(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 025828 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2017.02.28

(21) Номер заявки
201390716

(22) Дата подачи заявки
2011.11.14

(51) Int. Cl. ***A61K 31/337*** (2006.01)
A61K 31/475 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫМ ДОМЕНОМ FGFR1

(31) **61/413,940; 61/421,462**
(32) **2010.11.15; 2010.12.09**
(33) **US**
(43) **2014.02.28**
(86) **PCT/US2011/060666**
(87) **WO 2012/068032 2012.05.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФАЙВ ПРАЙМ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Лонг Ли, Бреннан Томас (US)

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

(56) WO-A2-2008065543
LONG LI ET AL.: "Antitumor efficacy of FP-1039, a soluble FGF receptor 1:Fc conjugate, as a single agent or in combination with anticancer drugs", PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 50, April 2009 (2009-04), page 674, XP008147481, & 100TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH; DENVER, CA, USA; APRIL 18-22, 2009, ISSN: 0197-016X, abstract

LONG L. ET AL.: "Preclinical Antitumor Efficacy of FP-1039, A Soluble FGF Receptor 1:Fc Conjugate, as a Single Agent or in Combination with Anticancer Drugs", AACR 100TH ANNUAL MEETING 2009, no. 2789, 17 April 2009 (2009-04-17), page 1, XP007920079, poster

Cancer chemotherapy: In: Rang HP et al.: "Rang and Dale's Pharmacology", 2008, Churchill Linvingston Elsevier, XP002667232, pages 718-735, the whole document

ZHENG ET AL.: "Enhanced efficacy in anti-tumour activity by combined therapy of recombinant FGFR-1 related angiogenesis and low-dose cytotoxic agent", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 43, no. 14, 14 September 2007 (2007-09-14), pages 2134-2139, XP022243363, ISSN: 0959-8049, DOI: 10.1016/J.EJCA.2007.07.014, abstract

(57) Описаны способы лечения рака, включающие введение внеклеточного домена (ECD) рецептора фактора роста фибробластов 1 (FGFR1) и/или молекулы слияния FGFR1 ECD в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом, выбираемым из доцетакселя, паклитакселя, винкристина, карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, доксорубицина, 5-фторурацила (5-ФУ), лейковорина, пеметрекседа и бевацизумаба. Также описаны упаковки дозы, включающие FGFR1 ECD и/или молекулу слияния FGFR1 ECD и/или по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент, выбираемый из доцетакселя, паклитакселя, винкристина, карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, доксорубицина, 5-фторурацила (5-ФУ), лейковорина, пеметрекседа и бевацизумаба. В некоторых вариантах воплощения изобретения упаковка дозы включает инструкции по введению FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом.

025828 B1

025828 B1

Данная заявка истребует приоритет предварительных заявок на патенты США No. 61/413940 от 15 ноября 2010 г. и 61/421462 от 9 декабря 2010 г., содержание которых включено сюда посредством ссылки.

Область техники и сущность изобретения

Было доказано, что растворимые формы рецептора фактора роста фибробластов 1 (FGFR1) ингибируют рост опухолевых клеток in vitro и in vivo. См., например, патент США No. 7678890. Комбинация противораковой терапевтической молекулы, такой как растворимая форма FGFR1, с другой противораковой терапевтической молекулой может привести к антагонистическому, аддитивному или синергическому воздействию на эффективность каждого противоракового лекарственного средства. Исследователями было сделано открытие, что введение FGFR1 ECD и доцетакселя в модели ксенотрансплантата мыши при немелкоклеточном раке легкого обладает синергическим противоопухолевым действием терапевтических агентов. Кроме того, исследователями было сделано открытие, что введение FGFR1 ECD и по меньшей мере одной дополнительной терапевтической молекулы, выбираемой из паклитакселя, винкристина, карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, доксорубицина, 5-фторурацила (5-ФУ), лейковорина, пеметрекседа и бевацизумаба, имеет, по меньшей мере, аддитивную активность относительно каждой молекулы, вводимой поодиночке в определенных моделях ксенотрансплантата мыши.

В некоторых вариантах воплощения изобретения описаны способы лечения рака, которые включают введение субъекту внеклеточного домена (ECD) рецептора фактора роста фибробластов 1 (FGFR1) и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, выбираемого из доцетакселя, паклитакселя, винкристина, карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, доксорубицина, 5-фторурацила (5-ФУ), лейковорина, пеметрекседа, сорафениба, этопозида, топотекана, антагониста фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ловушки ФРЭС, антитела к ФРЭС и бевацизумаба. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является доцетакселем. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является пеметрекседом. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является цисплатином. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является паклитакселем. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является 5-ФУ. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является топотеканом. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является винкристином. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является антагонистом ФРЭС, таким как антитело к ФРЭС или ловушка ФРЭС. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является бевацизумабом. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является сорафенибом. В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD включает последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 1 до 4.

В некоторых вариантах воплощения изобретения описаны способы лечения рака, которые включают введение субъекту молекулы слияния внеклеточного домена (ECD) рецептора фактора роста фибробластов 1 (FGFR1) и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, выбираемого из доцетакселя, паклитакселя, винкристина, карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, доксорубицина, 5-фторурацила (5-ФУ), лейковорина, пеметрекседа, сорафениба, этопозида, топотекана, антагониста фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ловушки ФРЭС, антитела к ФРЭС и бевацизумаба, при этом молекула слияния FGFR1 ECD включает FGFR1 ECD и партнер слияния. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является доцетакселем. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является пеметрекседом. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является цисплатином. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является паклитакселем. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является 5-ФУ. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является винкристином. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является топотеканом. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является антагонистом ФРЭС, таким как антитело к ФРЭС или ловушка ФРЭС. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является бевацизумабом. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является сорафенибом.

В некоторых вариантах воплощения изобретения описаны способы лечения рака, которые включают введение субъекту молекулы слияния FGFR1 ECD или FGFR1 ECD и по меньшей мере двух дополнительных терапевтических агентов, выбираемых из доцетакселя, паклитакселя, винкристина, карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, доксорубицина, 5-фторурацила (5-ФУ), лейковорина, пеметрекседа, это-

позида, сорафениба, этопозида, топотекана, антагониста фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ловушки ФРЭС, антитела к ФРЭС и бевацизумаба, при этом молекула слияния FGFR1 ECD включает FGFR1 ECD и партнер слияния. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один из двух дополнительных терапевтических агентов является паклитакселем. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один из двух дополнительных терапевтических агентов является цисплатином. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один из двух дополнительных терапевтических агентов является карбоплатином. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один из двух дополнительных терапевтических агентов является оксалиплатином. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один из двух дополнительных терапевтических агентов является 5-ФУ. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один из двух дополнительных терапевтических агентов является доксорубицином. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один из двух дополнительных терапевтических агентов является этопозидом. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один из двух дополнительных терапевтических агентов является топотеканом. В некоторых вариантах воплощения изобретения, по меньшей мере, один из двух дополнительных терапевтических агентов является антагонистом ФРЭС, таким как антитело к ФРЭС или ловушка ФРЭС. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один из двух дополнительных терапевтических агентов является бевацизумабом. В некоторых вариантах воплощения изобретения два дополнительных терапевтических агента являются паклитакселем и карбоплатином. В некоторых вариантах воплощения изобретения два дополнительных терапевтических агента являются доксорубицином и паклитакселем. В некоторых вариантах воплощения изобретения два дополнительных терапевтических агента являются цисплатином и этопозидом. В некоторых вариантах воплощения изобретения два дополнительных терапевтических агента являются оксалиплатином и 5-ФУ. В некоторых вариантах воплощения изобретения два дополнительных терапевтических агента являются 5-ФУ и лейковорином. В некоторых вариантах воплощения изобретения два дополнительных терапевтических агента являются 5-ФУ и бевацизумабом. В некоторых вариантах воплощения изобретения два дополнительных терапевтических агента являются паклитакселем и бевацизумабом. В некоторых вариантах воплощения изобретения два дополнительных терапевтических агента являются цисплатином и этопозидом.

