующим уровнем техники данное изобретение имеет следующие преимущества:

Моноклональное анти-VEGFR-2 антитело, которое обладает более высокой аффинностью, способно хорошо ингибировать связывание VEGFR-2 и лиганда фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) *in vitro*, обладает хорошей биологической активностью *in vitro* и имеет широкие перспективы развития.

Моноклональное анти-VEGFR-2 антитело, представленное в данном описании изобретения, используют для лечения заболеваний, вызванных опухолевым ангиогенезом, включающих, без ограничения ими, раковые заболевания, такие как немелкоклеточный рак легких, метастатический немелкоклеточный рак легких, глиомы, колоректальный рак, гепатоклеточную карциному, метастатическую гепатоклеточную карциному, метастатический рак молочной железы с негативным рецептором эпидермального фактора роста человека (HER2), метастатическую аденокарциному желудка, метастатический колоректальный рак, метастатическую меланому и метастатическую карциному почечных клеток и такие заболевания, как

макулярная дегенерация

### **Краткое описание графических материалов**

На Фиг. 1 показано графическое изображение плазмиды pScFvDisb-S;

На Фиг. 2 показана относительная аффинность одноцепочечного анти-VEGFR-2 антитела при сравнении в градиентном ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ);

На Фиг. 3 показан белок, экспрессированный плазмидой pTSE;

На Фиг. 4 показано сравнение связывающих способностей моноклональных анти-VEGFR-2 антител с KDR;

На Фиг. 5 показано связывание антител по изобретению с VEGFR-2 на клеточной поверхности;

На Фиг. 6 показано влияние ингибирования пролиферации антителами по изобретению на эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC).

### **Подробное описание воплощений**

Подробные способы осуществления настоящего изобретения показаны в воплощениях, и все способы и реагенты в воплощениях являются обычными способами тестирования и обычными реагентами, если не указано иное. Воплощения используются только для описания и интерпретации раскрытия, но не являются ненадлежащими ограничениями изобретения.

В изобретении предложены улучшенное моноклональное антитело против рецептора-2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR-2), включающее:

легкую цепь и тяжелую цепь, где аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи включает любую из SEQ NO.1, SEQ NO.2 или SEQ NO.3; аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи включает SEQ NO.4.

SEQ NO.1 (последовательность 1 варибельной области легкой цепи VEGFR-2):  
DIQMTQSPSSVSASIGDRVTITCRASQAIDNWLGWYQQKPGKAPKLLIYEGSNLNTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDFAVYFCQQAQKSFPPFTFGGGTKVDIK;

SEQ NO.2 (последовательность 2 варибельной области легкой цепи VEGFR-2):  
DIQMTQSPSSVSASIGDRVTITCRASDAIDQWLGWYQQKPGKAPKLLIYEASNLDTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQANQFAVYFCQQAQKSFPPFTFGGGTKVDIK;

SEQ NO.3 (последовательность 3 варибельной области легкой цепи VEGFR-2):  
DIQMTQSPSSVSASIGDRVTITCRASQGIDQWLGWYQQKPGKAPKLLIYEGSNLNTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQANQFAVYFCQQAQKSFPPFTFGGGTKVDIK;

SEQ NO.4 (последовательность 1 варибельной области тяжелой цепи VEGFR-2):  
QVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASFTFSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDADFLLWGQGMVTVSS.

Предпочтительно, в изобретении также предложено антитело, полипептид или белок, содержащий варибельную область легкой цепи или варибельную область тяжелой цепи.

Более предпочтительно, в изобретении также предложена полинуклеотидная последовательность или комбинация, содержащая аминокислотные последовательности варибельной области легкой цепи или варибельной области тяжелой цепи.

Более предпочтительно, в изобретении также предложен экспрессионный вектор на основе рекомбинантной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), содержащий указанную полинуклеотидную последовательность или комбинацию; ДНК-последовательность экспрессионного вектора на основе

рекомбинантной ДНК включает нуклеотидные последовательности для кодирования варибельной области тяжелой цепи, константной области тяжелой цепи, варибельной области легкой цепи и константной области легкой цепи моноклонального анти-VEGFR-2 антитела.

