

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091786** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.10.20

(51) Int. Cl. *A61K 38/00* (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.01.25

(54) **СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АНГИОГЕННЫХ РАССТРОЙСТВ С ПРИМЕНЕНИЕМ АГЕНТОВ ПРОТИВ ФРЭС**

(31) **62/622,382**

(72) Изобретатель:

(32) **2018.01.26**

Феррара Наполеоне (US)

(33) **US**

(74) Представитель:

(86) **PCT/US2019/015160**

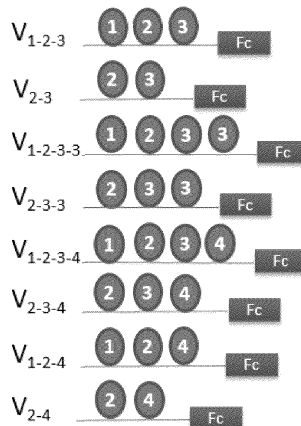
Медведев В.Н. (RU)

(87) **WO 2019/147944 2019.08.01**

(71) Заявитель:

**ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ
(US)**

(57) Предложены способы и композиции для лечения ангиогенных расстройств с применением агентов против ФРЭС. Агенты против ФРЭС содержат ФРЭС-связывающие домены и обладают способностью связывать стекловидное тело. Предложены иллюстративные варианты осуществления слитых белков Fc-IgG с ФРЭС-связывающими доменами с сильными характеристиками связывания гепарина, сильным ингибированием митогенной активности ФРЭС и улучшенной фармакокинетикой, а именно более длительными периодами полувыведения агентов против ФРЭС и, следовательно, менее частым введением доз.



**202091786
A1**

**202091786
A1**

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564164EA/042

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АНГИОГЕННЫХ РАССТРОЙСТВ С ПРИМЕНЕНИЕМ АГЕНТОВ ПРОТИВ ФРЭС

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/622382, поданной 26 января 2018 г., которая включена в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Указанная ASCII-копия, созданная 25 января 2019 года, называется 24978-0470_SL.txt и имеет размер 50,960 байт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Развитие неоваскулярного питания или ангиогенеза играет важную гомеостатическую роль, поскольку кровеносные сосуды переносят питательные вещества к тканям и органам и выводят продукты катаболизма¹. Однако неконтролируемый рост кровеносных сосудов может стимулировать или облегчать многочисленные патологические процессы, включая опухоли и внутриглазные сосудистые нарушения¹. Хотя первоначально было идентифицировано и охарактеризовано несколько ангиогенных факторов (например, ЭФР, ТФР- α , ТФР- β , кФРФ, оФРФ, ангиогенин)² работа, проведенная за последние три десятилетия, установила критическую роль ФРЭС-А (далее ФРЭС) в нормальном и патологическом ангиогенезе^{3,4}. ФРЭС является членом семейства генов, которое также включает PlGF, ФРЭС-В, ФРЭС-С и ФРЭС-Д. Сообщалось, что три родственные рецепторные тирозинкиназы (РТК) связывают лиганды ФРЭС: VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3. PlGF и ФРЭС-В селективно взаимодействуют с VEGFR-1, ФРЭС связывает как VEGFR-1, так и VEGFR-2. Третий член этого семейства РТК, VEGFR-3, связывает ФРЭС-С и ФРЭС-Д, которые участвуют в лимфангиогенезе. Каждый член этого класса РТК имеет семь иммуноглобулин (Ig) -подобных доменов во внеклеточной части⁷. Существует мнение, что VEGFR-2 является основным сигнальным рецептором ФРЭС⁵. Однако VEGFR-1 связывает ФРЭС с существенно более высокой аффинностью связывания, чем VEGFR-3.

[0004] Ингибиторы ФРЭС стали стандартом терапии при множественных опухолях и произвели революцию в лечении внутриглазных неоваскулярных расстройств, таких как неоваскулярная форма возрастной макулярной дегенерации (ВМД), пролиферативная диабетическая ретинопатия и окклюзия вен сетчатки, которые являются основными причинами тяжелой потери зрения и практической слепоты^{8,4}. В настоящее время в США по показаниям в офтальмологии широко используются три лекарственных средства против ФРЭС: бевацизумаб, ранибизумаб и афлиберцепт⁴. Бевацизумаб представляет собой полноразмерное антитело IgG, нацеленное на ФРЭС⁹. Хотя бевацизумаб не был

разработан для показаний в офтальмологии, он широко используется не по назначению из-за его низкой стоимости. Ранибизумаб представляет собой анти-ФРЭС Fab с созревшей аффинностью¹⁰. Афлиберцепт представляет собой слитый белок IgG-Fc 11¹², с элементами из VEGFR-1 и VEGFR-2, связывающими ФРЭС, PIGF и ФРЭС-B13. Конберцепт представляет собой растворимый рецептор ФРЭС, структурно связанный с афлиберцептом, широко используемый для лечения внутриглазной неоваскуляризации в Китае¹⁴. Миллионы пациентов во всем мире прошли курс лечения этими лекарственными средствами. Важно отметить, что после пятилетнего лечения ранибизумабом или бевацизумабом примерно у половины пациентов с неоваскулярной ВМД было хорошее зрение, т. е. острота зрения была 20/40 или выше, что было недостижимо до того, как стали доступны лекарственные средства против ФРЭС¹⁵.

[0005] Однако в условиях реальной клинической практики многие пациенты получают меньше инъекций анти-ФРЭС, чем в клинических испытаниях, и было высказано предположение, что это может коррелировать с плохими визуальными исходами¹⁶. Действительно, необходимость выполнения относительно частых интравитреальных инъекций препятствовала соблюдению пациентом режима и схемы лечения и, в конечном итоге, преимуществам терапии, особенно в некоторых странах¹⁶. Следовательно, существует необходимость в разработке агентов с более длительным действием при инъекции в глаз, таким образом, снижая частоту инъекций, и было предпринято несколько попыток приблизиться к этой цели^{17, 18}. Афлиберцепт (Эйлеа) был одобрен на основании клинических испытаний, которые продемонстрировали, что каждое 8-недельное введение дозы 2 мг может соответствовать эффективности ежемесячного введения ранибизумаба (0,5 мг). Однако, несмотря на прогноз, что переход на афлиберцепт снизит число интравитреальных инъекций, недавние исследования продемонстрировали, что это не так¹⁹. Следовательно, все еще существует неудовлетворенная медицинская потребность в интравитреальных агентах против ФРЭС с улучшенным периодом полувыведения.

[0006] В 1996 г. Davis-Smyth et al²⁰ (см. также патент США № 5952199) сообщили, что домен (D) 2 VEGFR-1 является критическим связывающим элементом для ФРЭС и PIGF. Удаление D2 полностью устранило связывание. Замена D2 VEGFR-3 на D2 VEGFR-1 придает VEGFR-3 лигандную специфичность VEGFR-120. В последующей работе описано взаимодействие между D2 и ФРЭС (или PIGF) при помощи рентгеновской кристаллографии²¹⁻²³.

[0007] Первоначальные исследования привели к созданию конструктора с характеристиками связывания полноразмерного ФРЭС, содержащего первые три Ig-подобных D из VEGFR-1, слитых с Fc-IgG (Flt-1-3-IgG)²⁰. Flt-1-3-IgG продемонстрировал сильную способность нейтрализовать ФРЭС *in vitro* и *in vivo*²⁴⁻²⁷. Однако присутствие D3, который обладает значительной аффинностью к гепарину из-за наличия кластеров основных остатков, что приводит к связыванию с HSPG в различных тканях, замедляла период полувыведения из кровотока этой молекулы. В 2002 году Holash и др.¹³ (патент

США №7070959) описали слитый конструктор IgG, содержащий D2 VEGFR-1 (связывающий элемент) и D3 VEGFR2, который имеет гораздо более слабую аффинность к гепарину по сравнению с D3 VEGFR-1. Сообщалось, что эта молекула, известная сегодня как афлиберцепт (продается как Эйлеа), имеет более длительный период полувыведения по сравнению с Flt (1-3-IgG) после системного введения¹³, что явно является преимуществом для нацеливания лечения, например, по показаниям в онкологии.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Данное изобретение обеспечивает композиции и способы ингибирования ангиогенеза и лечения патологических состояний, связанных с ФРЭС, таких как болезни глаз, включая, помимо прочего, возрастную дегенерацию желтого пятна, пролиферативную диабетическую ретинопатию, окклюзию вен сетчатки, хориоидальную неоваскуляризацию, вторичную по отношению к миопии, ретинопатию недоношенных, диабетический макулярный отек, полипидную хориоидальную васкулопатию, включающий введение агента против ФРЭС, который ингибирует активность ФРЭС и, в то же время, обладает сильными характеристиками связывания гепарина, обеспечивая тем самым превосходную фармакокинетику, а именно, более длительный период полувыведения терапевтического агента после интравитреального введения.

[0009] В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает композиции и способы лечения патологических состояний, при которых местное прямое введение агента против ФРЭС является полезным, например, для лечения и предотвращения пролиферативных состояний, связанных с эндотелиальными клетками, или ангиогенеза, например, при лечении солидных опухолей, таких как но не ограничиваясь этим, интракраниальное введение при глиобластомах.

[0010] В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает агент против ФРЭС, причем агент против ФРЭС представляет собой конструктор Fc-IgG, объединяющий домены с характеристиками связывания ФРЭС, и домены, которые связывают гепариновые протеогликаны. В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает агент против ФРЭС, причем агент против ФРЭС представляет собой конструктор Fc-IgG, обладающий способностью связывать гепарин, и содержит один или более доменов с характеристиками связывания ФРЭС. В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает агент против ФРЭС, причем агент против ФРЭС представляет собой слитый белок с улучшенной эффективностью для связывания с ФРЭС и гепарином. В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает агент против ФРЭС, причем агент против ФРЭС представляет собой слитый белок с очень низким уровнем эндотоксина.

[0011] В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает агент против ФРЭС, причем агент против ФРЭС представляет собой химерный белок IgG, содержащий элементы рецепторов ФРЭС. В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает химерный белок IgG, причем химерный белок IgG содержит один или более фрагментов семи иммуноглобулин (Ig)-подобных доменов во внеклеточной части

тирозинкиназных рецепторов ФРЭС. В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает химерный белок IgG, причем химерный белок IgG содержит один или более фрагментов внеклеточного домена VEGFR-1, слитых с Fc-IgG. В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает химерный белок IgG, содержащий по меньшей мере один домен 2 VEGFR-1, связывающий ФРЭС, и по меньшей мере один дополнительный домен 1 или 3 VEGFR-1 и не содержащий домен 4. В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает химерный белок IgG, причем химерный белок IgG содержит один или более фрагментов внеклеточного домена VEGFR-2, слитых с Fc-IgG. В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает химерный белок IgG, причем химерный белок IgG содержит один или более фрагментов внеклеточного домена VEGFR-1 и VEGFR-2, слитых с Fc-IgG.

[0012] В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивают агент против ФРЭС, содержащий часть, связывающую ФРЭС, функционально связанную с Fc-IgG, причем часть, связывающая ФРЭС, содержит по меньшей мере один домен, связывающий ФРЭС, который является IgG-подобным доменом 2 VEGFR-1, и причем агент против ФРЭС обладает большей способностью ингибировать стимулируемый ФРЭС митогенез, чем афлиберцепт. В вариантах осуществления данное изобретение предусматривает, что агент против ФРЭС обладает большей способностью связывать стекловидное тело, чем афлиберцепт. В вариантах осуществления данное изобретение предусматривает, что агент против ФРЭС обладает способностью ингибировать стимулируемую ФРЭС пролиферацию эндотелиальных клеток в стекловидном теле, большей, чем афлиберцепт. В вариантах осуществления данное изобретение предусматривает, что агент имеет увеличенный период полувыведения *in vivo* по сравнению с афлиберцептом.

[0013] В вариантах осуществления данное изобретение предусматривает, что часть, связывающая ФРЭС, состоит по существу из IgG-подобных доменов 1, 2 и 3 VEGFR-1 (V_{1-2-3}). В вариантах осуществления агент против ФРЭС содержит аминокислотную последовательность, как определено в SEQ ID No: 1.

[0014] В вариантах осуществления данное изобретение предусматривает, что часть, связывающая ФРЭС, состоит по существу из IgG-подобных доменов 2 и 3 VEGFR-1 (V_{2-3}). В вариантах осуществления агент против ФРЭС содержит аминокислотную последовательность, как определено в SEQ ID No: 3.

[0015] В вариантах осуществления данное изобретение предусматривает, что часть, связывающая ФРЭС, состоит по существу из IgG-подобных доменов 1, 2, 3 и 3 VEGFR-1 ($V_{1-2-3-3}$). В вариантах осуществления агент против ФРЭС содержит аминокислотную последовательность, как определено в SEQ ID No: 5.

[0016] В вариантах осуществления данное изобретение предусматривает, что часть, связывающая ФРЭС, состоит по существу из IgG-подобных доменов 2, 3 и 3 VEGFR-1 (V_{2-3-3}). В вариантах осуществления агент против ФРЭС содержит аминокислотную последовательность, как определено в SEQ ID No: 7.

[0017] В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает

фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество агента против ФРЭС, как определено в формуле изобретения, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает способы лечения расстройства, связанного с ФРЭС, у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества агента против ФРЭС, как определено. Агент против ФРЭС может быть непосредственно введен в пораженную ткань или орган, такой как глаз.

[0018] В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает способ лечения болезни глаз, в котором агент против ФРЭС вводят локально в глаз в дозировке, соответствующей молярному соотношению 2: 1 относительно ФРЭС. В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает способ лечения болезни глаз, в котором агент против ФРЭС вводят внутривенно. В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает способ лечения болезни глаз, в котором агент против ФРЭС вводят каждые 4-6 недель, а в других вариантах осуществления лечение продолжают в течение по меньшей мере одного года.

[0019] В соответствии с одним вариантом осуществления данное изобретение обеспечивает способ лечения болезни глаз, включающий введение терапевтически эффективного количества агента против ФРЭС локально в глаз, причем лечение эффективно для лечения оккультных, минимально классических и преимущественно классических форм влажной макулярной дегенерации, при этом агент представляет собой слитый белок.

[0020] В вариантах осуществления изобретение может быть применено для лечения широкого спектра связанных с ФРЭС расстройств, включая неоваскулярную возрастную макулярную дегенерацию, хориоидальную неоваскуляризацию, вторичную по отношению к миопии, пролиферативную диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, непроходимость сосудов сетчатки, такую как окклюзия вен сетчатки, опухоли глаза, синдром фон Гиппеля-Линдау, ретинопатию недоношенных, полипоидную хориоидальную васкулопатию, колоректальный рак, рак легкого, рак шейки матки, рак эндометрия, рак яичников, рак почки, шванномы, глиомы, эпендимомы и опухолевые и неопухолевые заболевания, при которых полезна терапия анти-ФРЭС.

[0021] Согласно другому аспекту данное изобретение обеспечивает фармацевтический состав, содержащий агент против ФРЭС в фармацевтически приемлемом составе-носителе, для местного введения, например, в глаз.

[0022] В вариантах осуществления в данном изобретении описываются новые конструкты, причем конструкты сильно нейтрализуют активность ФРЭС, в то же время обладая сильными характеристиками связывания гепарина.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0023] Лучшее понимание свойств и преимуществ данного изобретения будет получено на основе следующего подробного описания, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы

изобретения, и сопроводительных графических материалов, в которых:

[0024] На Фиг. 1 показано схематическое представление иллюстративных сконструированных слитых белков с различными Ig-подобными внеклеточными доменами VEGFR-1 (V), слитыми с Fc-IgG (Fc). Показаны следующие конструкторы: V₁₋₂₋₃-Fc; V₂₋₃-Fc; V₁₋₂₋₃₋₃-Fc; V₂₋₃₋₃-Fc; V₁₋₂₋₃₋₄-Fc; V₂₋₃₋₄-Fc; V₁₋₂₋₄-Fc и V₂₋₄-Fc.

