

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045024**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.10.26**

(21) Номер заявки  
**202190983**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.10.10**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**A61P 27/02** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

---

(54) **НОВОЕ АНТИТЕЛО К С-КИТ**

---

(31) **10-2018-0120233**

(32) **2018.10.10**

(33) **KR**

(43) **2021.07.23**

(86) **PCT/KR2019/013310**

(87) **WO 2020/076105 2020.04.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**НОВЕЛТИ НОБИЛИТИ ИНК. (KR)**

(72) Изобретатель:  
**Пак Сан Гю, Ким Чин-Ок (KR)**

(74) Представитель:  
**Носырева Е.Л. (RU)**

(56) OKAYAMA, Y. et al. Assessment of the anti-c-kit monoclonal antibody YB5.B8 in affinity magnetic enrichment of human lung mast cells, 1994, vol. 169, no. 2, pages 153-161. See abstract  
KR-A-1020150131173  
KR-A-1020140027239  
US-A1-20180193475  
KR-A-1020150038278

---

(57) Изобретение относится к новому антителу к С-КИТ или фрагменту такого антитела. Кроме того, настоящее изобретение относится к композиции для предотвращения или лечения заболеваний, связанных с ангиогенезом, содержащей антитело к С-КИТ или фрагмент такого антитела, или к набору для диагностики заболеваний, связанных с ангиогенезом.

---

**B1**

**045024**

**045024**  
**B1**

### **Область техники**

Настоящее изобретение относится к новому антителу к С-KIT или фрагменту такого антитела. Кроме того, настоящее изобретение относится к композиции для предотвращения или лечения заболеваний, связанных с ангиогенезом, содержащих антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела, или к набору для диагностики заболеваний, связанных с ангиогенезом.

### **Уровень техники**

Ангиогенез представляет собой процесс, посредством которого новые кровеносные сосуды образуются из уже существующих сосудов. Аномальный или чрезмерный ангиогенез может вызывать множество заболеваний. Например, ангиогенез является одной из причин роста опухоли, а также развития опухоли из доброкачественной в злокачественную, и злокачественной трансформации доброкачественной опухоли, и чрезмерное образование новых кровеносных сосудов было зарегистрировано при различных заболеваниях, например, при заболеваниях глаз, таких как возрастная дегенерация желтого пятна, диабетическая ретинопатия, глаукома, ревматоидный артрит, псориаз, хроническое воспаление (Cameliet and Jain, Nature, 407:249, 2000). По этой причине было проведено множество исследований для лечения заболеваний, связанных с ангиогенезом, с применением ингибиторов ангиогенеза, и были обнаружены различные стимулирующие и подавляющие ангиогенез факторы, участвующие в процессах ангиогенеза, такие как рост, миграция, дифференциация эндотелиальных клеток сосудов.

Ингибиторы ангиогенеза можно разделить на несколько категорий, включая ингибиторы разрушения матрикса, ингибиторы эндотелиальных клеток, ингибиторы ангиогенеза, в зависимости от механизма действия. Ингибиторы ангиогенеза включают лекарственные средства, которые нацелены на VEGFR2, VEGFR1, PDGFR, С-KIT, FLT3 и т. д., и подавляют их активность, передачу сигналов, продукцию и т. д.

С-KIT, один из мишеней ингибитора ангиогенеза, относится к классу III рецепторной тирозинкиназы (RTK) и также известен как рецептор для SCF (фактора стволовых клеток). SCF представляет собой цитокин, который связывается с рецептором С-KIT и, как сообщается, играет важную роль в дифференциации и продукции клеток крови, сперматозоидов и меланоцитов.

SCF связывается и взаимодействует с лиганд-связывающим доменом С-KIT, и, соответственно, белок С-KIT фосфорилируется, для появления активности. Он регулирует различные биологические функции, такие как рост, дифференциацию и пролиферацию клеток, посредством процессов передачи сигналов, таких как система PI3K/AKT, киназа RAS/MAP. В частности, сообщалось о действии стимуляции SCF/С-KIT в отношении ангиогенеза (Angiogenesis in Health, Disease and Malignancy, p. 33-36).

В качестве коммерчески доступных лекарственных средств, нацеленных на С-KIT, существуют Gleevec (иматиниба мезилат) и Sutent (сунитиниба малат). Однако это многоцелевые средства для лечения, которые подавляют несколько киназ, и сообщалось о терапевтических ограничениях, таких как множество побочных эффектов, низкая специфичность и биодоступность, антигенность и недопустимая фармакокинетика. Следовательно, требуется разработка эффективного терапевтического средства, которое является специфичным в отношении С-KIT и характеризуется отсутствием побочных эффектов при заболеваниях, связанных с ангиогенезом, путем активации С-KIT.

В результате усилий авторов настоящего изобретения по поиску терапевтического вещества для заболеваний, связанных с ангиогенезом, было подтверждено, что конкретное антитело к С-KIT, специфически связывающееся с С-KIT, может значительно подавлять ангиогенез и, таким образом, может характеризоваться превосходной терапевтической способностью в отношении заболеваний, связанных с ангиогенезом, и настоящее изобретение было создано.

### **Техническая задача**

Одна цель настоящего изобретения состоит в том, чтобы предоставить антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела, обладающее превосходной подавляющей способностью к С-KIT, путем специфического связывания с доменом II белка С-KIT. Другой целью настоящего изобретения является предоставление композиции для предотвращения или лечения заболеваний, связанных с ангиогенезом, и диагностического набора, содержащего антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела. Техническое решение

Согласно одному аспекту настоящего изобретения в настоящем изобретении предусматривает антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела, которое специфически связывается с С-KIT.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению специфически связывается с доменом II С-KIT.

Используемый в данном документе термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, обладающей иммунологической реактивностью с конкретным антигеном, или к молекуле белка, служащей рецептором для специфического распознавания антигена. Соответственно, в настоящем изобретении "антитело" используется в широком смысле и интерпретируется как включающее поликлональное антитело, моноклональное антитело, целое антитело (антитело, состоящее по меньшей мере из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, связанных дисульфидными связями) и фрагменты антитела. Полное антитело включает IgA, IgD, IgE, IgM и IgG. Кроме того, IgG может содержать подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Используемый в данном документе термин "фрагмент антитела" относится к антигенсвязывающему фрагменту или аналогу антитела, который сохраняет некоторую специфичность связывания исходного

антитела и включает часть (например, один или несколько CDR) или переменную область антигенсвязывающей области исходного антитела. Фрагмент антитела представляет собой, например, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, фрагмент Fv, sc-Fv, унители, диателы, линейное антитело, нанотело, доменное антитело или фрагмент мультиспецифического антитела, образованный из фрагмента антитела.

Используемый в данном документе термин "тяжелая цепь" относится ко всей тяжелой цепи, содержащей переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи и их фрагмент. В тяжелой цепи есть типы гамма ( $\gamma$ ), мю ( $\mu$ ), альфа ( $\alpha$ ), дельта ( $\delta$ ) и эпсилон ( $\epsilon$ ).

Используемый в данном документе термин "легкая цепь" относится ко всей легкой цепи, содержащей переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи и их фрагмент. В легкой цепи существуют типы каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ).

В настоящем изобретении антитело представляет собой целое антитело или фрагмент антитела, обладающие антигенсвязывающей способностью. Тяжелая цепь может быть любого из типов гамма ( $\gamma$ ), мю ( $\mu$ ), альфа ( $\alpha$ ), дельта ( $\delta$ ) или эпсилон ( $\epsilon$ ), и легкая цепь может быть типа каппа ( $\kappa$ ) или лямбда ( $\lambda$ ). Согласно одному аспекту настоящего изобретения легкая цепь относится к каппа-типу.

Используемый в данном документе термин "С-КИТ" относится к классу III рецепторной тирозинкиназы (RTK) и также известен как рецептор SCF.

С-КИТ, один из мишеней ингибитора ангиогенеза, относится к классу III рецепторной тирозинкиназы (RTK) и является рецептором для SCF (фактора стволовых клеток), который играет важную роль в гемопоэзе.

Используемый в данном документе термин "антитело к С-КИТ" относится к антителу, которое специфически связывается с С-КИТ. Антитело к С-КИТ специфически связывается с доменом II С-КИТ, таким образом, активность или активация С-КИТ может подавляться или нейтрализоваться.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения антитело к С-КИТ или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 1, CDR2 легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 2 и CDR3 легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 3.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения антитело к С-КИТ или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 5 и CDR3 тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 6.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения переменная область легкой цепи антитела к С-КИТ или фрагмента такого антитела согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения переменная область тяжелой цепи антитела к С-КИТ или фрагмента такого антитела согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения антитело к С-КИТ или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению может содержать легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения антитело к С-КИТ или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению может содержать тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26.