Более предпочтительно, в изобретении также предложена клетка-хозяин для трансфекции рекомбинантного экспрессионного ДНК-вектора, и эта клетка-хозяин включает клетку млекопитающего, клетку насекомого, клетку *Escherichia coli* или дрожжей, предпочтительно клетку млекопитающего и еще более предпочтительно клетку HEK293E, клетку яичника китайского хомячка (CHO) или клетку NS0.

Более предпочтительно, константная область тяжелой цепи по изобретению выбрана из группы, состоящей из человеческого IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, или из группы, состоящей из мышиного IgG1, IgG2a и IgG2b.

Более предпочтительно, в изобретении также предложено полное антитело, содержащее варибельную область легкой цепи или варибельную область тяжелой цепи, и фрагмент моноклонального анти-T1h антитела, и этот фрагмент включает, без ограничения ими, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv или ScFv.

Более предпочтительно, в изобретении также предложено одноцепочечное антитело, однодоменное антитело, биспецифическое антитело, конъюгат антитела с лекарственным средством и иммунотерапевтическое средство с использованием Т-клеток с химерными антигенными рецепторами, включающие указанную аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи или варибельной области тяжелой цепи.

Более предпочтительно, в изобретении также предложено моноклональное антитело, искусственный вектор, лекарственное средство или фармацевтическая композиция, содержащие указанную варибельную область легкой цепи или варибельную область тяжелой цепи.

Более предпочтительно, моноклональное антитело представляет собой полностью человеческое антитело.

Более предпочтительно, в изобретении также предложен реагент для выявления или набор для выявления, содержащий указанную варибельную область легкой цепи или варибельную область тяжелой цепи.

Более предпочтительно, антитело может быть использовано для лечения заболеваний, вызванных ангиогенезом, включающих, без ограничения ими, раковые заболевания, такие как немелкоклеточный рак легких, метастатический немелкоклеточный рак легких, глиомы, колоректальный рак, гепатоклеточную карциному, метастатическую гепатоклеточную карциному, метастатический рак молочной железы с негативным рецептором эпидермального фактора роста человека (HER2), метастатическую аденокарциному желудка, метастатический колоректальный рак, метастатическую меланому и метастатическую карциному почечных клеток и такие заболевания, как макулярная дегенерация.

#### **Подробное описание воплощений**

Изобретение подробно описано с помощью графических материалов и воплощений.

#### **Воплощение 1. Биопэппинг одноцепочечных анти-VEGFR-2 антител**

Вектор pCom3 (приобретенный у Biovector Science Lab, Inc.) модифицирован посредством ряда методов клонирования генов и, таким образом, этот вектор может быть использован для создания и экспрессии фаговой библиотеки одноцепочечных антител. Модифицированный вектор назван pScFvDisb-S, графическое изображение плазмиды вектора показано на Фиг. 1, и на основе этого вектора сконструирована новая полностью синтетическая фаговая библиотека антител, основанная на последовательностях антител в

патенте CN10333247B.

Покрывают пробирку для иммунного анализа внеклеточной частью VEGFR-2 в качестве антигена, количество покрывающего антигена составляет 2 мкг/500 мкл/пробирка, и покрытие производят в течение ночи при 4°C. Соответственно блокируют пробирку для иммунного анализа и полную синтетическую фаговую библиотеку антител 4% смесью обезжиренного молочного порошка/фосфатно-солевым буфером с твином (PBST) в течение одного часа при комнатной температуре. Помещают блокированную фаговую библиотеку антител в пробирку для иммунного анализа для связывания антиген-антитело, при этом количество фага составляет примерно  $10^9$ - $10^{12}$ , и реакцию осуществляют в течение 1 часа при комнатной температуре. Несколько раз промывают PBST-фосфатным буферным раствором (PBST-PBS) для удаления не связавшихся фагов, элюируют 0,1M глицином pH 2,2 и нейтрализуют элюированный раствор фагового антитела с помощью 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 до pH примерно 7,0.