[0025] На Фиг. 2 описана стратегия конструирования и экспрессии плазмиды.

[0026] На Фиг. 3 показана аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты конструктора V₁₋₂₋₃. SEQ ID No: 1 и SEQ ID No: 2, соответственно.

[0027] На Фиг. 4 показана аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты конструктора V₂₋₃. SEQ ID No: 3 и SEQ ID No: 4, соответственно.

[0028] На Фиг. 5 показана аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты конструктора V₁₋₂₋₃₋₃. SEQ ID No: 5 и SEQ ID No: 6, соответственно.

[0029] На Фиг. 6 показана аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты конструктора V₂₋₃₋₃. SEQ ID No: 7 и SEQ ID No: 8, соответственно.

[0030] На Фиг. 7 показана аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты конструктора V₁₋₂₋₃₋₃₋₄. SEQ ID No: 9 и SEQ ID No: 10, соответственно.

[0031] На Фиг. 8 показана аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты конструктора V₂₋₃₋₄. SEQ ID No: 11 и SEQ ID No: 12, соответственно.

[0032] На Фиг. 9 показана аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты конструктора V₂₋₄. SEQ ID No: 13 и SEQ ID No: 14, соответственно.

[0033] На Фиг. 10 показана экспрессия конструкторов VEGFR-1 в клетках 293.

[0034] На Фиг. 11 показаны окрашенные серебром ПААГ гели в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях 200 нг каждого Fc-слитого белка VEGFR-1 по сравнению с Эйлеа.

[0035] На Фиг. 12 показаны ингибирующие эффекты химерных белков на основе рецептора ФРЭС на стимулируемую ФРЭС пролиферацию эндотелиальных клеток.

[0036] На Фиг. 13 показана конкуренция ФРЭС за связывание с растворимым рецептором VEGFR1 с биотинилированным ФРЭС (при 100 нг/мл).

[0037] На Фиг. 14 показано связывание растворимого рецептора VEGFR-1 с биотинилированным ФРЭС и бычьим стекловидным телом.

[0038] На Фиг. 15 показан связанный с бычьим стекловидным телом V₁₋₂₋₃₋₃, являющийся биологически активным.

[0039] На Фиг. 16 показано влияние контрольных Fc-слитых белков контрольного

IgG, Эйлеа или VEGFR-1 на область хориоидальной неоваскуляризации (ХНВ). Каждый белок вводили мышам интравитреально в дозе 2,5 мг за один день до обработки лазером. Эйлеа была проверена также в дозе 25 мг. Звездочки обозначают значительные различия (критерий Стьюдента) по сравнению с соответствующими контрольными группами IgG (**p < 0,01, *p < 0,05).

[0040] На Фиг. 17А и 17В показаны эффекты Эйлеа, V_{1,2,3,3} или контрольного IgG на область ХНВ после однократного интравитреального введения (2,5 мг), за 1 сутки, 7 суток или 14 суток до обработки лазером. Звездочкой обозначены достоверные различия (p < 0,05, критерий Стьюдента) по сравнению с контрольной группой IgG. На Фиг. 17В показаны репрезентативные иммуофлуоресцентные изображения CD31 групп из Фиг. 17А.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0041] Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

[0042] Понятно, что аспекты и варианты осуществления изобретения, описанные в данном документе, включают «состоящий» и/или «состоящие по существу из» аспектов и вариантов осуществления. Другие объекты, преимущества и особенности данного изобретения станут очевидными из следующего описания, взятого вместе с прилагаемыми фигурами.

[0043] При введении элементов данного изобретения или его предпочтительного(ых) варианта(ов) осуществления единственное число и термин «указанный(ые)» предназначены для обозначения одного или более элементов. Термины «содержащий», «включающий» и «имеющий» предназначены для включения и означают, что могут быть дополнительные элементы, отличные от перечисленных элементов.

[0044] Используемые в данном документе термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеет», «имеющий», «содержит», «содержащий», «характеризующийся» или любой другой их вариант, предназначены для охвата неисключительного включения перечисленных компонентов с учетом явно указанного любого ограничения. Например, слитый белок, фармацевтическая композиция и/или способ, который «содержит» перечисленные элементы (например, компоненты, признаки или стадии), необязательно ограничен только этими элементами (или компонентами или стадиями), но может включать другие элементы (или компоненты или стадии), явно не перечисленные или несвойственные слитому белку, фармацевтической композиции и/или способу.

[0045] Используемые в данном документе переходные фразы «состоит из» и «состоящий из» исключают любой неуказанный элемент, стадию или компонент. Например, «состоит из» или «состоящий из», используемых в формуле изобретения, ограничит требования к компонентам, материалам или стадиям, конкретно

перечисленными в формуле изобретения, за исключением примесей, как правило, связанных с ними (то есть примесей в данном компоненте). Когда фраза «состоит из» или «состоящий из» появляется в отличительной части пункта, а не сразу после родового понятия, фраза «состоит из» или «состоящий из» ограничивает только элементы (или компоненты или стадии), изложенные в этом отличительной части; другие элементы (или компоненты) не исключаются из пункта в целом.

[0046] Используемые в данном документе переходные фразы «по существу состоят из» и «состоящие по существу из» используются для определения слитого белка, фармацевтической композиции и/или способа, который включает материалы, стадии, признаки, компоненты или элементы, в дополнение к тем, которые буквально раскрыты, при условии, что эти дополнительные материалы, стадии, признаки, компоненты или элементы не оказывают существенного влияния на основные и новые признаки заявленного изобретения. Термин «состоящий по существу из» занимает промежуточное положение между «включающим» и «состоящим из».

[0047] Используемый в данном документе термин «фармацевтическая композиция» подразумевает композиции, содержащие один или более терапевтических агентов или лекарственных средств, как описано ниже, и один или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, наполнителей или носителей.

[0048] Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, наполнители или носители» включает любые приемлемые материалы и/или любые одну или более добавок, известных в данной области техники. Используемые в данном документе термины «вспомогательные вещества», «наполнители» или «носители» относятся к материалам, подходящим для введения лекарственного средства посредством различных обычных способов введения, известных в данной области техники. Вспомогательные вещества, наполнители и носители, используемые в данном документе, включают любые такие материалы, известные в данной области техники, которые являются нетоксичными и не взаимодействуют вредным образом с другими компонентами композиции и, как правило, относятся к вспомогательному веществу, разбавителю, консерванту, солюбилизатору, эмульгатору, адьюванту и/или носителю, с которым вводят активный агент или лекарственный агент. Такие носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая нефтяные масла, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п., полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители. Противобактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; и агенты для регулирования тонуса, такие как хлорид натрия или декстроза, также могут быть носителями. Способы получения композиций в комбинации с носителями известны специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления язык «фармацевтически

приемлемый носитель» предназначен для включения любых и всех растворителей, дисперсионных сред, покрывающих агентов, изотонических и задерживающих абсорбцию агентов и тому подобного, совместимых с фармацевтическим введением. Применение таких сред и средств в отношении фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники.

[0049] Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к тем количествам, которые при введении конкретному субъекту с учетом характера и тяжести патологического состояния этого субъекта будут иметь желаемый терапевтический эффект, например, количество, которое будет лечить, предотвращать, подавлять или по меньшей мере частично останавливать или частично предотвращать целевое патологическое состояние. В некоторых вариантах осуществления термин «терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» относится к количеству терапевтического агента или лекарственного средства, которое при введении отдельно или в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом или лекарственным средством в клетку, ткань, орган или субъекту эффективно для профилактики или ослабления болезней глаз и злокачественных новообразований, включая, помимо прочего, возрастную макулярную дегенерацию, пролиферативную диабетическую ретинопатию, окклюзию вен сетчатки, хориоидальную неоваскуляризацию, вторичную по отношению к миопии; ретинопатию недоношенных, диабетический макулярный отек, полипидную хориоидальную васкулопатию, колоректальный рак, рак легкого, рак молочной железы, рак поджелудочной железы и рак простаты. Терапевтически эффективная доза, кроме того, относится к количеству терапевтического агента или лекарственного средства, достаточному для того, чтобы привести к ослаблению симптомов, например, лечению, заживлению, профилактике или улучшению соответствующего заболевания, или увеличению скорости лечения, заживления или предотвращения, или ослабления таких патологических состояний. При применении к отдельному активному ингредиенту, вводимому отдельно, терапевтически эффективная доза относится только к этому ингредиенту. При применении к комбинации терапевтически эффективная доза относится к объединенным количествам активных ингредиентов, которые приводят к терапевтическому эффекту, независимо от того, вводятся ли они в комбинации, последовательно или одновременно.

[0050] Используемые в данном документе термины «лечение», «процесс лечения» или «облегчение» относятся к терапевтическому лечению, цель которого заключается в том, чтобы замедлить (уменьшить), если не вылечено целевое патологическое состояние или расстройство или предотвратить рецидив этого патологического состояния. Субъект успешно «лечится», если после получения терапевтического количества терапевтического агента или лекарственного средства субъект демонстрирует заметное и/или измеримое уменьшение или отсутствие одного или более признаков и симптомов конкретного патологического состояния. Субъект также может ощущать уменьшение признаков или симптомов патологического состояния. Субъект также считается леченым, если у него

стабильное состояние. В некоторых вариантах осуществления лечение терапевтическим агентом или лекарственным средством эффективно для того, чтобы у субъектов не было симптомов через 3 месяца после лечения, предпочтительно через 6 месяцев, более предпочтительно через год, еще более предпочтительно через 2 или более лет после лечения. Эти параметры для оценки успешного лечения и облегчения патологического состояния легко измерить с помощью рутинных процедур, известных врачу с соответствующей квалификацией в данной области техники.

[0051] Используемый в данном документе термин «профилактическое» лечение означает отсрочку развития патологического состояния или симптома патологического состояния, подавление симптомов, которые могут появиться, или уменьшение риска развития или рецидива патологического состояния или симптома. Терапия, направленная на «излечение», включает уменьшение степени тяжести или подавление ухудшения существующего симптома или патологического состояния.

[0052] Используемый в данном документе термин «терапевтический агент», «агент против ФРЭС», «слитый белок», «химерный белок» или «рекомбинантный белок» включает первый полипептид, функционально связанный со вторым полипептидом, причем «терапевтический агент», «агент против ФРЭС», «слитый белок», «химерный белок» или «рекомбинантный белок» ингибирует активность ФРЭС. Химерные белки могут необязательно содержать третий, четвертый, или пятый, или другой полипептид, функционально связанный с первым или вторым полипептидом. Химерные белки могут содержать два или более разных полипептидов. Химерные белки могут содержать несколько копий одного и того же полипептида. Химерные белки также могут содержать одну или более мутаций в одном или более полипептидах. Способы получения химерных белков хорошо известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления термин «терапевтический агент», «слитый белок», «химерный белок» или «рекомбинантный белок» относится к любым конструктам, экспрессируемым или синтезированным, включая, но не ограничиваясь ими, пептиды или белки, функционально связывающие один или более Ig-подобных доменов или фрагментов доменов VEGFR-1 и/или VEGFR-2 с Fc-IgG.

[0053] Термин «Ig-подобные домены» относится к Ig-подобным доменам 1-7 VEGFR-1 и VEGFR-2. Термин «фрагменты Ig-подобного домена» включает часть полноразмерного домена, как правило, связывающую гепарин и/или ФРЭС или его переменную область. Примеры фрагментов домена включают аминокислотные последовательности, содержащие сегмент из по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, 90%, 95%, и наиболее предпочтительно 99% полноразмерного домена со 100% идентичностью последовательностей и их вариациями. Вариации в аминокислотных последовательностях слитых белков рассматриваются как охватываемые данным описанием, при условии, что вариации в аминокислотной последовательности сохраняют по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, 90%, 95%, и наиболее предпочтительно 99%. Между ними включены

определенные проценты, такие как 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% и 99% идентичности последовательностей. В частности, предусматриваются консервативные аминокислотные замещения. Консервативными замещениями являются те, которые происходят в пределах семейства аминокислот, родственных по их боковым цепям. Генетически кодируемые аминокислоты, как правило, делят на семейства: (1) кислые аминокислоты представляют собой аспартат, глутамат; (2) основные аминокислоты представляют собой лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные аминокислоты представляют собой аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан, и (4) незаряженные полярные аминокислоты представляют собой глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Гидрофильные аминокислоты включают аргинин, аспарагин, аспартат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобные аминокислоты включают аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают (i) серин и треонин, которые образуют алифатически-гидроксильное семейство; (ii) аспарагин и глутамин, которые образуют амидсодержащее семейство; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, которые образуют алифатическое семейство; и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, которые образуют ароматическое семейство. Например, разумно ожидать, что изолированное замещение лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин, или подобное замещение аминокислоты на структурно родственную аминокислоту не будет оказывать значительного эффекта на связывание или свойства образующейся молекулы, особенно, если замещение не затрагивает аминокислоту каркасного участка. Будет ли замена аминокислоты приводить к получению функционального пептида, может быть легко определено путем оценки специфической активности производного слитого белка. Фрагменты или аналоги слитых белков могут быть легко получены специалистами в данной области техники. Предпочтительные N- и C-концы фрагментов или аналогов расположены рядом с границами функциональных доменов.

[0054] Используемый в данном документе термин «выделенный» или «очищенный» слитый белок означает, что слитый белок является преобладающим присутствующим видом (то есть на молярной основе он более распространен, чем любой другой отдельный вид в композиции), и предпочтительно, по существу, очищенная фракция представляет собой композицию, в которой слитый белок составляет по меньшей мере около 50% (в молярном отношении) всех присутствующих макромолекулярных частиц. Как правило, очищенная композиция будет содержать более около 80% всех макромолекулярных соединений, присутствующих в композиции, более предпочтительно более около 85%, 90%, 95% и 99%. Наиболее предпочтительно, чтобы слитый белок был очищен до существенной гомогенности (загрязняющие виды не могут быть обнаружены в композиции обычными способами обнаружения), причем композиция состоит по существу из одного макромолекулярного соединения.

[0055] Значения или диапазоны могут быть выражены в данном документе как от «около» до «около» одного конкретного значения и/или до «около» другого конкретного значения. Когда такие значения или диапазоны выражены, другие раскрытые варианты осуществления включают конкретное приведенное значение от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Аналогичным образом, когда значения выражаются в виде приближений с использованием предшествующего «около», следует понимать, что конкретное значение образует другой вариант осуществления. Далее будет понятно, что в данном документе описано большое число значений и что каждое значение также описано в данном документе в терминах «около» этого конкретного значения помимо самого значения. В вариантах осуществления «около» может использоваться для обозначения, например, в около 10% от приведенного значения, в пределах 5% от приведенного значения или в пределах 2% от приведенного значения.

[0056] В одном аспекте данное изобретение описывает композицию, содержащую терапевтический агент, причем терапевтический агент содержит один или более гепарин-связывающих доменов VEGFR-1 или VEGFR-2 и один или более ФРЭС-связывающих доменов, тем самым ингибируя связывание ФРЭС с его родственным рецептором.

[0057] В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивают агент против ФРЭС, содержащий часть, связывающую ФРЭС, функционально связанную с Fc-IgG, причем часть, связывающая ФРЭС, содержит по меньшей мере один домен, связывающий ФРЭС, который является IgG-подобным доменом 2 VEGFR-1, и причем агент против ФРЭС обладает большей способностью ингибировать стимулируемый ФРЭС митогенез, чем афлиберцепт. В вариантах осуществления данное изобретение предусматривает, что агент против ФРЭС обладает большей способностью связывать стекловидное тело, чем афлиберцепт. В вариантах осуществления данное изобретение предусматривает, что агент против ФРЭС обладает большей способностью ингибировать стимулируемую ФРЭС пролиферацию эндотелиальных клеток в стекловидном теле, чем афлиберцепт. В вариантах осуществления данное изобретение предусматривает, что агент имеет увеличенный период полувыведения *in vivo* по сравнению с афлиберцептом.