В некоторых вариантах воплощения изобретения описаны способы лечения рака, которые включают введение субъекту молекулы слияния FGFR1 ECD или FGFR1 ECD и по меньшей мере трех дополнительных терапевтических агентов, выбираемых из доцетакселя, паклитакселя, винкристина, карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, доксорубицина, 5-фторурацила (5-ФУ), лейковорина, пеметрекседа, этопозида, сорафениба, антагониста ФРЭС, ловушки ФРЭС, антитела к ФРЭС и бевацизумаба, при этом молекула слияния FGFR1 ECD включает FGFR1 ECD и партнер слияния. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один из трех дополнительных терапевтических агентов является оксалиплатином. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один из трех дополнительных терапевтических агентов является 5-ФУ. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один из трех дополнительных терапевтических агентов является лейковорином. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один из трех дополнительных терапевтических агентов является карбоплатином. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один из трех дополнительных терапевтических агентов является паклитакселем. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один из трех дополнительных терапевтических агентов является бевацизумабом. В некоторых вариантах воплощения изобретения три дополнительных терапевтических агента являются оксалиплатином, 5-ФУ и лейковорином. В некоторых вариантах воплощения изобретения три дополнительных терапевтических агента являются бевацизумабом, 5-ФУ и лейковорином. В некоторых вариантах воплощения изобретения, по меньшей мере, два из трех дополнительных терапевтических агентов являются цисплатином и этопозидом. Изобретение также описывает, в некоторых вариантах воплощения изобретения комбинацию молекулы слияния FGFR1 ECD или FGFR1 ECD и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, выбираемого из доцетакселя, паклитакселя, винкристина, карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, доксорубицина, 5-фторурацила (5-ФУ), лейковорина, пеметрекседа, сорафениба, этопозида, топотекана, антагониста фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ловушки ФРЭС, антитела к ФРЭС и бевацизумаба, для лечения рака. Изобретение дополнительно описывает в некоторых вариантах воплощения изобретения комбинацию молекулы слияния FGFR1 ECD или FGFR1 ECD и по меньшей мере двух дополнительных терапевтических агентов, выбираемых из доцетакселя, паклитакселя, винкристина, карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, доксорубицина, 5-фторурацила (5-ФУ), лейковорина, пеметрекседа, этопозида, сорафениба, этопозида, топотекана, антагониста фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ловушки ФРЭС, антитела к ФРЭС и бевацизумаба, для лечения рака. Изобретение также описывает в некоторых вариантах воплощения изобретения комбинацию молекулы слияния FGFR1 ECD или FGFR1 ECD и по меньшей мере трех дополнительных терапевтических агентов, выбираемых из доцетакселя, паклитакселя, винкристина, карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, доксорубицина, 5-фторурацила (5-ФУ), лейковорина, пеметрекседа, этопозида, сорафениба, антагониста ФРЭС, ловушки ФРЭС, антитела к ФРЭС и бевацизумаба, для лечения рака.

В некоторых вариантах воплощения изобретения молекула слияния FGFR1 ECD и/или FGFR1 ECD упакована отдельно от по меньшей мере одного, по меньшей мере двух или по меньшей мере трех дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах воплощения изобретения молекула слияния FGFR1 ECD и/или FGFR1 ECD не смешана по меньшей мере с одним, по меньшей мере двумя или по меньшей мере тремя дополнительными терапевтическими агентами перед введением. В некоторых вариантах воплощения изобретения описан способ лечения рака, включающий введение субъекту FGFR1-ECD.339-Fc и доцетакселя, при этом FGFR1-ECD.339-Fc включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах воплощения изобретения описан способ лечения рака, включающий введение субъекту FGFR1-ECD.339-Fc и доцетакселя, при этом FGFR1-ECD.339-Fc включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD или молекула слияния FGFR1 ECD гликозилирована и/или сиалирована. В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD или участок полипептида молекулы слияния FGFR1 ECD экспрессируется в клетках яичника китайского хомячка (CHO). В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD включает аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере, одну дозу FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и по меньшей мере одну дозу, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента вводят сопутственно. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере одну дозу FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и по меньшей мере одну дозу, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента вводят в одно и то же время. В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD включает аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 1 до 4. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один партнер слияния выбирают из Fc, альбумина и полиэтиленгликоля. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один партнер слияния является Fc. В некоторых вариантах воплощения изобретения Fc включает аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 8 до 10. В некоторых вариантах воплощения изобретения молекула слияния FGFR1 ECD включает последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один партнер слияния является Fc и полиэтиленгликолем. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один партнер слияния является полиэтиленгликолем. В некоторых вариантах воплощения изобретения молекула слияния включает линкер между FGFR1 ECD и одним или несколькими партнерами слияния. В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD включает сигнальный пептид. В некоторых вариантах воплощения изобретения сигнальный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах воплощения изобретения молекула слияния FGFR1 ECD является количеством в диапазоне от около 0,5 мг/кг массы тела до около 20 мг/кг массы тела, таким как количество в диапазоне от около 8 до около 16 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах воплощения изобретения терапевтически эффективное количество молекулы слияния FGFR1 ECD является дозой около 8 мг/кг массы тела, в то время как в некоторых вариантах воплощения изобретения терапевтически эффективное количество молекулы слияния FGFR1 ECD является дозой около 16 мг/кг массы тела (или около 10 мг/кг массы тела или около 20 мг/кг массы тела, соответственно, при расчете с использованием коэффициента экстинкции 1,11 мл/мг·см). В некоторых вариантах воплощения изобретения терапевтически эффективное количество молекулы слияния FGFR1 ECD является дозой около 20 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах воплощения изобретения дозы могут вводиться два раза в неделю, еженедельно, через неделю, при частоте между каждой неделей и через неделю, каждые три недели, каждые четыре недели, или каждый месяц.