Заражают нейтрализованный фаг 10 мл бактериального раствора TG1, растущего до логарифмической фазы, оставляют на 30 минут в инкубаторе при 37°C, извлекают часть бактериального раствора для градиентного разбавления и покрывают планшет 2YTAG для расчета выхода фага. Центрифугируют оставшийся бактериальный раствор для удаления супернатанта, ресуспендируют бактерии в небольшом количестве среды, аспирируют и покрывают большой планшет 2YTAG для следующего раунда скрининга.

Соскабливают бактерии, которые инфицированы и нанесены на планшет с большого планшета, инокулируют жидкой средой 2YTAG, встряхивают до логарифмической фазы, добавляют хелперный фаг M13 для суперинфекции, культивируют в течение ночи при 28°C для амплификации фага, осаждают и очищают фаг с помощью PEG6000-NaCl для следующего раунда скрининга, в общей сложности фаговую библиотеку обогащают и подвергают скринингу три раза.

#### **Воплощение 2. Идентификация положительного клонирования анти-VEGFR-2 фагового одноцепочечного антитела**

После трех раундов скрининга отбирают моноколонии с хорошим разделением, инокулируют в глубокий 96-луночный планшет с жидкой средой 2YTAG, культивируют при 37°C и 220 об/мин до логарифмической фазы, добавляют примерно  $10^{10}$  хелперного фага M13K07 в каждую лунку и оставляют стоять и инфицироваться в течение 30 минут при 37°C. Центрифугируют при 4000 об/мин в течение 15 минут при 4°C, удаляют супернатант, ресуспендируют и осаждают бактерии с помощью 2YTAG, и культивируют в течение ночи при 28°C при 220 об/мин. Аспирируют супернатант с фагом для проведения идентификации посредством ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), при этом фаг содержит последовательность биологического антитела (аминокислотная последовательность тяжелой цепи представляет собой последовательность No.3 в CN10333247B, а аминокислотная последовательность легкой цепи представляет собой последовательность No.9 в CN10333247B) с тем же вектором, и тот же самый способ конструирования из CN10333247B используют в качестве положительного контроля (названного как 0-1), подвергают скринингу с получением моноклональных антител N-1, N-2 и N-3 с высокой аффинностью, и проводят секвенирование гена для подтверждения того, что антитела отличаются от последовательностей, указанных в патенте CN10333247B.

#### **Воплощение 3. ELISA с градиентным разведением фага для сравнения аффинности одноцепочечных анти-VEGFR-2 антител**

Выделяют и очищают моноколонии, полученные в воплощении 2, и выполняют ELISA с

градиентным разведением фага для тестирования и идентификации аффинности.

Покрывают внеклеточную область VEGFR-2 карбонатным буферным раствором с pH 9,6, при этом покрытие проводят в течение ночи в количестве 20 нг/лунка/100 мкл при 4°C. Промывают три раза PBST и блокируют в течение 1 часа 4% смесью молока-PBST при 37°C. Разбавляют очищенный фаг в виде 5-кратного градиента 4% смеси молока-PBST, помещают 100 мкл разбавленного образца в каждую лунку и оставляют стоять в течение 1 часа при комнатной температуре. Промывают планшет ELISA буфером PBST, помещают моноклональное HRP-анти-M13 антитело, разбавленное 4% смесью молока-PBST в планшете ELISA и оставляют стоять в течение 1 часа при комнатной температуре. Осуществляют окрашивание с помощью тетраметилбензидинового (ТМБ) окрашивающего набора в течение 10 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливают 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и считывают показания при 450 нм/630 нм. Результаты представлены на Фиг. 2, и показано, что все три отобранных разных одноцепочечных антитела могут специфично связываться с VEGFR-2, и у всех них способность к связыванию выше, чем у обычного антитела 0-1.

