

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039595**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.15

(21) Номер заявки
201990403

(22) Дата подачи заявки
2013.10.07

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, КОДИРУЮЩИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИ-VEGFR-2/
KDR-АНТИТЕЛА**

(31) **61/710,420**

(32) **2012.10.05**

(33) **US**

(43) **2019.07.31**

(62) **201500363; 2013.10.07**

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

(72) Изобретатель:
**Чжу Чжэньпин, Лу Дан, Полонская
Жанна (US)**

(74) Представитель:
**Парамонова К.В., Джермакян Р.В.,
Гизатуллина Е.М., Гизатуллин Ш.Ф.,
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,
Строкова О.В., Угрюмов В.М. (RU)**

(56) WO-A2-2012004631
US-B2-7329737
US-B2-7790862
US-B2-8128932
US-B2-7910098
US-A1-20120213841
US-B2-8114968
US-A1-20120202793
WO-A1-2010045315
WO-A2-2004023973

(57) Изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим антитела, которые связываются с VEGFR-2 и эффективны для лечения неопластических заболеваний, гиперпролиферативных процессов, ангиогенных нарушений.

039595

B1

039595

B1

Область техники

Изобретение относится к антителам, которые связываются с VEGFR-2. Эти антитела используются для лечения неопластических заболеваний и гиперпролиферативных процессов и могут применяться в качестве монотерапии или в сочетании с другими агентами.

Перекрестные ссылки на родственные заявки

В настоящей заявке заявляется приоритет по заявке на патент США № 61/710420, поданной 5 октября 2012 года, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

Ангиогенез представляет собой весьма сложный процесс развития новых кровеносных сосудов, который включает пролиферацию, миграцию и инфильтрацию тканей капиллярными эндотелиальными клетками из ранее существовавших кровеносных сосудов, объединение клеток в тубулярные структуры, присоединение вновь сформированных тубулярных комплексов к замкнутой сосудистой системе и созревание вновь сформированных капиллярных сосудов.

Ангиогенез имеет важное значение для нормальных физиологических процессов, включая эмбриональное развитие, фолликулярный рост и заживление ран. Чрезмерный ангиогенез также приводит к неоваскуляризации при неопластических заболеваниях и при неопухолевых патологиях, таких как возрастная макулярная дегенерация, диабетическая ретинопатия и неоваскулярная глаукома. Доказано, что антиангиогенная терапия с применением ранибизумаба (Луцентис), направленная на сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), эффективно задерживает прогрессирование ВМД (возрастная макулярная дегенерация). Однако неоваскуляризация сложна, и, похоже, в ее развитии участвует множество ангиогенных механизмов. Поэтому существует необходимость разработки агентов и терапий для лечения заболеваний, ассоциированных с неоваскуляризацией.

Сущность изобретения

В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его фрагмент, которое связывается с человеческим VEGFR2, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи, которая имеет последовательности

CDR-1H, CDR-2H и CDR-3H,

и вариабельный домен легкой цепи, которая имеет последовательности

CDR-1L, CDR-2L и CDR-3L,

при этом:

- (i) последовательность CDR-1H - GFTFSWYVMG,
- (ii) последовательность CDR-2H - SIYPSGGATNYADSVKG,
- (iii) последовательность CDR-3H - GNYFDY (SEQ ID NO:3), и
- (iv) последовательности CDR-1L, CDR-2L и CDR-3L выбраны из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7;
 SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23;
 SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27;
 SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31;
 SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35;
 SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39;
 SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 43;
 SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47;
 SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: 159;
 SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162 и SEQ ID NO: 163.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитело содержит CDR-1L с последовательностью SEQ ID NO: 5, CDR-2L с последовательностью SEQ ID NO: 6 и CDR-3L с последовательностью SEQ ID NO: 7.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 4.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитело содержит вариабельный домен легкой цепи с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 8.

Изобретение также обеспечивает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его фрагмент, которое связывается с человеческим VEGFR2, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи, которая имеет последовательности CDR-1H, CDR-2H и CDR-3H, и вариабельный домен легкой цепи, которая имеет последовательности CDR-1L, CDR-2L и CDR-3L, при этом

- (i) последовательность CDR-1H - GFTFSWYIML,
- (ii) последовательность CDR-2H - SIGSSGGFTDYADSVKG,
- (iii) последовательность CDR-3H - GLAAPRS (SEQ ID NO: 11) и
- (iv) последовательности CDR-1L, CDR-2L и CDR-3L выбраны из группы, состоящей из

SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15;
 SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23;
 SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27;
 SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31;
 SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35;
 SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39;
 SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 43;
 SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47;
 SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: 159;
 SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162 и SEQ ID NO: 163.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитело содержит CDR-1L с последовательностью SEQ ID NO: 13, CDR-2L с последовательностью SEQ ID NO: 14 и CDR-3L с последовательностью SEQ ID NO: 15.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитело содержит переменный домен тяжелой цепи с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 12.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитело содержит переменный домен легкой цепи с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 16.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитело содержит CDR-1L с последовательностью SEQ ID NO: 25, CDR-2L с последовательностью SEQ ID NO: 26 и CDR-3L с последовательностью SEQ ID NO: 27.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитело содержит переменный домен легкой цепи с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28 и последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 28.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитело содержит CDR-1L с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR-2L с последовательностью SEQ ID NO: 30 и CDR-3L с последовательностью SEQ ID NO: 31.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитело содержит переменный домен легкой цепи с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32 и последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 32.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитело блокирует связывание VEGF с hVEGFR2.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1А-С иллюстрируют последовательности переменных участков тяжелой цепи, легкой цепи лямбда и легкой цепи каппа соответственно анти-VEGFR2-антител по данному изобретению, определенных с помощью фагового дисплея у человека.

Фиг. 2 иллюстрирует связывание антител по настоящему изобретению с VEGFR2 (вверху) и конструкцией, содержащей домены 2 и 3 в VEGFR2 (в середине). Нижняя панель иллюстрирует блокирование лигандов (VEGF₁₆₅).

Фиг. 3 иллюстрирует Mab 101 и 102 по настоящему изобретению, которые ингибируют VEGF-стимулированное фосфорилирование VEGFR2, AKT и MAPK в эндотелиальных клетках аорты свиньи (PAE), избыточно экспрессирующих KDR (человеческий VEGFR2).

Фиг. 4 иллюстрирует связывание с hVEGFR2 и блокирование VEGF₁₆₅-лигандов с помощью Mab 104, 105, 106 и 108. Подобные результаты были получены для Mab 103, 107, 109 и 110 в отдельном эксперименте. Такие Mab содержат домен переменного участка тяжелой цепи Mab 101, объединенный с доменами переменного участка легкой цепи.

Фиг. 5 иллюстрирует Mab 105 и 106 по настоящему изобретению, которые ингибируют VEGF-стимулированное фосфорилирование VEGFR2, AKT и MAPK в эндотелиальных клетках аорты свиньи (PAE), избыточно экспрессирующих KDR (человеческий VEGFR2).

Подробное описание сущности изобретения

Настоящее изобретение предлагает человеческие антитела и их фрагменты, которые связываются с VEGFR-2 (KDR). В некоторых вариантах реализации изобретения антитела блокируют связывание лигандов (например, одного или более из VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D или VEGF-E) с VEGFR-2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела нейтрализуют активацию VEGFR-2. Антитела используются для лечения неопластических заболеваний, в том числе, например, солидных и несоллидных опухолей и гиперпролиферативных процессов. Таким образом, изобретение предлагает способы нейтрализации активации KDR, способы ингибирования роста опухоли, в том числе ингибирования ангиогенеза, ассоциированного с опухолью, и способы лечения заболеваний, связанных с нарушением ангиогенеза. Настоящее изобретение предлагает наборы человеческих антител или фрагменты антител, которые связываются с рецепторами VEGFR.

Настоящее изобретение предлагает изолированный переменный участок тяжелой цепи, содержа-

щий последовательности CDR-1H, CDR-2H и CDR-3H, при этом

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

(ii) последовательность CDR-2H - это SIX₁X₂SGGX₃TX₄YADSVK (SEQ ID NO: 186), где X₁ - это Y или G, X₂ это P или S, X₃ - это A или F, X₄ - это N или D, и

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

Настоящее изобретение предлагает изолированный вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR-1L, CDR-2L или CDR-3L, при этом

(i) последовательность CDR-1L - это X₁GX₂X₃LX₄X₅X₆X₇X₈S (SEQ ID NO: 187), где X₁ - это S, Q, или T, X₂ - это D, E или Q, X₃ - это K, S, N, I или A, X₄ это G или R, X₅ - это D, S, H, E или N, X₆ - это E, Y, Q, R или N, X₇ - это Y, F или S и X₈ - это A или S или SGSX₁SNX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO:188), где X₁ - это S или T, X₂ - это I или L, X₃ - это E или G, X₄ - это T, S, или N, X₅ - это N или Y, X₆ - это T, P, A или Y, X₇ -это V или L и X₈ - это N, I или Y или X₁GX₂SX₃DX₄GX₅YDYVS (SEQ ID NO: 189), где X₁ - это A или T, X₂ - это S или T, X₃ - это H, S или N, X₄ - это I или V и X₅ - это S или A,

(ii) последовательность CDR-2L - это X₁X₂X₃X₄X₅PS (SEQ ID NO: 190), где X₁ -это Q, D, T, Y, S или A, X₂ - это D, N, S, T, V или V, X₃ - это D, N, S, T или Y, X₄ - это Q, K, N или L и X₅ - это R или L, и

(iii) где последовательность CDR-3L - это QX₁WX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 191), где X₁ - это A или T, X₂ - это D или G, X₃ - это R или нет аминокислоты, X₄ - это S, F на N, X₅ - это S, T на N, X₆ - это S, T или P, X₇ - это A, V, L, I или Y и X₈ -это V или L или AX₁WDDX₂LX₃X₄X₅X₆ (SEQ ID NO: 192), где X₁ - это A, S или T, X₂ -это N или S, X₃ - это N, I или G, X₄ - это G или S, X₅ - это P, W или V и X₆ - это V или L или MYSTITX₁LL (SEQ ID NO: 193), где X₁ - это A или T.