Термин "CDR (определяющая комплементарность область)", используемый в данном документе, относится к аминокислотной последовательности гипервариабельной области, которая образует антигенсвязывающий сайт как часть переменной области антитела, продуцируемого В-клетками и Т-клетками. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи включает три несмежных CDR: CDR<sub>H1</sub> тяжелой цепи, CDR<sub>H2</sub>, CDR<sub>H3</sub>, и аминокислотная последовательность легкой цепи включает три несмежных CDR: CDR<sub>L1</sub> легкой цепи, CDR<sub>L2</sub>, CDR<sub>L3</sub>. CDR является областью, связанной с распознаванием антигена, и играет решающую роль в разнообразии антигенной специфичности, обеспечивая основные контактные остатки при связывании антитела с антигеном или эпитопом.

Антитело или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению содержит последовательность, которая демонстрирует существенную идентичность последовательности, описанной в перечне последовательностей. Существенная идентичность означает, что две последовательности выравниваются для максимального соответствия и анализируются с использованием алгоритма, обычно используемого в данной области техники, и затем демонстрируют гомологию между последовательностями, составляющую 80%, 90%, 95% или больше.

Кроме того, антитело к С-КИТ по настоящему изобретению включает не только последовательность антитела к С-КИТ, описанного в данном документе, но также его биологический эквивалент в диапазоне специфического распознавания и связывания С-КИТ. Например, он может содержать дополнительные мутации в последовательности для улучшения аффинности связывания антитела и/или биологических свойств, и он может включать дополнительные мутации в диапазоне, который не изменяет общую актив-

ность молекулы.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению может содержать константную область, полученную из человеческого IgG1. Согласно одному аспекту настоящего изобретения, в настоящем изобретении предусмотрено человеческое антитело к С-KIT, содержащее переменную область легкой цепи, переменную область тяжелой цепи и константную область, полученную из человеческого IgG1.

Используемый в данном документе термин "человеческое антитело" относится к антителу, в котором каркасная область и области CDR имеют переменные области, полученные из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Человеческие антитела по настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями иммуноглобулинов полученных от человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Человеческое антитело может быть в форме целого антитела или в форме, содержащей функциональный фрагмент молекулы антитела. Поскольку все компоненты человеческого антитела получены от человека, вероятность возникновения иммунного ответа при введении человеку меньше, чем таковая для гуманизированного антитела или мышиного антитела. Таким образом, оно имеет преимущество в качестве терапевтического антитела для человека.

В качестве результата подтверждения эффекта, связанного с эффектом подавления ангиогенеза, с помощью различных примеров, описанных ниже, антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению может эффективно способствовать предотвращению или лечению заболевания, связанного с ангиогенезом, путем значительного подавления ангиогенеза.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения, в настоящем изобретении предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела.

Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению, может содержать нуклеотидные последовательности под SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11. Нуклеотидные последовательности под SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11 кодируют CDR1 легкой цепи, представленной под SEQ ID NO: 1, CDR2 легкой цепи, представленной под SEQ ID NO: 2 и CDR3 легкой цепи, представленной под SEQ ID NO: 3 соответственно. Нуклеотидные последовательности под SEQ ID NO: 9-11 могут быть кодон-оптимизированы для клетки CHO соответственно, и нуклеиновая кислота, содержащая кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность, должна быть расценена как включаемая в объем нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела в соответствии с настоящим изобретением. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению, может содержать SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19.

При необходимости нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению, может содержать нуклеотидные последовательности под SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14. Нуклеотидные последовательности под SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14 кодируют CDR1 тяжелой цепи, представленной под SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, представленной под SEQ ID NO: 5 и CDR3 тяжелой цепи, представленной под SEQ ID NO: 6 соответственно. Нуклеотидные последовательности под SEQ ID NO: 12-14 могут быть кодон-оптимизированы для клеток CHO соответственно, и нуклеиновая кислота, содержащая кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность, должна быть расценена как включаемая в объем нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела в соответствии с настоящим изобретением. Например, нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению, могут содержать SEQ ID NO: 20, 21 и 22.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению, может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 15 или 23.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению, может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 16 или 24.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению, может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 27 или 29.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению, может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 28 или 30.

Термин "нуклеиновая кислота", используемый в данном документе, полностью включает ДНК (геномную ДНК и кДНК) и РНК. Нуклеотиды, составляющие основную структурную единицу в молекуле нуклеиновой кислоты, включают природные нуклеотиды, а также аналоги нуклеотидов с модифицированными сайтами сахара или основания (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York (1980); Uhlman and Peyman, Chemical Review, 90:543-584 (1990)).

Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела со-

гласно настоящему изобретению, содержит нуклеотидную последовательность, указывающую на значительную степень идентичности к вышеуказанным нуклеотидным последовательностям. Существенная идентичность означает, что две последовательности выравниваются для максимального соответствия и анализируются с использованием алгоритма, обычно используемого в данной области, и затем демонстрируют гомологию между последовательностями, составляющую 80%, 90%, 95% или более.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения, в настоящем изобретении предусматривает вектор, содержащий нуклеиновую кислоту и клетку, трансформированную этим вектором.

Используемый в данном документе термин "вектор" относится к любому вектору, который может быть вставлен в клетку-хозяина и способен к репликации гена. Вектор включает плазмиду, линейную нуклеиновую кислоту, космиду, РНК-вектор, вирусный вектор и т.д., и вирусный вектор предусматривает без ограничения ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус и т.п. Система рекомбинантных векторов по настоящему изобретению может быть сконструирована различными способами, известными в данной области. Кроме того, вектор по настоящему изобретению может быть сконструирован в качестве вектора для клонирования или экспрессии и может быть сконструирован с использованием прокариотических или эукариотических клеток в качестве хозяина.

Более того, клетки могут быть прокариотическими клетками, эукариотическими клетками или клетками животных. Соответствующим образом выбранная клетка-хозяин может быть трансформирована вектором и ее можно использовать для экспрессии и/или секреции целевого белка. Клетки-хозяева могут быть иммортализованными клетками гибридомы, клетками миеломы N/SO, клетками 293, клетками HuT 78, клетками CHO, клетками HELA, клетками COS и т.п., предпочтительно клетками CHO. Однако настоящее изобретение не ограничивается этим, и любая клетка-хозяин, известная в данной области, может использоваться в качестве клетки-хозяина по настоящему изобретению.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения, в настоящем изобретении предусматривает фармацевтическую композицию для предотвращения или лечения заболеваний, связанных с ангиогенезом, содержащую антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения, в настоящем изобретении предусматривает способ лечения или предотвращения заболеваний, связанных с ангиогенезом у субъекта, включающий введение антитела к С-KIT или фрагмента такого антитела или композиции, содержащей то же самое, субъекту при необходимости.

Используемый в данном документе термин "лечение" предусматривает то, что симптомы заболеваний, связанных с ангиогенезом, улучшаются, купируются или излечиваются путем введения композиции согласно настоящему изобретению.

Используемый в данном документе термин "предотвращение" включает любое уменьшение, задержку или блокирование возникновения или рецидива заболеваний, связанных с ангиогенезом, путем введения композиции согласно настоящему изобретению.

Используемый в данном документе термин "заболевание, связанное с ангиогенезом" включает заболевание, вызванное ангиогенезом. К ним относятся рак, лейкоз, офтальмологические сосудистые заболевания, ревматоидный артрит, псориаз, хронические раны, хроническое воспаление, гемангиома, гемангиофиброма, сосудистые мальформации, артериосклероз, спайки сосудов, васкулит, пиогенная гранулема, болезни, связанные с волдырями, легочная гипертензия, астма, носовые полипы, инфекционные заболевания, воспалительное заболевание кишечника, заболевание пародонта, спайки брюшины, эндометриоз, маточные кровотечения, кисты яичника, остеомиелит, остит, сепсис и аутоиммунные заболевания и тому подобное. Предпочтительно, это может быть рак и офтальмологические сосудистые заболевания, но этим не ограничиваются.

Рак может представлять собой рак кости, рак легкого, рак головного мозга, рак шеи, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, мелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак поджелудочной железы, рак кожи, меланому кожи или интраокулярную меланому, рак прямой кишки, анальный рак, рак толстой кишки, рак матки, рак яичников, карцинома маточной трубы, карцинома эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкой кишки, эндокринную аденокарциному, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак почки или рак мочеточника, почечно-клеточную карциному, карциному почечной лоханки, опухоль центральной нервной системы, лимфому центральной нервной системы, опухоль спинного мозга, глиобластому, глиому ствола головного мозга или аденому гипофиза.

Офтальмологические сосудистые заболевания могут включать диабетическую ретинопатию, дегенерацию желтого пятна, старческую дегенерацию желтого пятна, глаукому, связанную с глаукомой дегенерацию пигмента сетчатки, хориоидальную неоваскуляризацию, ретинопатию недоношенных, дистрофию роговицы или расслоение сетчатки.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать только антитело к С-KIT или его фрагмент или может дополнительно содержать один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, наполнителей или разбавителей.