#### **Воплощение 4. Получение полных анти-KDR антител**

Соответственно клонируют гены тяжелой цепи VH и легкой цепи к трех антител N-1, N-2 и N-3 в вектор pTSE (как показано на Фиг. 3), содержащий гены константной области тяжелой и легкой цепи, и вектор pTSE для кодирования константной области человеческого IgG1 (см. SEQ. 5) и константной области цепи к (см. SEQ. 6) (вектор pTSE показан на Фиг. 3, и процесс получения представлен в абзаце [0019] на с. 3 описания CN103525868A).

SEQNO.5 (последовательность константной области человеческого IgG1):  
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG  
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG.

SEQ NO.6 (последовательность константной области цепи к):  
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST  
 LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

Выполняли временную трансфекцию в клетки HEK293E для экспрессии полного антитела, проводили очистку с помощью аффинной колонки с белком А системы АКТА с получением белка полного антитела и определяли концентрации белка с помощью набора Bicinchoninic Acid Disodium (BCA) (бицинхониновой кислоты динатриевая соль).

#### **Воплощение 5. Эксперименты по связыванию полного антитела и внеклеточной области VEGFR2**

Покрывают внеклеточную область VEGFR карбонатным буферным раствором с pH 9,6, покрытие осуществляют в количестве 20 нг/лунка/100мкл в течение ночи при 4°C. Промывают три раза 300 мкл/лунка/PBST и затем блокируют в течение 1 часа раствором 4% молока-PBST при 37°C и добавляют полные антитела, меченные биотином, с различной степенью разведения. В качестве гомотипичного контроля используют человеческий IgG (hIgG), самая высокая концентрация различных полных антител составляет 100 нг/мл, делают 8 градиентов с 5-кратным разбавлением и инкубируют в течение 2-3 часов при 37°C. Промывают пять раз 300 мкл/лунка PBST и затем инкубируют в течение 1 часа стрептавидином,



разбавленным в соотношении 1:10000 4% смесью молока-PBST, при 37°C. Промывают восемь раз 300 мкл/лунка PBST, окрашивают с помощью TMB окрашивающего набора в количестве 100 мкл/лунка в течение 10 минут при комнатной температуре и останавливают реакцию с помощью 2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Считывают показания при 450 нм/630нм. Результаты показаны на Фиг. 4, все антитела могут хорошо связываться с молекулами KDR на клеточной поверхности, N3 имеет самую высокую аффинность, а аффинность N-1, N-2 и N-3 выше, чем аффинность обычных антител 0-1.

#### **Воплощение 6. Анализ специфичности связывания полных антител и VEGFR-2 на клеточной поверхности**

Согласно изобретению, связывание разных биспецифических антител с EGFR на клеточной поверхности определяют с использованием клеток CHO со сверхэкспрессией VEGFR-2, и человеческий IgG (hIgG) используют в качестве гомотипичного контроля. Переваривают 0,25% панкреатином и центрифугируют для сбора клеток. В то же время разбавляют различные антитела с наивысшей концентрацией 100 нМ при 4-кратном градиенте. Промывают собранные клетки PBS + 1% BSA три раза, затем добавляют PBS + 1% BSA для ресуспендирования клеток, помещают клетки в 96-луночный планшет, по  $1 \times 10^5$  клеток в каждую лунку, добавляют 100 мкл разбавленных биспецифических антител и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре; центрифугируют для удаления супернатанта, промывают три раза с помощью PBS, затем ресуспендируют клетки разбавленным антителом против человеческого IgG FC, меченным Alexa488, затем инкубируют в течение 1 часа без света, при комнатной температуре, промывают три раза PBS, ресуспендируют в 100 мкл PBS и определяют интенсивность флуоресценции с помощью проточной цитометрии. Результаты анализируют с помощью Graphpad Prism. Результаты показывают, что N3 способен лучше связываться с VEGFR-2, экспрессируемым клетками, и связывающие способности всех из N1, N2 и N3 лучше, чем у 0-1 (см. Фиг. 5).