Изобретение также описывает в некоторых вариантах воплощения изобретения упаковку дозы. В некоторых вариантах воплощения изобретения упаковка дозы, включающая по меньшей мере один компонент, выбираемый из:

(i) внеклеточного домена (ECD) рецептора фактора роста фибробластов 1 (FGFR1),

(ii) молекулы слияния внеклеточного домена (ECD) рецептора фактора роста фибробластов 1 (FGFR1) и

(iii) по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, выбираемого из доцетакселя, паклитакселя, винкристина, карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, доксорубицина, 5-фторурацила (5-ФУ), лейковорина, пеметрекседа, этопозида, топотекана, антагониста ФРЭС, ловушки ФРЭС, антитела к ФРЭС, бевацизумаба и сорафениба; а также инструкции для введения FGFR1 ECD или молекулы слияния FGFR1 ECD и, по меньшей мере, одного дополнительного терапевтического агента пациенту. В некоторых вариантах воплощения изобретения инструкции, включенные в упаковку дозы, включают инструкции по введению терапевтически эффективного количества молекулы слияния FGFR1 ECD. В некоторых вариантах воплощения изобретения терапевтически эффективное количество молекулы слияния FGFR1 ECD является количеством в диапазоне от около 0,5 мг/кг массы тела до около 20 мг/кг массы тела, таким как количество в диапазоне от около 8 до около 16 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах воплощения изобретения терапевтически эффективное количество молекулы слияния

FGFR1 ECD является дозой около 8 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах воплощения изобретения терапевтически эффективное количество молекулы слияния FGFR1 ECD является дозой около 16 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах воплощения изобретения терапевтически эффективное количество молекулы слияния FGFR1 ECD является дозой около 20 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах воплощения изобретения дозы могут вводиться два раза в неделю, еженедельно, через неделю, при частоте между каждой неделей и через неделю, каждые три недели, каждые четыре недели, или каждый месяц.

В некоторых вариантах воплощения изобретения упаковка дозы включает FGFR1 ECD и не включает, по меньшей мере, один дополнительный терапевтический агент, например, доцетаксел, паклитаксел, винкристин, карбоплатин, цисплатин, оксалиплатин, доксорубицин, 5-фторурацил (5-ФУ), лейковорин, пеметрексед, этопозид, топотекан, антагонист ФРЭС, антитело к ФРЭС, ловушку ФРЭС, бевацизумаб или сорафениб. В некоторых вариантах воплощения изобретения упаковка дозы включает молекулу слияния FGFR1 ECD и не включает по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент, например доцетаксел, паклитаксел, винкристин, карбоплатин, цисплатин, оксалиплатин, доксорубицин, 5-фторурацил (5-ФУ), лейковорин, пеметрексед, этопозид, топотекан, антагонист ФРЭС, антитело к ФРЭС, ловушку ФРЭС, бевацизумаб или сорафениб. В некоторых вариантах воплощения изобретения упаковка дозы включает по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент, но не включает FGFR1 ECD или молекулу слияния FGFR1 ECD. В некоторых вариантах воплощения изобретения упаковка дозы включает:

(i) FGFR1 ECD или молекулу слияния FGFR1 ECD и

(ii) по меньшей мере, один дополнительный терапевтический агент. В некоторых вариантах воплощения изобретения, по меньшей мере, один дополнительный терапевтический агент является доцетакселем, паклитакселем, винкристином, карбоплатином, цисплатином, оксалиплатином, доксорубицином, 5-фторурацилом (5-ФУ), лейковорином, пеметрекседом, этопозидом, топотеканом, антагонистом ФРЭС, антителом к ФРЭС, ловушкой ФРЭС, бевацизумабом или сорафенибом. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является доцетакселем. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является пеметрекседом. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является цисплатином. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является паклитакселем. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является 5-ФУ. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является винкристином. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является бевацизумабом. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является сорафенибом. В некоторых вариантах воплощения изобретения упаковка дозы включает по меньшей мере два дополнительных терапевтических агента, но не включает FGFR1 ECD или молекулу слияния FGFR1 ECD. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере два дополнительных терапевтических агента выбирают из доцетакселя, паклитакселя, винкристина, карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, доксорубицина, 5-фторурацила (5-ФУ), лейковорина, пеметрекседа, этопозида, топотекана, антагониста ФРЭС, антитела к ФРЭС, ловушки ФРЭС, бевацизумаба и сорафениба.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, описанных выше, FGFR1 ECD или фрагмент FGFR1 ECD молекулы слияния FGFR1 ECD включает последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 1 до 4. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один партнер слияния выбирают из Fc, альбумина и полиэтиленгликоля. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один партнер слияния является Fc. В некоторых вариантах воплощения изобретения Fc включает аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 8 до 10. В некоторых вариантах воплощения изобретения молекула слияния FGFR1 ECD включает последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах воплощения изобретения молекула слияния FGFR1 ECD состоит из последовательности, выбираемой из SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один партнер слияния является Fc и полиэтиленгликолем. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один партнер слияния является полиэтиленгликолем.

В определенных вариантах воплощения изобретения рак является раком предстательной железы, раком молочной железы, колоректальным раком, раком легкого, раком эндометрия, раком головы и шеи, раком гортани, раком печени, раком почки, глиобластомой или раком поджелудочной железы. В определенных вариантах воплощения изобретения рак является раком легкого. В определенных вариантах воплощения изобретения рак является раком почки. В определенных вариантах воплощения изобретения рак является раком толстого кишечника. В определенных вариантах воплощения изобретения рак является раком молочной железы. В определенных вариантах воплощения изобретения рак является раком эндометрия. В определенных вариантах воплощения изобретения рак является раком предстательной железы.

Любой описанный здесь вариант воплощения изобретения или любая комбинация дополнительных терапевтических агентов применимы к любому и всем способам описанного здесь изобретения.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 отображает средний объем опухолей у мышей, которым вводили только FGFR1-ECD.339-Fc, только доцетаксел, FGFR1-ECD.339-Fc и доцетаксел последовательно, и FGFR1-ECD.339-Fc и доцетаксел одновременно, как это описано в примере 1.

Фиг. 2 отображает средний объем опухолей (A) и массу тела (B) у мышей, которым вводили только FGFR1-ECD.339-Fc, только пеметрексед (доза 62,5 мг/кг) или FGFR1-ECD.339-Fc и пеметрексед (доза 62,5 мг/кг), как это описано в примере 2.

Фиг. 3 отображает средний объем опухолей (A) и массу тела (B) у мышей, которым вводили только FGFR1-ECD.339-Fc, только пеметрексед (доза 125 мг/кг) или FGFR1-ECD.339-Fc и пеметрексед (доза 125 мг/кг), как это описано в примере 2.

Фиг. 4 отображает средний объем опухолей (A) и массу тела (B) у мышей, которым вводили только FGFR1-ECD.339-Fc, только пеметрексед (доза 250 мг/кг) или FGFR1-ECD.339-Fc и пеметрексед (доза 250 мг/кг), как это описано в примере 2.

Фиг. 5 отображает средний объем опухолей у мышей, которым вводили только FGFR1-ECD.339-Fc, только цисплатин, или комбинацию FGFR1-ECD.339-Fc и цисплатина, как это описано в примере 3A.