Фармацевтически приемлемый носитель может дополнительно включать, например, носитель для

перорального введения или носитель для парентерального введения. Носители для перорального введения могут включать лактозу, крахмал, производные целлюлозы, стеарат магния, стеариновую кислоту и т.п. Кроме того, носитель для парентерального введения может включать воду, подходящее масло, физиологический раствор, водную глюкозу и глицоль и т. п., и может дополнительно содержать стабилизатор и консервант. Примеры стабилизаторов включают антиоксиданты, такие как гидросульфит натрия, сульфит натрия или аскорбиновая кислота. Примерами консервантов могут быть хлорид бензалкония, метил- или пропилпарабен и хлорбутанол. В качестве других фармацевтически приемлемых носителей можно использовать известные в данной области (Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может вводиться млекопитающим, включая человека, любым способом. Например, его можно вводить перорально или парентерально. В качестве способа парентерального введения можно использовать внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, интрамедуллярное, интратекальное, внутрисердечное, трансдермальное, подкожное, внутрибрюшинное, интраназальное, кишечное, местное, сублингвальное или ректальное введение, и не ограничиваться этим. Например, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть изготовлена в инъекционной форме и введена способом легкого укола кожи тонкой инъекционной иглой 30-го размера или путем нанесения ее непосредственно на кожу.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть составлена в виде состава для перорального или парентерального введения в соответствии со способом введения, как описано выше. В случае состава для перорального введения, композиция по настоящему изобретению может быть составлена с использованием способа, известного в данной области, в качестве порошка, гранулы, таблетки, пилюли, драже, капсулы, жидкости, геля, сиропа, разбавителя, суспензии и т.д. Например, в качестве пероральных препаратов, таблетки или драже могут быть получены путем смешивания активного ингредиента с твердым наполнителем, его измельчения, добавления подходящего вспомогательного средства и переработки в гранулированную смесь. Примеры наполнителей включают сахара, содержащие лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит и мальтит, и крахмалы, содержащие кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал и картофельный крахмал, и целлюлозу, предусматривающую целлюлозу, метилцеллюлозу, натрий-карбоксиметилцеллюлозу и гидроксиметилцеллюлозу, пропилметилцеллюлозу, и наполнители, такие как желатин, поливинилпирролидон и т. п. Кроме того, в некоторых случаях в качестве разрыхлителя могут быть добавлены структурированный поливинилпирролидон, агар, альгиновая кислота или альгинат натрия. Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать антиагрегантное средство, смазывающее средство, смачивающее средство, ароматизирующее вещество, эмульгирующее средство и консервант. В случае состава для парентерального введения, его можно составить в форме инъекций, кремов, лосьонов, мазей для наружного применения, масел, увлажняющих средств, гелей, аэрозолей и назальных ингаляторов с помощью способа, известного в данной области техники. Эти составы описаны в документах, широко известных во всех областях фармацевтической химии (Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975 Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour).

Общее эффективное количество фармацевтической композиции по настоящему изобретению можно вводить пациенту в виде разовой дозы и можно вводить по протоколу фракционированного лечения с множественными дозами в течение длительного периода времени. В фармацевтической композиции по настоящему изобретению может варьировать содержание активного ингредиента в зависимости от степени проявления симптомов заболевания. Например, суточная доза фармацевтической композиции по настоящему изобретению может составлять от 0,0001 до 100 мг/кг. Однако дозировка фармацевтической композиции по настоящему изобретению может быть определена с учетом различных факторов, таких как возраст, вес, состояние здоровья, пол, тяжесть заболевания, диета, скорость выведения, путь введения, частота лечения и один из специалистов со средней квалификацией в данной области сможет определить подходящую эффективную дозировку. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению не имеет особых ограничений по своему составу, пути введения и способу введения, если она демонстрирует эффекты настоящего изобретения.

Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может вводиться как отдельное терапевтическое средство или вводиться в комбинации с другими терапевтическими средствами. При введении в комбинации с другими терапевтическими средствами композицию по настоящему изобретению и другие терапевтические средства можно вводить одновременно, отдельно или последовательно. Другое терапевтическое средство может быть веществом, о котором уже известно, что оно оказывает эффект на лечение или улучшение заболеваний, связанных с ангиогенезом, и включает все другие противораковые виды лечения, включающие немедикаментозную терапию, такую как лучевая терапия.

Когда фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят в комбинации с другими терапевтическими средствами, антитело к С-КПТ, содержащееся в композиции по настоящему изобретению, и другие терапевтические средства вводят отдельно в отдельные контейнеры или вместе в одном контейнере.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения, в настоящем изобретении предусмотрен набор для диагностики заболеваний, связанных с ангиогенезом, содержащий антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела.

Термин "биологический образец", используемый в данном документе, предусматривает образцы ткани, клеток, крови, сыворотки, плазмы, образцы тканей после аутопсии (головного мозга, кожи, лимфатических узлов, спинного мозга) и т.п., но не ограничивается ими.

Путем реакции антитела по настоящему изобретению с биологическим образцом можно диагностировать начало или возможность заболевания, связанного с ангиогенезом. В частности, это можно диагностировать посредством приведения в контакт антитела к С-KIT или его функционального фрагмента с биологическим образцом и подтверждения образования комплекса антиген-антитело. Поскольку диагностический набор по настоящему изобретению содержит антитело, его можно сделать пригодным для различных иммуноанализов или иммуноокрашивания. Иммуноанализ или иммуноокрашивание может представлять собой без ограничения иммуноферментный анализ (ELISA), иммунофлуоресценцию, вестерн-блоттинг, иммуногистохимическое окрашивание, проточную цитометрию, иммуноцитохимию, радиоиммуноанализ (RIA), белковый чип и т. п.

Метки для качественного или количественного определения образования комплекса антиген-антитело включают ферменты, флуоресцентные вещества, лиганды, люминесцентные вещества, микро-частицы, окислительно-восстановительные молекулы и радиоизотопы, но не ограничиваются ими.

Новое антитело к С-KIT или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению специфически связывается с конкретным доменом II С-KIT и характеризуется сильной аффинностью. Соответственно, антитело или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению характеризуется исключительно превосходным эффектом значительного подавления образования аномальной или избыточной неоваскуляризации и может эффективно способствовать предотвращению или лечению заболевания, связанного с ангиогенезом. Кроме того, антитело или фрагмент такого антитела согласно настоящему изобретению можно эффективно использовать в исследовании заболеваний, связанных с ангиогенезом, поскольку оно обладает перекрестной реактивностью в отношении белков мыши и крысы в дополнение к белкам человека.

#### Краткое описание фигур

Фиг. 1 представляет собой график, демонстрирующий эффект подавления образования трубок для всех пятнадцати моноклональных антител к С-KIT на относительном уровне по сравнению с необработанной контрольной группой, когда клетки HUVEC обрабатывали SCF.

Фиг. 2 представляет собой график, демонстрирующий эффект подавления образования трубок в зависимости от концентрации антитела 2G4 на относительном уровне по сравнению с необработанной контрольной группой, когда клетки HUVEC обрабатывали SCF.

Фиг. 3 представляет собой график, демонстрирующий эффект подавления образования трубок в зависимости от концентрации антитела 2G4, когда полученные от мыши эндотелиальные клетки MS-1 обрабатывали SCF.

На фиг. 4 и 5 показаны полосы варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи антитела 2G4 соответственно.

На фиг. 6 показана нуклеотидная последовательность, аминокислотная последовательность и область CDR варибельной области легкой цепи антитела 2G4.

На фиг. 7 показана нуклеотидная последовательность, аминокислотная последовательность и область CDR варибельной области тяжелой цепи антитела 2G4.

На фиг. 8 показаны результаты анализа SDS-PAGE антител 2G4, полученных путем клонирования, разделения и очистки.

Фиг. 9 представляет собой график, демонстрирующий результаты анализа SPR для подтверждения аффинности С-KIT к антителу 2G4.

На фиг. 10 показаны экспериментальные результаты для подтверждения связывающего домена С-KIT антитела 2G4.

На фиг. 11 показаны результаты сравнения способности подавлять аномальный ангиогенез для антитела 2G4 и коммерчески доступного Eylea с использованием мышинной модели индуцированной кислородом ретинопатии.

На фиг. 12 показаны результаты сравнения способности подавлять аномальный ангиогенез для антитела 2G4 и коммерчески доступного Eylea с использованием модели дегенерации желтого пятна на коричневых норвежских крысах.

На фиг. 13 показана подавляющая способность антител 2G4 в отношении фосфорилирования АКТ под действием SCF в клеточных линиях HUVEC.

На фиг. 14 показана подавляющая способность антител 2G4 в отношении фосфорилирования АКТ, фосфорилирования С-KIT, фосфорилирования ERK 1/2 и  $\beta$ -катенина в клеточной линии TF-1, что тем самым демонстрирует подавление пролиферации лейкозных клеток.

На фиг. 15 показана способность антитела 2G4 подавлять пролиферацию клеток HUVEC и TF-1.