[0058] В вариантах осуществления данное изобретение предусматривает, что часть, связывающая ФРЭС, состоит по существу из IgG-подобных доменов 1, 2 и 3 VEGFR-1 (V_{1-2-3}). В вариантах осуществления агент против ФРЭС содержит аминокислотную последовательность, как определено в SEQ ID No: 1.

[0059] В вариантах осуществления данное изобретение предусматривает, что часть, связывающая ФРЭС, состоит по существу из IgG-подобных доменов 2 и 3 VEGFR-1 (V_{2-3}). В вариантах осуществления агент против ФРЭС содержит аминокислотную последовательность, как определено в SEQ ID No: 3.

[0060] В вариантах осуществления данное изобретение предусматривает, что часть, связывающая ФРЭС, состоит по существу из IgG-подобных доменов 1, 2, 3 и 3 VEGFR-1 ($V_{1-2-3-3}$). В вариантах осуществления агент против ФРЭС содержит аминокислотную последовательность, как определено в SEQ ID No: 5.

[0061] В вариантах осуществления данное изобретение предусматривает, что часть, связывающая ФРЭС, состоит по существу из IgG-подобных доменов 2, 3 и 3 VEGFR-1 (V₂₋₃₋₃). В вариантах осуществления агент против ФРЭС содержит аминокислотную последовательность, как определено в SEQ ID No: 7.

[0062] В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество агента против ФРЭС, как определено в формуле изобретения, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает способы лечения расстройства, связанного с ФРЭС, у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества агента против ФРЭС, как определено. Агент против ФРЭС может быть непосредственно введен в пораженную ткань или орган, такой как глаз.

[0063] В вариантах осуществления изобретение может быть применено для лечения широкого спектра связанных с ФРЭС расстройств, включая неоваскулярную возрастную макулярную дегенерацию, хориоидальную неоваскуляризацию, вторичную по отношению к миопии, пролиферативную диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, непроходимость сосудов сетчатки, такую как окклюзия вен сетчатки, опухоли глаза, синдром фон Гиппеля-Линдау, ретинопатию недоношенных, полипоидную хориоидальную васкулопатию, колоректальный рак, рак легкого, рак шейки матки, рак эндометрия, рак яичников, рак почки, шванномы, глиомы, эпендимомы и опухолевые и неопухолевые заболевания, при которых полезна терапия анти-ФРЭС.

[0064] В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент находится в вводимой дозированной форме, содержащей терапевтический агент и дополнительное вспомогательное вещество, носитель, адъювант, растворитель или разбавитель.

[0065] В некоторых вариантах осуществления данное изобретение раскрывает фармацевтическую композицию, подходящую для лечения и/или профилактического лечения субъекта, причем терапевтический агент содержится в количестве, эффективном для достижения его предполагаемой цели.

[0066] В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент или композиции, описанные в данном документе, вводят путем инъекции. В определенных вариантах осуществления композиции или терапевтический агент вводят непосредственно в больной орган или ткань. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент можно применять местно, например, при помощи пластыря или путем непосредственного нанесения на больной орган или ткань или посредством ионофореза. Терапевтические агенты могут быть предоставлены в композициях с замедленным высвобождением, таких как описанные, например, в патентах США №№ 5672659 и 5595760. Применение композиций с немедленным или замедленным высвобождением зависит от природы патологического состояния, которое лечат. Если патологическое состояние представляет собой острое или сверхострое заболевание, лечение с применением формы композиции с немедленным высвобождением будет предпочтительным по сравнению с композицией с

продолжительным высвобождением. В качестве альтернативы, для определенного профилактического или длительного лечения может быть применима композиция с замедленным высвобождением.

[0067] Терапевтический агент также может быть доставлен с применением имплантата, такого как, но не ограничиваясь этим, внутриглазной имплантат. Такие имплантаты могут быть биоразлагаемыми и/или биосовместимыми имплантатами или могут быть биоразлагаемыми имплантатами. Имплантаты могут быть проницаемыми или непроницаемыми для активного агента. Специфические имплантаты для доставки терапевтического агента зависят как от пораженной ткани или органа, так и от природы патологического состояния, подлежащего лечению. Применение таких имплантатов хорошо известно в данной области техники.

[0068] Ингибиторы, описанные в этом изобретении, могут быть составлены в виде наночастиц или других лекарственных форм для обеспечения точной доставки в конкретные ткани, а также для обеспечения терапии с контролируемым высвобождением.

[0069] Ингибиторы, описанные в данной заявке, могут быть доставлены не только в виде очищенных рекомбинантных белков, но также с помощью генно-терапевтического подхода. Рекомбинантные аденоассоциированные векторы (rAAV) или другие подходящие векторы могут быть применены для доставки ингибитора ФРЭС путем субретинальной или интравитреальной доставки^{43,44}.

[0070] В связанном аспекте данное изобретение относится к способу лечения связанного с ФРЭС или неоваскулярного расстройства у субъекта, причем способ включает введение субъекту: (а) эффективного количества слитого белка, способного связывать гепарин и уменьшать или предотвращать развитие нежелательных новообразованных сосудов. Слитый белок можно комбинировать с другими агентами против ФРЭС, включая, но не ограничиваясь этим: антитела или фрагменты антител, специфические к ФРЭС; антитела, специфические к рецепторам ФРЭС; соединения, которые ингибируют, регулируют и/или модулируют сигнальную трансдукцию тирозинкиназы; полипептиды ФРЭС; олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессию ФРЭС на уровне нуклеиновых кислот, например, антисмысловые РНК; и различные органические соединения и другие агенты с ингибирующей активностью в отношении ангиогенеза.

[0071] Изобретение предусматривает, что связывание гепарина, опосредованное D3 (или другим Ig-подобным доменом) VEGFR128, хотя и является недостатком для системного введения, может давать важные преимущества для интравитреального (или другого местного) введения. Действительно, способность связывать HGPSG, ключевые компоненты внеклеточного матрикса²⁹, способствует накоплению в стекловидном теле, а также проникновению в сетчатку³⁰. Изобретение обеспечивает серию Fc-слитых конструкторов VEGFR-1, имеющих различающиеся способности взаимодействовать с HSPG. Это позволяет выбирать ингибиторы ФРЭС с различной длительностью/периодом полувыведения из глаза, которые применимы при различных клинических состояниях.

[0072] Признаки и другие детали изобретения теперь будут более подробно описаны и указаны в следующих примерах, описывающих предпочтительные методики и результаты экспериментов. Примеры приведены в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничивающие изобретения.

ПРИМЕРЫ

[0073] В вариантах осуществления данное изобретение, следовательно, раскрывает агенты против ФРЭС, которые являются новыми, и улучшают существующие агенты против ФРЭС, включая афлиберцепт, благодаря высокой биологической активности в сочетании с сильными характеристиками связывания гепарина. Связывание гепарина является прогностическим фактором более длительного периода полувыведения и, следовательно, снижения частоты введения.

[0074] Изобретение предусматривает, что связывание гепарина, опосредованное D3 (или другим Ig-подобным доменом) VEGFR1,28 хотя и является недостатком для системного введения, может давать важные преимущества для интравитреального (или другого местного) введения. Действительно, способность связывать HGPSG, ключевые компоненты внеклеточного матрикса,²⁹ может способствовать накоплению в стекловидном теле, а также проникновению в сетчатку.³⁰ Изобретение обеспечивает серию Fc-слитых конструкторов VEGFR-1, имеющих различающиеся способности взаимодействовать с HSPG.

[0075] На Фиг. 1 схематически представлены конструкторы, используемые в данном документе. На Фиг. 2 показаны используемый вектор и стратегия клонирования. На Фиг. 3-9 показаны последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот созданных конструкторов.

[0076] В Примерах показано, что уровни экспрессии большинства конструкторов были низкими; V₁₋₂₋₃₋₄, V₁₋₂₋₃₋₃, V₂₋₃₋₄ и V₁₋₂₋₄ были почти полностью необнаружимы в кондиционированных средах. Предыдущие исследования продемонстрировали, что изоформы ФРЭС с высокой аффинностью к гепарину (ФРЭС₁₈₉ или ФРЭС₂₀₆) не обнаруживаются в кондиционированной среде трансфицированных клеток, будучи тесно связанными с поверхностью клеток или внеклеточным матриксом.³¹³² Однако они могут высвободиться в растворимой форме путем добавления гепарина или гепариназы, что указывает на то, что сайт связывания состоит из HSPG.³¹³² В этом примере пытались определить, может ли добавление гепарина также влиять на уровни рекомбинантных слитых белков VEGFR-1. Действительно, добавление гепарина в среду трансфицированных клеток в 6-луночных планшетах приводило к дозозависимому увеличению концентрации рекомбинантного белка в среде (Фиг. 10).

[0077] В попытке очистить рекомбинантные белки стандартная аффинная хроматография на основе белка А (РА) сама по себе дала основную полосу ожидаемой массы, но с многочисленными незначительными полосами, вероятно, отражая взаимодействие рекомбинантных белков с HSPG, происходящими из клеток-хозяев, и другими молекулами. Был разработан протокол, который удалял такие примеси, как

описано в Способах. Промывка при высоком pH (например, 9,2) в присутствии 1,2 М NaCl, в то время как белок связан с РА, приводила к высвобождению многочисленных загрязняющих примесей. Следующий шаг, анионообменная хроматография с Hi-Trap Q, был очень эффективен при удалении основной массы загрязняющих примесей и агрегатов, в то время как очищенные белки находились в элюате. Уровни LPS в конечных очищенных препаратах составляли <0,1 EU/мг (диапазон 0,02-0,08), очень низкий уровень, отвечающий требованиям доклинических исследований.³³ Как показано на Фиг. 11, чистота рекомбинантных белков составляла >95%, как оценивали с помощью окрашенного серебром ДСН/ПААГ геля, и была сходной с таковой для одобренного FDA лекарственного средства Эйлеа.

[0078] Рекомбинантные белки были протестированы на их способность ингибировать стимулируемый ФРЭС митогенез (10 нг/мл) в эндотелиальных клетках хориоидеи крупного рогатого скота. Рекомбинантные белки оказывали ингибирующие эффекты, при этом значения IC₅₀ находились в диапазоне ~ 1 нМ, за исключением V₁₋₂₋₄ и V₂₋₄, которые были менее сильнодействующими (Фиг. 12). Интересно, что Эйлеа, даже при самой высокой испытанной концентрации, ингибировал не более ~80% стимулируемой ФРЭС пролиферации (Фиг. 12). Напротив, данные конструкции VEGFR-1 (за исключением V₁₋₂₋₄ и V₂₋₄) полностью блокировали индуцируемую ФРЭС пролиферацию (Фиг. 12). В анализах связывания подтверждали взаимодействие между растворимыми рецепторами ФРЭС и биотинилированным ФРЭС и способность ФРЭС вытеснять связывание (Фиг. 13, 14).

[0079] Для дальнейшего определения терапевтически значимых взаимодействий мы стремились оценить, связывают ли рекомбинантные белки бычье стекловидное тело *in vitro*. Как показано на Фиг. 14, данные белки продемонстрировали значительное связывание, в то время как Эйлеа или контрольный IgG слабо связывались или вообще не связывались. Наиболее сильными связывающими веществами были V₁₋₂₋₃₋₃, V₂₋₃₋₃ и V₁₋₂₋₃₋₄, а затем V₁₋₂₋₃. V₂₋₃ имели промежуточные характеристики связывания между Эйлеа (или контрольным IgG) и V₁₋₂₋₃₋₃. Авастин, моноклональное антитело,⁹ как правило, используемое для лечения внутриглазной неоваскуляризации, также слабо связывались или вообще не связывались.

[0080] Чтобы определить, может ли связанный со стекловидным телом гибрид VEGFR-1-FC быть биологически активным, планшеты покрывали бычьим стекловидным телом. Добавление V₁₋₂₋₃₋₃, но не Эйлеа или контрольного IgG, ингибировало способность экзогенно добавленного ФРЭС стимулировать пролиферацию эндотелиальных клеток (Фиг. 15).

[0081] Рекомбинантные белки тестировали в анализе ХНВ мыши и сравнивали их с контрольным IgG или Эйлеа. Каждый белок вводили интравитреально в дозе 2,5 мкг за один день до обработки лазером. Эйлеа также была протестирована при 25 мкг. V₁₋₂₋₃, V₂₋₃, V₁₋₂₋₃₋₃ и V₂₋₃₋₃ в дозе 2,5 мкг продемонстрировали степень ингибирования, сходную или большую, чем при 25 мкг Эйлеа. Однако ни один из конструкций, содержащих D4, не

продемонстрировал значительного ингибирования при тестируемых условиях (Фиг. 16).

[0082] Чтобы определить, может ли связывание гепарина приводить к длительным терапевтическим эффектам после однократного введения, V₁₋₂₋₃₋₃, Эйлеа или контрольный IgG вводили интравитреально (2,5 мкг) за 1 сутки, 7 суток или 14 суток до индуцированного лазером повреждения. Как показано на Фиг. 17, Эйлеа приводила к значительному ингибированию только при введении за 1 сутки до повреждения. Однако V₁₋₂₋₃₋₃ приводил к значительному ингибированию также при введении за 7 или 14 суток до повреждения.

[0083] Раскрыто несколько новых конструкторов VEGFR-1-Fc, оцененных в различных анализах *in vitro* и *in vivo*. Для очистки рекомбинантных белков был применен многостадийный протокол. Это было в значительной степени продиктовано относительно низкими уровнями экспрессии в транзистентно экспрессирующих клетках 293, что требовало добавления гепарина в среду для улучшения высвобождения. Однако необходимость применения гепарина может частично или полностью устраняться различными клетками-хозяевами (например, имеющими другой состав HSPG или их мутантами) или более высокими уровнями экспрессии, такими как в амплифицированных стабильных клеточных линиях.

[0084] Все конструкторы, кроме V2-4, сильно нейтрализовали активность ФРЭС и в то же время обладали сильными характеристиками связывания гепарина, которые могут прогнозировать длительный период полувыведения после интравитреального введения. В примере показано, что эти белки связываются с бычьим стекловидным телом. Наиболее сильными связывающими веществами были V1-2-3-3, V2-3-3, V1-2-3-4, а затем V1-2-3. V2-3 имел значительное, но более низкое связывание в стекловидном теле. Контрольный IgG, Эйлеа или Авастин имели минимальное связывание. Одно из самых сильных связывающих веществ для стекловидного тела, V1-2-3-3, было выбрано для проверки гипотезы о том, что конструкторы VEGFR1-Fc, связанные с витреальной матрицей, могут быть биологически активными. Как показано на Фиг. 15, в планшетах, покрытых бычьим стекловидным телом, добавление V1-2-3-3, но не Эйлеа или контрольного IgG, ингибировало способность экзогенно добавленного ФРЭС стимулировать пролиферацию эндотелиальных клеток.

[0085] Затем рекомбинантные белки тестировали на мышинной модели ХНВ на их способность ингибировать индуцированную лазером неоваскуляризацию. Эйлеа использовали в качестве положительного контроля, а человеческий IgG1 в качестве отрицательного контроля. Для испытаний *in vivo* была выбрана относительно низкая доза, которая лучше всего подходит для выявления различий в эффективности между различными конструкторами. Кроме того, сообщалось, что при интравитреальном введении относительно высоких доз антител изотипа IgG1 могут наблюдаться нецелевые ингибирующие эффекты, опосредованные FcγRI (CD64) и c-Cbl, при интравитреальной инъекции.³⁴ При применяемой дозе должна исключаться такие побочные эффекты и выявляться действительно специфические эффекты.