Фиг. 6 отображает средний объем опухолей у мышей, которым вводили только FGFR1-ECD.339-Fc, только паклитаксел, или комбинацию FGFR1-ECD.339-Fc и паклитакселя, как это описано в примере 3B.

Фиг. 7 отображает средний объем опухолей у мышей, которым вводили только FGFR1-ECD.339-FC, только 5-ФУ, или комбинацию FGFR1-ECD.339-Fc и 5-ФУ, как это описано в примере 3C.

Фиг. 8 отображает средний объем опухолей у мышей, которым вводили только FGFR1-ECD.339-Fc, только доцетаксел, или комбинацию FGFR1-ECD.339-Fc и доцетакселя, при двух разных дозах доцетакселя, 3 мг/кг (A) и 10 мг/кг (B), как это описано в примере 3D.

Фиг. 9 отображает средний объем опухолей у мышей, которым вводили только FGFR1-ECD.339-Fc, только винкристин, или комбинацию FGFR1-ECD.339-Fc и винкристина, при двух разных дозах винкристина, 1 мг/кг, начиная со дня 1 (A), и 1,5 мг/кг, начиная со дня 19 (B), как это описано в примере 3E. Также указана средняя масса тела мышей, которым вводили 1,5 мг/кг, начиная со дня 19 (C).

Фиг. 10 отображает средний объем опухолей у мышей, которым вводили только FGFR1-ECD.339-Fc, только карбоплатин, только паклитаксел, комбинацию карбоплатина и паклитакселя и комбинацию FGFR1-ECD.339-Fc, карбоплатина и паклитакселя, как это описано в примере 3F.

Фиг. 11 отображает средний объем опухолей у мышей, которым вводили только FGFR1-ECD.339-Fc, комбинацию 5-ФУ (10 мг/кг) и лейковорина (10 мг/кг), и комбинацию FGFR1-ECD.339-Fc, 5-ФУ (10 мг/кг) и лейковорина (10 мг/кг) (A); только FGFR1-ECD.339-Fc, комбинацию 5-ФУ (20 мг/кг) и лейковорина (20 мг/кг), и комбинацию FGFR1-ECD.339-Fc, 5-ФУ (20 мг/кг) и лейковорина (20 мг/кг) (B); только FGFR1-ECD.339-Fc, комбинацию 5-ФУ (30 мг/кг) и лейковорина (30 мг/кг), и комбинацию FGFR1-ECD.339-FC, 5-ФУ (30 мг/кг) и лейковорина (30 мг/кг) (C); только FGFR1-ECD.339-Fc, только бевацизумаб, и комбинацию FGFR1-ECD.339-Fc и бевацизумаба (D); и только FGFR1-ECD.339-Fc, комбинацию бевацизумаба, 5-ФУ и лейковорина, и комбинацию FGFR1-ECD.339-Fc, бевацизумаба, 5-ФУ и лейковорина (E), как это описано в примере 4A.

Фиг. 12 отображает средний объем опухолей у мышей, которым вводили только FGFR1-ECD.339-Fc, оксалиплатин плюс 5-ФУ и только лейковорин (LV), и комбинацию FGFR1-ECD.339-Fc и оксалиплатин плюс 5-ФУ/LV, при разных дозах оксалиплатина, 5 мг/кг (A), 10 мг/кг (B) и 15 мг/кг (C), как это описано в примере 4B.

Фиг. 13 отображает средний объем опухолей у мышей, которым вводили только FGFR1-ECD.339-Fc, комбинацию доксорубицина и паклитакселя и комбинацию FGFR1-ECD.339-Fc, доксорубицина и паклитакселя, как это описано в примере 5.

Фиг. 14 отображает средний объем опухолей у мышей, которым вводили только FGFR1-ECD.339-Fc, молекулу слияния с рецептором, содержащим домен вставки киназы (KDR)-ECD, и комбинацию FGFR1-ECD.339-Fc и молекулы слияния KDR-ECD, как это описано в примере 6.

Подробное описание

Названия глав в тексте данной заявки представлены только в организационных целях и не должны рассматриваться в качестве ограничивающих объект изобретения.

Определения

Если иное не указано, научные и технические термины, используемые в связи с данным изобретением, будут иметь значения, общепринятые специалистами в данной области. Кроме того, если иное не обусловлено контекстом, термины в единственном числе включают термины во множественном числе, и термины во множественном числе включают термины в единственном числе.

Определенные способы, используемые для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, культуры ткани и трансформации (например, электропорации, липофекции), ферментативных реакций и способов очистки, известны в науке. Многие из таких способов и процедур, кроме других источников, описаны, например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor La-

boratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Кроме того, определенные способы для химического синтеза, химических анализов, фармацевтической композиции, разработки состава и доставки, а также лечения пациентов также известны в науке.

В данной заявке использование терминов "или" обозначает "и/или", если не указано иное. В контексте пункта патентной формулы, зависимого от другого пункта, использование термина "или" относится более чем к одному предшествующему зависимому или независимому пункту только в качестве альтернативы. Кроме того, такие термины как "элемент" или "компонент" охватывают элементы и компоненты, включающие одну единицу, и элементы и компоненты, включающие более чем одну субъединицу, если отдельно не указано иное.

В контексте данного изобретения все значения являются приблизительными и могут варьировать с учетом погрешности измерений и округления значащих цифр. Использование "около" перед определенными измеренными количествами включает вариации, вызванные примесями в образце, погрешностью измерений, ошибкой специалиста и статистической вариацией, в также округлением значащих цифр. При использовании в соответствии с данной заявкой следующие термины, если не указано иное, должны пониматься как имеющие следующие значения: Термины "молекула нуклеиновой кислоты" и "полинуклеотид" могут использоваться взаимозаменяемым образом и обозначают полимер из нуклеотидов. Такие полимеры из нуклеотидов могут содержать встречающиеся и/или не встречающиеся в природе нуклеотиды и включают, но не ограничиваются, ДНК, РНК и ПНК. "Последовательность нуклеиновых кислот" обозначает линейную последовательность нуклеотидов, которая включает молекулу нуклеиновой кислоты или полинуклеотид. Термины "полипептид" и "белок" используют взаимозаменяемым образом для обозначения полимера из аминокислотных остатков, который не ограничивается минимальной длиной. Такие полимеры аминокислотных остатков могут содержать остатки встречающихся или не встречающихся в природе аминокислот, и включают, но не ограничиваются, пептиды, олигопептиды, димеры, тримеры и мультимеры аминокислотных остатков. Определение включает белки полной длины и их фрагменты. Термины также включают пост-экспрессионные модификации полипептида, например, гликозилирование, сиалирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п. Кроме того, в целях данного изобретения, "полипептид" обозначает белок, который включает модификации, такие как делеции, вставки и замены (обычно консервативные по своей природе), в нативной последовательности, при сохранении белком требуемой активности. Такие модификации могут быть преднамеренными, как при сайт-специфическом мутагенезе, или могут быть случайными, такими как при мутациях хозяина с получением белков или ошибок в результате ПЦР амплификации. Если полипептид "состоит из" отдельной аминокислотной последовательности, он все еще может включать пост-трансляционные модификации, такие как гликозилирование и сиалирование. Термин "внеклеточный домен FGFR1" ("FGFR1 ECD") включает FGFR1 ECD полной длины, фрагменты FGFR1 ECD и варианты FGFR1 ECD. В контексте данного изобретения термин "FGFR1 ECD" обозначает полипептид FGFR1, у которого отсутствуют внутриклеточные и трансмембранные домены, с или без сигнального пептида. В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD является FGFR1 ECD полной длины человека с аминокислотной последовательностью, выбираемой из SEQ ID NO: 1 и 2. Термин "FGFR1 ECD полной длины", как это используется в контексте данного изобретения, обозначает FGFR1 ECD, продолжающийся на последнюю аминокислоту внеклеточного домена, и может включать или не включать N-терминальный сигнальный пептид. Согласно определению в тексте данной заявки последняя аминокислота FGFR1 ECD полной длины находится в положении 353. Таким образом, FGFR1 ECD полной длины человека может состоять из аминокислотной последовательности, соответствующей SEQ ID NO: 2 (зрелая форма) или SEQ ID NO: 1 (с сигнальным пептидом). В контексте данного изобретения термин "фрагмент FGFR1 ECD" обозначает FGFR1 ECD, имеющий один или несколько остатков, удаленных из N и/или C конца ECD полной длины с сохранением способности связываться с FGF-2. Фрагмент FGFR1 ECD может включать или не включать N-терминальный сигнальный пептид. В некоторых вариантах воплощения изобретения фрагмент FGFR1 ECD является фрагментом FGFR1 ECD человека с аминокислотной последовательностью, соответствующей SEQ ID NO: 4 (зрелая форма) или SEQ ID NO: 3 (с сигнальным пептидом).