### Примеры

Далее примерные варианты осуществления идеи изобретения будут объяснены в дополнительных деталях со ссылкой на примеры. Однако следующие примеры предназначены для иллюстрации на примере настоящего изобретения, и объем настоящего изобретения этими примерами не ограничивается. Термины, которые конкретно не определены в настоящем описании, следует понимать как имеющие значения, обычно используемые в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Пример 1. Получение линии клеток для продуцирования антител С-КИТ.

1-1. Получение иммунизированных мышей.

Эмульсию получали путем смешивания 50 мкг (из расчета на одну мышь) рекомбинантного белка С-КИТ (№ по кат. PKSH030939), приобретенного у Elabscience, с таким же объемом полного адьюванта Фрейнда (Sigma, США). Полученную эмульсию вводили внутривентрально шести гуманизированным мышам NSG, 7-недельным самкам, получившим путем инъекции клетки CD34+ человека. Каждой мышке вводили 50 мкг антигена в общем объеме 500 мкл. Через 1 и 2 недели эмульсию, полученную путем смешивания неполного адьюванта Фрейнда (Sigma, США) с антигеном, дополнительно вводили во внутривентральную полость мышке соответственно.

1-2. Подтверждение продуцирования антител.

Кровь собирали из глазных яблок мышей, иммунизированных описанным выше способом, помещали в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 минут. Сыворотку отделяли и хранили при -20°C до проведения эксперимента для подтверждения продукции антител. После подтверждения продукции антител путем проведения иммуноферментного анализа с использованием антигенного белка эмульсию, в которой антиген был смешан с неполным адьювантом Фрейнда (Sigma, США), далее вводили во внутривентральную полость мышке за 3 дня до слияния клеток.

1-3. Получение гибридом.

После подтверждения продукции антител мышью умерщвляли. Спленциты выделяли и подвергали слиянию с клетками миеломы P3X63Ag 8.653 (ATCC CRL-1580) для получения гибридом.

В частности, клетки мышью P3X63Ag 8.653 культивировали в культуральной планшете с использованием среды RPMI1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки. Для выполнения слияния клеток клетки P3X63Ag 8.653 дважды промывали бессывороточной средой RPMI1640 (Nunc, США) и доводили до концентрации клеток  $1 \times 10^7$ . Мышь умерщвляли смещением шейных позвонков, собирали селезенку и затем помещали в сетчатый контейнер (Sigma, США) для разделения клеток. После получения суспензии спленцитов суспензию промывали центрифугированием. Эритроциты лизировали, подвергая раствор спленцитов воздействию Трис-NH<sub>4</sub>Cl (TRIS 20,6 г/л, NH<sub>4</sub>Cl 8,3 г/л). Полностью выделенные клетки, продуцирующие антитела, центрифугировали при 400×g в течение 5 минут. После этого их дважды промывали бессывороточной средой и ресуспендировали в 10 мл среды. Лимфоциты подсчитывали с помощью гемоцитометра, и  $1 \times 10^8$  лимфоцитов смешивали с  $1 \times 10^6$  клеток P3X63Ag 8.653 (10:1) в бессывороточной среде.

После центрифугирования при 400×g в течение 5 минут по каплям добавляли 1 мл раствора с использованием 50% (вес/об.) полиэтиленгликоля 1500 (Sigma, США), нагретого до 37°C, и перемешивали в течение 1 минуты. Полученный таким образом раствор смеси для слияния разбавляли бессывороточной RPMI1640 и центрифугировали при 400×g в течение 3 минут. Клетки суспендировали в 35 мл селективной среды RPMI1640 с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки и НАТ (100 мкМ гипоксантина, 0,4 мкМ аминокперина, 16 мкМ тимидина). 100 мкл суспензии загружали в 96-луночный планшет, покрытый питающими клетками (макрофаги, выделенные из брюшной полости с использованием RPMI1640) за день до этого и культивировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Через 5 дней среду НАТ меняли каждые 2-3 дня, и клетки культивировали в течение 14 дней. Через 14 дней проводили вторичное культивирование путем замены среды RPMI1640 с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки и НАТ (среда, в которой 0,4 мкМ аминокперина было удалено из НАТ).

1-4. Отбор и выделение слитых клеток, продуцирующих антитела

Супернатант из предварительно полученной культуральной среды слитых клеток собирали и подвергали иммуноферментному анализу для определения, продуцируются ли специфические антитела к полученному антигену или нет. Культуральную среду слитых клеток, демонстрирующую подходящую концентрацию, 4-кратную или больше по сравнению с группой отрицательного контроля, отбирали и переносили в 24-луночный планшет для культивирования. Кроме того, после культивирования посредством разведения с обеспечением содержания одна клетка на лунку в 96-луночном планшете (предельное разведение) культуральный раствор выделяли, и наносили покрытие белком С-КИТ, используемым в качестве антигена, при 0,1 мкг на лунку на 96-луночный планшет. После этого выполняли иммуноферментный анализ для осуществления окончательного выбора слитых клеток, продуцирующих 15 моноклональных антител (1C6, 1H2, 1A6, AFA, 2B3, 2G4, 4G5, 4C4, 4C7, 4D7, 1E1, 2H6, 1G3, 1A3, 1D3).

Пример 2. Отбор антител к С-KIT.

2-1. Анализ образования трубок с помощью HUVEC.

После внесения 300 мкл матригеля (Corning, США) в 24-луночный планшет HUVEC (эндотелиальные клетки пупочной вены человека) вносили в матригель с SCF (50 нг/мл) или SCF (50 нг/мл) + антитело к С-KIT (1 мкг/мл). После этого наблюдали образование трубки HUVEC, и результаты показаны на фиг. 1.

На фиг. 1, согласно результатам ангиогенеза *in vitro* с использованием HUVEC, было подтверждено, что 2G4 является наиболее эффективным среди 15 антител для подавления образования трубок HUVEC, индуцированного SCF. Это предполагает, что антитело к С-KIT, обозначаемое как 2G4, можно эффективно использовать для предотвращения или лечения заболеваний, связанных с ангиогенезом.

2-2. Эффекты подавления ангиогенеза в зависимости от концентраций антитела 2G4.

После внесения 300 мкл матригеля (Corning, США) в 24-луночный планшет HUVEC вносили в матригель с SCF (50 нг/мл), SCF (50 нг/мл) + антитело 2G4 (0,1 мкг/мл) или SCF (50 нг/мл) + антитело 2G4 (1 мкг/мл). После этого наблюдали образование трубки HUVEC, и результаты показаны на фиг. 2.

На фиг. 2, согласно результатам анализа образования трубок с использованием HUVEC, было подтверждено, что антитело 2G4 подавляет образование трубок HUVEC в зависимости от концентрации. В частности, антитело 2G4 обладало превосходной способностью подавлять ангиогенез даже при концентрации 0,1 мкг/мл.

2-3. Тест перекрестной реакции на мышах.

С целью проведения теста перекрестной реактивности антитела 2G4 на мышах его проводили таким же образом, как в примере 2-2, с использованием полученных от мыши эндотелиальных клеток MS-1.

В качестве результата, как показано на фиг. 3, было подтверждено, что антитело 2G4 значительно подавляло ангиогенез с участием эндотелиальных клеток мыши в случае полученных от мыши эндотелиальных клеток MS-1.

Пример 3. Анализ нуклеотидной последовательности варибельной области IgG антитела к С-KIT.

Общую РНК выделяли из клона 5×10 слитых клеток, продуцирующих 2G4, полученного в примерах 1 и 2. КДНК синтезировали с использованием случайного праймера (Bioneer, Республика Корея) и обратной транскриптазы.

Домен легкой каппа-цепи амплифицировали из кДНК с использованием набора праймеров библиотеки человеческого IgG от PROGEN. Амплифицированную нуклеиновую кислоту подтверждали посредством электрофореза в агарозном геле, и результаты показаны на фиг. 4. Аналогичным образом, домен тяжелой цепи амплифицировали с использованием набора праймеров библиотеки человеческого IgG от PROGEN, и результаты показаны на фиг. 5.

Как показано на фиг. 4 и 5, была обнаружена полоса между доменом легкой каппа-цепи (414 п.о.) и доменом тяжелой цепи (483 п.о.), что подтверждает получение ПЦР-продукта ожидаемого размера.

После этого ПЦР-продукт наносили на агарозный гель, полосу вырезали, агарозный гель растворяли при 60°C, и затем нуклеиновую кислоту очищали с использованием центрифужной колонки (Qiagen). Очищенную нуклеиновую кислоту клонировали в вектор ТОРО-ТА, трансформировали *E. coli* DH5α для получения колоний, и затем полученные колонии культивировали с выделением плазмид. Впоследствии, снова проводили ПЦР с получением четырех плазмид, и затем анализировали нуклеотидную последовательность антитела 2G4.