Настоящее изобретение предлагает изолированный вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR-1L, CDR-2L или CDR-3L, при этом

(i) последовательность CDR-1L - это RASX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇YX₈X₉ (SEQ ID NO: 194), где X₁ - это Q, E, или H, X₂ - это S, R, или N, X₃ - это V, I или L, X₄ - это S, R, G или N, X₅ - это S или N, X₆ - это S, N, W или D, X₇ - это G или нет аминокислоты, X₈ - это L или F и X₉ - это A, G, M или S,

(ii) последовательность CDR-2L - это GASX₁RAT (SEQ ID NO: 195), где X₁ - это S, T, I, или N, и

(iii) последовательность CDR-3L - это QX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 196), где X₁ - это F или Y, X₂ - это D, G или Y, X₃ - это S, T или N, X₄ - это S, L или W, X₅ - это P или нет аминокислоты, X₆ - это P или T, X₇ - это L, I, V, P, W или Y и X₈ - это T или S.

Антитело представляет собой антитело, указанное в табл. 2. В одном из вариантов реализации изобретения антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO: 4. В одном из вариантов реализации изобретения антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO:28. В другом варианте реализации настоящего изобретения антитело содержит домен легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 32.

Антитело используется в способе нейтрализации активации VEGFR2, который предполагает приведение клетки в контакт с эффективным количеством антитела.

Антитело используется в способе ингибирования ангиогенеза у субъекта, при котором предполагается введение эффективного количества антитела. В некоторых таких вариантах реализации изобретения антитело вводят с эффективным количеством антагониста, ассоциированного с rho-киназой 2 (ROCK 2)

Антитело используют в способе для лечения опухоли или подавления роста опухоли у субъекта, при котором предполагается введение эффективного количества антитела. В некоторых таких вариантах реализации изобретения антитело вводят с эффективным количеством антагониста рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). В некоторых таких вариантах реализации изобретения антитело вводят с эффективным количеством антагониста рецептора fms-подобной тирозинкиназы (flt-1). В некоторых таких вариантах реализации изобретения антитело вводят с эффективным количеством антагониста rho-ассоциированной киназы (ROCK). В дополнительных таких вариантах реализации изобретения антитело вводят с эффективным количеством антагониста матричных металлопротеиназ.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает новые антитела VEGFR2 или антигенсвязывающие фрагменты таких антител, использование которых эффективно для ингибирования VEGFR2-зависимой трансдукции сигнала. Используемый в настоящем документе термин "ингибирование рецептора" означает уменьшение и/или инактивацию естественной киназной активности рецептора для трансдукции сигнала. Достоверным анализом для определения ингибирования VEGFR2 является снижение фосфорилирования рецептора.

Настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным механизмом ингибирования VEGFR2. Механизм действия одного антитела не обязательно тот же, что другого. Некоторые возможные механизмы включают предотвращение связывания VEGF лиганда с внеклеточным связывающим доменом VEGFR2 и предотвращение димеризации и олигомеризации рецепторов. В то же время другие механизмы не могут быть исключены.

Антитела представляют собой белки, которые распознают и связываются со специфическим антигеном или веществом. В предпочтительных вариантах реализации изобретения антитела по настоящему изобретению связывают KDR, по меньшей мере, так же сильно, как природный лиганд. Аффинность,

представленная константой равновесия для диссоциации антигена с антителом (K_d), измеряет силу прочности связывания между антигенной детерминантой и участком связывания антител. Авидность является мерой прочности связывания между антителом и его антигеном. Авидность связана как с аффинностью между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим участком антитела, так и с количеством участков связывания (валентность) на антителе. Например, одновалентное антитело (к примеру, Fab) имеет один участок связывания для конкретного эпитопа. Антитело IgG имеет два антигенсвязывающих участка. Типичные значения K (обратная константа диссоциации K_d) составляют 10^5 до 10^{11} л/моль. Считается, что любое значение K ниже, чем 10^4 л/моль, указывает на связывание, которое является неспецифическим.

Антитела по настоящему изобретению ингибируют активацию VEGFR2. Одним из показателей ингибирования VEGFR2 является сниженная тирозинкиназная активность рецептора. Ингибирование тирозинкиназы может быть определено с использованием известных методов, таких как измерение уровня аутофосфорилирования рецептора. Ингибирование VEGFR2 также может наблюдаться в результате ингибирования или регулирования процессов фосфорилирования природных или синтетических субстратов VEGFR2 и других компонентов пути сигнальной трансдукции VEGFR2. Фосфорилирование может быть обнаружено, например, с использованием антитела, специфичного для фосфотирозина в анализе ELISA или при вестерн-блоте. Некоторые исследования тирозинкиназной активности описаны в Panek et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 283: 1433-44 (1997) и Batley et al., *Life Sci.*, 62: 143-50 (1998).

Также могут быть проведены исследования *in vivo*. Например, ингибирование рецепторной тирозинкиназы можно обнаружить при анализе митоза с использованием клеточных линий, стимулированных рецептором лиганда в присутствии и в отсутствие ингибитора. Например, клетки HUVEC (ATCC), стимулированные VEGF, могут быть использованы для анализа ингибирования VEGFR. Другой способ включает анализ ингибирования роста VEGF-экспрессирующих опухолевых клеток с использованием, например, опухолевых клеток человека, введенных мышам. См. патент США № 6365157 (Rockwell et al.).

Настоящее изобретение предлагает анти-VEGFR2-антитела, в том числе нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела, и композиции, содержащие такие антитела. В одном из вариантов реализации изобретения предлагается изолированный вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR-1H, CDR-2H и CDR-3H, при этом

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

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

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

В одном из вариантов реализации изобретения предлагается изолированный вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR-1L, CDR-2L, или CDR-3L, при этом

(i) последовательность CDR-1L - это X₁GX₂X₃LX₄X₅X₆X₇X₈S (SEQ ID NO: 187), где X₁ - это S, Q или T, X₂ - это D, E или Q, X₃ - это K, S, N, I или A, X₄ это G или R, X₅ - это D, S, H, E или N, X₆ - это E, Y, Q, R или N, X₇ - это Y, F или S и X₈ - это A или S или SGSX₁SNX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 188), где X₁ - это S или T, X₂ - это I или L, X₃ - это E или G, X₄ - это T, S или N, X₅ - это N или Y, X₆ - это T, P, A или Y, X₇ - это V или L, and X₈ - это N, I или Y, или X₁GX₂SX₃DX₄GX₅YDYVS (SEQ ID NO: 189), где X₁ - это A или T, X₂ - это S или T, X₃ - это H, S или N, X₄ - это I или V и X₅ - это S или A,

(ii) последовательность CDR-2L - это X₁X₂X₃X₄X₅PS (SEQ ID NO: 190), где X₁-это Q, D, T, Y, S или A, X₂ - это D, N, S, T или V, X₃ - это D, N, S, T или Y, X₄ - это Q, K, N или L и X₅ - это R или L,

(iii) где последовательность CDR-3L - это QX₁WX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 191), где X₁ - это A или T, X₂ - это D или G, X₃ - это R или нет аминокислоты, X₄ - это S, F или N, X₅ - это S, T или N, X₆ - это S, T или P, X₇ - это A, V, L, I или Y и X₈ -это V или L или AX₁WDDX₂LX₃X₄X₅X₆ (SEQ ID NO: 192), где X₁ - это A, S или T, X₂ -это N или S, X₃ - это N, I или G, X₄ это G или S, X₅ - это P, W или V и X₆ - это V, или L, или MYSTITX₁LL (SEQ ID NO: 193), где X₁ - это A или T.

В одном из вариантов реализации изобретения предлагается изолированный вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий CDR-1L, CDR-2L, или CDR-3L, при этом

(i) последовательность CDR-1L - это RASX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇YX₈X₉ (SEQ ID NO: 194), где X₁ - это Q, E или H, X₂ - это S, R или N, X₃ - это V, I или L, X₄ - это S, R, G или N, X₅- это S или N, X₆ - это S, N, W или D, X₇ - это G или нет аминокислоты, X₈ - это L или F и X₉ - это A, G, M или S,

(ii) последовательность CDR-2L - это GASX₁RAT (SEQ ID NO: 195), где X₁ - это S, T, I или N, и

(iii) последовательность CDR-3L - это QX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 196), где X₁ - это F или Y, X₂ - это D, G или Y, X₃ - это S, T или N, X₄ - это S, L или W, X₅ -это P или нет аминокислоты, X₆ - это P или T, X₇ - это L, I, V, P, W или Y и X₈ - это T или S.

В одном из вариантов реализации изобретения предлагается антитело, которое содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий одну, две, три, четыре, пять или шесть последовательностей вариабельного домена CDR легкой цепи и вариабельного домена тяжелой цепи, указанных выше.

Предлагаются неограничивающие примеры последовательностей VEGFR2-связывающих антител. Как описано в настоящем документе, из библиотек фагового дисплея Fab человека идентифицированы

два нейтрализующие антитела, которые связываются с человеческим VEGFR2, блокируют связывание лиганда VEGFA с hVEGFR2 и подавляют фосфорилирование VEGFR2 и нисходящую сигнальную трансдукцию, стимулированную VEGFA. Табл. 1 показывает аминокислотные последовательности CDR и переменные домены антител. K_d s Mab 101 и Mab 102 составляют около 6.6 нМ и 1.7 нМ соответственно.

Таблица 1. Антитела аминокислотных последовательностей, SEQ ID NO

Mab	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	V _H домен	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	V _L домен
101	1	2	3	4	5	6	7	8
102	9	10	11	12	13	14	15	16

Тяжелая цепь Mab 101 была перегруппирована с генами к легкой цепи (κ-библиотека) и генами λ легкой цепи (λ-библиотека). 20 уникальных вариантов λ легкой цепи были найдены путем скрининга λ-библиотеки с VEGFR2 человека и VEGFR2 мыши. 22 уникальных варианта κ легкой цепи были найдены путем скрининга κ-библиотеки с VEGFR2 человека и VEGFR2 мыши. В табл. 2 указаны аминокислотные последовательности CDR и переменные домены легких цепей. K_d Mab 105, 106 и 107 увеличивались приблизительно в 10-кратном размере (0,24 нМ, 0,22 нМ и 0,12 нМ соответственно). Подобно родительскому антителу эти антитела связываются с VEGFR2, блокируют связывание VEGFA с VEGFR2 и подавляют VEGFA-стимулируемое фосфорилирование VEGFR2, AKT и MAPK (фиг. 4).

Некоторые из антител, включая Mab, 138, 139, 140 и 146, также перекрестно реагируют с VEGFR2 мыши. Эти антитела также ингибировали VEGFA-стимулируемое фосфорилирование VEGFR2 и молекул нисходящей сигнальной трансдукции, включая MAPK.