В контексте данного изобретения термин "варианты FGFR1 ECD" обозначает FGFR1 ECD, содержащие аминокислотные вставки, делеции и замены, с сохранением способности связываться с FGF-2. Такие варианты могут быть по меньшей мере на 90, 92, 95, 97, 98 или 99% идентичны исходному FGFR1 ECD. % идентичности двух полипептидов может быть измерен по шкале подобия, определяемой путем сравнения аминокислотных последовательностей двух полипептидов с использованием программы Bestfit со значениями по умолчанию для определения подобия. Программа Bestfit использует алгоритм локальной гомологичности Смита и Уотермана, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981), с помощью чего можно определить наилучший отдельный участок подобия между двумя последовательностями. В некоторых вариантах воплощения изобретения вариант FGFR1 ECD по меньшей мере на 95% идентичен последовательности SEQ ID NO: 4.

Полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, например, на 95% идентична эталонной аминокислотной последовательности полипептида FGFR1 ECD, является таковым, в котором аминокислотная последовательность полипептида идентична эталонной последова-

тельности, за исключением того, что такая полипептидная последовательность может включать до пяти изменений в аминокислотах на каждые 100 аминокислот эталонного полипептида. Другими словами, для получения полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична эталонной аминокислотной последовательности, до 5% аминокислотных остатков в эталонной последовательности могут быть удалены или замещены другой аминокислотой или целым рядом аминокислот, до 5% от общего количества аминокислотных остатков в эталонной последовательности могут быть вставлены в эталонную последовательность. Такие изменения эталонной последовательности могут возникать в положениях на N- или С-конце эталонной аминокислотной последовательности или в любом месте между этими терминальными позициями, перемежающимися индивидуальным образом между остатками в эталонной последовательности, или в одной или нескольких смежных группах в эталонной последовательности.

С практической точки зрения, любой отдельный полипептид, который идентичен по меньшей мере на 70, 80, 90 или 95%, например, аминокислотной последовательности, или полипептидная последовательность, кодируемая последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в Списке последовательностей, может быть определена стандартным способом с использованием известных компьютерных программ, таких как программа Bestfit. При использовании Bestfit или другой программы для сравнения последовательностей для определения, например, 95% идентичности определенной последовательности в сравнении с эталонной последовательностью, параметры устанавливаются, естественно, таким образом, что процент идентичности рассчитывается для полной длины эталонной аминокислотной последовательности, и допускаются пробелы в гомологии до 5% от общего числа аминокислотных остатков в эталонной последовательности. В контексте данного изобретения термины "hFGFR1-ECD.353" и "hFGFR1.353" могут использоваться взаимозаменяемым образом для обозначения FGFR1 ECD полной длины человека, соответствующего SEQ ID NO: 1 (с сигнальным пептидом) или SEQ ID NO: 2 (без сигнального пептида; зрелая форма). В контексте данного изобретения термины "hFGFR1-ECD.339" и "hFGFR1.339" могут использоваться взаимозаменяемым образом для обозначения FGFR1 ECD человека, соответствующего SEQ ID NO: 3 (с сигнальным пептидом) или SEQ ID NO: 4 (без сигнального пептида; зрелая форма).

Дополнительные hFGFR1 ECD описаны, например, в патенте США No. 7678890, который включен сюда во всей своей полноте посредством ссылки для любых целей.

Термин "молекула слияния FGFR1 ECD" обозначает молекулу, включающую FGFR1 ECD и один или несколько "партнеров слияния". В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD и партнер слияния ковалентно связаны ("слиты"). Если партнер слияния является также полипептидом ("полипептидный партнер слияния"), FGFR1 ECD и полипептидный партнер слияния могут быть частью непрерывной аминокислотной последовательности, и полипептидный партнер слияния может быть присоединен к N-концу или С-концу FGFR1 ECD. В таких случаях FGFR1 ECD и полипептидный партнер слияния могут транслироваться как единый полипептид из кодирующей последовательности, кодирующей FGFR1 ECD и полипептидный партнер слияния ("белок слияния FGFR1 ECD"). В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD и партнер слияния ковалентно присоединены другим способом, таким как, например, химическая связь, в отличие от пептидной связи. Может использоваться множество известных способов ковалентного присоединения полипептидов к другим молекулам (например, партнерам слияния). В других вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD и партнер слияния могут быть слиты посредством "линкера", который состоит по меньшей мере из одной аминокислоты или химической молекулы.

В некоторых вариантах воплощения изобретения полипептид FGFR1 ECD и партнер слияния связаны нековалентным способом. В некоторых таких вариантах воплощения изобретения они могут быть присоединены, например, с использованием связующих пар. Типичные связующие пары включают, но не ограничиваются, биотин и авидин или стрептавидин, антитело и его антиген и т.д.

Типичные партнеры слияния включают, но не ограничиваются, домен Fc иммуноглобулина, альбумин и полиэтиленгликоль. Аминокислотные последовательности некоторых типичных доменов Fc представлены в SEQ ID NO: 8 до 10. В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD, слитый с Fc, обозначают как "hFGFR1 ECD-Fc". В некоторых вариантах воплощения изобретения домен Fc выбирают из IgG1 Fc, IgG2 Fc, IgG3 Fc и IgG4 Fc.