[0086] Как показано на Фиг. 16, Эйлеа приводила к приблизительно 30% ингибированию при дозе 2,5 мкг и ~ 50% ингибированию при 25 мкг. Эти результаты в значительной степени согласуются с опубликованными данными. Saishin et al. сообщили, что интравитреальная инъекция ~ 5 мкг афлиберцепта привела к ~ 30% ингибированию области ХНВ у мыши.³⁵ Действительно, дозу 40 мкг, как правило, используют для достижения максимального эффекта в мышинной модели ХНВ.³⁶ Неожиданным открытием нашего исследования стала большая эффективность некоторых наших конструкторов: V1-2-3, V2-3, V1-2-3-3 и V2-3-3. Введение 2,5 мкг этих конструкторов за один день до того, как повреждение соответствовало или даже превысило уровень ингибирования, достигнутое с помощью 25 мкг Эйлеа. Обнаружение того, что V1-2-3-3, но не Эйлеа, оказывает существенное влияние на профилактику ХНВ при введении за 7 суток или 14 суток до повреждения (Фиг. 17), подтверждает долговременность эффекта и терапевтическую ценность.

[0087] Неожиданным открытием является то, что ни один из конструкторов, содержащих D4 (V1-2-3-4, V2-3-4, V1-2-4, V2-4), не привел к заметному ингибированию *in vivo* (по меньшей мере при исследуемой дозе), несмотря на то, что эти молекулы (за исключением V₂₋₄) продемонстрировали способность блокировать стимулируемый ФРЭС митогенез *in vitro*. Однако все эти конструкторы продемонстрировали склонность к образованию мультимеров или агрегатов, как оценивали с помощью ДСН/ПААГ геля в невозстановливающих условиях (Фиг. 11) или эксклюзионной хроматографии (не показано). Хотя в более ранней работе³⁷ идентифицировали D4 (вместе с D7) в качестве требования для димеризации VEGFR-1, известно, что такой эффект зависит от лиганда. Исследования кристаллической структуры выявили петлю в D4, ответственную за такие гомотипические взаимодействия.²³ Возможно, что высокие концентрации и/или принудительная димеризация, вызванная конструктором Fc, могут приводить к лиганд-независимым взаимодействиям, что приводит к агрегации. В любом случае, агрегаты не являются желательными фармацевтическими препаратами, учитывая возможность воспаления и иммуногенности.^{38, 39} Следовательно, аспектом данного изобретения является идентификация конструкторов, имеющих D2/D3 VEGFR-1, но не D4, в вариантах осуществления.

[0088] Следует отметить, что хорошо охарактеризованные мутации Fc, хорошо известные специалистам в данной области техники, которые снижают эффекторные функции, могут быть полезными дополнениями к изобретению, чтобы минимизировать антитело-зависимую цитотоксичность (АЗКЦ), а также взаимодействия с C1q и инициирование каскада комплемента.⁴⁰

[0089] В заключение, афлиберцепт был разработан для устранения гепарин-связывающего домена с целью улучшения периода полувыведения из системы кровообращения по показаниям в онкологии. Конструкции, описанные в данном исследовании, вместо этого предназначены для стимуляции связывания и удержания в стекловидном теле, чтобы обеспечить более устойчивые и терапевтически релевантные

взаимодействия.

Способы

[0090] Для конструирования плазмид экспрессии VEGFR-1_{ECD}-Fc фрагменты нуклеиновой кислоты кодировали сигнальный пептид и было синтезировано от одного до четырех различных внеклеточных Ig-подобных доменов 20 VEGFR-1 (Gene ID: 2321) GenScript USA Inc. Разнообразие конструкторов внеклеточного Ig-подобного домена является следующим: V123 содержит D1, 2 и 3; V23, D1 и D2; V1234, D1, 2, 3 и 4; V1233, D1, 2, 3 и 3; V234, D 2, 3 и 4; V124, D1, 2 и 4; V24, D2 и 4; F7 представляет собой ВКД₂, 2 и 3, а F8 представляет собой ВКД₂ и 3. Синтезированные фрагменты встраивали в вектор pFUSE-hIgG1-Fc (InvivoGen, #pfuse-hg1fc1) в сайтах EcoRI и BgIII, создавая плазмиды, содержащие различные ВКД Fc1. Затем, используя набор PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara, R046A), аминокислотные интервалы R и S (сайт BgIII) между ВКД и Fc-фрагментом удаляли, получая плазмиды (F1-F8), экспрессирующие слитые белки ВКД Fc1 с 227-аминокислотным человеческим IgG1-Fc.

Трансфекция и приготовление кондиционированных сред

[0091] Систему экспрессии Expi293 (Life technologies, A14524) использовали для получения кондиционированной среды для очистки в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки Expi293TM (ThermoFisher) культивировали в виде суспензии в среде для экспрессии Expi293TM при 37°C в увлажненной атмосфере с 8% CO₂. Когда плотность клеток достигла 2,5 млн/мл, плазмиды ДНК и реагент ExpiFectamineTM 293 смешивали, инкубировали 5 мин и добавляли к клеткам. Конечная концентрация ДНК и трансфицированного реагента составляла 1 мкг и 2,7 мкл на миллилитр, соответственно. Через пять часов после трансфекции к клеткам добавляли 100 мкг/мл гепарина (Sigma, H3149) и смесь ингибиторов протеаз, 1: 400 (Sigma, P1860). Через 16 часов после трансфекции были добавлены усиливающие реагенты 1 и 2. Через девяносто шесть часов после трансфекции кондиционированную среду собирали. Аликвоты тестировали на концентрацию Fc-слитых белков с использованием набора Human Fc ELISA (Syd Labs, EK000095-HUFC-2) в соответствии с инструкциями производителя. Ингибиторы протеазы добавляли (1: 500) к массе, которую хранили при -80 °C до дальнейшего применения.

Очистка рекомбинантных белков

[0092] Были использованы апирогенные реагенты. Перед использованием колонки и оборудование (Akta Explorer System) дезинфицировали путем воздействия 0,5 н. NaOH в течение приблизительно 45 минут. Кондиционированные среды из трансфицированных клеток доводили PBS, 0,01% полисорбатом (PS) 20. PS20 добавляли в буферы на всех стадиях. После центрифугирования при 20000 мкг в течение 30 минут супернатанты подвергали аффинной хроматографии на основе белка А (РА) с использованием Hi-Trap MabSelect SuRe (5 мл, GE Healthcare). После загрузки колонку промывали 20 мМ диэтанолмином, рН 9,2, 1,2 М NaCl, до элюирования 0,1 М лимонной кислотой, рН 3,0, которую немедленно нейтрализовали. Затем пул элюирования РА разбавляли в 20 мМ

диэтаноламине, pH 9,2 и наносили на анионообменную колонку Hi-Trap Q (5 мл, GE Healthcare). Связанный материал элюировали градиентом NaCl. Элюат, который содержал очищенный рекомбинантный белок, немедленно доводили 20 mM Трис, pH 6,8, а затем концентрировали посредством связывания с гепарин-сефарозой (Hi-TrapTM-HS). После промывки 0,2-0,45 M NaCl (в зависимости от конструкции) рекомбинантный слитый белок VEGFR1 элюировали 1 M NaCl. Конечная стадия доочитски состояла из эксклюзионной хроматографии (SEC) с использованием, например, Superdex 200 Increase, 10/300 GL или Hi-Load 16/600 Superdex 200 pg, GE Healthcare. Наконец, для белков заменяли буфер путем диализа в 10 mM Трис, pH 6,8, 10 mM гистидин, 1% трезалозы, 40 mM NaCl, 0,01% PS20. Для определения уровня эндотоксинов в соответствии с протоколом производителя был использован набор для анализа эндотоксинов LAL ToxinSromor Chromogenic LAL (GenScript, L00350).

Анализы пролиферации клеток

[0093] Анализы пролиферации бычьих эндотелиальных клеток выполняли, по существу, как описано ранее.⁴¹ Растущие в лог-фазе эндотелиальные клетки хориоидеи крупного рогатого скота (BCEC) (пассаж <10) обрабатывали трипсином, ресуспендировали и высевали в 96-луночные планшеты (без покрытия) в DMEM с низким содержанием глюкозы, дополненной 10% бычьей фетальной сывороткой, 2 mM glutамина и антибиотиками, при плотности 1000 клеток на лунку в объеме 200 мкл. rhVEGF₁₆₅ (Peprotech) добавляли в концентрации 10 нг/мл. Афлиберцепт (Эйлеа) приобретали в аптеке. Ингибиторы добавляли в клетку в различных концентрациях, как указано на фигурах, перед добавлением лигандов. Через 5 или 6 суток клетки инкубировали с Alamar Blue в течение 4 часов. Флуоресценцию измеряли при длине волны возбуждения 530 нм и длине волны излучения 590 нм.

Твердофазные анализы связывания варианта VEGFR-1

[0094] Стрипированные 96-луночные планшеты для EIA/RIA Costar (№ 2592, Corning Incorporated, Кеннебанк, Мэн) покрывали в течение ночи при 4 °C очищенными белками рецептора ФРЭС (250 нг/лунку) в покрывающем буфере (Biolegend, Сан-Диего, Калифорния, № 421701). Сайты неспецифического связывания блокировали инкубацией стрипов с 2% BSA (Sigma, A6003) в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре (комн. темп.) после однократной промывки промывочным буфером для ИФА (R&D systems 895003). Затем стрипы промывали 3 раза, после чего добавляли биотинилированный человеческий ФРЭС₁₆₅ (G&P Biosciences, Санта-Клара, Калифорния) в аналитическом разбавителе (Biolegend, № 421203) отдельно или в комбинации с различными концентрациями небитинилированного человеческого ФРЭС₁₆₅ (R&D systems) при 37 °C в течение 2 часов. После трех промывок связанный с VEGFR1 биотинилированный человеческий ФРЭС₁₆₅ детектировали путем инкубации со стрептавидином HRP (1: 1000, Biolegend, № 405210) в течение 1 часа при комнатной температуре. Стрипы промывали 5 раз перед инкубацией с высокочувствительным субстратным раствором TMB (Biolegend, № 421501) в течение 30 минут, и измеряли

поглощение при 450 нм после добавления равного количества стоп-раствора (Biolegend, № 77316). Все эксперименты проводились в двойных лунках и повторялись не менее двух раз.

Связывание in vitro с бычьим стекловидным телом

[0095] Бычьи стекловидные тела (InVision BioResource, Сиэтл, штат Вашингтон) оттаивали при 4 °С. Материал сначала разбавляли 1: 1 PBS, фильтровали через фильтр 0,22 мкм, аликвотировали и хранили при -80 °С. Концентрацию общего белка в материале из бычьего стекловидного тела измеряли при помощи анализа белка Pierce BCA. 96-луночные стрипированные планшеты для EIA/RIA Costar покрывали бычьим стекловидным телом (1 мкг/лунку) в течение 4 часов при комнатной температуре с последующей промывкой промывочным буфером для ИФА. Сайты неспецифического связывания блокировали добавлением 2% BSA в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре с последующим промыванием три раза 0,01% PBS-T. В каждую лунку добавляли 50 мкл VEGFR1 или контрольных белков в течение ночи при 4 °С. На следующий день планшеты трижды промывали 0,01% PBS-T с последующей инкубацией с 100 мкл AP-конъюгированного козьего антитела против Fc человека (1: 2000, Invitrogen, № A18832) в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты дополнительно промывали пять раз 0,01% PBS-T перед добавлением 50 мкл субстрата 1-Step PNPP (Thermo Scientific, Рокфорд, Иллинойс, № 37621) в течение 15-30 мин при комнатной температуре. ОП измеряли при 405 нм.

[0096] Эффекты связанного со стекловидным телом VEGFR1 на стимулируемую ФРЭС пролиферацию эндотелиальных клеток исследовали в 96-луночных стрипированных планшетах для EIA/RIA Costar сначала стерилизовали УФ-излучением в течение 1 часа, а затем покрывали 1 мкг/лунку стекловидного тела крупного рогатого скота, разведенного в PBS в течение 4 часов при комнатной температуре. Планшеты один раз промывали PBS, блокировали 2% BSA при 4 °С и дважды промывали PBS в ламинарном боксе биологической защиты. Равные количества растворимых рецепторов или контрольного IgG добавляли в планшеты, разведенные в PBS O/N при 4°C (50 мкл/лунку). Затем планшеты один раз промывали PBS, а затем один раз промывали средой для анализа, содержащей 10% BCS. 100 мкл среды добавляли в каждую лунку с последующим добавлением ФРЭС в концентрации 5 нг/мл или PBS только в отсутствие контроля ФРЭС. Планшеты инкубировали с ФРЭС или PBS в течение 1 часа с последующим добавлением 100 мкл клеточной суспензии BCEC (конечные 2500 клеток/лунка). Спустя 48 часов пролиферацию измеряли путем добавления Alamar Blue.

Индукцированная лазером хориоидальная неоваскуляризация (ХНВ)

[0097] Самцов мышей C57BL/6J (6-8 недель) подвергали анестезии смесью кетамин/ксилазин перед обработкой лазером. Повреждения ХНВ индуцировали лазерной фотокоагуляцией с использованием диодного лазера (IRIDEX, Oculight GL) и целевой лампы (Zeiss) с размером пятна 50 мкм, мощностью 180 мВт и длительностью воздействия 100 мс. 36, 42. Четыре лазерных ожога, как правило, индуцировали в 3, 6, 9 и 12 часах

вокруг диска зрительного нерва в каждом глазу. Различные конструкторы или изотипический контроль IgG вводили интравитреально в дозе 2,5 мкг на глаз в объеме 1 мкл. Эйлеа использовали в качестве положительного контроля при 2,5 или 25 мкг. Через одни сутки после инъекции проводили обработку лазером и глаза вылущивали, и фиксировали в 4% параформальдегиде (PFA) в течение 15 минут через 7 суток после обработки лазером. В отдельном наборе исследований выбранные конструкторы вводили один раз за 1 сутки, 7 суток или 14 суток до обработки лазером. Хориоидально-склеральные комплексы и сетчатку отделяли и проводили иммунофлуоресценцию (IF) против CD31 для подтверждения васкуляризации путем окрашивания тотального препарата комплекса как сетчатки, так и хориоидальных тканей. Для CD31 IF, крысиное антимышиное антитело BD 550274 разводили 1: 100 и инкубировали в течение ночи при 4 °С. После 4-часовой инкубации со вторичным антителом против крысиного IgG (Life Technologies A11006) были получены изображения тотальных препаратов при 488 нм. Количественное определение неоваскуляризации в области поражения и плотности сосудов в сетчатке проводили с помощью Image J. P-значения оценивали при помощи t-критерия Стьюдента (значимое изменение, $p < 0,05$).

Ссылки

- [1] Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science* 1987, 235:442-7.
- [2] Klagsbrun M, D'Amore PA: Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 1991, 53:217-39.
- [3] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nature Med* 2003, 9:669-76.
- [4] Ferrara N, Adamis AP: Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2016, 15:385-403.
- [5] Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L: VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7:359-71.
- [6] Alitalo K, Tammela T, Petrova TV: Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005, 438:946-53.
- [7] Ferrara N: VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:795-803.
- [8] Miller JW, Le Couter J, Strauss EC, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease. *Ophthalmology* 2013, 120:106-14.
- [9] Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N: Humanization of an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Monoclonal Antibody for the Therapy of Solid Tumors and Other Disorders. *Cancer Res* 1997, 57:4593-9.
- [10] Chen Y, Wiesmann C, Fuh G, Li B, Christinger HW, McKay P, de Vos AM, Lowman HB: Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *Journal of Molecular Biology* 1999, 293:865-81.
- [11] Chamow SM, Ashkenazi A: Immunoadhesins: principles and applications. *Trends In Biotechnology* 1996, 14:52-60.

[12] Chamow SM, Ryll T, Lowman HB, Farson D: Therapeutic Fc-Fusion Proteins. Wiley Blackwell, 2014.

[13] Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Boland P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Radziejewski C, Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Rudge JS: VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:11393-8.

[14] Nguyen TT, Guymer R: Conbercept (KH-902) for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2015, 8:541-8.

[15] Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials Research G, Maguire MG, Martin DF, Ying GS, Jaffe GJ, Daniel E, Grunwald JE, Toth CA, Ferris FL, 3rd, Fine SL: Five-Year Outcomes with Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration: The Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials. *Ophthalmology* 2016, 123:1751-61.