Таблица 2. κ и λ легкие цепи SEQ ID NO

Mab	Легкая цепь	SEQ ID NO				Mab	Легкая цепь	SEQ ID NO			
		CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	V _L			CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	V _L
103	λ	17	18	19	20	124	κ	101	102	103	104
104	λ	21	22	23	24	125	κ	105	106	107	108
105	λ	25	26	27	28	126	κ	109	110	111	112
106	λ	29	30	31	32	127	κ	113	114	115	116
107	λ	33	34	35	36	128	κ	117	118	119	120
108	λ	37	38	39	40	129	κ	121	122	123	124
109	λ	41	42	43	44	130	κ	125	126	127	128
110	λ	45	46	47	48	131	κ	129	130	131	132
111	λ	49	50	51	52	132	κ	133	134	135	136
112	λ	53	54	55	56	133	κ	137	138	139	140
113	λ	57	58	59	60	134	κ	141	142	143	144
114	λ	61	62	63	64	135	κ	145	146	147	148
115	λ	65	66	67	68	136	κ	149	150	151	152
116	λ	69	70	71	72	137	κ	153	154	155	156
117	λ	73	74	75	76	138	κ	157	158	159	160
118	λ	77	78	79	80	139	κ	161	162	163	164
119	λ	81	82	83	84	140	κ	165	166	167	168
120	λ	85	86	87	88	141	κ	169	170	171	172
121	λ	89	90	91	92	142	κ	173	174	175	176
122	λ	93	94	95	96	143	κ	177	178	179	180
123	κ	97	98	99	100	144	κ	181	182	183	184

В изобретении предлагается изолированное антитело VEGFR2 и связывающие фрагменты VEGFR2, которые содержат одну, две или три CDR тяжелой цепи и одну, две или три CDR легкой цепи, выбранных из последовательностей, отраженных в табл. 1 и табл. 2. При выборе более чем одной CDR из последовательностей, представленных в табл. 1 и табл. 2, в антителе по настоящему изобретению не следует выбирать различные CDR из тех же моноклональных антител, представленных в этих таблицах. Они могут быть выбраны из двух или более переменных доменов антитела, представленных в таблицах. Конкретные варианты реализации изобретения включают, но не ограничиваются, следующие.

В одном из вариантов реализации изобретения изолированное антитело VEGFR2 содержит одну, две или три CDR тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3. В одном из вариантов реализации изобретения антитело содержит одну, две или три CDR легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7. В другом варианте реализации изобретения антитело содержит од-

ну, две или три CDR легкой цепи, имеющие последовательности, отраженные в табл. 1 или 2. Неограничивающие примеры включают переменный участок легкой цепи, содержащий одну или более из SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27, одну или несколько SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31 или одну или несколько SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело VEGFR2 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело VEGFR2 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела содержат один из вышеупомянутых переменных доменов тяжелой цепи и один из вышеупомянутых переменных доменов легкой цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела VEGFR2 или их связывающие фрагменты содержат одну или больше CDR или один или больше переменный домен с аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательностям CDR и переменного домена, указанным в табл. 1 или 2.

Термин "идентичность" относится к количеству или проценту идентичных положений, распределенных между двумя аминокислотами или последовательностями нуклеиновых кислот, принимая во внимание количество пропусков. Для оптимального выравнивания двух последовательностей должна быть введена длина каждого пропуска. Термин "по существу идентичные" относится к аминокислотным последовательностям, которые отличаются только консервативными заменами аминокислот, например заменой одной аминокислоты на другую того же класса (например, валина на глицин, лизина на аргинин и т.д.) или одной или более неконсервативными заменами, делецией или вставками, расположенными в положениях аминокислотной последовательности, которые не разрушают функцию белка. Предпочтительно, чтобы аминокислотная последовательность была сходной с другой аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 85% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 90%. Способы и компьютерные программы для определения сходства последовательностей являются общедоступными, в том числе, но не ограничиваясь, пакет программ GCG (Devereux et al., *Nucleic Acids Research* 12: 387, 1984), BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990)) и программа ALIGN (версия 2.0). Для определения сходства также может быть использован известный алгоритм Смита Ватермана (Smith Waterman). Программа BLAST является общедоступной в NCBI и других источниках (BLAST Manual, Altschul, et al., NCBI NLM NIH, Bethesda, MD. 20894; BLAST 2.0 at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). При сравнении последовательностей эти методы учитывают различные замены, делеции и другие модификации. Консервативные замены обычно включают замены в пределах следующих групп: глицин, аланин; валин, изолейцин, лейцин; аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аспарагин, глутамин; серин, треонин; лизин, аргинин; фенилаланин, тирозин.

Антитела по настоящему изобретению также включают те, связывающие характеристики которых были улучшены путем прямой мутации, способов созревания аффинности, фагового дисплея или перестановки цепей. Аффинность и специфичность могут быть изменены или улучшены путем мутации CDR и скрининга антигенсвязывающих участков, имеющих желаемые характеристики. CDR мутируют различными способами. Один из способов заключается в рандомизации отдельных остатков или комбинации остатков таким образом, что в популяции идентичных антигенсвязывающих участков все двадцать аминокислот обнаруживаются в определенной позиции. Кроме того, мутации индуцируются в диапазоне остатков CDR при ПЦР, допускающей ошибки (см., например, Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992)). Например, векторы фагового дисплея, содержащие гены переменного участка легкой цепи, могут быть размножены в мутаторных штаммах *E. coli* (см., например, Low et al., *J. Mol. Biol.*, 250: 359-368 (1996)). Эти способы мутагенеза являются типовыми способами, известными специалисту в данной области техники.

Для минимизации иммуногенности антител, которые связываются с рецепторами VEGF, в настоящем изобретении предлагаются антитела, которые содержат переменную и постоянную последовательности доменов человека. Антитела могут быть любого класса иммуноглобулинов или могут сочетать представителей любого класса иммуноглобулинов, например IgG, IgM, IgA, IgD или IgE и их подклассы. Для оптимизации эффекторных функций может быть выбран класс антитела (например, комплемент-зависимая цитотоксичность (КЗЦ) и антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ)) природных антител.

Некоторые варианты реализации изобретения включают использование VEGFR2-связывающих фрагментов антител. Fv является наименьшим фрагментом, который содержит полный переменный домен тяжелой и легкой цепи, включая все шесть гиперпеременных петель (CDR). Не имея постоянных доменов, переменные домены нековалентно связаны. Тяжелые и легкие цепи могут быть соединены в одну полипептидную цепь ("одноцепочечный Fv" или "оcFv") с помощью линкера, который позволяет V_H и V_L доменам ассоциировать с образованием антигенсвязывающего участка. В одном из вариантов реализации изобретения линкером является (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃. Поскольку фрагменты оcFv лишены постоянных доменов целых антител, они значительно меньше, чем целые антитела. Фрагменты оcFv также свободны от взаимодействий постоянного домена нормальной тяжелой цепи с другими биологиче-

скими молекулами, что может быть нежелательно в некоторых вариантах реализации изобретения.

Также могут быть использованы фрагменты антитела, содержащие V_H , V_L и в некоторых случаях C_L , C_H1 или другие постоянные домены. Моновалентные фрагменты антител, образованные ферментацией с помощью папаина, относятся к Fab и не имеют шарнирной области тяжелой цепи. Фрагменты, образованные ферментацией с помощью папаина, относятся к $F(ab')_2$, сохраняют шарнирную область тяжелой цепи и являются двухвалентными. Такие фрагменты могут быть также получены рекомбинантным путем. В данной области техники известны многие другие подходящие антигенсвязывающие фрагменты антител, которые включают без ограничения диатела, триатела, однодоменные антитела и другие одновалентные и мультиспецифичные формы.

Кроме того, в изобретении предлагаются поливалентные антигенсвязывающие белки, которые могут быть в форме, без ограничения, антител, их антигенсвязывающих фрагментов, белков, содержащих все или часть антиген-связывающих сегментов антител. Поливалентные антиген-связывающие белки могут быть моноспецифичными, биспецифичными или мультиспецифичными. Термин "специфичность" относится к числу различных типов антигенных детерминант, с которыми может связываться определенная молекула. Если молекула иммуноглобулина связывается с только одним типом антигенной детерминанты, такая молекула иммуноглобулина является моноспецифичной. Если молекула иммуноглобулина связывается с разными типами антигенных детерминант, такая молекула иммуноглобулина является мультиспецифичной.

Например, биспецифичное поливалентное одноцепочечное антитело позволяет распознать два различных типа эпитопов. Оба эпитопа могут быть на одном и том же антигене (например, VEGFR2). Кроме того, один эпитоп может быть на одном антигене (например, VEGFR2), а второй эпитоп - на другом антигене.

В одном варианте реализации изобретения поливалентное одноцепочечное антитело включает вариабельный фрагмент легкой цепи, связанный с вариабельным фрагментом тяжелой цепи (аналогичный оcFv), который дополнительно связан с помощью другого пептидного линкера по меньшей мере с одним другим антиген-связывающим доменом. Как правило, пептидный линкер состоит из пятнадцати аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте реализации изобретения количество V_L и V_H доменов является эквивалентным. Например, двухвалентное одноцепочечное антитело может быть представлено следующим образом: $V_L-L_1-V_H-L_2-V_L-L_3-V_H$, или $V_L-L_1-V_H-L_2-V_H-L_3-V_L$, или $V_H-L_1-V_L-L_2-V_H-L_3-V_L$, или $V_H-L_1-V_L-L_2-V_L-L_3-V_H$. Поливалентные одноцепочечные антитела, которые являются трехвалентными или характеризуются большей валентностью, имеют один или несколько фрагментов антитела, присоединенных к двухвалентному одноцепочечному антителу с дополнительными пептидными линкерами. Один из примеров трехвалентного одноцепочечного антитела: $V_L-L_1-V_H-L_2-V_L-L_1-V_H-L_2-V_L-L_1-V_H$.

Два одноцепочечных антитела могут быть объединены с образованием диатела, также известного как двухвалентный димер. Диатела имеют две цепи. Каждая цепь диатела включает домены V_H , связанные с доменами V_L с помощью короткого линкера, состоящего с около 5-10 аминокислотных остатков, например (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser), (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂. Такие линкеры являются достаточно короткими для предотвращения внутрицепочечного спаривания между доменами на одной и той же цепи. Поэтому происходит движущее межцепочечное спаривание между комплементарными доменами на разных цепях и воссоздается два антигенсвязывающих участка. Структура диатела является жесткой и компактной, с антигенсвязывающими участками, которые располагаются на противоположных концах молекулы. Диатела могут быть моноспецифичными или биспецифичными.