#### **Воплощение 7. Эксперимент по ингибированию пролиферации эндотелиальных клеток человеческой пупочной вены (HUVES) полными антителами**

Эндотелиальную клетку пупочной вены человека (HUVES) уже широко применяют для исследования пролиферации эндотелиальных клеток сосудов, клеточных сигнальных путей и многочисленных механизмов онкогенеза, а в описании исследовано ингибирование пролиферации HUVES разными анти-VEGFR-2 антителами. Когда клетки HUVES выросли до плотности, равной 80%, среду заменяют свежей средой EGM с 5% FBS, через 6 часов переваривают панкреатином, затем промывают переваренные клетки 4-5 раз бессывороточной средой, по возможности полностью удаляя среду после каждого центрифугирования, подсчитывают ресуспендированные клетки, инокулируют 5000 клеток/лунка в 96-луночные планшеты, избегая краевых лунок 96-луночных планшетов, помещают 100 мкл бессывороточной среды в каждую лунку, и подвергают клетки голоданию в течение ночи. Аспирируют супернатант через 14-16 часов, добавляют 50 мкл VEGF/ECM (200 нг/мл) до концентрации 100 нг/мл, равномерно смешивают с разными концентрациями разных антител и культивируют в течение 24 часов. Дополнительно добавляют ССК-8 и определяют пролиферацию клеток. Результаты показывают, что IC<sub>50</sub> (нг/л) для N1, N2 и N3 составляют 12,76; 17,32; и 10,53, соответственно, и IC<sub>50</sub> (нг/л) для 0-1 составляет 18,59; способности всех из N1, N2 и N3 ингибировать пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека выше, чем у 0-1, и N3 обладает лучшей способностью ингибировать пролиферацию (см. Фиг. 6). Воплощения 5-7 показывают, что результаты, как на молекулярном, так и на цитологическом уровне, для N1, N2 и N3 лучше, чем для 0-1 оптимального антитела исходного патента CN103525868A, а это

означает, что молекулы-кандидаты данного патента имеют хорошие перспективы для развития и применения.

Антитело можно использовать для лечения заболеваний, вызванных опухолевым ангиогенезом, включающих, без ограничения ими, раковые заболевания, такие как немелкоклеточный рак легких, метастатический немелкоклеточный рак легких, глиомы, колоректальный рак, гепатоклеточную карциному, метастатическую гепатоклеточную карциному, метастатический рак молочной железы с отрицательными HER2, метастатическую аденокарциному желудка, метастатический колоректальный рак, метастатическую меланому и метастатическую карциному клеток почечного эпителия, и такие заболевания, как макулярная дегенерация.

Для специалистов в данной области указанные воплощения только иллюстративно описывают изобретение, и очевидно, что конкретные реализации изобретения не ограничены упомянутыми выше вариантами. Любые несущественные улучшения на основе идей и технических схем изобретения или применения идей и технических схем изобретения без улучшения применительно к другим ситуациям попадают в объем защиты данного изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Моноклональное анти-VEGFR-2 антитело, содержащее легкую цепь и тяжелую цепь, где аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи содержит любую из SEQ NO.1, SEQ NO.2 или SEQ NO.3; и аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи содержит SEQ NO.4.

2. Антитело, полипептид или белок, содержащее(ий) варибельную область легкой цепи или варибельную область тяжелой цепи по п. 1.

3. Полинуклеотидная последовательность или комбинация, содержащая аминокислотные последовательности варибельной области легкой цепи или варибельной области тяжелой цепи по п. 1.

4. Экспрессионный вектор на основе рекомбинантной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), содержащий полинуклеотидную последовательность или комбинацию по п. 3, где ДНК-последовательность экспрессионного рекомбинантного ДНК-вектора содержит нуклеотидные последовательности для кодирования аминокислотных последовательностей варибельной области тяжелой цепи, константной области тяжелой цепи, варибельной области легкой цепи и константной области легкой цепи моноклонального анти-VEGFR-2 антитела.