На фиг. 6 показана аминокислотная последовательность и нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи антитела 2G4, которые соответственно соответствуют аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 и нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 15 в перечне последовательностей, прилагаемом к настоящему описанию. Кроме того, CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области легкой цепи на фиг. 6 обозначены в соответствующем порядке посредством выделения красным цветом, что соответствует аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 1-3 и нуклеотидным последовательностям под SEQ ID NO: 9-11 соответственно в перечне последовательностей, прилагаемом к настоящему описанию.

На фиг. 7 показаны аминокислотная последовательность и нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела 2G4, которые соответственно соответствуют аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8 и нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 16 в перечне последовательностей, прилагаемом к настоящему описанию. Кроме того, CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области тяжелой цепи на фиг. 7 обозначены в соответствующем порядке посредством выделения красным цветом, что соответствует аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 4-6 и нуклеотидным последовательностям под SEQ ID NO: 12-14 соответственно в перечне последовательностей, прилагаемом к настоящему описанию.

Пример 4. Получение антитела к С-KIT.

4-1. Клонирование полностью гуманизированных антител.

Варибельную область антитела 2G4, полученного в примере 3, прививали на аминокислотную последовательность Fc человека и клонировали в вектор pCHO (Life Technology).

Вариабельную область легкой цепи подвергали слиянию в рамке считывания с константной областью каппа-цепи человека, и вариабельную область тяжелой цепи подвергали слиянию в рамке считывания с константной областью человеческого IgG1. Последовательность лидерного пептида для секреции целого антитела IgG1 в среде добавляли к двум генам для синтеза гена, и затем снова проверяли путем секвенирования. Для теста экспрессии в клетках CHO отбирали три клона. Для трех клонов получали глицериновые стоки, и для теста экспрессии в клетках CHO получали плазмиду без эндотоксина.

#### 4-2. Выделение и очистка антител.

Полученную как изложено выше плазмидную ДНК трансфицировали в клетки CHO-S.

За неделю до трансфекции клетки CHO-S (Invitrogen, 10743-029) переносили в однослойные культуры в присутствии DMEM с добавлением сыворотки. После распределения клеток за 1 день до трансфекции для трансфекционного образца получали комплекс нуклеиновой кислоты с липофектаминол, и клетки инкубировали в течение ночи при 5% CO<sub>2</sub> и 37°C в инкубаторе. Среду инкубировали в течение недели, добавляя каждые 2-3 дня. Затем культуральный раствор собирали, связывали с агарозой с белком A/G (Invitrogen) и промывали PBS. Затем после элюирования 0,1 М глицином (pH 2,8) его нейтрализовывали 1 М трис-HCl (pH 8,0). После диализа с использованием PBS его хранили при -70°C.

Отделенное и очищенное антитело 2G4 обрабатывали 6% SDS-PAGE в невозстанавливающих и восстанавливающих условиях, чтобы подтвердить чистоту и размер антитела. Результаты показаны на фиг. 8. Как показано на фиг. 8, в результате SDS-PAGE наблюдали полосу тяжелой цепи 50 кДа и полосу легкой цепи 25 кДа, что подтверждало, что антитело было получено соответствующим образом.

#### Пример 5. Аффинность антитела 2G4.

Для подтверждения способности антитела 2G4 связывать C-KIT выполняли анализ с помощью SPR (поверхностного плазмонного резонанса). С использованием SR7500DC (Reichert, США), 20 мкг человеческого C-KIT (Elabscience, PKSH030939), используемого для получения антител, 20 мкг мышинового C-KIT (SB, № партии LC05DE2304) и 20 мкг крысиного C-KIT (SB, № партии LC06SE1787) фиксировали на чипе с PEG (Reichert, США). После этого, после пропускания антитела 2G4 при некоторой концентрации, значение K<sub>D</sub>, которое представляет собой аффинность в отношении C-KIT, анализировали с использованием программы Scrubber2. Значение K<sub>D</sub> получали делением kd на ka, и чем ниже значение, тем выше способность связывания с мишенью.

Результаты показаны на фиг. 9. Антитело 2G4 продемонстрировало сильную аффинность в отношении человеческого C-KIT со значением K<sub>D</sub>, составляющим приблизительно  $2,8237 (\pm 0,9) \times 10^{-12}$  М. Аффинность в отношении белка человека была наиболее высокой, при этом более низкой в отношении белков мыши и крысы.

#### Пример 6. Картирование доменов.

Варианты делеции (Q26-P520, D113-P520  $\Delta$  домена I, A207-P520  $\Delta$  домена I-II, K310-P520  $\Delta$  домена I-III) человеческого гена C-KIT (NM\_000222) помечали FLAG на C-конце, и затем трансфицировали в HEK293. Затем, после секреции в культуральную среду, их очищали с использованием микроносителей с антителами к FLAG (Sigma-Aldrich). Затем проводили ELISA.

Как показано на фиг. 10, антитело 2G4 не распознало C-KIT, когда домен II был удален, и на основании этого было доказано, что для антитела 2G4 специфическим сайтом связывания с C-KIT являлся домен II.

#### Сравнительный пример 1. Сравнение эффективности in vivo на мышинной модели.

В качестве животной модели пролиферативной диабетической ретинопатии и ретинопатии недоношенных использовали широко используемую мышиную модель индуцированной кислородом ретинопатии (OIR). Аномальные кровеносные сосуды образовывались, если мышью C57BL/6 подвергали воздействию среды с высоким содержанием кислорода, составляющим 75%, в течение 5 дней с 7 дней после рождения.

Мышей C57BL/6 подвергали воздействию среды с 21% кислорода от 0 до 7 дней после рождения и среды с 75% кислорода от 7 до 12 дней после рождения. На 12-й день после рождения антитело 2G4 (2 мкг/глаз) и Eylea (2 мкг/глаз) вводили интравитреально в правый глаз соответственно и PBS вводили в левый глаз и сравнивали с использованием в качестве контрольной группы. Затем, с 12-го по 17-ый день после рождения, их снова подвергали воздействию кислородной среды с концентрацией 21% и умерщвляли на 17-й день после рождения.

В качестве результата, как показано на фиг. 11, подавление аномального ангиогенеза наблюдалось в правом глазу, в который вводили путем инъекции антитела 2G4 и Eylea (2 мкг/глаз), и было подтверждено, что степень подавления находилась на эквивалентном уровне.

#### Сравнительный пример 2. Сравнение эффективности in vivo на крысиной модели.

Модель дегенерации желтого пятна была получена с использованием коричневых норвежских крыс.

CNV (хориоидальную неоваскуляризацию) в глазу крысы индуцировали с помощью лазера. При этом антитело 2G4 (6,28 мкг/глаз) и Eylea (10 мкг/глаз) вводили интравитреально в дозе 4 мкл/глаз соответственно. Группу, которой вводили антитело IgG (10 мкг/глаз) в дозе 4 мкл/глаз, использовали в каче-

стве контроля.

На фиг. 12 показаны результаты анализа с использованием лектина BS-1 через 14 дней. Аномальный ангиогенез, вызванный дегенерацией желтого пятна, значительно подавлялся как в группе с Eylea, так и в группе с антителом 2G4. В частности, антитело 2G4 показало эквивалентный уровень эффективности, хотя концентрация дозы была ниже, чем в группе с Eylea, и это указывает на то, что антитело 2G4 более эффективно, чем Eylea.

Пример 7. Способность антитела 2G4 к подавлению передачи сигналов SCF/C-KIT.

Известно, что передача сигналов SCF/C-KIT в основном индуцирует фосфорилирование АКТ. Как видно на фиг. 13, было подтверждено, что фосфорилирование АКТ увеличивалось, когда HUVEC обрабатывали SCF. С другой стороны, было подтверждено, что фосфорилирование АКТ снижалось антителом 2G4.

Кроме того, на фиг. 14 показано, что фосфорилирование АКТ с помощью SCF подавляется антителом 2G4 в линии лейкозных клеток TF-1. Более того, на фиг. 14 показано, что фосфорилирование ERK1/2 и фосфорилирование C-KIT с помощью SCF также подавляются.

$\beta$ -катенин является нисходящим сигналом АКТ и, как известно, является важным фактором пролиферации клеток. На фиг. 14 показано, что антитело 2G4 подавляет увеличение уровня  $\beta$ -катенина под действием SCF в зависимости от концентрации, что означает, что антитело 2G4 значимо подавляет пролиферацию линии лейкозных клеток TF-1. Лейкоз характеризуется множеством мутаций C-KIT, поэтому часто обнаруживается устойчивость или толерантность к противоопухолевым лекарственным средствам. Однако антитело по настоящему изобретению может проявлять профилактический или терапевтический эффект против лейкоза и, таким образом, может преодолевать ограничения предшествующих противоопухолевых лекарственных средств.

Пример 8. Способность антитела 2G4 подавлять пролиферацию клеток HUVEC и TF-1.

Антителами 2G4 предварительно обрабатывали TF-1 и HUVEC в течение 30 минут при различных концентрациях (0, 0,1, 1, 5, 10 мкг/мл). После этого обрабатывали 50 нг/мл SCF и через 36 часов измеряли количество клеток для сравнения скорости пролиферации клеток.