В контексте данного изобретения термины "hFGFR1-ECD.339-Fc" и "hFGFR1.339-Fc" могут использоваться взаимозаменяемым образом для обозначения аминокислотной последовательности, выбираемой из SEQ ID NO: 6 (без сигнального пептида, зрелая форма) и SEQ ID NO: 5 (с сигнальным пептидом). Неограничивающие типичные виды рака, которые могут быть подвергнуты лечению с использованием hFGFR1-ECD.339-Fc, включают, но не ограничиваются, немелкоклеточный рак легкого, рак толстого кишечника, рак молочной железы, рак желудка, рак головы и шеи, рак предстательной железы, рак эндометрия, саркому, мелкоклеточныи рак легкого, рак яичников, саркому Капоши, болезнь Ходжкина, лейкемию, неходжкинскую лимфому, нейробластому (рак головного мозга), рабдомиосаркому, опухоль Вильмса, острый лимфобластный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак яичек, лимфомы, герминогенные опухоли, рак толстой и прямой кишки, рак желудочно-кишечного тракта,

рак щитовидной железы, множественную миелому, рак поджелудочной железы, мезотелиому, злокачественную плевральную мезотелиому, гематологический/лимфатический рак, злокачественную перитонеальную мезотелиому, рак пищевода, почечноклеточную карциному, мультиформную глиобластому и рак печени.

Термин "сигнальный пептид" обозначает последовательность аминокислотных остатков, расположенную на N-конце полипептида и облегчающую секрецию полипептида из клетки млекопитающего. Сигнальный пептид может быть расщеплен при экспорте полипептида из клетки млекопитающего с образованием зрелого белка. Сигнальные пептиды могут быть естественными или синтетическими, и они могут быть гетерологичными или гомологичными белку, у которому они присоединены. Типичные сигнальные пептиды включают, но не ограничиваются, сигнальные пептиды FGFR1, такие как, например, аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 7. Типичные сигнальные пептиды также включают сигнальные пептиды из гетерологичных белков. "Сигнальная последовательность" обозначает полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD не включает сигнальный пептид. В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD включает по меньшей мере один сигнальный пептид, который может быть нативным сигнальным пептидом FGFR1 или гетерологичным сигнальным пептидом. Термин "вектор" используют для описания полинуклеотида, который может быть рекомбинирован для содержания клонированного полинуклеотида или полинуклеотидов, которые могут быть введены в клетку-хозяина. Вектор может включать один или несколько следующих элементов: точка начала репликации, одна или несколько регуляторных последовательностей (таких как, например, промоторы и/или энхансеры), которые регулируют экспрессию интересующего полипептида, и/или один или несколько селектируемых маркерных генов (такие как, например, гены устойчивости к антибиотикам и гены, которые могут использоваться в колориметрических анализах, например, β-галактозидазы). Термин "вектор экспрессии" обозначает вектор, используемый для экспрессии интересующего полипептида в клетке-хозяине.

"Клетка-хозяин" обозначает клетку, которая может быть или была реципиентом вектора или выделенного полинуклеотида. Клетки-хозяева могут быть прокариотическими клетками или эукариотическими клетками. Типичные эукариотические клетки включают клетки млекопитающих, такие как клетки приматов или других животных; клетки грибов; клетки растений; и клетки насекомых. Типичные клетки млекопитающих включают, но не ограничиваются, клетки 293 и CHO, и их производные, такие как клетки 293-6E и DG44, соответственно.

Термин "выделенный" в контексте данного изобретения обозначает молекулу, которая была выделена, по меньшей мере, из некоторых компонентов, с которыми она обычно встречается в природе. Например, полипептид является "выделенным", когда он разделен, по меньшей мере, от некоторых компонентов клетки, в которых его получают. Если полипептид секретируется клеткой после экспрессии, физическое разделение супернатанта, содержащего полипептид, из вырабатывающей его клетки, считается "выделением" полипептида. Подобным образом, полинуклеотид называют "выделенным", если он не является частью большего полинуклеотида (такого как, например, геномной ДНК или митохондриальной ДНК, в случае полинуклеотида ДНК), в котором он обычно находится в природе, или отделяют, по меньшей мере, от некоторых компонентов вырабатывающей его клетки, например, в случае полинуклеотида РНК. Таким образом, полинуклеотид ДНК, содержащийся в векторе внутри клетки-хозяина, может обозначаться как "выделенный" до тех пор, пока полинуклеотид не находится в векторе в природе.

Термин "противоопухолевая композиция" обозначает композицию, используемую в лечении рака, включающую, по меньшей мере, один активный терапевтический агент, например "противораковый агент". Примеры терапевтических агентов (противораковых агентов) включают, но не ограничиваются, например, агенты химиотерапии, агенты-ингибиторы роста, цитотоксические агенты, агенты, используемые в лучевой терапии, антиангиогенные агенты, апоптозные агенты, антитубулиновые агенты и другие агенты для лечения рака, такие как антитела к ФРЭС (например, бевацизумаб, Авастин®), антитела к HER-2 (например, трастузумаб, Герцептин®), антитела к CD20 (например, ритуксимаб, Ритуксан®), антагонист рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, ингибитор тирозинкиназы), ингибиторы HER1/EGFR (например, эрлотиниб (Тарцева®), ингибиторы фактора роста, полученные из тромбоцитов (например, Гливек® (иматиниба мезилат)), ингибиторы COX-2 (например, целекоксиб), интерфероны, цитокины, антагонисты (например, нейтрализующие антитела), которые связываются с одной или несколькими следующими мишенями ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-β, BlyS, APRIL, BCMA или рецептор(-ы) ФРЭС, TRAIL/Apo2, и другие биоактивные и органические химические агенты и т.д. В изобретение также включены их комбинации.

"Препарат химиотерапии" включает химическое соединение, используемое в лечении рака. Примеры агентов химиотерапии включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (Цитоксан®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбохинон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметиломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); δ-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, Маринол®); β-лапахон;