5. Клетка-хозяин для трансфекции экспрессионного рекомбинантного ДНК-вектора по п. 4, включающая клетку млекопитающего, клетку насекомого, клетку *Escherichia coli* или дрожжей, предпочтительно клетку млекопитающих и еще более предпочтительно клетку HEK293E, клетку CHO (клетка яичника китайского хомячка) или клетку NS0.

6. Моноклональное антитело по п. 1, где константная область тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из человеческих IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, или из группы, состоящей из мышинных IgG1, IgG2a и IgG2b.

7. Полное антитело, содержащее варибельную область легкой цепи или варибельную область тяжелой цепи по п. 1 или фрагмент моноклонального анти-T1h антитела, где фрагмент содержит, без ограничения ими, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv или ScFv.

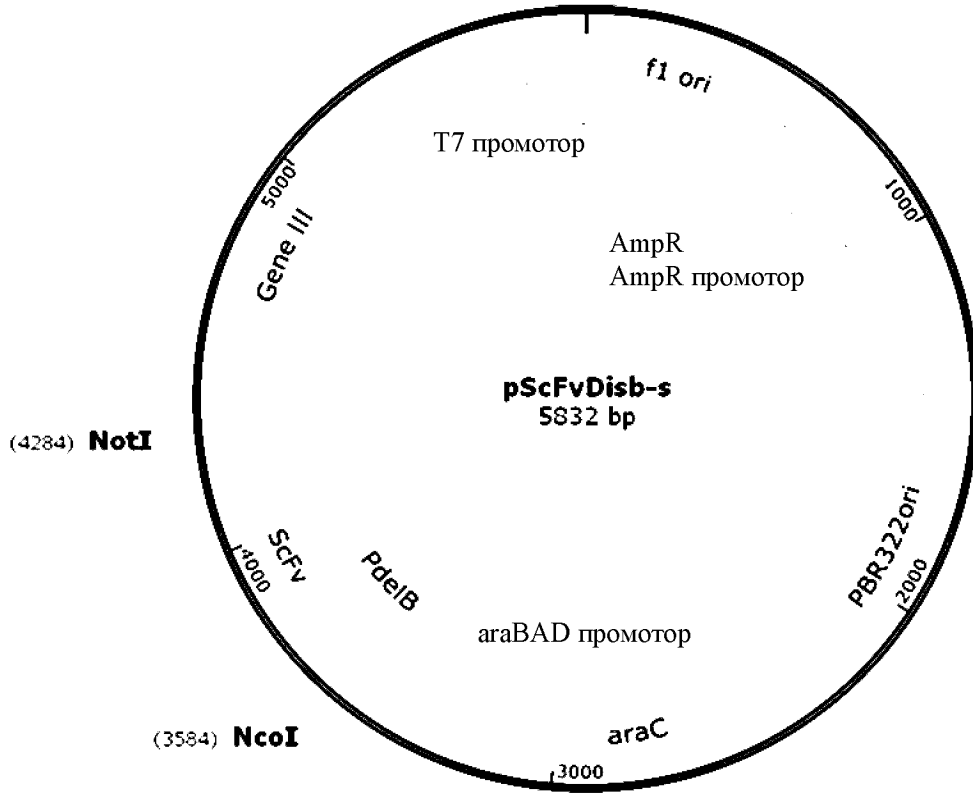
8. Однопочечное антитело, однодоменное антитело, биспецифическое антитело, конъюгат антитела с лекарственным средством и иммунотерапевтическое средство с использованием Т-клеток с химерными антигенными рецепторами, содержащие аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи или варибельной области тяжелой цепи по п. 1.

9. Моноклональное антитело, искусственный вектор, лекарственное средство или фармацевтическая композиция, содержащие варибельную область легкой цепи или варибельную область тяжелой цепи по п. 1.