Как показано на фиг. 15, в группе, обработанной SCF, количество клеток TF-1 увеличивалось на приблизительно 26% и количество клеток HUVEC увеличивалось на приблизительно 70% по сравнению с группой отрицательного контроля. С другой стороны, в группе, обработанной антителом 2G4, пролиферация клеток, индуцированная SCF, подавлялась зависимым от концентрации образом как в случае TF-1, так и в случае HUVEC. Это означает, что антитело 2G4 характеризуется очень хорошей способностью подавлять пролиферацию клеток HUVEC и TF-1.

#### Перечень последовательностей

<110> НОВЕЛТИ НОБИЛИТИ ИНК.  
 <120> НОВОЕ АНТИТЕЛО К C-KIT  
 <130> PCT19016  
 <150> KR 10/2018/0120233  
 <151> 2018-10-10  
 <160> 30  
 <170> KoPatentIn 3.0  
 <210> 1  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> CDR1 легкой цепи 2G4  
 <400> 1  
 Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr  
 1 5 10  
 <210> 2

<211> 3  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR2 легкой цепи 2G4

<400> 2  
Leu Gly Ser  
1

<210> 3  
<211> 8  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR3 легкой цепи 2G4

<400> 3  
Met Gln Ala Leu Gln Thr Ile Thr  
1 5

<210> 4  
<211> 8  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR1 тяжелой цепи 2G4

<400> 4  
Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Gly  
1 5

<210> 5  
<211> 8  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR2 тяжелой цепи 2G4

<400> 5  
Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Lys  
1 5

<210> 6  
<211> 11  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR3 тяжелой цепи 2G4

## 045024

<400> 6  
Ala Arg Glu Asp Trp Ala Glu Ala Phe Asp Met  
1 5 10

<210> 7  
<211> 111  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> варьируемый домен легкой цепи 2G4

<400> 7  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30  
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45  
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
50 55 60  
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80  
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
85 90 95  
Leu Gln Thr Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 8  
<211> 118  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> варьируемый домен тяжелой цепи 2G4

<400> 8  
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr  
20 25 30  
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Asp Tyr Thr Asp Ser Val  
50 55 60  
Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr



<400> 12  
 ggattcacct tcagtcgcta tggc  
 24

<210> 13  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR2 тяжелой цепи 2G4

<400> 13  
 atatggtatg atggaастаа тааа  
 24

<210> 14  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR3 тяжелой цепи 2G4

<400> 14  
 gcgagagaag attgggctga ggcttttgat atg  
 33

<210> 15  
 <211> 333  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> вариабельный домен легкой цепи 2G4

<400> 15  
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca ccctggaga gccggcctcc  
 60

atctcctgca ggtctagtca gaggctcctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg  
 120

tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcgggcc  
 180

tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc  
 240

agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaaactatc  
 300

accttcggcc aagggacacg actggagatt aaa  
 333

<210> 16

045024

<211> 354  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> варьибельный домен тяжелой цепи 2G4

<400> 16  
caggtgcagc tggaggagtc tgggggagggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc  
60  
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt cgctatggca tgcactgggt ccgccaggct  
120  
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaactaa taaagactat  
180  
acagactccg tgaggggccc attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat  
240  
cttcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaagat  
300  
tgggctgagg cttttgatat gtggggccaa gggacaacgg tcaccgtctc ttca  
354

<210> 17  
<211> 33  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR1 кодон-оптимизированной легкой цепи 2G4 для СНО

<400> 17  
cagtcscctgc tgcactcсаа сggctасаас tac  
33

<210> 18  
<211> 9  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR2 кодон-оптимизированной легкой цепи 2G4 для СНО

<400> 18  
ctgggctcc  
9

<210> 19  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR3 кодон-оптимизированной легкой цепи 2G4 для СНО

<400> 19  
atgcaggccc tgcaaacat cacc  
24

<210> 20  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR1 кодон-оптимизированной тяжелой цепи 2G4 для СНО

<400> 20  
ggcttcacct tctccagata cggg  
24

<210> 21  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR2 кодон-оптимизированной тяжелой цепи 2G4 для СНО

<400> 21  
atttggtacg acggcassaа сааg  
24

<210> 22  
<211> 33  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR3 кодон-оптимизированной тяжелой цепи 2G4 для СНО

<400> 22  
gccaagaggg attgggссga agccttcgat atg  
33

<210> 23  
<211> 333  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> переменный домен кодон-оптимизированной легкой цепи 2G4 для СНО

<400> 23  
gacatcgtga tgaccсagtc tccactgagc ctgcctgtga cacctggcga gcctgcttcc  
60

atctcctgca gatcctctca gtcctctgtg cactccaacg gctacaacta cctggactgg  
120

045024

tatctgcaga agcccggcca gtctcctcag ctgctgatct acctgggctc caacagagct  
180

tctggcgtgc ccgatagatt ctccggctct ggctctggca ccgacttcac cctgaagatc  
240

tccagagtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgta tgcaggcctt gcagaccatc  
300

accttcggcc agggaaaccag actggaaatc aag  
333

<210> 24

<211> 354

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> переменный домен кодон-оптимизированной тяжелой цепи 2G4 для СНО

<400> 24

caggtgcagc tgggtggaatc tgggtggcggg gttgtgcagc ctggcagatc cctgagactg  
60

tcttgtgccg cctccggctt caccttctcc agatacggaa tgcactgggt ccgacaggcc  
120

cctggcaaaag gattggaatg ggtcgccgtg atttggtacg acggcaccaa caaggactac  
180

accgactctg tgcggggcag attcaccatc tctcgggaca actccaagaa caccctgtac  
240

ctgcagatga actccctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagagaggat  
300

tgggccgaag ccttcgatat gtggggccag ggcacaaccg tgaccgtgtc ctct  
354

<210> 25

<211> 238

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> легкая цепь 2G4

<400> 25

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro  
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser  
35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys

045024

50 55 60  
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala  
 65 70 75 80  
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 85 90 95  
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr  
 100 105 110  
 Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu  
 115 120 125  
 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
 130 135 140  
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
 145 150 155 160  
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn  
 165 170 175  
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser  
 180 185 190  
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala  
 195 200 205  
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly  
 210 215 220  
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

<210> 26  
 <211> 468  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> тяжелая цепь 2G4

<400> 26  
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val  
 20 25 30  
 Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
 35 40 45  
 Phe Ser Arg Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
 50 55 60  
 Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Asp Tyr  
 65 70 75 80  
 Thr Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys  
 85 90 95

045024

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala  
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Trp Ala Glu Ala Phe Asp Met Trp  
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
420 425 430

045024

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
450 455 460

Ser Pro Gly Lys  
465

<210> 27  
<211> 717  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> легкая цепь 2G4

<400> 27  
atggaaacag acacactcct cctctgggtc ctctctctct ggggtcccagg cagcacagga  
60  
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc  
120  
atctctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg  
180  
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcgggcc  
240  
tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc  
300  
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaactatc  
360  
accttcggcc aagggacacg actggagatt aaacgtacgg tggtcgcacc atctgtcttc  
420  
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg  
480  
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg  
540  
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc  
600  
agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaacacaa aagtctacgc ctgcgaagtc  
660  
accatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttga  
717

<210> 28  
<211> 1407  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

## 045024

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;     тяжелая цепь 2G4

&lt;400&gt;     28

atggaaacag acacactcct cctctgggtc ctctctctct gggccccagg cagcacagga  
60caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc  
120tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt cgctatggca tgcactgggt ccgccaggct  
180ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaactaa taaagactat  
240acagactccg tgaggggccc attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat  
300cttcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaagat  
360tgggctgagg cttttgatat gtggggccaa gggacaacgg tcaccgtctc ttcagcctcc  
420accaagggcc catcggctct ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca  
480gcgggcctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac  
540tcagggcccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc  
600tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc  
660tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagttga gcccaaatct  
720tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca  
780gtcttcctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac cctgaggtc  
840acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg  
900gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg  
960taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac  
1020aagtgcaagg tcagcaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc  
1080aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc  
1140

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg

045024

1200

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac  
1260

tccgacggct ctttcttctt ctacagcaag ctaccctgtg acaagagcag gtggcagcag  
1320

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag  
1380

agcctctccc tgtctccggg taaatga  
1407

<210> 29

<211> 717

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированная легкая цепь 2G4 для СНО