[16] Holz FG, Tadayoni R, Beatty S, Berger A, Cereda MG, Cortez R, Hoyng CB, Hykin P, Staurenghi G, Heldner S, Bogumil T, Heah T, Sivaprasad S: Multi-country real-life experience of anti-vascular endothelial growth factor therapy for wet age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2015, 99:220-6.

[17] Regula JT, Lundh von Leithner P, Foxton R, Barathi VA, Cheung CM, Bo Tun SB, Wey YS, Iwata D, Dostalek M, Moelleken J, Stubenrauch KG, Nogoceke E, Widmer G, Strassburger P, Koss MJ, Klein C, Shima DT, Hartmann G: Targeting key angiogenic pathways with a bispecific CrossMAb optimized for neovascular eye diseases. *EMBO Mol Med* 2016, 8:1265-88.

[18] Rodrigues GA, Mason M, Christie LA, Hansen C, Hernandez LM, Burke J, Luhrs KA, Hohman TC: Functional Characterization of Abicipar-Pegol, an Anti-VEGF DARPIn Therapeutic That Potently Inhibits Angiogenesis and Vascular Permeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018, 59:5836-46.

[19] Vorum H, Olesen TK, Zinck J, Hedegaard M: Real world evidence of use of anti-VEGF therapy in Denmark. *Curr Med Res Opin* 2016:1-32.

[20] Davis-Smyth T, Chen H, Park J, Presta LG, Ferrara N: The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *EMBO Journal* 1996, 15:4919-27.

[21] Wiesmann C, Fuh G, Christinger HW, Eigenbrot C, Wells JA, de Vos AM: Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* 1997, 91:695-704.

[22] Christinger HW, Fuh G, de Vos AM, Wiesmann C: The Crystal Structure of Placental Growth Factor in Complex with Domain 2 of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1. *J Biol Chem* 2004, 279:10382-8.

[23] Markovic-Mueller S, Stutfeld E, Asthana M, Weinert T, Bliven S, Goldie KN, Kisko K, Capitani G, Ballmer-Hofer K: Structure of the Full-length VEGFR-1 Extracellular Domain in Complex with VEGF-A. *Structure* 2017, 25:341-52.

- [24] Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber H-P, Nguyen T-N, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH: Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nature Medicine* 1998, 4:336-40.
- [25] Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N: VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Med* 1999, 5:623-8.
- [26] Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller G-A, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N: VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999, 126:1149-59.
- [27] Gerber HP, Kowalski J, Sherman D, Eberhard DA, Ferrara N: Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2000, 60:6253-8.
- [28] de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT: The *fms*-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992, 255:989-91.
- [29] Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD: Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011, 3.
- [30] Woodard KT, Liang KJ, Bennett WC, Samulski RJ: Heparan Sulfate Binding Promotes Accumulation of Intravitreally Delivered Adeno-associated Viral Vectors at the Retina for Enhanced Transduction but Weakly Influences Tropism. *J Virol* 2016, 90:9878-88.
- [31] Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N: Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J-Biol-Chem* 1992, 267:26031-7.
- [32] Ferrara N: Binding to the extracellular matrix and proteolytic processing: two key mechanisms regulating vascular endothelial growth factor action. *Mol Biol Cell* 2010 21:687-90.
- [33] Malyala P, Singh M: Endotoxin limits in formulations for preclinical research. *J Pharm Sci* 2008, 97:2041-4.
- [34] Bogdanovich S, Kim Y, Mizutani T, Yasuma R, Tudisco L, Cicatiello V, Bastos-Carvalho A, Kerur N, Hirano Y, Baffi JZ, Tarallo V, Li S, Yasuma T, Arpitha P, Fowler BJ, Wright CB, Apicella I, Greco A, Brunetti A, Ruvo M, Sandomenico A, Nozaki M, Ijima R, Kaneko H, Ogura Y, Terasaki H, Ambati BK, Leusen JH, Langdon WY, Clark MR, Armour KL, Bruhns P, Verbeek JS, Gelfand BD, De Falco S, Ambati J: Human IgG1 antibodies suppress angiogenesis in a target-independent manner. *Signal Transduct Target Ther* 2016, 1.
- [35] Saishin Y, Takahashi K, Lima e Silva R, Hylton D, Rudge JS, Wiegand SJ, Campochiaro PA: VEGF-TRAP(R1R2) suppresses choroidal neovascularization and VEGF-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *J Cell Physiol* 2003, 195:241-8.
- [36] Silva RLE, Kanan Y, Mirando AC, Kim J, Shmueli RB, Lorenc VE, Fortmann SD, Sciamanna J, Pandey NB, Green JJ, Popel AS, Campochiaro PA: Tyrosine kinase blocking collagen IV-derived peptide suppresses ocular neovascularization and vascular leakage. *Sci Transl Med* 2017, 9.
- [37] Barleon B, Totzke F, Herzog C, Blanke S, Kremmer E, Siemeister G, Marme D,

Martiny-Baron G: Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272:10382-8.

[38] Roberts CJ: Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control. *Trends Biotechnol* 2014, 32:372-80.

[39] Ratanji KD, Derrick JP, Dearman RJ, Kimber I: Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation. *J Immunotoxicol* 2014, 11:99-109.

[40] Wang X, Mathieu M, Brezski RJ: IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell* 2018, 9:63-73.

[41] Yu L, Wu X, Cheng Z, Lee CV, Lecouter J, Campa C, Fuh G, Lowman H, Ferrara N: Interaction between Bevacizumab and Murine VEGF-A: A Reassessment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, 49:522-7.

[42] Lambert V, Lecomte J, Hansen S, Blacher S, Gonzalez ML, Struman I, Sounni NE, Rozet E, de Tullio P, Foidart JM, Rakic JM, Noel A: Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. *Nat Protoc* 2013, 8:2197-211.

[43] Heier J.S., Kherani S., Desai S., Dugel P., Kaushal S., Cheng S.H., Delacono C., Purvis A., Richards S., Le-Halpere A., et al., Intravitreal injection of AAV2-sFLT01 in patients with advanced neovascular age-related macular degeneration: a phase 1, open-label trial, *Lancet* **390**, 2017, 50-61.

[44] Heier Rakoczy E.P., Lai C.M., Magno A.L., Wikstrom M.E., French M.A., Pierce C.M., Schwartz S.D., Blumenkranz M.S., Chalberg T.W., Degli-Esposti M.A. and Constable I.J., Gene therapy with recombinant adeno-associated vectors for neovascular age-related macular degeneration: 1 year follow-up of a phase 1 randomised clinical trial, *Lancet* **386**, 2015, 2395-2403.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агент против ФРЭС, содержащий часть, связывающую ФРЭС, функционально связанную с Fc-IgG, причем часть, связывающая ФРЭС, содержит по меньшей мере один домен, связывающий ФРЭС, который является IgG-подобным доменом 2 VEGFR-1, и при этом агент против ФРЭС обладает большей способностью ингибировать стимулируемый ФРЭС митогенез, чем афлиберцепт.

2. Агент против ФРЭС по п. 1, отличающийся тем, что агент против ФРЭС обладает большей способностью связывать стекловидное тело, чем афлиберцепт.

3. Агент против ФРЭС по п. 2, отличающийся тем, что агент против ФРЭС обладает большей способностью ингибировать стимулируемую ФРЭС пролиферацию эндотелиальных клеток в стекловидном теле, чем афлиберцепт.

4. Агент против ФРЭС по п. 3, отличающийся тем, что агент имеет увеличенный период полувыведения *in vivo* по сравнению с афлиберцептом.

5. Агент против ФРЭС по п. 4, отличающийся тем, что часть, связывающая ФРЭС, состоит по существу из IgG-подобных доменов 1, 2 и 3 VEGFR-1 (V_{1-2-3}).

6. Агент против ФРЭС по п. 5, отличающийся тем, что агент против ФРЭС содержит аминокислотную последовательность, как определено в SEQ ID No: 1.

7. Агент против ФРЭС по п. 4, отличающийся тем, что часть, связывающая ФРЭС, состоит по существу из IgG-подобных доменов 2 и 3 VEGFR-1 (V_{2-3}).

8. Агент против ФРЭС по п. 5, отличающийся тем, что агент против ФРЭС содержит аминокислотную последовательность, как определено в SEQ ID No: 3.

9. Агент против ФРЭС по п. 4, отличающийся тем, что часть, связывающая ФРЭС, состоит по существу из IgG-подобных доменов 1, 2, 3 и 3 VEGFR-1 ($V_{1-2-3-3}$).

10. Агент против ФРЭС по п. 5, отличающийся тем, что агент против ФРЭС содержит аминокислотную последовательность, как определено в SEQ ID No: 5.

11. Агент против ФРЭС по п. 4, отличающийся тем, что часть, связывающая ФРЭС, состоит по существу из IgG-подобных доменов 2, 3 и 3 VEGFR-1 (V_{2-3-3}).

12. Агент против ФРЭС по п. 5, отличающийся тем, что агент против ФРЭС содержит аминокислотную последовательность, как определено в SEQ ID No: 7.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество агента против ФРЭС по любому из предшествующих пунктов и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

14. Способ лечения расстройства, связанного с ФРЭС, у нуждающегося субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества агента против ФРЭС по любому из пп. 1-12.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что агент против ФРЭС вводят непосредственно в пораженную ткань или орган.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что указанная пораженная ткань или орган представляет собой глаз.

17. Способ по п. 14, отличающийся тем, что расстройство, связанное с ФРЭС, выбрано из группы, включающей неоваскулярную возрастную макулярную дегенерацию, хориоидальную неоваскуляризацию, вторичную по отношению к миопии, пролиферативную диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, непроходимость сосудов сетчатки, такую как окклюзия вен сетчатки, опухоли глаза, синдром фон Гиппеля-Линдау, ретинопатию недоношенных, полипoidную хориоидальную васкулопатию, колоректальный рак, рак легкого, рак шейки матки, рак эндометрия, рак яичников, рак почки, шванномы, глиомы, эпендимомы и опухолевые и неопухолевые заболевания, при которых полезна терапия анти-ФРЭС.

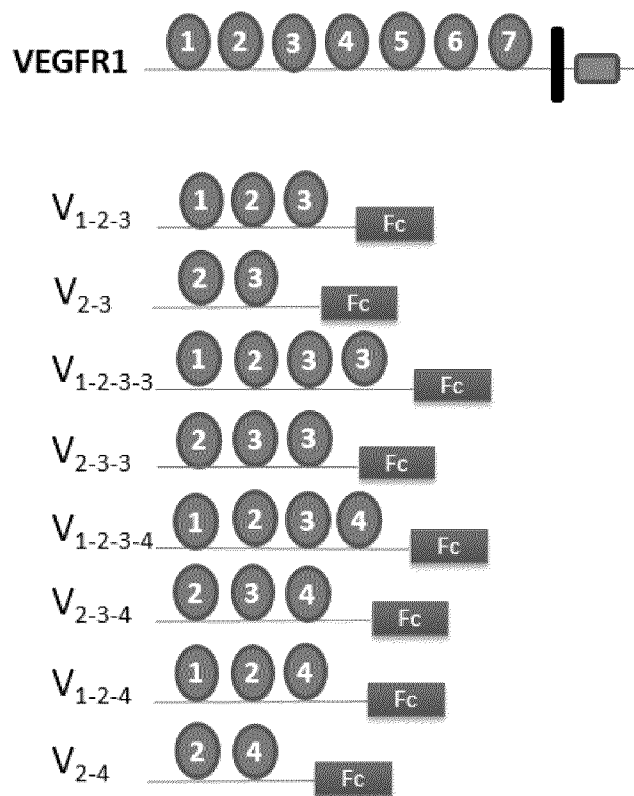
18. Способ лечения расстройства, связанного с ФРЭС, у нуждающегося субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 13.

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что агент против ФРЭС непосредственно вводят в пораженную ткань или орган.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что указанная пораженная ткань или орган представляет собой глаз.

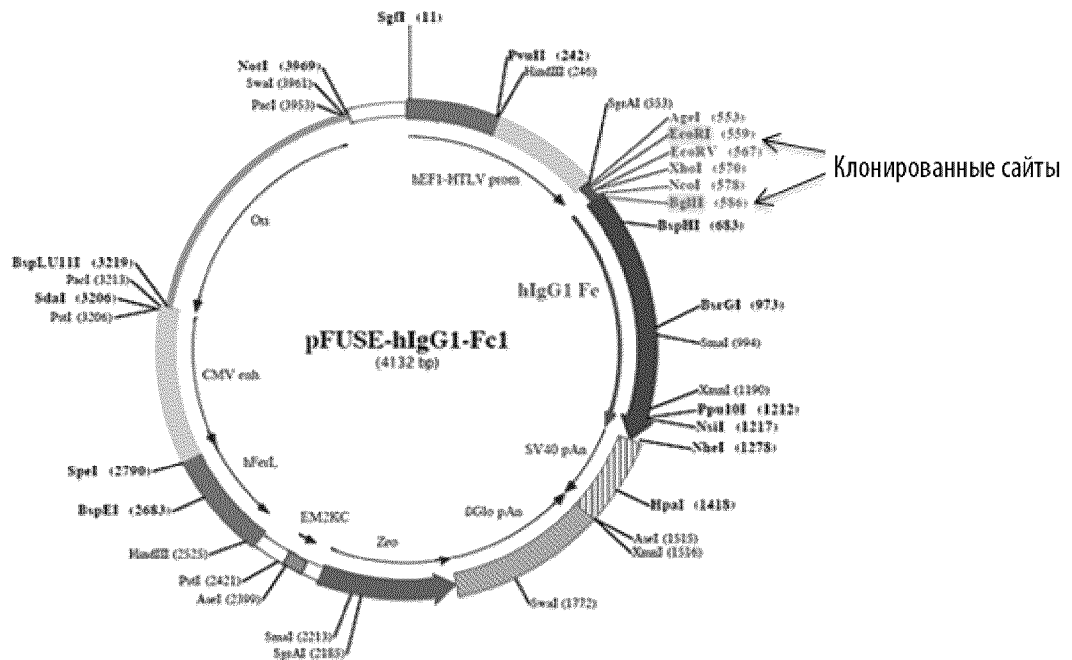
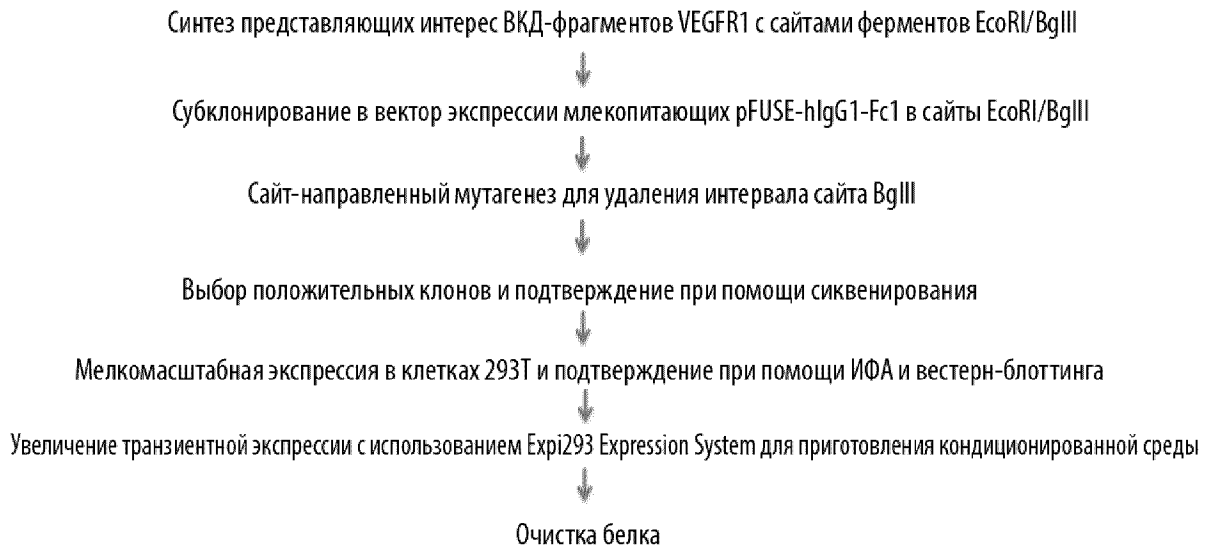
21. Способ по п. 19, отличающийся тем, что расстройство, связанное с ФРЭС, выбрано из группы, включающей неоваскулярную возрастную макулярную дегенерацию, хориоидальную неоваскуляризацию, вторичную по отношению к миопии, пролиферативную диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, непроходимость сосудов сетчатки, такую как окклюзия вен сетчатки, опухоли глаза, полипoidную хориоидальную васкулопатию, синдром фон Гиппеля-Линдау, ретинопатию недоношенных, колоректальный рак, рак легкого, рак шейки матки, рак эндометрия, рак яичников, рак почки, шванномы, глиомы, эпендимомы и опухолевые и неопухолевые заболевания, при которых полезна терапия анти-ФРЭС.