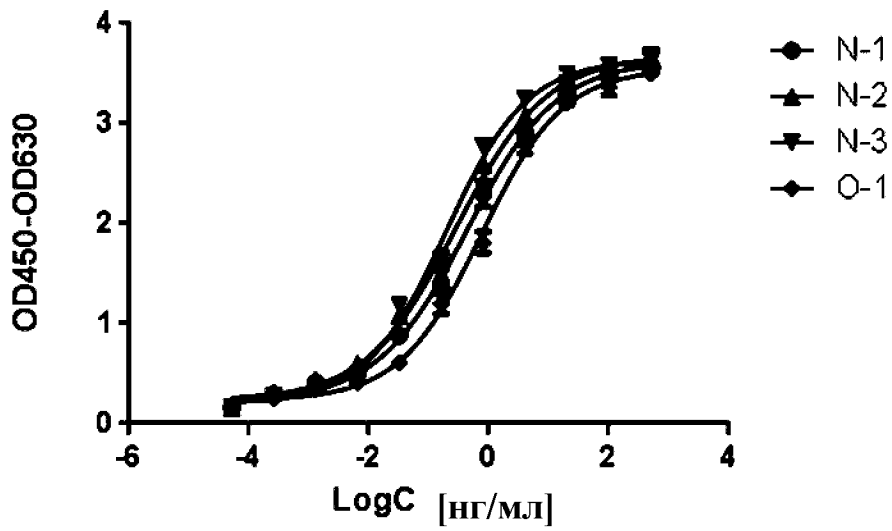
10. Моноклональное антитело по п. 1, представляющее собой полностью человеческое антитело.

11. Реагент для обнаружения или набор для обнаружения, содержащий варибельную область легкой цепи или варибельную область тяжелой цепи по п. 1.

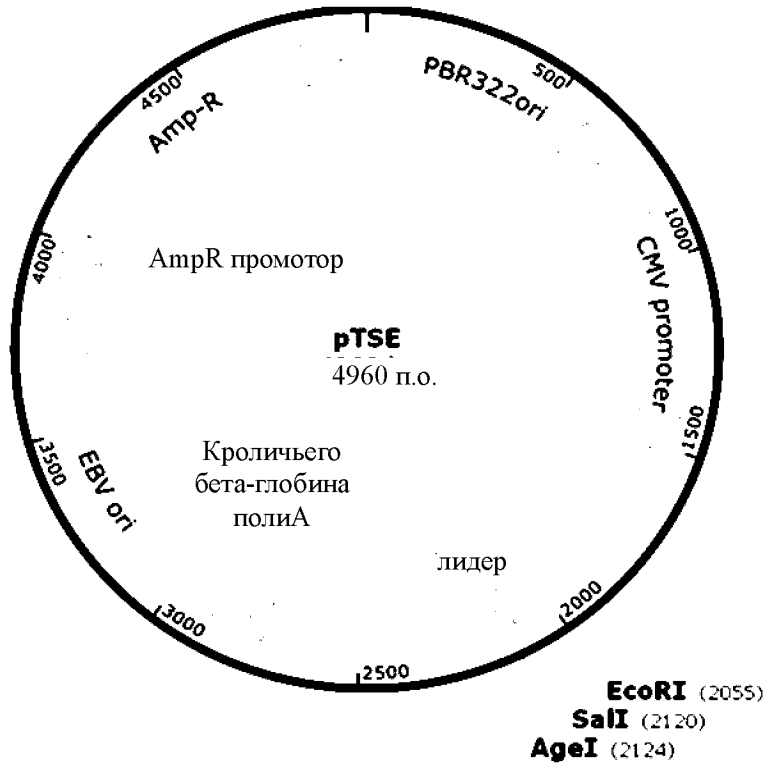
12. Антитело, содержащее варибельную область легкой цепи или варибельную область тяжелой цепи по п. 1 для лечения заболеваний, вызванных ангиогенезом, и эти заболевания включают раковые заболевания и макулярную дегенерацию.