<400> 29

atggaaaccg acacactgct gctgtgggtg ctgctcttgt gggtgccagg atctaccggc  
60

gacatcgtga tgaccagtc tccactgagc ctgcctgtga cacctggcga gcctgcttcc  
120

atctcttgca gatcctctca gtccctgctg cactccaacg gctacaacta cctggactgg  
180

tatctgcaga agcccggcca gtctctcag ctgctgatct acctgggctc caacagagct  
240

tctggcgtgc ccgatagatt ctccggctct ggctctggca ccgacttcac cctgaagatc  
300

tccagagtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgta tgcaggccct gcagaccatc  
360

accttcggcc agggaaccag actggaaatc aagcggacag tggccgctcc ttccgtgttc  
420

atcttcccac cttccgacga gcagctgaag tccggcacag cttctgtcgt gtgcctgctg  
480

aacaacttct accctcggga agccaagggtg cagtgggaagg tggacaatgc cctgcagtcc  
540

ggcaactccc aagagtctgt gaccgagcag gactccaagg acagcaccta cagcctgtcc  
600

tccacactga ccctgtccaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgcgaagtg  
660

accatcagg gcctgtctag ccctgtgacc aagtctttca accggggcga gtgctga  
717

<210> 30

045024

<211> 1407  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность  
  
<220>  
<223> кодон-оптимизированная тяжелая цепь 2G4 для СНО

<400> 30  
atggaaccg acacactgct gctgtgggtg ctgctcttgt gggtgccagg atctacagga  
60  
  
caggtgcagc tgggtggaatc tgggtggcggg gttgtgcagc ctggcagatc cctgagactg  
120  
  
tcttgtgccg cctccggctt caccttctcc agatacggaa tgcactgggt ccgacaggcc  
180  
  
cctggcaaag gattggaatg ggtcgccgtg atttggtacg acggcaccaa caaggactac  
240  
  
accgactctg tgcggggcag attcaccatc tctcgggaca actccaagaa caccctgtac  
300  
  
ctgcagatga actccctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagagaggat  
360  
  
tgggccgaag ccttcgatat gtggggccag ggcacaaccg tgaccgtgtc ctctgcttct  
420  
  
accaagggac ccagcgtggt ccctctggct ccttcagca agtctacctc tggcggaaaca  
480  
  
gctgctctgg gctgcctggc caaggattac ttccctgagc ctgtgacagt gtcctggaac  
540  
  
tctggcgctc tgacatccgg cgtgcacacc tttccagctg tgctgcaatc ctccggcctg  
600  
  
tactctctgt cctccgtcgt gacagtgcct tccagctctc tgggaacca gacctacatc  
660  
  
tgcaatgtga accacaagcc ttccaacacc aagggtggaca agaaggtgga acccaagtcc  
720  
  
tgcgacaaga cccacacctg tccaccatgt cctgctccag aactgctcgg cggaccttcc  
780  
  
gtgttctgt ttctccaaa gcttaaggac accctgatga tctctcggac ccctgaagtg  
840  
  
acctgcgtgg tgggtgatgt gtctcacgag gatcccgaag tgaagttcaa ttggtacgtg  
900  
  
gacggcgtgg aagtgcacaa cgccaagacc aagcctagag aggaacagta caactccacc  
960  
  
tacagagtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggatt ggctgaacgg caaagagtac  
1020  
  
aagtgcaagg tgtccaacaa ggcctgctt gctcctatcg aaaagaccat ctccaaggcc  
1080

aagggccagc ctaggggaacc ccagggtttac accttgccctc catctcggga cgagctgacc  
1140

aagaaccagg tgtccctgac ctgtctcgtg aagggcttct acccctccga tatcgccgtg  
1200

gaatgggagt ctaatggcca gcctgagaac aactacaaga caaccctcc tgtgctggac  
1260

tccgacggct cattcttctt gtactccaag ctgacagtgg acaagtccag atggcagcag  
1320

ggcaacgtgt tctcctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaatcacta caccagaag  
1380

tcctgtctc tgagccccgg caaatga  
1407

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к С-КИТ или фрагмент такого антитела, специфически связывающиеся с С-КИТ, где антитело или фрагмент такого антитела содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 1, CDR2 легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 2, и CDR3 легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 3, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 5, и CDR3 тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 6.

2. Антитело к С-КИТ или фрагмент такого антитела по п.1, где антитело или фрагмент такого антитела содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

3. Антитело к С-КИТ или фрагмент такого антитела по п.1, где антитело или фрагмент такого антитела содержит константную область, полученную из человеческого IgG1.

4. Антитело к С-КИТ или фрагмент такого антитела по п.1, где антитело или фрагмент такого антитела специфически связывается с доменом II С-КИТ.

5. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело к С-КИТ или фрагмент такого антитела по п.1.

6. Нуклеиновая кислота по п.5, при этом нуклеиновая кислота содержит (i) SEQ ID NO: 9-14, (ii) SEQ ID NO: 15 и 16, (iii) SEQ ID NO: 17-22 или (iv) SEQ ID NO: 23 и 24.

7. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.5.

8. Клетка, трансформированная вектором по п.7.

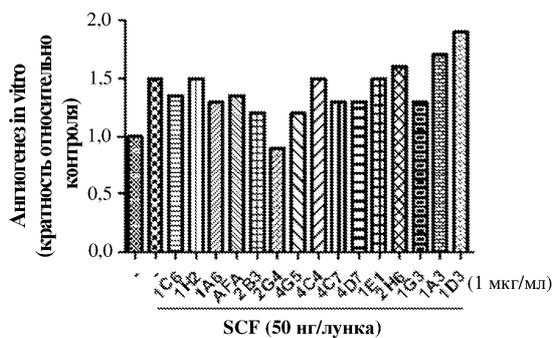
9. Применение антитела к С-КИТ или фрагмента такого антитела по п.1 для предотвращения или лечения заболевания, связанного с ангиогенезом, где заболевание, связанное с ангиогенезом, выбрано из группы, состоящей из рака, лейкоза, офтальмологических сосудистых заболеваний, ревматоидного артрита, псориаза, хронических ран, хронического воспаления, гемангиомы, гемангиофибром, сосудистых мальформаций, атеросклероза, сращения сосудов, васкулита, пиогенной гранулемы, заболеваний, связанных с волдырями, легочной гипертензии, астмы, носовых полипов, инфекционных заболеваний, воспалительного заболевания кишечника, заболевания пародонта, спаек брюшины, эндометриоза, маточного кровотечения, кист яичника, остеомиелита, остита, сепсиса и аутоиммунных заболеваний.

10. Применение по п.9, при этом рак выбран из группы, состоящей из рака кости, рака легкого, рака головного мозга, рака шеи, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, немелкоклеточного рака легких, рака желудка, рака печени, рака поджелудочной железы, рака кожи, меланомы кожи или интраокулярной меланомы, рака прямой кишки, рака анального канала, рака толстой кишки, рака матки, рака яичника, карциномы маточной трубы, карциномы эндометрия, карциномы шейки матки, карциномы влагалища, карциномы вульвы, болезни Ходжкина, рака пищевода, рака тонкого кишечника, аденокарциномы железы внутренней секреции, рака надпочечников, саркомы мягких тканей, рака уретры, рака полового члена, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака почки или рака мочеточника, почечно-клеточной карциномы, карциномы почечной лоханки, опухоли центральной нервной системы, лимфомы центральной нервной системы, опухоли спинного мозга, глиобластомы, глиомы ствола головного мозга и аденомы гипофиза.

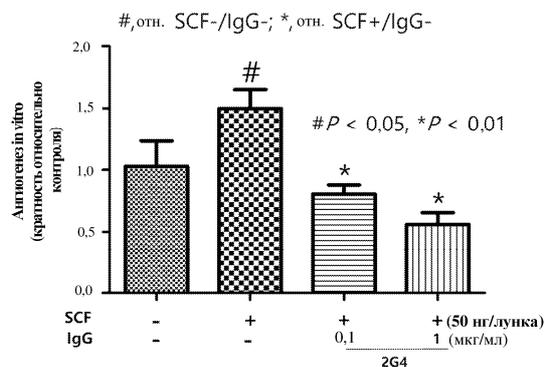
11. Применение по п.9, при этом офтальмологические сосудистые заболевания выбраны из группы, состоящей из диабетической ретинопатии, дегенерации желтого пятна, старческой дегенерации желтого пятна, глаукомы, связанной с глаукомой пигментной дегенерации сетчатки, хориоидальной неоваскуля-

ризации, ретинопатии недоношенных, дистрофии роговицы и расслоения сетчатки.

12. Применение антитела к С-КІТ или фрагмента такого антитела по п.1 для диагностики заболеваний, связанных с ангиогенезом, где заболевание, связанное с ангиогенезом, выбрано из группы, состоящей из рака, лейкоза, офтальмологических сосудистых заболеваний, ревматоидного артрита, псориаза, хронических ран, хронического воспаления, гемангиомы, гемангиофибромы, сосудистых мальформаций, артериосклероза, сращения сосудов, васкулита, пиогенной гранулемы, заболеваний, связанных с волдырями, легочной гипертензии, астмы, носовых полипов, инфекционных заболеваний, воспалительного заболевания кишечника, заболевания пародонта, спаек брюшины, эндометриоза, маточного кровотечения, кист яичника, остеомиелита, остита, сепсиса и аутоиммунных заболеваний.