Три одноцепочечных антитела могут быть объединены с образованием триатела, также известных как трехвалентные тримеры. В некоторых вариантах реализации изобретения триатела создаются с карбоксиконца домена V_L или V_H , непосредственно сливаясь с аминоконцом домена V_H или V_L , т.е. без какой-либо линкерной последовательности. Триатело имеет три головки Fv из полипептидов, расположенных циклически "голова к хвосту". Возможная конформация молекулы триатела является плоской с тремя участками связывания, расположенными в плоскости под углом 120° друг от друга. Триатела могут быть моноспецифичными, биспецифичными или триспецифичными.

Подразумевается, что анти-VEGFR2-антитела по настоящему изобретению, которые используются с целью профилактики или лечения млекопитающих, могут быть введены в виде композиции, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, например, одно или больше веществ из нижеперечисленных: вода, физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер, декстроза, глицерин, этанол и тому подобные, а также их комбинации. Фармацевтически приемлемые носители могут дополнительно содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность антител.

В способах настоящего изобретения терапевтически эффективное количество антитела по настоящему изобретению вводят млекопитающему, нуждающемуся в этом. Термин "введение", используемый в настоящем документе, означает доставку антител настоящего изобретения млекопитающему любым способом, в результате которого можно достичь искомого результата. Введение может осуществляться, например, внутривенно или внутримышечно. Несмотря на то, что человеческие антитела по настоящему

изобретению особенно пригодны для введения человеку, они могут быть введены также другим млекопитающим. Термин "млекопитающее", используемый в настоящем документе, предусматривает обозначение, но не ограничивается, человека, лабораторных, домашних и сельскохозяйственных животных. "Терапевтически эффективное количество" означает такое количество антитела по настоящему изобретению, которое при введении млекопитающему обеспечивает эффективное достижение желаемого терапевтического эффекта, заключающегося в ингибировании активности киназы. Например, в зависимости от заболевания необходимое количество антитела может составлять 0,1; 1,0; 3,0; 6,0 или 10,0 мг/кг. Для IgG с молекулярной массой 150000 г/моль (два связывающих участка) эти дозы соответствуют приблизительно 18 нМ, 180 нМ, 540 нМ и 1,08 мкМ, и 1,8 мкМ связывающих участков для объема крови 5 л.

Антитела по настоящему изобретению могут быть использованы для ингибирования роста опухоли, ангиогенеза, связанного с ростом опухоли или других патологических состояний, связанных с ангиогенезом. Опухоли, при которых может быть назначено лечение, включают первичные опухоли, метастатические опухоли и резистентные опухоли. Резистентные опухоли включают опухоли, которые не отвечают или являются устойчивыми к лечению с применением монотерапии химиотерапевтическими агентами, монотерапии антителами, монотерапии излучением или их комбинации. Резистентные опухоли также включают опухоли, которые, как представляется, подавляются лечением с применением таких агентов, но рецидивируют в течении пяти лет, иногда десяти лет или больше после прекращения терапии. Антитела являются эффективными для лечения васкуляризированных опухолей и опухолей, которые не васкуляризированы или пока еще являются в значительной степени не васкуляризированными.

Примеры солидных опухолей, которые могут быть соответствующим образом пролечены, включают карциному молочной железы, карциному легких, колоректальный рак, карциному поджелудочной железы, глиому и лимфому. Некоторые примеры таких опухолей включают эпидермоидные опухоли, плоскоклеточные опухоли, такие как опухоли головы и шеи, толстого кишечника, простаты, молочной железы, легких, в том числе мелкоклеточные и немелкоклеточные опухоли легкого, поджелудочной железы, щитовидной железы, яичников и печени. Другие примеры включают саркому Капоши, опухоли ЦНС, нейробластомы, капиллярные гемангиобластомы, менингиомы и метастазы головного мозга, меланому, желудочно-кишечные и почечные карциномы и саркомы, рабдомиосаркому, глиобластому, предпочтительно мультиформную глиобластому и лейомиосаркому. Примеры васкуляризированных раков кожи, при лечении которых являются эффективными антагонисты по настоящему изобретению, включают плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному и рак кожи, которые можно лечить путем подавления роста злокачественных кератиноцитов, таких как злокачественные кератиноциты человека.

Примеры несолидных опухолей включают лейкоз, множественную миелому и лимфому. Некоторые примеры лейкозов включают острый миелолейкоз (ОМЛ), хронический миелолейкоз (ХМЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), эритроцитарный лейкоз или моноцитарный лейкоз. Некоторые примеры лимфом включают ходжкинскую и неходжкинскую лимфому.

Антитела по настоящему изобретению также могут быть использованы для лечения или профилактики патологических состояний, характеризующихся избыточным ангиогенезом, с наличием, например, васкуляризации и/или воспаления, таких как атеросклероз, ревматоидный артрит (РА), гемангиома, ангиофиброма и псориаз. Другие неограничивающие примеры неопухолевых ангиогенных заболеваний включают ретинопатию недоношенных (ретролентальная фиброплазия), отторжение трансплантата роговицы, инсулинзависимый сахарный диабет, рассеянный склероз, миастению гравис, болезнь Крона, аутоиммунный нефрит, первичный билиарный цирроз печени, острый панкреатит, отторжение аллографта, аллергическое воспаление, контактный дерматит и замедленные аллергические реакции, воспалительные заболевания кишечника, септический шок, остеопороз, остеоартрит, дефекты когнитивных функций, вызванные воспалением нейронов, синдром Ослера-Вебера, рестеноз, грибковые, паразитарные и вирусные инфекции, в том числе цитомегаловирусную инфекцию.

Глазные болезни с избыточным ангиогенезом включают неоваскулярную глаукому, пролиферативную ретинопатию, в том числе пролиферативную диабетическую ретинопатию и макулярную дегенерацию. Настоящее изобретение предполагает способы и соединения для лечения заболеваний и устройств со стороны органа зрения. В одном варианте реализации изобретения настоящее предполагает лечение возрастной макулярной дегенерации (ВМД), которая проявляется в "сухой" и "влажной" формах. "Влажная" форма ВМД вызывает потерю зрения из-за неправильного роста кровеносных сосудов (неоваскуляризации). Кровотечение, просачивание и рубцевание этих кровеносных сосудов сетчатки в конечном итоге вызывает необратимое повреждение фоторецепторов. Сухая форма вызывает атрофию ретинального пигментного эпителиального слоя, что приводит к потере зрения из-за гибели фоторецепторов (палочек и колбочек) в центральной части глаза. В другом варианте реализации настоящее изобретение предлагает способ лечения хориоидальной неоваскуляризации (ХНВ). Хориоидальная неоваскуляризация - это процесс, при котором новые кровеносные сосуды прорастают в сосудистую оболочку глаза через мембрану Бруха и вторгаются в субретинальное пространство, Хориоидальная неоваскуляризация является симптомом, в том числе, возрастной макулярной дегенерации, миопии и травм глаза. В другом варианте реализации настоящее изобретение предлагает способ лечения диабетического макулярного отека (ДМО). В другом варианте реализации настоящее изобретение предлагает способ лечения маку-

лярного отека, который является вторичным по отношению к окклюзии ветки вены сетчатки (ОВВС) или окклюзии центральной вены сетчатки (ОЦВС). Другие заболевания, которые можно лечить согласно данному изобретению, включают без ограничения неоваскуляризацию радужной оболочки, увеит, неоваскулярную глаукому и ретинит недоношенных (РН). Способ лечения может быть профилактическим, т.е. для предотвращения образования новых сосудов роговицы после трансплантации или для модулирования процесса заживления раны при трабекулэктомии.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут с успехом вводиться вместе с другими пациентам, нуждающимся в этом. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения антитело VEGFR-2 по настоящему изобретению вводят субъекту в комбинации с противоопухолевым агентом. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело VEGFR-2 по настоящему изобретению вводят субъекту в комбинации со вторым ингибитором ангиогенеза. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело VEGFR-2 по настоящему изобретению вводят с противовоспалительным агентом или иммунодепрессантом.

Противоопухолевые агенты включают цитотоксические химиотерапевтические агенты, целевые низкомолекулярные агенты, биологические молекулы и излучение. Неограничивающие примеры химиотерапевтических агентов включают цисплатин, дакарбазин (DTIC), дактиномицин, иринотекан, мехлорэтамин (азотистый иприт), стрептозоцин, циклофосфамид, кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), доксорубин (адриамицин), даунорубин, прокарбазин, митомицин, цитарабин, этопозид, метотрексат, 5-фторурацил, винбластин, винкристин, блеомицин, паклитаксел (таксол), доцетаксел (таксотер), алдеслейкин, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, кладрибин, дакарбазин, флоксурин, флударабин, гидроксимочевину, ифосфамид, интерферон-альфа, лейпролид, мегестрол, мелфалан, меркаптопурин, пликамицин, митотан, пегаспаргас, пентостатин, пипоброман, пликамицин, стрептозоцин, тамоксифен, тенипозид, тестолактон, тиогуанин, тиотепу, урацил иприт, винорелбин, хлорамбуцил, таксол и их комбинации.

Целевые низкомолекулярные агенты и биологические молекулы включают без ограничения ингибиторы компонентов пути сигнальной трансдукции, такие как модуляторы тирозинкиназ и ингибиторы рецепторных тирозинкиназ, и агенты, которые связываются с опухоль-специфичными антигенами. Неограничивающие примеры рецепторов факторов роста, участвующих в онкогенезе, включают рецепторы для тромбоцитарного фактора роста (PDGFR), инсулиноподобного фактора роста (IGFR), фактора роста нервов (NGFR) и фактора роста фибробластов (FGFR), рецепторы семейства рецепторов фактора роста эпидермиса, в том числе EGFR (erbB1), HER2 (erbB2), ErbB3 и ErbB4.

Антагонисты EGFR включают антитела, которые связываются с EGFR или с лигандом EGFR и ингибируют связывание лиганда и/или активацию рецептора. Например, агент может блокировать образование рецепторных димеров или гетеродимера с другими представителями семейства EGFR. Лиганды для EGFR включают, например, EGF, TGF- α амфирегулин, гепарин-связывающий EGF (HB-EGF) и бета-рекуллулин. Антагонист EGF может извне связываться с внеклеточным сегментом EGFR, который способен или не способен ингибировать связывание лиганда или изнутри с доменом тирозинкиназы. Антагонисты EGFR дополнительно включают агенты, которые ингибируют EGFR-зависимую сигнальную трансдукцию, например путем ингибирования функции компонента EGFR пути сигнальной трансдукции. Примеры антагонистов EGFR, которые связываются с EGFR, включают без ограничения биологические молекулы, такие как антитела (и их функциональные эквиваленты), специфичные к EGFR и низкомолекулярные ингибиторы киназы, которые действуют непосредственно на цитоплазматическом домене EGFR.