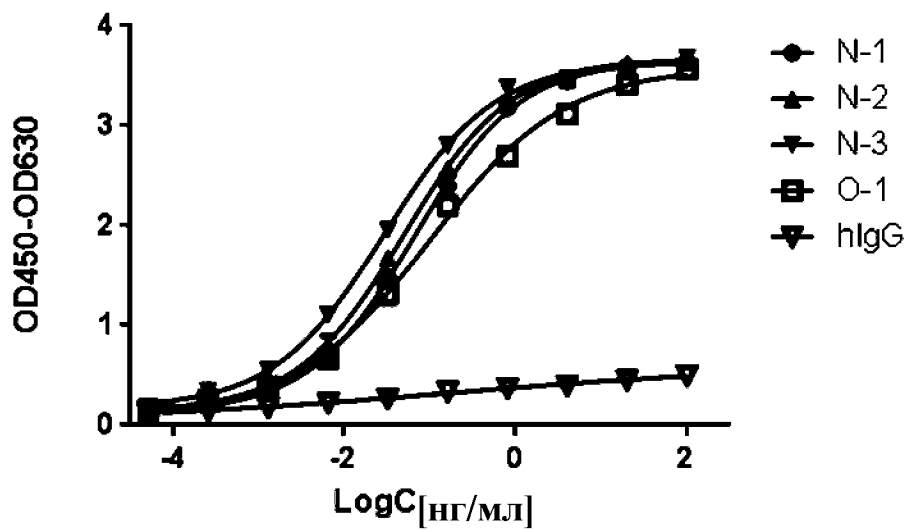
Фиг. 1



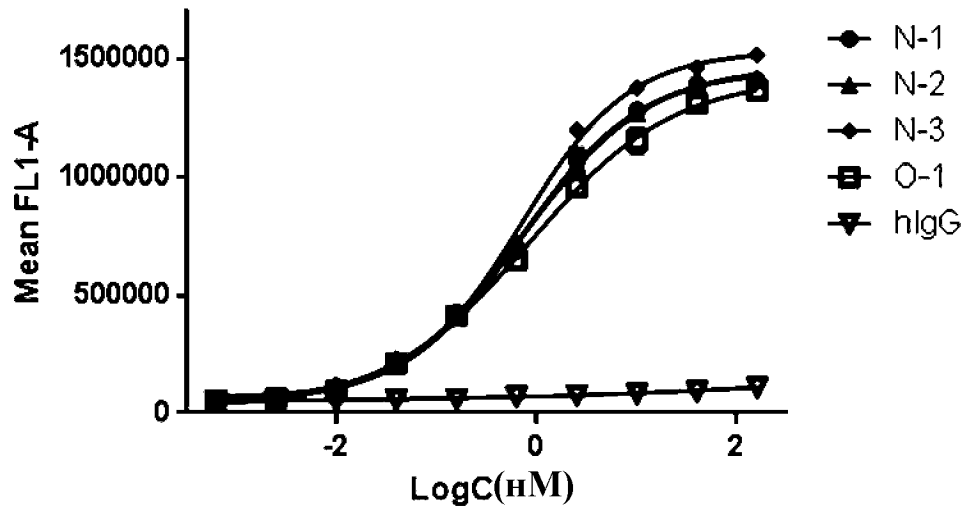
Фиг. 2



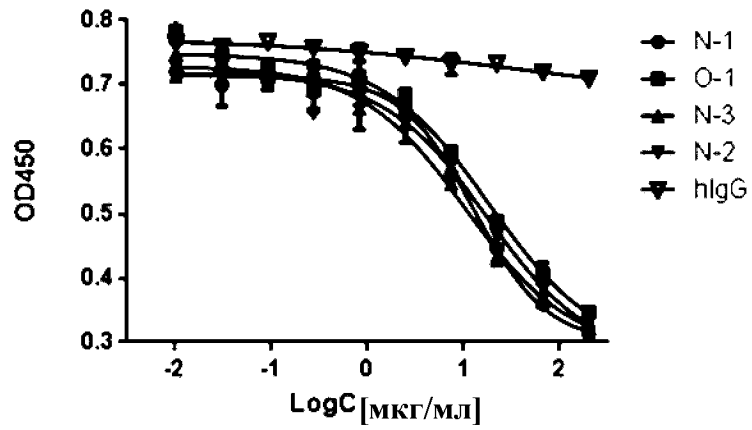
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6