По доверенности



Фиг. 1

Стратегия конструирования и экспрессии плазмиды



Фиг. 2

V₁₂₃

Аминокислотная последовательность

MVS~~Y~~WDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTQHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVS
 KE SERLSITKSACGRNGKQFCSTLTLN~~TAQ~~ANHTGFYSC~~KY~~LAVPTSKKKE TESAIYIFISDTGR~~FTV~~
~~MY~~SEIPEI~~I~~HMTEGRELVIPCR~~Y~~ISENITV~~LRK~~FPLD~~TL~~IPDGR~~II~~WDSR~~KG~~FTI~~SN~~AIYKEIGL
 LTCEATVNGHLYKTNYLTHRQNTIIIDVQISIPRFVKLLRGHTLVLNCTATPLNTRVQMTWSYPDEK
 NKRASVRRRI~~D~~QSN~~SH~~ANI~~F~~YSVLTID~~KM~~QNKDKGLYTCRVRS~~G~~PSF~~K~~SVN~~I~~SVHIYDKD~~KT~~H~~TC~~PPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~F~~SCSV~~M~~HEALHNH
 YTKSLSLSPGK

Последовательность нуклеиновой кислоты

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGC TGTGCGCGCTGC TCAGCTGTCTGC TTCTCACAGGATC
 TAGTTCAGGTTCAAAAT~~TA~~AAAGATCCTGAACTGAGTTT~~TA~~AAAGGCA~~CCC~~AGCACATCATGCAAGCAG
 GCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGGGGAAGCA~~CCCC~~ATAAATGGTCTT~~TG~~CC~~TG~~AAATGGT~~G~~AGT
 AAGGAAAGCGAAAGGCTGAGCATAACTAAATCTGCCTGTGGAA~~AAA~~TGGCAAA~~CA~~ATTCTGCAGTAC
 TTAA~~CC~~CTTGAACACAGCTCAAG~~CAA~~CCACACTGGCTTCTACAGCTGCAAATATCTAGCTGTACCTA
 CTTC~~AA~~AGAAGAAGGAACAGAACTGCAATCTATATATTTATAGTGATACAGGTAGAAC~~CTT~~TGTA
 GAGATGTACAGTGAAAT~~CC~~CGAAAT~~T~~ATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCAAT~~CC~~CTGCGG
 GGTTACGTCACCTAACATCACTGTTACTTTTAAAAAAGTTTCCA~~CT~~TGACAC~~TT~~TGAT~~CC~~CTGATGGAA
 AACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTT
 CTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAACCA
 TACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACACCCAGCCAGTCAAATTACTTAGAGGCCATACTCTGTCC
 TCAATTGTA~~CT~~GCTACCCTCCCTTGAACACGAGAGITCAAATGACCTGGAGTTACCOCTGATGAAAAA
 AATAAGAGAGCTTCCGTAAGGGGACGAATTGACCAAAGCAATTCCCATGCCAACATATTCTACAGTGT
 TCTTAC~~T~~ATTGACAA~~AA~~TGCAGAACAAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCTGTAAGGAGTGGACCAT
 CATTC~~AA~~ATCTGTAAACACCTCAGTGCATATATATGATAAA~~GA~~CAAAACTCACACATGCCACCGTGC
 CCAGCACCTGAACTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC~~CCCC~~AAAA~~CCCC~~AGGACACCCCTCAT
 GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
 TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA~~TA~~ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
 AGCAGGTACCGTGTGTGTCAGCGTCTCACCCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGCAAGGAGTACAA
 GTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTCCAGCC~~CC~~CA~~TC~~GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG~~GC~~AGC
 CCGGAGAACCA~~C~~AGGTGTACACCCTGCC~~CCCC~~ATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCGAGTCA~~GC~~CTG
 ACCTGCC~~T~~GGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
 GAACAACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTACAGCAAGCTCA
 CCGTGGACAAGAGCGGTGGCAGCAGGGGAACGTC~~TT~~CTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCAC
 AACCCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA~~A~~

Серый с курсивом: сигнальный пептид; Желтый: Ig-подобный домен 1; Полубой: Ig-подобный домен 2
 Серый: Ig-подобный домен 3; Черный с подчеркиванием: Fc-фрагмент человеческого IgG1

Фиг. 3

V₂₃ Аминокислотная последовательность

MVS^{YWD}TG^{VLL}CALLS^{CLLL}TGS^{SSGI}FIS^{DTGR}PF^{VEMYSEIPEI}IHMTE^{GREL}VIP^{CRVI}SPN^{ITV}
 TLKK^{FPLDT}LIP^{DGKRI}IWD^{SRKGFII}SNAT^{YKE}IG^{LLTCEATV}NGHLY^{KTYN}LT^{HRQ}TNTI^IIDV^{QIS}
 IPR^{PVKLLR}GHTL^{VLN}CTAI^IPLN^{TRVQMI}WSYP^{DEKNKRA}SVRR^{RIDQSN}SHANI^{FYSV}LT^{IDKMQN}
 KDK^{GLYTCR}VRSG^{PSFKSVNI}SV^{HIYDKDK}TH^{TC}PPC^{PAPE}LLGG^{PSVFLF}PP^{KPKDT}LMI^{SRT}PE^V
 CV^{VVDV}SHE^{DPEVKFNWYVD}GVE^{VHNAKTK}PREE^{QYN}STY^{RVVS}VLT^{VLHQ}DWLN^{GKE}YK^{CKVSNKAL}
 PA^{PIEK}TIS^{KAKGQ}PRE^{PQVYTL}PP^{SRDEL}TKN^{QVSLT}TCL^{VKGFY}PSD^{IAVEWES}NG^QPEN^{NYKT}TP^P
 VL^{DS}DG^{SFF}LY^{SKLTV}DK^{SRWQQ}GN^VSCS^{VMHEAL}HN^{HYT}QKS^LLS^LPGK

Последовательность нуклеиновой кислоты

ATGGT^{CAGC}TACTGGG^{ACAC}CGGG^{GTC}CTGCTGTGCG^{CGCT}GCTCAGC^{TGTCTGC}TTC^{TCAC}AGG^{ATC}
 TAGT^{TCAGG}TATATTTATTA^{GTGATAC}AGG^{TAGA}CCT^{TTTCG}TAG^{AGAT}GTAC^{AGT}GAAT^{TCCC}GAAA
 TTATAC^{ACA}TGACTGAAGGA^{AGGG}GAGCTCG^{TCA}TCC^{CTGCC}GGG^{TAC}GTCA^{CC}TAA^{CATCA}CT^{ACT}GTT
 ACTTTAAAAA^{AGT}TTC^{CACT}TGAC^{ACT}TTG^{ATCC}CTG^{AT}GGAAA^{ACGC}ATA^{ATCT}GGG^{ACAG}TAG^{AAA}
 GGG^{CTT}CAT^{CATAT}CAA^{ATG}CAAC^{GTACA}AA^{AGAA}ATAG^{GGCT}TC^{TGAC}CTGT^{GAA}GCA^{ACAG}TC^{CAATG}
 GG^{CATT}TGT^{ATAAG}ACA^{AC}TAT^{CTCAC}ATCG^{ACA}AA^{CC}AA^{TACA}ATCA^{TAGA}TGT^{CCAA}ATA^{AGC}
 AC^{ACCA}CG^{CCAG}TCAA^{ATTACT}TAG^{AGGC}CATA^{CTCT}TGT^{CCT}CA^{AT}TGT^{ACTG}CTA^{CCACT}TCC^{CTT}
 GA^{AC}CG^{GAG}AG^TCAA^{ATGA}CCT^{GGAG}T^{TAC}CC^{CT}GAT^{GAAAA}AA^{ATAA}GAG^{AGCT}TCC^{GTA}AG^{GGC}GAC
 GA^{ATTG}ACC^{AAAG}CA^{ATTCC}CAT^{GCCA}ACA^{TATT}CTA^{CAGT}GTT^{CTTACT}ATT^{GAC}AA^{ATG}CAG^{AAC}
 AA^{AGACA}AA^{GGACT}TTT^{ATAC}TG^{TCTGT}GTA^{AGGA}GTG^{GACC}AT^{CATT}CAA^{ATCT}GTTA^{ACAC}CT^{CAGT}
 GC^{ATATATA}TG^{ATAAA}GACA^{AAACT}CAC^{ACAT}GCC^{ACCG}TGCC^{CAGC}AC^{CTGAA}CTC^{CTGG}GGG^{GAC}
 CG^TCAG^{TCT}TCC^{TCT}CCCC^{CCAAA}CC^{CAAG}CA^{CCCT}CAT^{GATCT}CCC^{GGAC}CC^{CTGAG}GT^{CACA}
 TG^{CGT}GG^{TGT}GG^{ACGT}AG^{CCA}CGA^{AGAC}CCT^{GAGGT}CA^{AGTT}CA^{ACT}GG^{TAC}GTG^{GAC}GG^{CGT}GGA
 GGT^{GCA}TAA^{TGCC}AA^{GACA}AG^{CCG}CG^{GGG}AG^{GGAG}CAG^{TAC}AC^{AGCAC}GT^{ACCG}TGT^{GTC}AG^{CGT}CC
 TC^{ACCG}TCC^{TGC}CCA^{GGAC}TGG^{CTGA}AT^{TGCC}AA^{GGAG}TACA^{AGT}GCA^{AGG}TCT^{CCAA}CAA^{AGCC}CTC
 CC^{AGCC}CCC^{ATCG}AGAAA^{AC}CAT^{CTCC}AAA^{GCCA}AG^{GGC}AG^{CC}CC^{GAGAA}CC^{ACAG}GT^{GTAC}ACC^{CT}
 GCC^{CCAT}CC^{CGG}GAG^{GAGA}TG^{ACCA}AGAA^{CCAG}GT^{CAG}CC^{TGAC}CT^{GCC}TGG^{TCAA}GG^{CTTCT}ATC
 CC^{AGG}ACA^{TCC}CG^{TGG}AG^{TGG}GAG^{AGCA}AT^{TGG}CA^{GCC}GG^{GAGAA}CA^{ACTACA}AG^{AC}CC^{CG}CC^{TCC}
 GT^{GCT}GG^{ACT}CC^{GAC}GG^{CTC}CTT^{CTT}CT^{CTAC}AG^{CAAG}CT^{CAC}CG^{TGG}AC^{AGAG}CA^{GGT}GG^{AGCA}
 GGG^{GAA}CG^{TCT}CTCA^{TGCT}CC^{GTGAT}GC^{AC}GG^{GCT}CT^{GCACA}ACC^{ACTAC}AG^{AGCC}TCT
 CCC^{TGTCT}CGGG^{TAAA}

Серый с курсивом: сигнальный пептид; Голубой: Ig-подобный домен 2; Серый: Ig-подобный домен 3;
 Черный с подчеркиванием: Fc-фрагмент человеческого IgG1

Фиг. 4

V₁₂₃₃

Аминокислотная последовательность

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDFELSLKGTQHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVS
 KESERLSITKSACGRNGKQFCSTLTLNLTQAQNHITGFYSCKYLAVPTSKKKEESAIIYIFI SDTGRPFV
 EMYSEIPEIHNTEGRELVI PCRVTSFNITVILKKFPLDTLIPDGKRIIWDSSRKGFIISNATYKEIGL
 LTCEATVNGHLYKINYLIHQNTII DVQI STPRPVKLLRGHTLVLNCTATT PLNTRVQMTWSYPDEK
 NKRASVRRRI DQSNSHANIFYSVLTI DQSNSHANIFYSVLTI DQSNSHANIFYSVLTI DQSNSHANIFYSVLTI
 VKLLRGHTLVLNCTATT PLNTRVQMTWSYPDEK NKRASVRRRI DQSNSHANIFYSVLTI DQSNSHANIFYSVLTI
 LYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKDKHTC PFC PAPELLGGPSVFLFPKPKDITMI SRTPEVTCVVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKIKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSD
 DGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNNHTQKSLLSLSPGK

Последовательность нуклеиновой кислоты

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGTCCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATC
 TAGTTACAGGTTC AAAATTA AAAAGAT CCTGAACTGAGTTTAAAAGGCACCCAGCACATCATGC AAGCAG
 GCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGGGGAAGCAGCCCAATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGAGT
 AAGGAAAGCGAAAGGCTGAGCATAAATAAATCTGCTGTGGAAGAAATGGCAAAATAATCTG CAGTAC
 TTTAACTTGAACACAGCTCAAGCAAACCACTGGCTTCTACAGCTGCAAAATATCTAGCTGTACCTA
 CTTCAAAGAAAGGAAACAGAACTGCAATCTATATATTTATTAAGT GATACAGGTAGACCTTTCTGTA
 GAGATGTACAGTGAAATCCCGGAAATATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTGGTCAATTCCTGCGG
 GGTACCTCACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAA
 AACGCATAATCTGGGACAGTGAAGGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTA CAAAGAAATAGGGCTT
 CTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAACCAA
 TACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACACCACGCCAGTCAAATTACTTAGAGCCATACTTTGTCC
 TCAATTTACTGCTACCACTCCCTTGAACACGAGAGTTCAAATGACCTGGAGTTACCCTGATGAAAAA
 AATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGAATGACCAAAGCAATCCCATGCCAACAATTTCTACAGTGT
 TCTTACTATTGACAAATGCAGAACAAAGACAAAGGACTTTATACTTTGTCGTGTAAGGAGTGGACCAT
 CATTCAAATCTGTAAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGCAGTCCAAATAAGCACACCACGCCA
 GTCAAATTAATAGAGGCCATACTCTTGTCTCAATTTACTGCTACCACTCCCTTGAACACGAGAGT
 TCAAATGACCTGGAGTACCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGGGACGCAATGACCAAA
 GCAATTCCTATGCCAACAATTTCTACAGTGTCTTACTATTGACAAATGCAGAACAAAGACAAAGGA
 CTTTATACTTTGTCGTGTAAGGAGTGGACCATCAATCAAATCTGTAAACACCTCAGTGCATATATATGA
 TAAAGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGACCGT CAGTCTTCC
 TCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT
 GACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGC
 CAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCCTCTCACCCGCTCTGC
 ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATC
 GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCCACAGGTGTACA CCTGCCCCCATCCCG
 GGAGGAGATGACCAAGAACAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCG
 CCGTGGAGTGGGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCC
 GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCTGGGCAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAACGTTCT
 CTCATGCTCCGTGATGCAGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAAGAGGCCTCTCCCTGTCTCCGG
 GTAAA

Серый с курсивом: сигнальный пептид; **Желтый:** Ig-подобный домен 1; **Голубой:** Ig-подобный домен 2
Серый: Ig-подобный домен 3; **Черный с подчеркиванием:** Fc-фрагмент человеческого IgG1

Фиг. 5

V₂₃₃

Аминокислотная последовательность

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGIFISDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVISPNTIV
 TLKKFPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLTHRQNTNIIIDVQIS
 TPREFVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIIDKMQN
 KDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPD
 EKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKDKHTICP
 PCPAPELLGGPSVFLFPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
 SLTCLLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTIPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
 LHNHYTQKLSLSLSPGK