лапахол; колхицины; бетулиновая кислота; камптотецин (включая синтетический аналог топотекана (Гикамтин®), CPT-11 (иринотекан, Камптосар®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая адозелесин, карзелесин и синтетические аналоги бизелесина); подофиллотоксин; подофиллиновая кислота; тенипозид; эриптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги, KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, мехлоретамина оксид гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитромочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как антибиотики энедиина (например, калихеамицин, в частности, калихеамицин γII и калихеамицин ωII (см., например, Nicolaou et al., Angew. Chemlntl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); CDP323, пероральный ингибитор интегрина α-4; динемицин, включая динемицин A; эсперамицин; а также неокарциностатина хромофор и родственные хромофоры антибиотика хромопротеина энедиина), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофиллин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая Адриамицин®, морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин, доксорубицина HCl липосомальная инъекция (Доксил®), липосомальный доксорубицин TLC D-99 (Миоцет®), пегилированный липосомальлный доксорубицин (Каэликс®) и деоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин C, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфиромицин, пуромицин, хеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин (Гемзар®), пеметрексед (Алимта®); тегафур (Уфторал®), капецитабин (Кселода®), эпотилон и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как дентоптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолона пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; антитела к надпочечникам, такие как аминоглютетимид, митотан, трилостан; заменитель фолиевой кислоты, такой как фолиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминолевуленовая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколхин; диазихон; элфорнитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглюцид; галлия нитрат; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтансиноиды, такие как майтансин и анзамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK® полисахаридный комплекс (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; шизофиран; спирогерманиум; тенуазоновая кислота; триазихон; 2,2',2'-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно T-2 токсин, верракурин A, роридин A и ангвидин); уретан; виндезин (Элдизин®, Филдезин®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); тиотепа; таксоид, например, паклитаксел (Таксол®), композиция паклитакселя из наночастиц с введенным альбумином (Абраксан™), и доцетаксел (Таксотер®); хлорамбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; агенты платины, такие как цисплатин, оксалиплатин (например, Элоксатин®) и карбоплатин; винкас, предотвращающий полимеризацию тубулина при образовании микротрубочек, включая винбластин (Велбан®), винкристин (Онковин®), виндесин (Элдисин®, Филдесин®) и винорелбин (Навелбин®); этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; лейковорин; новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота, включая бексаротен (Таргретин®); бифосфонаты, такие как клодронат (например, Бонефос® или Остак®), этидронат (Дидрокал®), NE-58095, золендроновая кислота/золендронат (Зомета®), алендронат (Фосамакс®), памидронат (Аредия®), тилудронат (Скелид®) или ризедронат (Актонел®); троксацитабин (аналог 1,3-диоксолан нуклеозида цитозина); антисмысловые олигонулкеотиды, в частности, ингибирующие экспрессию генов в пути передачи сигнала при пролиферации аберрантных клеток, такие как, например, PKC-α, Raf, H-Ras и рецептор эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина Тератоп® и вакцины генной терапии, например вакцина Алловектин®, вакцина Леувектин® и вакцина Ваксид®; ингибитор топоизомеразы 1 (например, Луртотекан®); rmRH (например, Абареликс®); BAY439006 (сорафениб, Нексавар®; Bayer); SU-11248 (сунитиниб, Сутент®, Pfizer); перифосин, ингибитор COX-2 (например, целекоксиб или эторикоксиб), ингибитор протеосомы (например, PS341); бортезомиб (Велкаде®); CCI-779; типифарниб (R11577); орафениб, ABT510; ингибитор Bc1-2, такой как облимирсена натрий (Генасенс®); пиксантрон; ингибиторы EGFR (см. определение ниже); ингибиторы тирозинкиназы (см. определение ниже); ингибиторы серонин-треонин киназы, такие как рапамицин (сиролимус, Рапамун®); ингибиторы фарнезилтрансферазы, такие как лонафарниб (SCH 6636, Сарасар™); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанного выше агента; а также комбинации двух или более агентов, таких как CHOP, сокращение, используемое для комбиниро-

ванной терапии циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном; и Фолфокс, сокращение, используемое для режима лечения оксалиплатином (Элоксатин™) в сочетании с 5-ФУ и лейковорином. Агенты химиотерапии согласно определению в тексте данной заявки включают "антигормональные агенты" или "эндокринные препараты", действующие для регуляции, снижения, блокады или ингибирования эффектов гормонов, которые могут способствовать росту рака. Они могут быть представлены гормонами, включая, но не ограничиваясь, следующие: антиэстрогены со смешанными агонистическим/антагонистическим профилем, включая тамоксифен (Нолвадекс®), 4-гидрокситамоксифен, торемифен (Фарестон®), идоксифен, дролоксифен, ралоксифен (Эвиста®), триоксифен, кеоксифен, и селективные модуляторы рецепторов эстрогенов (SERM), такие как SERM3; чистые антиэстрогены без агонистических свойств, такие как фулвестрант (Фаслодекс®) и EM800 (такие агенты могут блокировать димеризацию рецептора эстрогена (ER), ингибировать связывание ДНК, повышать преобразование ER и/или супрессировать уровни ER); ингибиторы ароматазы, включая стероидальные ингибиторы ароматазы, такие как форместан и экземестан (Аромасин®), и нестероидные ингибиторы ароматазы, такие как анастразол (Аримидекс®), летрозол (Фемара®) и аминоглютетимид, и другие ингибиторы ароматазы, включая ворозол (Ривизор®), мегестрола ацетат (Мегазе®), фадрозол и 4(5)-имидазолы; агонисты гормонов, высвобождающих лютеинизирующий гормон, включая леупролид (Лупрон® и Элигард®), госерелин, бусерелин и триптерелин; половые стероиды, включая прогестины, такие как мегестрола ацетат и медроксипрогестерона ацетат, эстрогены, такие как диэтилстилбестрол и премарин, и андрогены/ретиноиды, такие как флуоксиместерон, все трансретиноевые кислоты и фенретинид; онапристон; анти-прогестероны; регуляторы, понижающие экспрессию рецепторов эстрогена (ERD); антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид и бикалутамид; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанного выше агента; а также комбинации двух или более указанных выше агентов.

"Ангиогенный фактор или агент" обозначает фактор роста, который стимулирует развитие кровеносных сосудов, например, способствует ангиогенезу, росту клеток эндотелия, стабильности кровеносных сосудов и/или васкулогенезу и т.д. Например, ангиогенные факторы включают, но не ограничиваются, например, ФРЭС и члены семейства ФРЭС (ФРЭС-B, ФРЭС-C и ФРЭС-D), PlGF, семейство PDGF, семейство фактора роста фибробластов (FGF), лиганды TIE (ангиопоэтины), эфрины, δ-подобный лиганд 4 (DLL4), del-1, факторы роста фибробластов: кислотный (aFGF) и основный (bFGF), фоллистатин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), фактор роста гепатоцитов (HGF)/рассеивающий фактор (SF), интерлейкин-8 (ИЛ-8), лептин, мидкин, нейропилины, плацентарный фактор роста, фактор роста клеток эндотелия, полученный из тромбоцитов (PD-ECGF), тромбоцитарный фактор роста, особенно PDGF-BB или PDGFR-β, плейотрофин (PTN), програнулин, пролиферин, трансформирующий фактор роста-α (ТФР-α), трансформирующий фактор роста-бета (ТФР-β), фактор некроза опухоли-α (ФНО-α) и т.д. Термин также включает факторы, ускоряющие заживление раны, такие как фактор гормона роста, инсулиноподобный фактор роста-I (IGF-I), VIGF, эпидермальный фактор роста (ЭФР), CTGF и члены его семейства, а также TGF-α и TGF-β. См., например, Klagsbrun and D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39; Streit and Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179; Ferrara & Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364; Tonini et al. (2003) Oncogene 22:6549-6556 (например, табл. 1, перечисляющую известные ангиогенные факторы); и Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206.