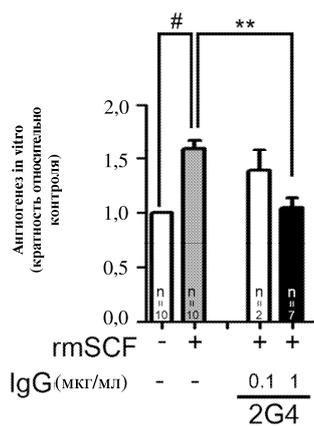


Фиг. 1

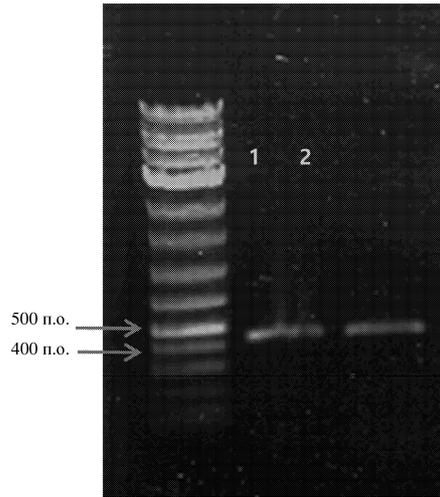


Фиг. 2

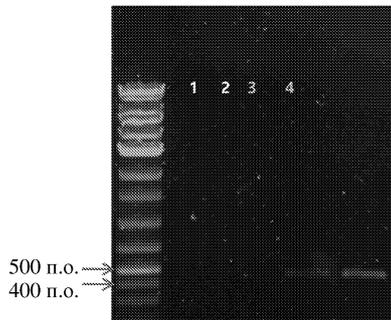
(\*\*P<0.001, #P<0.001)



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

```

GAT ATT GTG ATG ACT CAG
D I V M T Q

TCT CCA CTC TCC CTG GGC GTC ACC OCT GGA GAG CCG GCC TCC ATC
S P L S L P V T P G E P A S I
                                CDR1
TCC TGC AGG TCT AGT CAG AGC CTC CTG CAT AGT AAT GGA TAC AAC
S C R S S Q S L L H S N G Y N

TAT TTG GAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGG CAG TCT CCA CAG CTC
Y L D N Y L Q K P G Q S P Q L
                                CDR2
CTG ATC TAT TTG GGT TCT AAT CCG GCC TCC GGG GTC OCT GAC AGG
L I Y L G S K R A S G V P D R

TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA GAT TTT ACA CTG AAA ATC AGC
F S G S G S G T D F T L K I S
                                CDR3
AGA GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG GTS TAT TAC TGC ATG CAA GCT
R V E A E D V G V Y Y C M Q A

CTA CAA ACT ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA
L Q T I T F G Q G T R L E I K
    
```

Фиг. 6

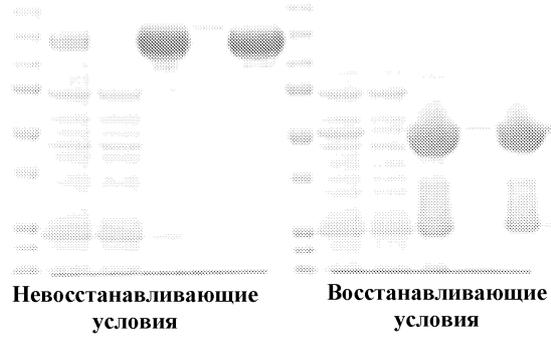
```

CAG CTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG
Q V Q L V E S G G G V

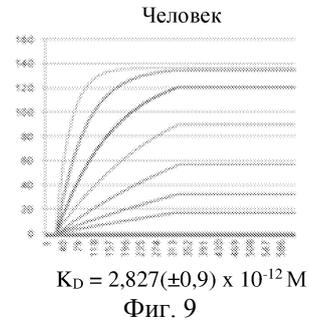
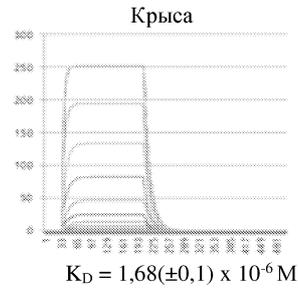
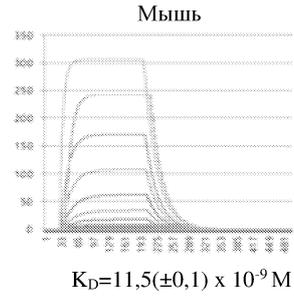
GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA
V Q P G R S L R L S C A A S *
CDR1
TTC ACC TTC ACT CGC TAT GGC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA
F T F S R Y * M H W V R Q A F
CDR2
GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TAT GAT GGA ACT
G K G L E W V A V I W Y D * T
AAT AAA GAC TAT ACA GAC TCC GTG AGG GGC CGA TTC ACC ATC TCC
N K D Y T D S V R G R F T I S
AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTT CAA ATG AAC AGC CTG
R D N S K N T L Y L Q M N S L
AGA GGC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAA GAT TGG
R A E D T A V Y Y C A R E D N
CDR3
GCT GAG GCT TTT GAT ATG TGG GGC CAA GGG ACA ACG GTC ACC GTC
K E A F D M W G Q G T T V T V
TCT TCA
S S

```

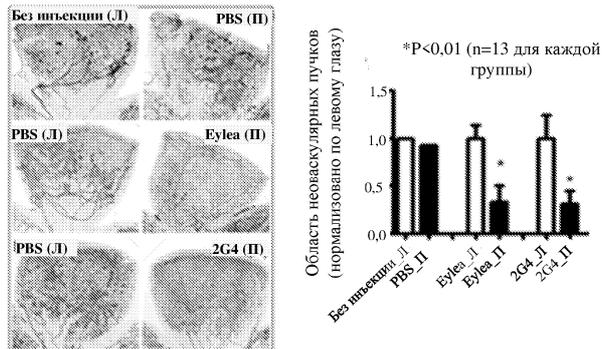
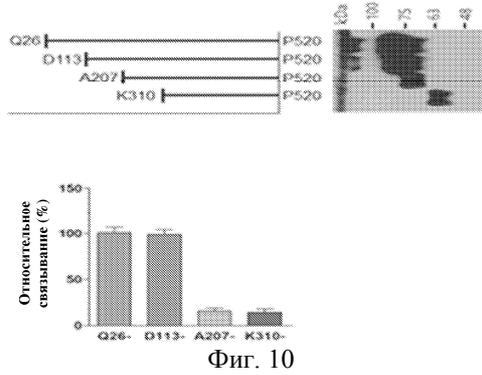
Фиг. 7

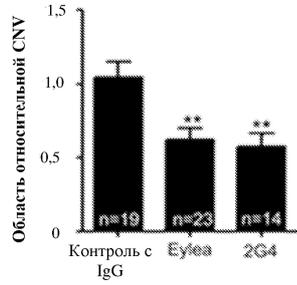
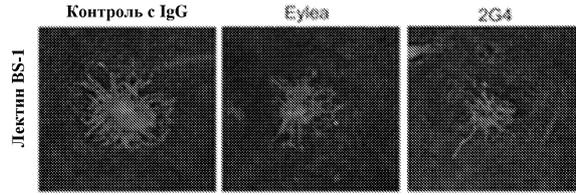


Фиг. 8



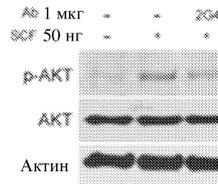
Конструкция на основе c-Kit с делецией





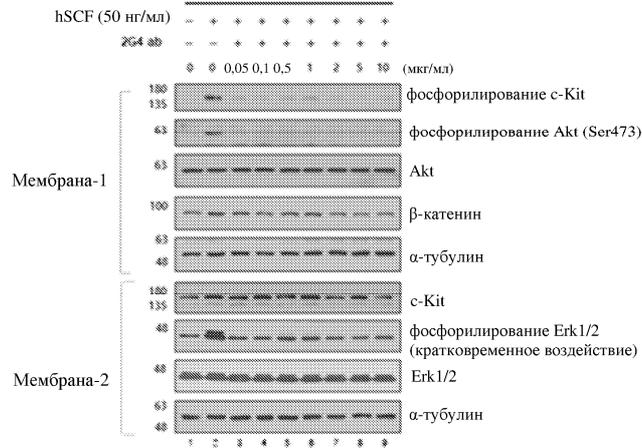
Фиг. 12

HUVEC

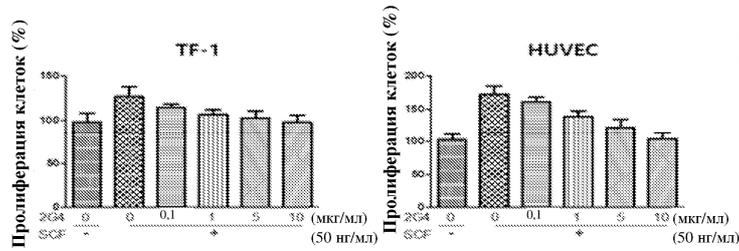


Фиг. 13

TF-1



Фиг. 14



Фиг. 15