Последовательность нуклеиновой кислоты

ATGGTCAGCTAC TGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATC
 TAGTTCAGGTATATTTATAGTGATACAGGTAGAOCCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCGGAAA
 TTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTACGTCACCTAACA TCACTGTT
 ACTTTAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGAAA
 GGGCTTCATCATATCAAAATGCAACGTACAAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATG
 GGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAAACAATACAATCATAGATGTCCAAATAAGC
 ACACCACGCCCCAGTCAAATTACTTAGAGGCCATACTCTTGTCCCTCAATTGTACTGCTACCCTCCCTT
 GAACACGAGAGT TCAAATGACCTGGAGTTACCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGT AAGGCGAC
 GAATTGACCAAAAGCAATCCCATGCCAACATATTCTACAGTGTCTTACTATTGACAAAA TGCAGAAC
 AAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCTGTAAGGAGTGGACCATCATTCAAATCTGTTAACACCTCAGT
 GCATATATATGATAAAGCAGTCCAAATAAGCACACCACGCCCAGTCAAATTACTTAGAGGCCATACTC
 TTGTCCCTCAATTGTACTGCTACCCTCCCTTGAACA CGAGAGTTCAAATGACCTGGAGTTACCTGAT
 GAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAAGGCGACGAATTGACCAAAAGCAATCCCATGCCAACATATTCTA
 CAGTGTCTTACTATTGACAAAAATGCAGAACAAAGA CAAAGGACTTTATACTTGTCTGTAAGGAGTG
 GACCATCATTCAAATCTGTTAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGACAAAACCTCACACATGCCCA
 CCGTGCCCAGCACTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCCAAGGACAC
 CCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGGTGAGCCACGAAGACCTGAGG
 TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAG
 TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
 GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCOCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAG
 GGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCCAGGTC
 AGCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
 GCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCA
 AGTCCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCT
 CTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

Серый с курсивом: сигнальный пептид; **Голубой:** Ig-подобный домен 2; **Серый:** Ig-подобный домен 3;
Черный с подчеркиванием: Fc-фрагмент человеческого IgG1

Фиг. 6

V₁₂₃₄ Аминокислотная последовательность

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTPQHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVS
 KESERLSITKSACGRNGKQFCSTILTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIYIFISDTGRPFV
 EMYSEIPEIIMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFIIISNATYKEIQI
 LTCBATVNGHLYKTNYLTHRQNTI I IDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEK
 NKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDKMNKDKGLYTCRVRSRGSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRR
 QQVLETVAGKRSYRISMVKVKAFFSPFVWVKDGLPATEKSARYLIRGYSLLIKDVTIREDAGNYTILLS
 IKQSNVFNLTATLIVNVKFDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPFKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Последовательность нуклеиновой кислоты

ATGGTCAGCTACTGGGACACGGGGTCCCTGCTGTGGCGGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATC
 TAGTTCAGGTTCAAAATTAAGAATCCTGAACTGAGTTTAAAAGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAG
 GCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGGGAGCAGCCATAAATGGTCTTTGCTTGAATGGTGAGT
 AAGGAAAGCGAAAGGCTGAGCATAAATAAATCTGCCTGTGGAAGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTAC
 TTTAACTTGAACACAGCTCAAGCAACCACACTGGCTTCTACAGCTGCAAAATATCTAGCTGTACCTA
 CTTCAAAGAAAGGAAGCAAGCAATCTGCAATCTATATATTTATAGTGATACAGGTAGACCTTTCGTA
 GAGATGTACAGTGAATCCCCAATTTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCG
 GGTACGTCACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAGATTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAA
 AACGCATAATCTGGGACAGTAGAAGGGCTTCAICATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTT
 CTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGCCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATGACAAACCAA
 TACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACACCCAGCCAGTCAAATTACTTAGAGGCCATACTCTTGTCC
 TCAATTGTACTGCTACCCTCCCTTGAACACGAGAGTCAAATGACCTGGAGTATCCCTGATGAAAAA
 AATAAGAGAGCTTCCGTAAAGCCGACGAATTGACCAAAGCAATTOCCATGCCAACATATTCTACAGTGT
 TCTTACTATTGACAAATGCAGAACAAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCTGTAAGGAGTGCACCAT
 CATTCAAATCTGTTAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGCATTCATCACTGTGAAACATCGAAA
 CAGCAGGTCTTGAACCCGTAGCTGGCAAGCCGCTTACCCGCTCTCTATGAAAGTGAAGGCATTTCC
 CTCGCCGGAAGTTGTATGGTTAAAAGATGGGTTACCTGGGACTGAGAAATCTGCTCGTATTTTGACTC
 GTGGCTACTCGTTAATTATCAAAGCACTAACTGAAGAGCATGCAGGGAATTATACAATCTTGGTGAGG
 ATAAAACAGTCAAATGTGTTAAAACCTCACTGCCACTCTAATTTGCAATGTGAAACCCGACAAAAC
 TCACACATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCCGTCACTCTTCCCTCTCCCCCAA
 AACCCAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACCTGAGCCAC
 GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACCCGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
 GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACACAGGACTGGC
 TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATC
 TCCAAAGCCAAAGGCGAGCCCGGACAACCACAGGTGTACACCCCTCCCCCATCCCGGGAGCAGATGAC
 CAAGAACAGGTCAGCCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG
 AGAGCAATGGGACCCGGAGAACAATAACAAGACCACCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC
 TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTTCTCATGCTCCGT
 GATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGGCAGAAGACCTTCCCTGTCTCCGGGTAA

Серый курсивом: сигнальный пептид; Желтый: Ig-подобный домен 1; Голубой: Ig-подобный домен 2

Серый: Ig-подобный домен 3; Зеленый: Ig-подобный домен 4; Черный с подчеркиванием: Fc-фрагмент человеческого IgG1

Фиг. 7

V₂₃₄

Аминокислотная последовательность

MVSYWDTGVLLCALLSCDLLTGSSSGI FISDTGRF FVEMYSEI PEI IHMTEGRELVI PCRVTS PNITV
 TLKRFPLDTLI PDGKRIIWDSEKGFII SNATYKEI GLLI CEATVNGHLYKTI NYLTHRQNTII IDVQIS
 TPRFVKLLRGHTLVLNCTATPLNTRVQMTW SYPDERNKRASVRRRI DQSN SHANIFYSVLTIDKMQN
 KDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFI TVKHRWQQVLETVAGKRSYRLSMKVIAFSPSEVVMLE
 DGLPATKESAR YLTRGYSLLIKDVTEE DAGNYTILLSIKQSNVFNKL TATLIVNVKIKDKTHTC PPCPA
 PELGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
 LVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKITP FVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNH
 YTKQSLSLSPGK

Последовательность нуклеиновой кислоты

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGC TCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATC
 TAGTTCAGGTA TATT TATT AGTGATACAGGTAGACCTTTTGGTAGAGATGTA CAGT GAAATCCCGAAA
 TTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGT CATT CCCTGCCGGGTTACGT CACCTAACATCACTGT
 ACTTTAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGAAA
 GGGCTTCAITCATCAATCAAATGCAACGTA CAAAGAAA TAGGGCTTCTGACCTGTGAA GCAACAGTCAATG
 GGCATTGTATAGA CAAA CTATCTCACACATCGACAAAACCAA TACAATCATAGATGTC CAAATAGC
 ACACCACGCCAGTCAAAT TACTTAGAGGCCATAC TCTTGTCC TCAATGTACTGCTACCCTCCCTI
 GAACACGAGAGTTCAAATGAOCTGGAGTTAC CCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAAGGGAC
 GAATTGACCAAAGCAATTC CCAATGCCAACATATCTACAGTGTCTTACTATTGACAAAATGCAGAAC
 AAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCTGTGTAAGGAGTGGACCAT CATTCAAATCTGTTAACACCTCAGT
 GCATATATATGATAAGCATTCATCACTGTGAAACATCGAAAACAGCAGGTGCTTGAACCGTAGCTG
 GCAAGCGGTCTTACC GGCTCTCTATGAAAAGT GAAGGCATTTCCCTCGCCGGAAGTGTATGGTAAAA
 GATGGGTACCTGCGACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTAC TCGT TAAT TATCAAGGA
 CGTAACGTGAAGAGGATGCAAGGAAT TATACAATCTTGTGAGCATAAAACAGTCAAATGTGTTAAAA
 CCTCACTGCCACTCTAAT TGTCAATGTGAAACCGGACAAAAC TCACACATGCCACCCTGCCAGCA
 CCTGAATCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCAAAACCCAAAGGACACCTCATGATCTC
 CCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAATCAAAT
 GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
 TACCGTGTGGT CAGCGTCTCACCGTCTGCAACCAAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
 GGTCTCCAAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA GGGCAGCCCGGAG
 AACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGT CAGCCTGACCTGCT
 CTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA
 CTACAAGACCAAGCTCCCGTGGCTGGACTCCGACCGCTCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGG
 ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAAGCTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCA
 TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

Серый с курсивом: сигнальный пептид; Голубой: Ig-подобный домен 2; Серый: Ig-подобный домен 3; Зеленый: Ig-подобный домен 4;
 Черный с подчеркиванием: Fc-фрагмент человеческого IgG1

Фиг. 8

V₂₄

Аминокислотная последовательность

MVSYWD TG VLLCALLSCLLLTGSSSGI FI SDTGRPFVEMYSEI PE I IHMT EGRELVI PCRVTS PNITV
 TLKKFP LDTLI PDGKR I IWD SRKG F I I SNAT YKE I GLLTCEATVNGHLYKINYLTHRQTNI I I DVFIT
 VKHRKQOVLETVA GKRSYRL SMKVKAFPS FEVWMLKDGLPATEKSARYLTRGYS LI IKDVTEEDAGNY
 T I I LLSIKQSNVFKNL TATLI VNVKPKDTHTC PPCPAPE LLGGP SVFLFPPKPKD TLMI SRT PEVTCVV
 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKFREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
 IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCEVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK

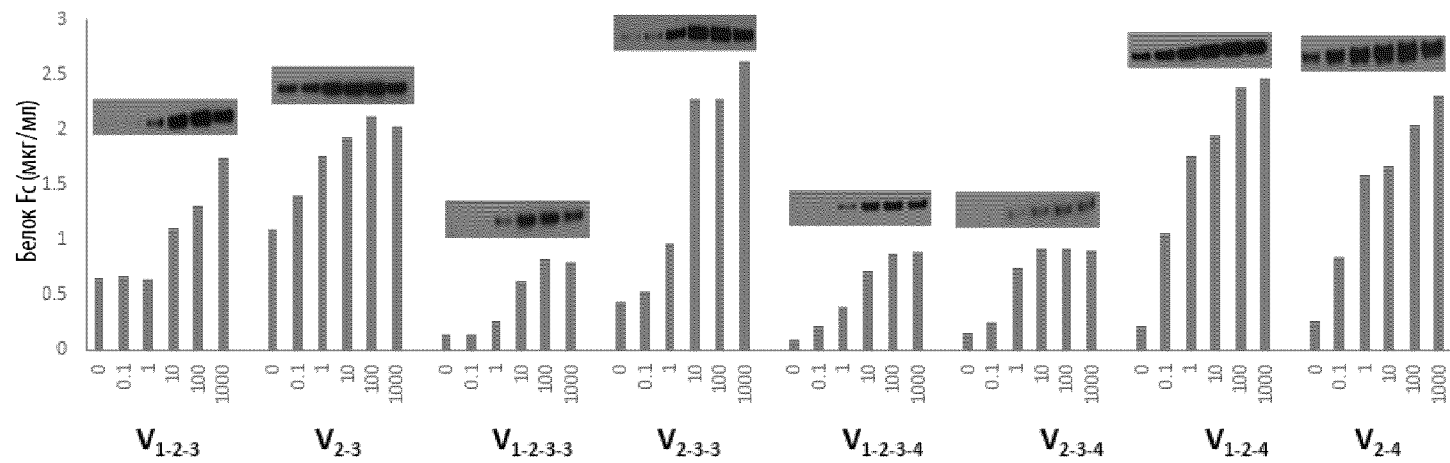
Последовательность нуклеиновой кислоты

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGTCCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGCTTGCTTCTCACAGGATC
 TAGTTCAGGTATATTTAT TAGT GATACAGGTAGA CCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAATCCCGAAA
 TTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGT CATTCCTGCGGGTTACGTCACCTAACATCACTGTT
 ACTT TAAAAAGT T TCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAA CGCATAATCTGGGACAGTAGAAA
 GGGCTT CATCATATCAAA TGCAACGTACAAA GAAATAGGGCTTCTGA CCTGTGAAGCAA CAGTCAATG
 GGCATT TGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAAACCAATACAATCATAGATGTC TT CATCACT
 GTGAAACATCGAAAA CAGCAGGTGCTT GAAA CCGTAGCTGGCAAGCGGTCTTACCGGCTCTCTATGAA
 AGTGAAGGCATTTCCCTGCGCGAAGTGTATGCGTTAAAAAGATGGGT TACCTGCGACTGAGAAATCTG
 CTGCTATTTGACTCGTGGCTACTCGT TAAAT TATCAAGGACGTAACTGAAGAGGATGCAGGGAAT TAT
 ACAATCTTTGCTGAGCATAAAACAGTCAAATGRTTTAAAAACCTCACTGCCTACTCTAAT TGTCAATGT
 GAAAACCGGACAAAAC TACACATGCCACCGTGCOCAGCACCTGAAC TCTGGGGGGACCGTCAGTCT
 TCCTCTTCCCCCAAACCCAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG
 GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
 TGCCAAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTTACCGTGTGGTCAGCGTCTCCACCGTCC
 TGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCC
 ATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATC
 CCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGCTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACA
 TCGCCGTGGAGTGGGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGAC
 TCCGACGGCTCCTTCTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT
 CTTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
 CGGTAAA

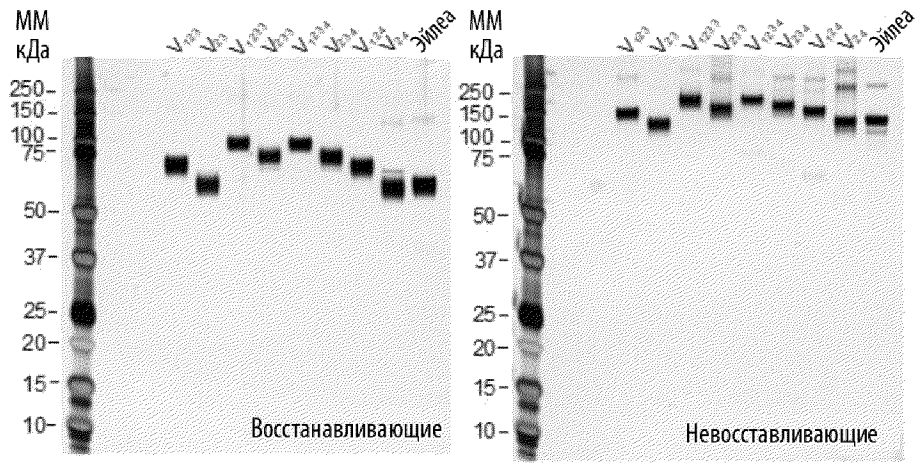
Серый с курсивом: сигнальный пептид; Голубой: Ig-подобный домен 2; Зеленый: Ig-подобный домен 4
 Черный с подчеркиванием: Fc-фрагмент человеческого IgG1