Низкомолекулярные и биологические ингибиторы включают ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), в том числе gefitinib, erlotinib и cetuximab, ингибиторы HER2 (например, trastuzumab, trastuzumab эмтансин (trastuzumab-DM1, T-DM1) и pertuzumab), антитела анти-VEGF и фрагменты (например, bevacizumab), антитела, которые ингибируют CD20 (например, rituximab, ibritumomab), анти-VEGFR-антитела (например, ramucicumab (IMC-1121B), IMC-1C11 и CDP791), антитела анти-PDGFR, imatinib. Низкомолекулярные ингибиторы киназы могут быть специфическими для конкретной тирозинкиназы или быть ингибиторами двух или более киназ. Например, соединение N-(3,4-дихлор-2-фторфенил)-7-({(3aR,6aS)-2-метилоктагидроциклопента[с]пиррол-5-ил}метил)окси)-6-(метилокси)хиназолин-4-амин (также известное как XL647, EXEL-7647 и KD-019) является *in vitro* ингибитором нескольких рецепторных тирозинкиназ (RTK), в том числе EGFR, EphA4, KDR (VEGFR), Flt4 (VEGFR3) и ErbB2, а также ингибитором киназы SRC, и участвует в пути, который приводит к невосприимчивости опухолей к определенным TKI. В одном из вариантов реализации изобретения субъекту, нуждающемуся в лечении, вводят rho-киназный ингибитор с формулой I и KD-019.

Дазатиниб (BMS-354825; Bristol-Myers Squibb, New York) является еще одним перорально биодоступным, конкурентным за АТФ-участок ингибитором Src. Дазатиниб также воздействует на BCR-ABL (одобрен FDA для применения у пациентов с хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ) или острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ с положительной филадельфийской хромосомой (Ph+)), а также на c-Kit, PDGFR, C-FMS, EphA2, SFKs. Два других пероральных тирозинкиназных ингибитора Src и BCR-ABL - это бозутиниб (SKI-606) и саракатиниб (AZD0530).

Поскольку VEGFR2 опосредует большинство последующих эффектов VEGF в ангиогенезе, он может подойти в качестве второго ингибитора ангиогенеза. Анти-VEGFR-2-антитела по настоящему изобретению могут вводиться вместе с антителами, которые нейтрализуют другие рецепторы, участвующие в росте опухоли или ангиогенезе.

Неограничивающие примеры VEGF-связывающих агентов включают антитела VEGF и уловители VEGF, т.е. лиганд-связывающие домены VEGF-рецепторов. Двумя примерами антител (в том числе фрагментов VEGF-связывающего антитела) являются бевацизумаб (авастин), антитело, которое связывается с VEGF-A; и ранибизумаб (Луцентис), Fab, полученный из бевацизумаба. В большинстве случаев уловитель VEGF представляет собой белок, который содержит связывающие VEGF домены одного или нескольких белков рецептора VEGF. VEGF-уловители включают без ограничения растворимый VEGFR-1, растворимый нейропилин 1 (NRP1), растворимый VEGFR-3 (который связывает VEGF-C и VEGF-D), афлиберцепт (зальтрап, эйлеа; VEGF-уловители R1R2), содержащие сегменты внеклеточных доменов рецепторов VEGFR1 и VEGFR2 фактора роста эндотелия сосудов человека, слитых с постоянной областью (Fc) человеческого IgG1. Конберцепт (KH902) представляет собой слитый белок, который содержит внеклеточный домен 2 VEGFR-1 (Flt-1) и внеклеточный домен 3, 4 VEGFR-2 (KDR), слитый с Fc-сегментом человеческого IgG1. Несколько уловителей VEGF, содержащих KDR и FLT-1-Ig-подобные домены, в различных комбинациях, описаны в патенте США 8216575. Белки DARP (акроним для синтезированных белков с анкириновым повтором) являются генетически сконструированными миметическими белками антитела, которые, как правило, характеризуются высокой специфичностью и аффинностью при связывании с белками-мишенями. DARPin® MP0112 представляет собой ингибитор фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и проходит клинические испытания для лечения влажной макулодистрофии и диабетического макулярного отека.

Согласно данному изобретению экспрессия VEGF может быть целенаправленной. Например, ингибитор VEGF, PTC299 действует на VEGF пост-транскрипционно, путем селективного связывания 5'- и 3'-нетранслируемых областей (UTR) VEGF информационной РНК (иРНК), тем самым предотвращая трансляцию VEGF. Пегаптаниб (Макуген) является РНК-аптамером, направленным против VEGF-165.

В патологический ангиогенез вовлечен фактор роста плаценты (PlGF). PlGF структурно связан с VEGF и является также лигандом для VEGFR-1. Следовательно, уловители VEGF, содержащие внеклеточный домен VEGFR1 (см. выше), пригодны для воздействия на PlGF. Антиангиогенные агенты дополнительно включают те, которые связываются с рецептором VEGFR-1/Flt-1. В некоторых вариантах реализации изобретения антиген-связывающие белки, которые связываются с внеклеточным доменом VEGFR-1, блокируют связывание одного или обоих его лигандов, VEGF и PlGF, и/или нейтрализуют VEGF-индуцированную или PlGF-индуцированную активацию VEGFR-1.

PDGF состоит из четырех полипептидных цепей, которые образуют гомодимеры PDGF-AA, BB, CC, DD так же, как и гетеродимер PDGF-AB. Рецепторы PDGF (PDGFR) - α и - β опосредуют функции PDGF. В частности, PDGFR α связывается с PDGF-AA, -BB, -AB, -CC, в то время как PDGFR β взаимодействует с -BB и -DD. Неограничивающие примеры PDGF-связывающих агентов включают антитела анти-PDGF и PDGF-уловители. Агенты, которые воздействуют на PDGF, включают Fovista™ (E10030, Ophthotech), пегилированный аптамер, воздействующий на PDGF-B, и AX102 (Sennino et al., 2007, Cancer Res. 75 (15): 7359-67), ДНК-олигонуклеотидный аптамер, который связывает PDGF-B.

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

Ингибиторы ангиогенеза включают внутриклеточные агенты, которые блокируют сигнальную трансдукцию, опосредованную, например, VEGF, PDGF, лигандами рецепторов VEGF или PDGF, или комплимент. Внутриклеточные агенты, которые ингибируют ингибиторы ангиогенеза, включают следующие, но без ограничения. Сунитиниб (Сутент; SU11248) является панспецифичным низкомолекулярным ингибитором VEGFR1-VEGFR3, PDGFR α и PDGFR β , рецептора фактора стволовых клеток (cKIT), Flt-3 и рецептора колоннестимулирующего фактора-1 (CSF-1R). Аксинитиниб (AG013736; Инлита) - еще один низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы, который ингибирует VEGFR-1-VEGFR-3, PDGFR и cKIT. Цедираниб (AZD2171) является ингибитором VEGFR-1-VEGFR-3, PDGFR β и cKIT. Сорафениб (Нексавар) - еще один низкомолекулярный ингибитор нескольких тирозинпротеинкиназ, в том числе VEGFR, PDGFR и Raf киназ. Пазопаниб (Вотриент; GW786034) ингибирует VEGFR-1, -2 и -3, cKIT и PDGFR. Форетиниб (GSK1363089; XL880) ингибирует VEGFR2 и MET, подобно кабозантинibu (Кометрик; XL184). Понатиниб (Инклусиг; AP24534) ингибирует VEGFR, PDGFR и cKIT. Тивозаниб (AV-951) ингибирует VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3 в пиколярных концентрациях. CP-547632 является потенциальным ингибитором VEGFR-2 и киназ основного фактора роста фибробластов (FGF). E-3810 ((6-(7-((1-аминоциклопропил)метокси)-6-метоксихинолин-4-илокси)-N-метил-1-нафтамид) ингибирует VEGFR-1, -2, и -3 и FGFR-1 и -2 киназы в наномолярных концентрациях. Бриваниб (BMS-582664) является ингибитором VEGFR-2, который также подавляет передачу сигналов рецептора FGF. СТ-322 (Аднектин) представляет собой небольшой белок на основе домена фибронектина человека, который связы-

вается с VEGFR2 и ингибирует активацию VEGFR2. Вандетаниб (Капрелас, Зактима; ZD6474) является ингибитором VEGFR2, EGFR, RET тирозинкиназ. X-82 (Xcovery) является низкомолекулярным индолиноновым ингибитором передачи сигнала через рецепторы факторов роста VEGFR и PDGFR.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-VEGFR-антитела по настоящему изобретению вводят в комбинации с ингибиторами матриксных металлопротеиназ. Матриксные металлопротеазы (ММП), такие как ММП-14, ММП-16 и ММП-24, отщепляют компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ) и базальных мембран, тем самым позволяя раковым клеткам проникать и инфильтрировать нижележащий стромальный матрикс. Кроме того, некоторое количество рецепторов факторов роста, молекулы клеточной адгезии, хемокины, цитокины, апоптотические лиганды и ангиогенные факторы являются субстратами ММП. Таким образом, активность ММП может вызвать активацию факторов роста, подавление апоптоза опухолевых клеток, разрушение хемокиновых градиентов в результате иммунного ответа хозяина или высвобождение ангиогенных факторов. ММП могут ускорять рост опухоли, способствуя высвобождению факторов пролиферации клеток, таких как инсулин-подобные факторы роста, которые связываются со специфическими связывающими белками (IGFBP) (Manes et al., 1997 J. Biol. Chem. 272: 25706-25712).

Повышенный уровень коллагеназы, в том числе ММП-2, обнаруживали при меланоме, раке толстой кишки, молочной железы, легких, простаты и мочевого пузыря. Как правило, эти повышенные уровни коррелируют с более высокой степенью дифференцировки опухоли и инвазивности. Уровни ММП-2 значительно возрастают в сыворотке пациентов с метастатическим раком легких. У пациентов с высоким уровнем ММП-2 снижается эффективность химиотерапии. Уровень ММП-14, которая расщепляет proMMP-2 для освобождения активной ММП-2, повышается при многочисленных видах рака и может способствовать росту опухолей, опухолевой эмболии, а также подвижности, инвазивности и метастазированию рака (например, опухоли ЦНС (например, глиомы), рака головы и шеи, ротовой полости, гортани, хондросаркомы, рака молочной железы). Уровень ММП-16 и ММП-24 также повышается при многочисленных видах рака и может способствовать росту опухолей, инвазивности и метастазированию рака (например, рака молочной железы, гортани, яичника, яичек, меланомы, опухолей головного мозга (например, астроцитомы, глиобластомы, глиомы)).

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-VEGFR-антитела по настоящему изобретению вводят в комбинации с антагонистами ММП-14, включая, но не ограничиваясь, антитела анти-ММП-14, описанные в патентах США 7745587 и 8106168. В одном варианте реализации изобретения антитело является человеческим моноклональным антителом DX-2400 (Duax Corp). Комбинированное введение с таким антителом может быть применено для лечения рака человека, в том числе, но не ограничиваясь, рака шейки матки, желудка, легких, молочной железы, толстой кишки, головы и шеи, злокачественных опухолей головного мозга и меланомы.

В другом варианте реализации изобретения антитело VEGFR2 по настоящему изобретению можно вводить в комбинации с одним или несколькими соответствующими адьювантами, такими как, например, цитокины (IL-10 и IL-13, например) или другие иммунные стимуляторы. Однако следует иметь в виду, что введение терапевтически эффективным способом одного лишь антитела анти-KDR является достаточным для предотвращения, подавления или уменьшения прогрессирования опухоли.

Противовоспалительные средства и иммунодепрессанты включают стероидные препараты, такие как глюкокортикоиды (например, дексаметазон), FK-506 (такролимус), циклоспорин, финголимод, интерфероны, такие как IFN β или IFN γ , белок, связывающий фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α), такой как инфликсимаб (Ремикейд), этанерцепт (Энбрел) или адалимумаб (Хумира) и микофеноловая кислота.

Некоторые варианты реализации изобретения включают введение антитела по настоящему изобретению и второго агента, а именно доцетаксела при солидных опухолях, в том числе раке молочной железы и мочевого тракта, раке почки; паклитаксела (солидные опухоли, аденокарцинома желудка), FOLFRI (т.е. иринотекан, фолиновая кислота, 5-фторурацил) при колоректальном раке, капецитабина (рак молочной железы), FOLFOX (т.е. оксалиплатин, лейковорин, 5-фторурацил) (рак желудка, пищевода, гастроэзофагеальный рак), эрибулина (рак молочной железы), FOLFIRI (т.е. иринотекан, левофолинат, 5-фторурацил) (колоректальный рак), карбоплатина (НМРЛ), митоксантрон и преднизолон (рак простаты), OFF (оксалиплатин фолиевой кислоты, 5-фторурацил) (колоректальный рак), иринотекан и цетуксимаба (колоректальный рак), дакарбазина (злокачественная меланوما).

Антитела и антиген-связывающие фрагменты по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с агентом, например цитотоксическим лекарственным средством, цитотоксическим ферментом или радиоизотопом. Этот способ включает в себя введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, связывающего белка отдельно или в соединении с агентом (например, цитотоксическим лекарственным средством). Например, антитела VEGFR2 или их фрагменты могут быть использованы для доставки наночастиц, содержащих агенты, такие как токсины, в VEGFR2-ассоциированные клетки или ткани, например опухоли.

Связывающие белки VEGFR2 могут быть использованы непосредственно *in vivo* для элиминации антиген-экспрессирующих клеток посредством естественной комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ) или антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). Связывающие белки, описанные в

настоящем документе, могут включать в себя комплемент-связывающий эффекторный домен, например сегменты Fc из IgG1, -2, или -3 или соответствующие сегменты IgM, которые связывают комплемент.

Если антитело VEGFR-2 по настоящему изобретению вводят со вторым агентом, первый и второй агенты могут вводиться последовательно или одновременно. Каждый агент может быть введен в одной или нескольких дозах. Дозы могут вводиться по любой схеме, в том числе, без ограничения, два раза в день, ежедневно, еженедельно, раз в две недели, раз в месяц.

Изобретение также включает дополнительное введение. Дополнительное введение означает, что второй агент вводят пациенту в дополнение к первому агенту, который уже применяется для лечения заболевания или симптома заболевания. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительное введение включает введение второго агента пациенту, для которого применение первого агента было неэффективным или недостаточно эффективным при лечении заболевания или симптома заболевания. В других вариантах реализации изобретения дополнительное введение включает введение второго агента пациенту, заболевание которого эффективно пролечено применением первого агента.

В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело или его антиген-связывающий фрагмент вводят путем инъекции, низкомолекулярное средство вводят перорально. В одном таком варианте реализации изобретения антитело вводят один раз в неделю или два раза в месяц, а низкомолекулярное средство вводят ежедневно.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения антитело или его антиген-связывающий фрагмент вводят путем инъекции, а ингибитор ROCK2 вводят перорально. В предпочтительном варианте реализации изобретения агенты вводят один раз в день. Согласно данному изобретению, если субъекту для лечения глазных заболеваний вводят ингибитор ROCK или антитело VEGFR2, для редуцирования или предотвращения образования рубцов субъекту можно вводить антагонист TGF- β . Например, в одном из вариантов реализации изобретения, если для лечения патологии органа зрения вводят ингибитор ROCK, параллельно применяют антагонист TGF- β . В другом варианте реализации изобретения, если для лечения патологии органа зрения субъекту вводят антагонист VEGF, параллельно применяют антагонист TGF- β . В другом варианте реализации изобретения, если для лечения патологии органа зрения вводят антагонист VEGF и ингибитор ROCK, параллельно применяют также антагонист TGF- β . При глазных заболеваниях, связанных с неоваскуляризацией, просачивание новых кровеносных сосудов влечет за собой образование рубцов (например, дископодобных). Изобретение включает введение антагониста TGF- β , а также антагониста VEGF и ингибитора ROCK2 субъекту для лечения неоваскуляризации при глазных заболеваниях.

Приемлемые антагонисты TGF- β включают без ограничения следующие: (i) антитела анти-TGF- β и их антигенсвязывающие фрагменты, такие как антитела пан-TGF- β GC-1008 (Genzyme), анти-TGF- β_1 антитела метелиумаб (CAT-192) (Cambridge Antibody Technology) и антиген-связывающие фрагменты этих антител, (ii) растворимые рецепторы TGF- β или их лиганд-связывающие фрагменты, такие как P144, синтетический пептид, охватывающий аминокислоты 730-743 из мембранного проксимального лиганд-связывающего домена рецептора TGF- β III типа (Esparza-López et al., 2001, J. Biol. Chem. 276(18): 14588-96), и рецептор TGF- β II типа -Fc (IgG₁) слияния (Smith, J. et al., 1999, Circulation Res. 84:1212-22), (iii) пептиды, которые связываются с рецепторами TGF- β и блокируют одну или несколько изоформ TGF- β , например пептиды из 25 аминокислот TGF- β_1 , TGF- β_2 и TGF- β_3 описанных Huang et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:27155-59, которые связываются с рецепторами TGF- β , и (iv) антисмысловые агенты, которые ингибируют синтез TGF- β , например трабедерсен (Antisense Pharma GmbH), олигонуклеотид, который ингибирует синтез TGF- β_2 . Дополнительные антагонисты описаны в WO 2006/052568, WO 02/094833, WO 04/048382, WO 04/048381, WO 04/050659, WO 04/021989, WO 04/026871 и WO 04/026307.

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

Способы введения включают, но не ограничиваются, парентеральный, внутрикожный, интравитриальный, внутримышечный, интраперитонеальный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный, пероральный, сублингвальный, интраназальный, интрацеребральный, интравагинальный, трансдермальный, ректальный пути, через слизистые, путем ингаляции или местно, в частности в уши, нос, глаза или на кожу. Способ введения определяется на усмотрение врача. В большинстве случаев введение приводит к поступлению соединения в кровоток. Для лечения глазных заболеваний предпочтительным является интравитриальное введение биологических агентов.

В конкретных вариантах реализации изобретения может быть желательным местное введение соединения. Это может быть достигнуто, например, но не ограничиваясь, местными инфузиями, местной

апликацией, путем инъекций, при помощи катетера или имплантата (пористого или непористого) или желатинового материала, включая мембраны, например сиаэластические мембраны или волокна. В таких случаях введение может осуществляться селективно в местные ткани без существенного попадания соединения в кровоток.

Также может быть применено введение в легкие, например путем использования ингалятора или небулайзера; в составе с аэрозольным агентом или через перфузии в фтороуглерод или синтетический сурфактант легких. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение формируется в виде свечей, с традиционными вяжущими средствами и наполнителями, такими как триглицериды.

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

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

Описанные выше схемы введения предоставляются только в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничивающие. Средний специалист в данной области техники легко поймет, что все дозы находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Следует понимать, и ожидается, что изменения принципов изобретения, описанного в настоящем документе, могут быть сделаны специалистом в данной области техники, и предполагается, что такие модификации должны быть включены в объем настоящего изобретения.

В настоящей заявке упоминаются различные публикации. Эти публикации включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей их полноте для более полного описания состояния области техники, к которой относится настоящее изобретение. Следующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, и их не следует рассматривать как ограничивающие каким-либо образом объем настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1.

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

Два антитела, которые связываются с человеческим VEGFR2 и нейтрализуют его (табл. 1), были выделены из библиотек Fab фагового дисплея человека. Антитела блокируют связывание лиганда VEGFA с hVEGFR2 (фиг. 2). Антитела также связывают эндотелиальные клетки аорты свиньи (PAE), экспрессируя KDR, и ингибируют VEGFA-стимулированное фосфорилирование VEGFR2, AKT и MAPK (фиг. 3). Табл. 1 иллюстрирует аминокислотные последовательности CDR и вариабельные домены антител. K_{d} s Mab 101 и Mab 102 составляют около 6.6 нМ и 1.7 нМ соответственно.

Тяжелые цепи Mab 101 были переставлены с генами κ -библиотеки и генами λ -легкой цепи (λ -библиотека). 20 уникальных вариантов λ -легкой цепи были найдены путем пэннинга λ -библиотеки с VEGFR2 человека и VEGFR2 мыши. 22 уникальных варианта κ -легкой цепи были найдены путем пэннинга κ -библиотеки с VEGFR2 человека и VEGFR2 мыши. Табл. 2 иллюстрирует аминокислотные последовательности CDR и вариабельные домены легких цепей. Уровни K_{d} Mab 105, 106 и 107 увеличивались приблизительно в 10 раз (0,24 нМ, 0,22 нМ и 0,12 нМ соответственно) (табл. 3). Эти антитела и антитело Mab101, из которого их получают, связываются с доменами 2 и 3 VEGFR и структурами, содержащими эти домены.

Таблица 3. Результаты связывания антител

Антитело	ka 10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹	kd 10 ⁻⁴ s ⁻¹	KD нМ
107	55,8	0,934	0,167
109	30,6	3,80	1,24
104	79,2	1,13	0,165
110	44,9	3,10	0,69
108	71,9	1,75	0,244
105	24,3	0,591	0,243
101	29,8	5,93	1,81

Подобно родительскому антителу, эти антитела связываются с VEGFR2, блокируют связывание VEGFA с VEGFR2 (фиг. 4) и подавляют VEGFA-стимулируемое фосфорилирование VEGFR2, АКТ и MAPK (фиг. 5).