Фиг. 9

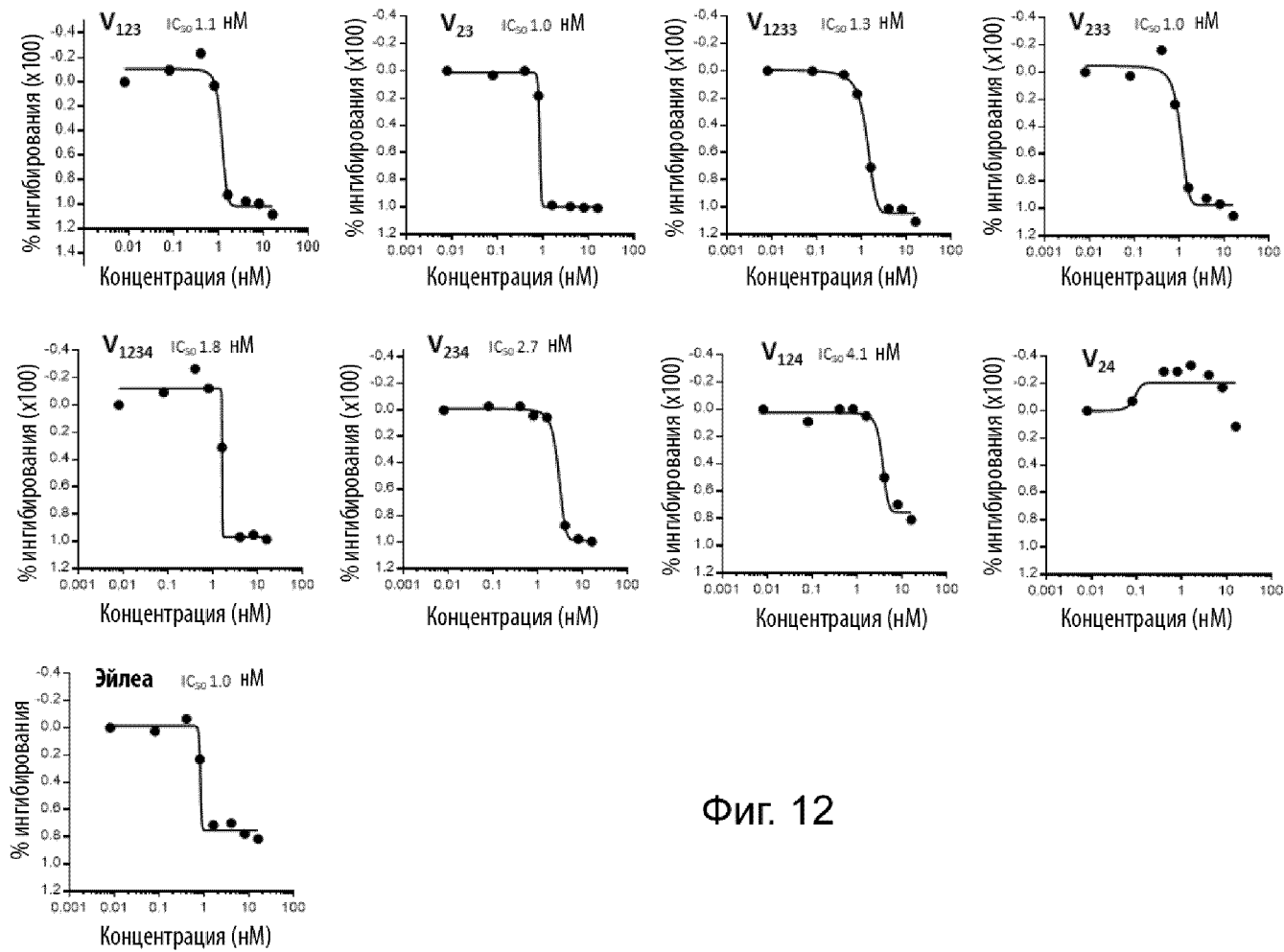
Экспрессия конструкторов VEGFR1 в клетках 293: Влияние гепарина (0-1000 мкг/мл) на высвобождение



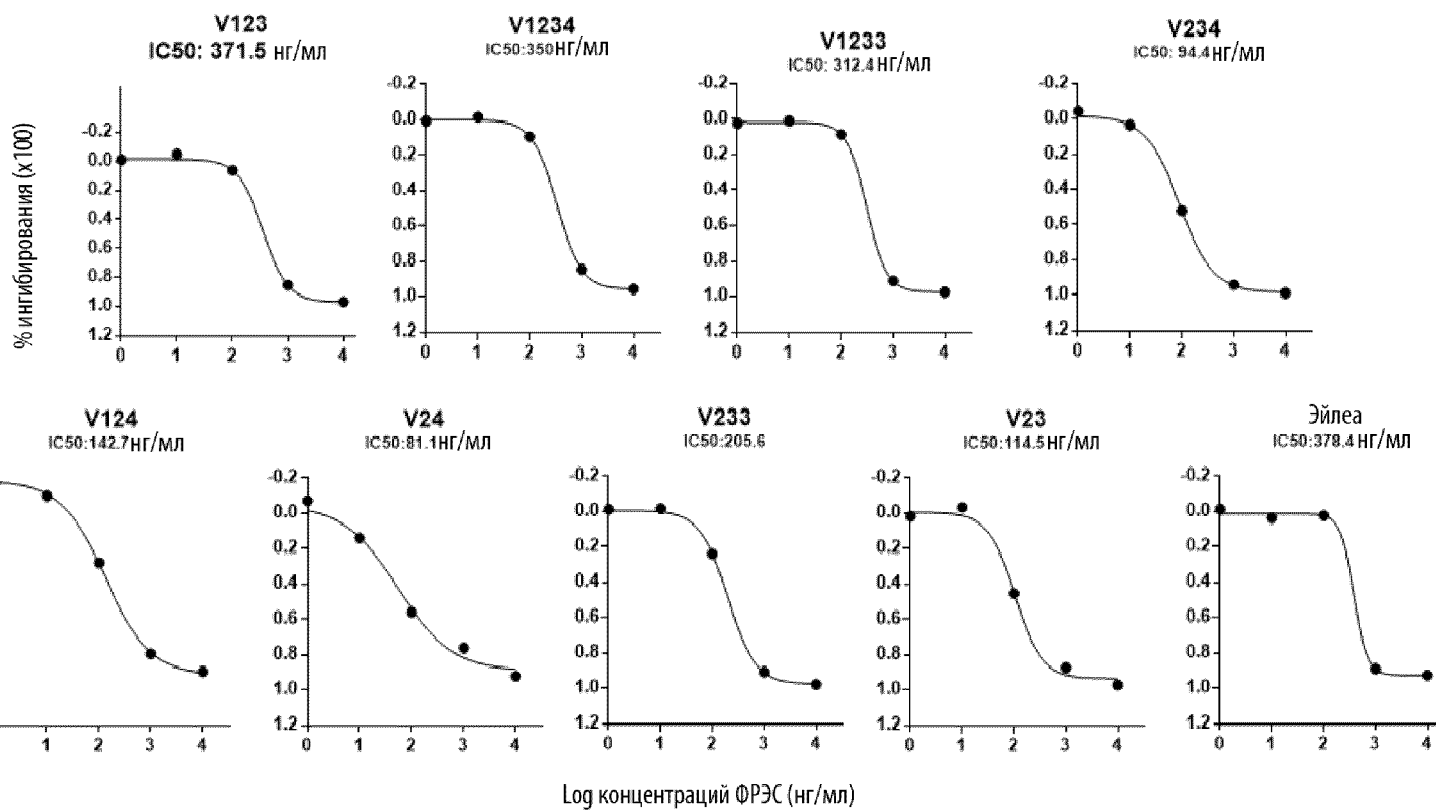
Фиг. 10



Фиг. 11

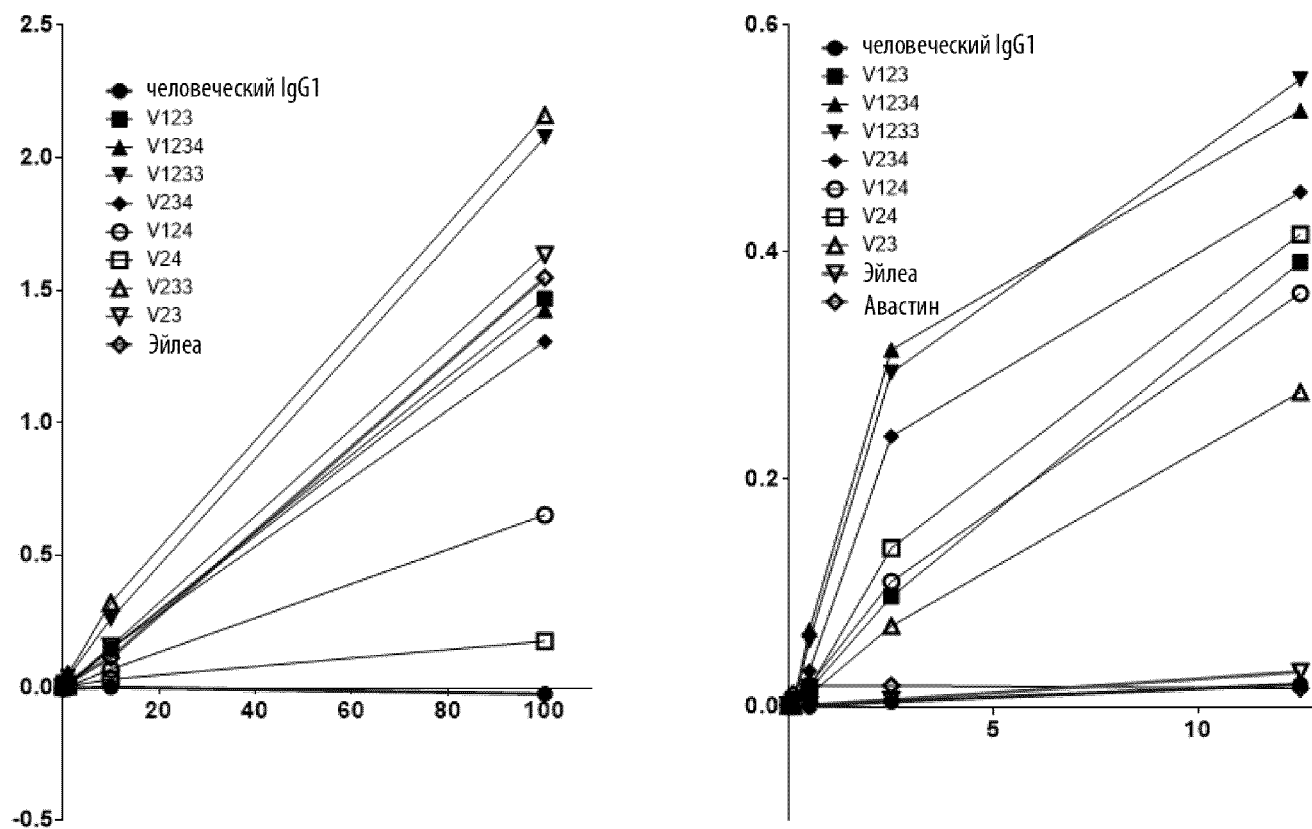


Фиг. 12

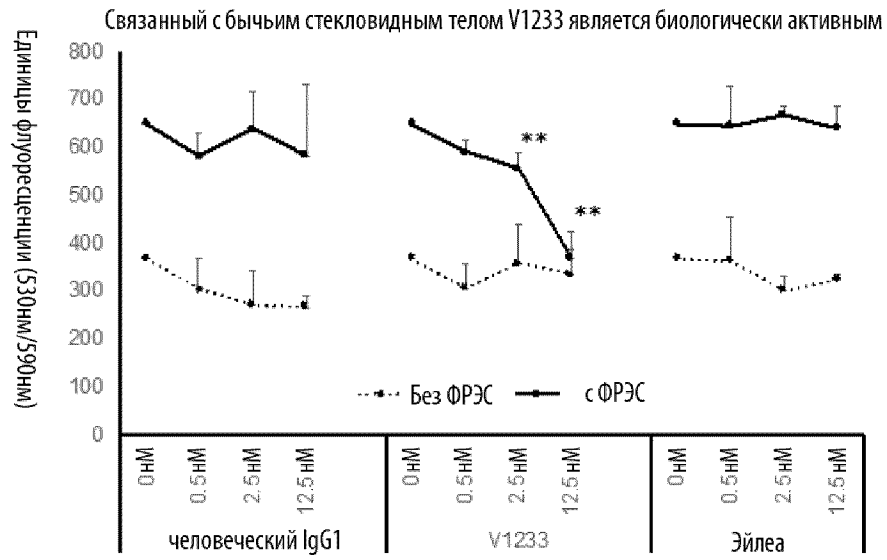


Фиг. 13

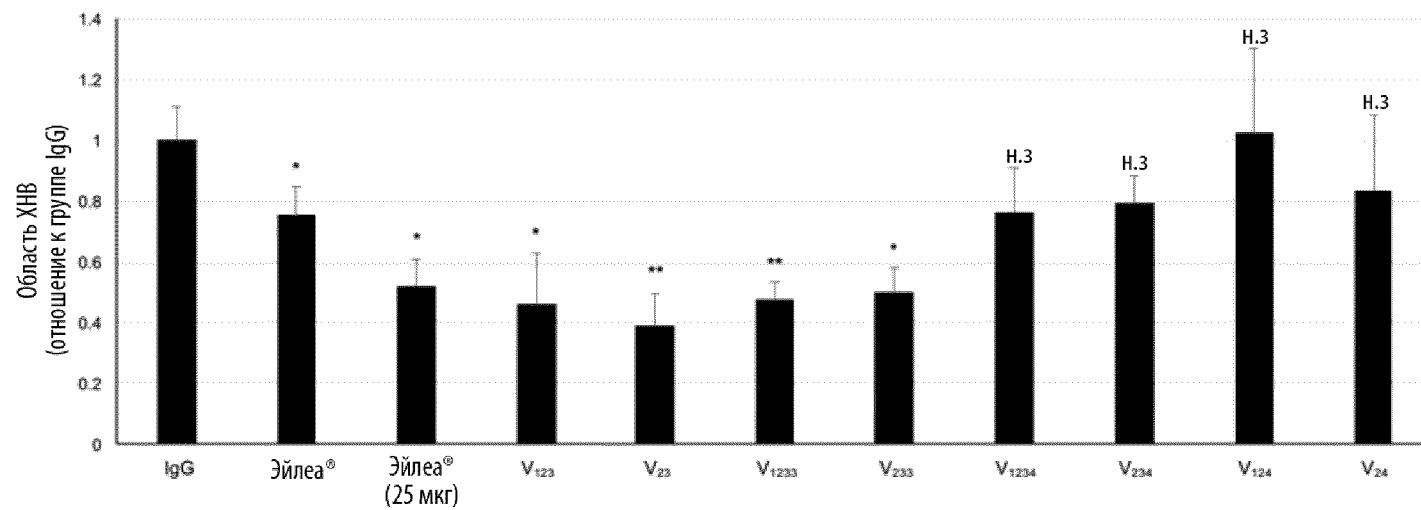
Связывание растворимого рецептора VEGFR1 с бычьим стекловидным телом Связывание растворимого рецептора VEGFR1 с биотинилированным ФРЭС



Фиг. 14

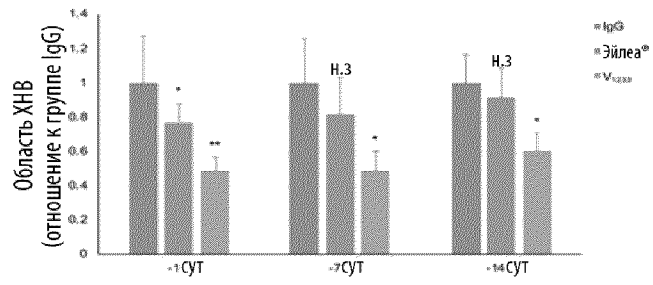


Фиг. 15

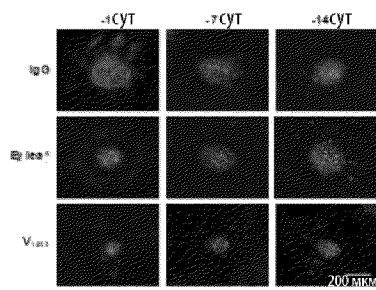


Фиг. 16

17/17



Фиг. 17А



Фиг. 17В