Некоторые из антител, включая Mab, 138, 139, 140 и 146, также перекрестно реагируют с VEGFR2 мыши.

Таблица 4. Перекрестная реактивность

Антитело	hVEGFR2			mVEGFR2		
	ka 10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹	kd 10 ⁻⁴ s ⁻¹	KD нМ	ka 10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹	kd 10 ⁻⁴ s ⁻¹	KD нМ
138	19,7	1,42	0,72	23,4	5,90	2,55
139	14,6	1,75	1,20	13,0	3,17	2,44
106	35,6	0,512	0,144			

Mab 138, 139 и 140 ингибировали VEGFA-стимулируемое фосфорилирование VEGFR2 и молекул нисходящей сигнальной трансдукции, включая MAPK.

Пример 2.

Подавление роста опухоли *in vivo*.

6-8-недельные мыши NOD-SCID, подобранные по полу (самки), подвергались облучению 3,5 гр из источника гамма-лучей ¹³⁷ с мощностью дозы около 0,9 гр/мин. Также мышам внутривенно инокулировали 2×10⁷ HL60 клеток. Через три дня после инокуляции опухоли группы мышей получали лечение с применением разных доз Mab 106 два раза в неделю с документированием времени выживания.

Все мыши, не получавшие лечения, погибли в течение около двух недель. Даже с высокой опухолевой нагрузкой время выживания мышей, пролеченных с применением Mab 106 в дозе 10 мг/кг, продолжалось до 28 дней.

Пример 3.

Лечение рака толстой кишки у человека.

Пациенты с диагностированным раком толстой кишки были разделены на группы и получали стандартный режим химиотерапии. Две группы пациентов получали 5 мг/кг/неделю за неделю или 15 мг/кг/неделю в течение 4 месяцев.

Пациентам контрольной группы был назначен только режим стандартной химиотерапии. Опухолевая масса периодически оценивалась с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ). По сравнению с контрольной группой, предполагается, что у пациентов, которые получили недельное лечение антителами, наблюдается значительное замедление роста опухоли или уменьшение ее размера, увеличение задержки прогрессирования или длительного выживания, по сравнению с пациентами, которые не получали лечения антителами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его фрагмент, которые связываются с человеческим VEGFR2, содержащие варибельный домен тяжелой цепи, которая имеет последовательности CDR-1H, CDR-2H и CDR-3H, и варибельный домен легкой цепи, которая имеет последовательности CDR-1L, CDR-2L и CDR-3L, при этом

(i) последовательность CDR-1H представляет собой GFTFSWYVMG,

(ii) последовательность CDR-2H представляет собой SIYPSGGATNYADSVKG,

(iii) последовательность CDR-3H - GNYFDY (SEQ ID NO:3) и

(iv) последовательности CDR-1L, CDR-2L и CDR-3L выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23;

SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27;
SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31;
SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35;
SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39;
SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 43;
SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47;
SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: 159;
SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162 и SEQ ID NO: 163.

2. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что антитело содержит CDR-1L с последовательностью SEQ ID NO: 5, CDR-2L с последовательностью SEQ ID NO: 6 и CDR-3L с последовательностью SEQ ID NO: 7.

3. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что антитело содержит переменный домен тяжелой цепи с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 4.

4. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что антитело содержит переменный домен легкой цепи с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 8.

5. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его фрагмент, которые связываются с человеческим VEGFR2, содержащие переменный домен тяжелой цепи, которая имеет последовательности CDR-1H, CDR-2H и CDR-3H, и переменный домен легкой цепи, которая имеет последовательности CDR-1L, CDR-2L и CDR-3L, при этом

- (i) последовательность CDR-1H представляет собой GFTFSWYIML,
- (ii) последовательность CDR-2H представляет собой SIGSSGGFTDYADSVKKG,
- (iii) последовательность CDR-3H представляет собой GLAAPRS (SEQ ID NO: 11) и
- (iv) последовательности CDR-1L, CDR-2L и CDR-3L выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15;
SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23;
SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27;
SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31;
SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35;
SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39;
SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 43;
SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47;
SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: 159;
SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162 и SEQ ID NO: 163.

6. Молекула нуклеиновой кислоты по п.5, отличающаяся тем, что антитело содержит CDR-1L с последовательностью SEQ ID NO: 13, CDR-2L с последовательностью SEQ ID NO: 14 и CDR-3L с последовательностью SEQ ID NO: 15.

7. Молекула нуклеиновой кислоты по п.5, отличающаяся тем, что антитело содержит переменный домен тяжелой цепи с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 12.

8. Молекула нуклеиновой кислоты по п.5, отличающаяся тем, что антитело содержит переменный домен легкой цепи с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 16.

9. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что антитело содержит CDR-1L с последовательностью SEQ ID NO: 25, CDR-2L с последовательностью SEQ ID NO: 26 и CDR-3L с последовательностью SEQ ID NO: 27.

10. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что антитело содержит переменный домен легкой цепи с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28 и последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 28.

11. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что антитело содержит CDR-1L с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR-2L с последовательностью SEQ ID NO: 30 и CDR-3L с последовательностью SEQ ID NO: 31.

12. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что антитело содержит переменный домен легкой цепи с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32 и последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 32.

13. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-12, отличающаяся тем, что антитело блокирует связывание VEGF с hVEGFR2.

Kabat
No. (нумерация по Kabat) 1 2 3 4
1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 A B 6 7 8 9 0 1 2 3
SEQ ID NO.
4 EVQLLESGGGLVQPFGGSLRLSCAAS GFTFSWYVMG-- WVRQAPGK
12 EVQLLESGGGLVQPFGGSLRLSCAAS GFTFSWYIML-- WVRQAPGK

Kabat
No. (нумерация по Kabat) 5 6 7 8
4 5 6 7 8 9 0 1 2 A B C 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 A B C
SEQ ID NO.
4 GLEWVS SIYP--SGGATNYADSVKGRFTISRDNLSKNTLYLQMNLSL
12 GLEWVS SIGS--SGGFTDYADSVKGRFTISRDNLSKNTLYLQMNLSL

Kabat
No. (нумерация по Kabat) 9 1 0 1
3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 A B C D E F G H I J K L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3
SEQ ID NO.
4 RAEDTAVYYCAR GNYF-----DY WQGQTLVTVSS
12 RAEDTAVYYCAR GLAAP-----RS WGRGTLVTVSS

Фиг. 1A

Kabat
No. (нумерация по Kabat) 1 2 3
1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7
SEQ ID NO.
8 QSVLTQDPA-VSVVALGQTVRITC QGDSL RSYYAS WYQ
24 QSALTQPPS-VSVSPGQTASITC SGDKL GDEYAS WYQ
28 QYELTQPPS-VSVSPGQTASITC SGDNL RHEYSS WYQ
32 QSVLTQPPS-VSVSPGQTASITC SGEKL GDEYAS WYQ
36 QSELTQPPS-VSVSPGQTASITC SGEKL GDEYAS WYQ
40 QYELTQPPS-VSVSPGQTATITC TGDKL GDEYAS WYQ
44 QSALTQPPS-VSVSPGHATATITC SGQIL GERSAS WYQ
48 QSALTQPPS-VSVSPGQTATITC SGDAL GNNYAS WYQ
16 QSALTQPPS-VSEAPGQQRVTISC SGSTSN IGNNAVI WYQ
20 QSALTQPPS-ASGTPGQQRVTISC SGSSSN IGTYPVN WYQ
52 QSALTQPPS-VSGTPGQQRVTISC SGSSSN IGNTTLN WYQ
56 QYELTQPPS-VSEAPGQQRVTISC SGSTSN IGNNAVI WYQ
60 QSELTQPPS-ASGTPGQQRVTISC SGSSSN LGSNTVN WYQ
64 QSVLTQPPS-ASGTPGQQRVTISC SGSSSN IESNYVY WYQ
68 QSELTQPPS-VSGSPGQSIITISC TGSSND IGSYDYVS WYQ
72 QSALTQPPS-VSGSPGQSIITISC TGSSHD IGSYDYVS WYQ
76 QSALTQPPS-VSGSRGQSIITISC AGTSSD VGAYDYVS WYK
80 QSVLTQPPS-VSGSPGQSIITISC TGSSHD IGAYDYVS WYK
84 QSVLTQPPS-VSGSPGQSIITISC TGSSHD IGAYDYVS WYK
88 QSVLTQPPS-VSGSPGQSIITISC TGSSHD IGAYDYVS WYK
92 QSALTQPPS-VSGSPGQSIITISC TGSSHD IGAYDYVS WYK
96 QSELTQPPS-VSGSPGQSIITISC TGSSHD IGAYDYVS WYK

Фиг. 1B1

Kabat
No. (нумерация по Kabat) 4 5 6 7 8
8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0
SEQ ID NO:
8 QKPGQSPVLVIIY QDTNRRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA
24 QKPGQSPVLVIIY QDNKRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA
28 QKPGQSPVLVIIY QDNKRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA
32 QKPGQSPVLVIIY QDNKRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA
36 QKPGQSPVLVIIY QDNKRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA
40 HKPGQSPVLLIIY QNDKRPS GIPDRFSGSDSGNTATLTISGTQA
44 QKPGQSPVLVIIY QSSQRPS GIPERFSGSISGNTATLTISGAQS
48 QKPGQSPVLVIIY QDTKRPS GIPERFSGSSSGNTATLTISGTQA
16 QLPGKAPKLLIIY YDDL LPS GVSDRFSGSKSGTSGSLAISGLQS
20 QLPGAAPKLLIIY STDQRPS GVPDRFSGSNSGNTATLTISGTQA
52 QLPGTAPKLLIIY ANNQRPS GVPDRFSGSRSGTASSLAISGLQS
56 QLPGTAPKLLIIY YDDL LPS GVSDRFSGSKSGTSGSLAISGLQS
60 QLPGTAPKLLIIY TNSQRPS GVPDRFSGSLQSGTASSLAISGLQS
64 QLPGTAPKLLIIY TNNQRPS GVPDRFSGSKSGTASSLAISGLQS
68 QHPGRAPKFFIIY DVNRRPS GVADRFSGFKSGNTASLTISGLQP
72 YHPGKAPKFFIIY DVNRRPS GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQP
76 HLPGNAPKFFIIY DVYNNRPS GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQP
80 HLPGNAPKFFIIY DVYNNRPS GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQP
84 HLPGNAPKFFIIY DVYNNRPS GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQP
88 HLPGNAPKFFIIY DVYNNRPS GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQP
92 HLPGNAPKFFIIY DVYNNRPS GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQP
96 HLPGNAPKFFIIY DVYNNRPS GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQP

Фиг. 1B2

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

Фиг. 1B3

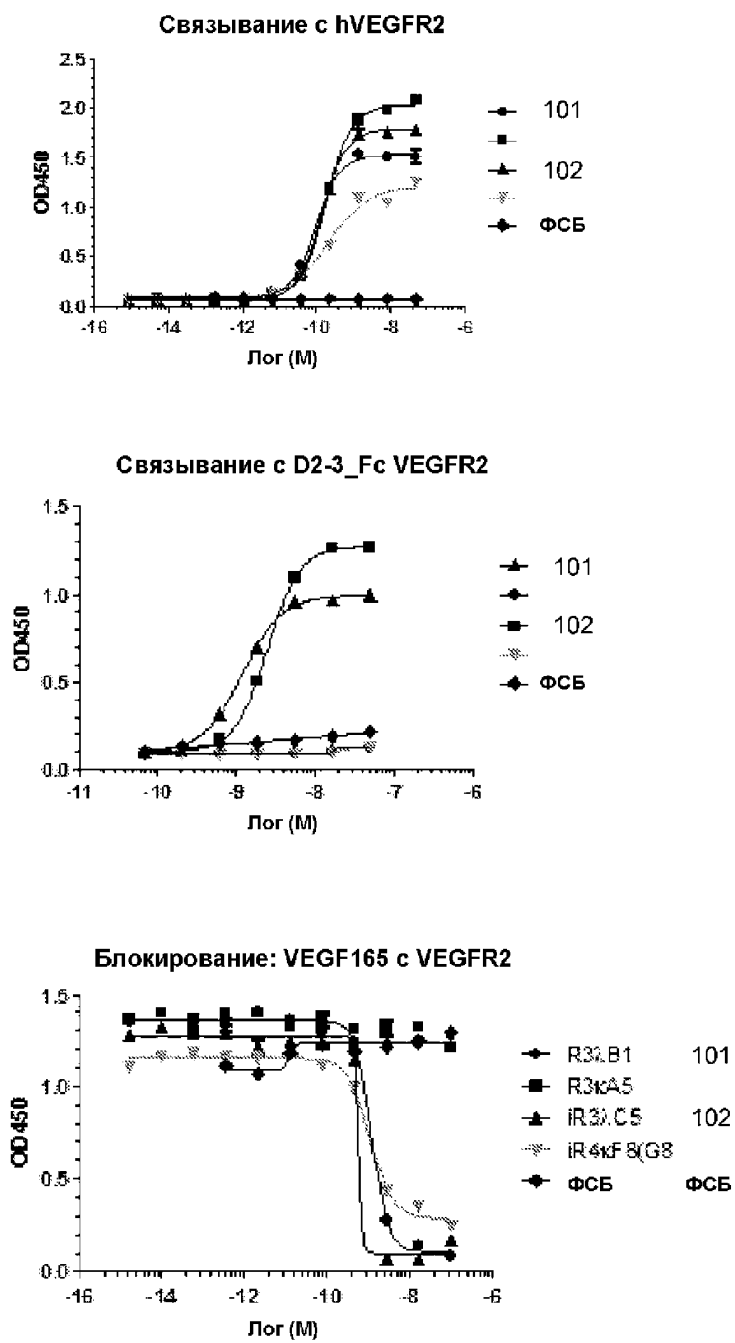
Kabat No. (нумерация по Kabat)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7																						
SEQ ID NO:																																							
100	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	
104	D	I	Q	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	V	L	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	E	R	I	S	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	
108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

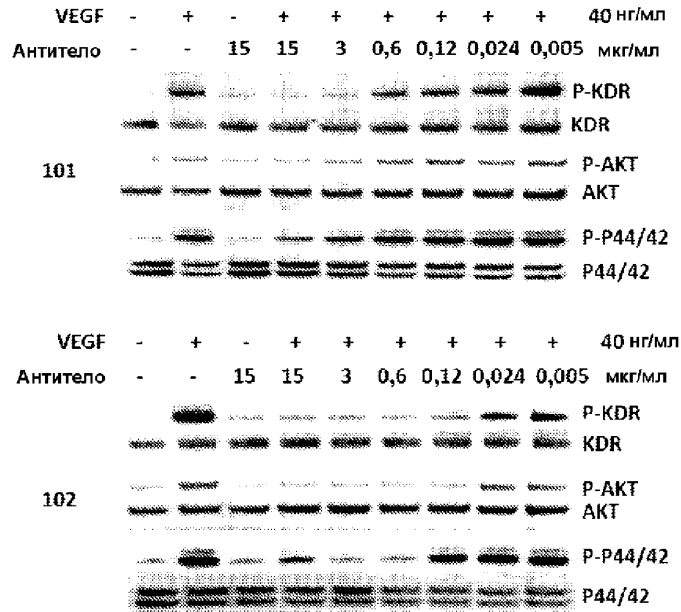
Фиг. 1C1

Kabat No. (нумерация по Kabat)	4	5	6	7	8																																						
SEQ ID NO:																																											
100	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	M	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	F	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	S	L	T	I	S	R	L	E	P
104	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	M	Y	G	A	S	I	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	E	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	V	E	P
108	Q	R	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	S	T	G	T	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P
112	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	A	S	T	R	A	T	G	T	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	D	R	L	E	S
116	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P
120	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P
124	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	S	L	T	I	S	R	L	E	P
128	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	M	Y	G	A	S	N	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P
132	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	M	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	F	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	S	L	T	I	S	R	L	E	P
136	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	M	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	F	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	S	L	T	I	S	R	L	E	P
140	Q	K	P	G	R	A	P	R	L	L	M	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	F	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	S	L	T	I	S	R	L	E	P
144	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T											

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

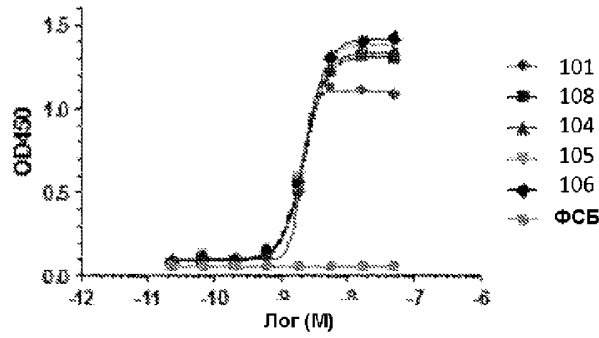
Фиг. 1С3



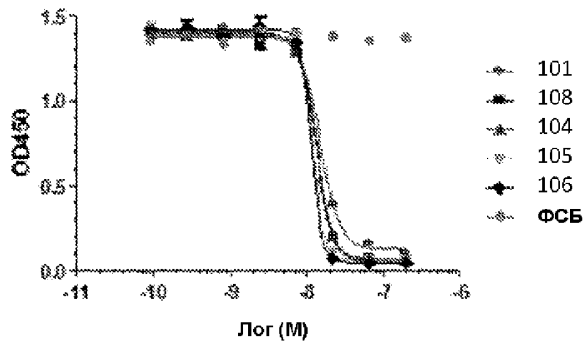


Фиг. 3

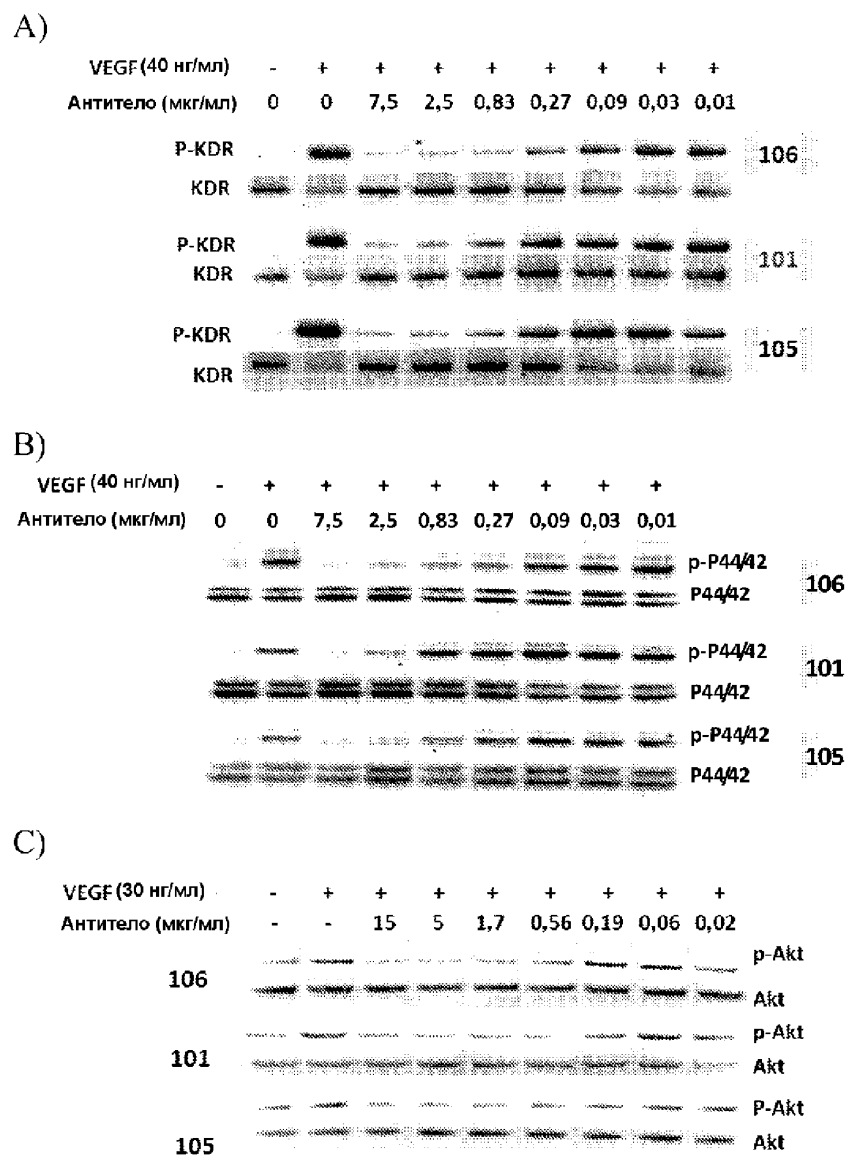
Связывание с hVEGFR2 (1)



Блокирование: VEGF165 с VEGFR2 (1)



Фиг. 4



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2