"Антиангиогенный агент" или "ингибитор ангиогенеза" обозначает вещество с небольшим молекулярным весом, полинуклеотид (включая, например, ингибирующие РНК (и РНК или ми РНК)), полипептид, выделенный белок, рекомбинантный белок, антитело или конъюгаты или белки слияния, которые ингибируют ангиогенез, васкулогенез или нежелательную проницаемость сосудов, прямым или косвенным образом. Следует понимать, что антиангиогенный агент включает агенты, связывающиеся и блокирующие ангиогенную активность ангиогеного фактора или его рецептора. Например, антиангиогенный агент является антителом или другим антагонистом к ангиогенному агенту, как это указано выше, например, белки слияния, котоыре связываются с ФРЭС-A, такие как Залтрап™ (Афлиберцепт), антитела к ФРЭС-A, такие как Авастин® (бевацзумаб) или к рецептору ФРЭС-A (например, рецептору KDR или рецептору Flt-1), ингибиторы антитела к PDGFR, такие как Гливек® (Иматиниба мезилат), небольшие молекулы, блокирующие рецептор сигнализации ФРЭС (например, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU11248 (сунитиниба малат), AMG706, или описанные, например, в заявке на международный патент WO 2004/113304). Антиангиогенные агенты также включают нативные ингибиторы ангиогенеза, например, ангиостатин, эндостатин и т.д. См., например, Klagsbrun and D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39; Streit and Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179 (например, табл. 3, перечисляющую антиангиогенную терапию при злокачественной меланоме); Ferrara & Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364; Tonini et al. (2003) Oncogene 22:6549-6556 (например, табл. 2, перечисляющую известные антиангиогенные факторы); и Sato (2003) Int. J. Clin. dOncol. 8:200-206 (например, табл. 1, перечисляющую антиангиогенные агенты, используемые в клинических исследованиях). "Доцетаксел" обозначает 1,7β,10β-тригидрокси-9-оксо-5β,20-эпокситакс-11-ен-2α,4,13α-триил 4-ацетат 2-бензоат 13-{(2R,3S)-

3-[(трет-бетоксикарбонил)амино]-2-гидрокси-3-фенилпропаноат}, который в некоторых вариантах воплощения изобретения может продаваться под торговой маркой Таксотер®. В некоторых вариантах воплощения изобретения доцетаксел эффективен в лечении по меньшей мере одного вида рака, выбираемого из рака молочной железы и немелкоклеточного рака легкого. Неограничивающие примеры рака, который может быть подвергнут лечению доцетакселем, включают рак молочной железы, колоректальный рак, рак легкого, рак яичника, рак предстательной железы, рак печени, рак почки, рак желудка, рак головы и шеи и меланому.

"Паклитаксел" обозначает (2α,4α,5β,7β,10β,13α)-4,10-бис(ацетилокси)-13-{[(2R,3S)-3-(бензоиламино)-2-гидрокси-3-фенилпропаноил]окси}-1,7-дигидрокси-9-оксо-5,20-эпокситакс-11-ен-2-ил бензоат, который в некоторых вариантах воплощения изобретения может продаваться под торговой маркой Таксол®. Неограничивающие примеры рака, который может быть подвергнут лечению паклитакселем, включают рак молочной железы, рак легкого и саркому Капоши.

"Карбоплатин" обозначает цис-диамин(циклобутан-1,1-дикарбоксилат-O,O')платину(II), который в некоторых вариантах воплощения изобретения может продаваться под торговой маркой Параплатин®. Неограничивающие примеры рака, который может быть подвергнут лечению паклитакселем включают рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, рак яичек, рак ротовой полости и рак мочевого пузыря. "Оксалиплатин» обозначает [(1R,2R)-циклогексан-1,2-диамин](этандиоато-O,O')платину(II), который в некоторых вариантах воплощения изобретения может продаваться под торговой маркой Элоксатин®. Неограничивающие примеры рака, который может быть подвергнут лечению оксалиплатином, включают колоректальный рак, рак желудка и рак яичников.

"Цисплатин" обозначает (SP-4-2)-диаминдихлориридоплатину. Неограничивающие примеры рака, который может быть подвергнут лечению цисплатином, включают саркомы, мелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак яичек, лимфомы и герминомы.

"Винкристин" обозначает метил (1R,9R,10S,11R,12R,19R)-11-(ацетилокси)-12-этил-4-[(13S,15S,17S)-17-этил-17-гидрокси-13-(метоксикарбонил)-1,11-диазатетрацикло[13.3.1.$0^{4,12}$.$0^{5,10}$]нонадека-4(12),5,7,9-тетраен-13-ил]-8-формил-10-гидрокси-5-метокси-8,16-диазапентацикло[10.6.1.$0^{1,9}$.$0^{2,7}$.$0^{16,19}$]нонадека-2,4,6,13-тетраен-10-карбоксилат, который в некоторых вариантах воплощения изобретения может продаваться под торговой маркой Винкасар®. Неограничивающие примеры рака, который может быть подвергнут лечению винкристином, включают болезнь Ходжкина, лейкоз, неходжкинскую лимфому, нейробластому, рабдомиосаркому, острый лимфобластный лейкоз и опухоль Вильмса.

"Пеметрексед" обозначает (S)-2-[4-[2-(4-амино-2-оксо-3,5,7-триазабицикло[4.3.0] нона-3,8,10-триен-9-ил)этил]бензоил]аминопентандиоевую кислоту, который в некоторых вариантах воплощения изобретения может продаваться под торговой маркой Алимта®. Неограничивающие примеры рака, который может быть подвергнут лечению пеметрекседом, включают немелкоклеточный рак легкого, мезотелиому и рак пищевода.

"Доксорубицин" обозначает (8S,10S)-10-(4-амино-5-гидрокси-6-метил-тетрагидро-2H-пиран-2-илокси)-6,8,11-тригидрокси-8-(2-гидроксиацетил)-1-метокси-7,8,9,10-тетрагидротетрацен-5,12-дион, который в некоторых вариантах воплощения изобретения может продаваться под торговой маркой Адриамицин®. Неограничивающие примеры рака, который может быть подвергнут лечению доксорубицином, включают рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак легкого, рак яичников, рак ротовой полости, рак щитовидной железы, саркому мягких тканей, множественную миелому, болезнь Ходжкина, лейкоз, неходжкинскую лимфому, нейробластому, саркому и опухоль Вильмса.

"5-ФУ" и "5-фторурацил" обозначает 5-фтор-1H-пиримидин-2,4-дион, который в некоторых вариантах воплощения изобретения может продаваться под торговой маркой Адруцил®. Неограничивающие примеры рака, который может быть подвергнут лечению 5-ФУ, включают колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, гепатому и рак яичников.

"Лейковорин" также известен как фолиновая кислота и обозначает (S)-2-[4-[(2-амино-5-формил-4-оксо-5,6,7,8-тетрагидро-1H-птеридин-6-ил)метиламино]бензоил]аминопентандиоевую кислоту. В некоторых вариантах воплощения изобретения лейковорин вводят с 5-фторурацилом.

Термин "ФРЭС" или "ФРЭС-А" в контексте данного изобретения обозначает фактор роста эндотелия сосудов человека из 165 аминокислот и относится к факторам роста эндотелия сосудов человека из 121, 189 и 206 аминокислот, как это описано Leung et al. (1989) Science 246:1306, and Houck et al. (1991) Mol. Endocrin, 5:1806, вместе с встречающимися в природе аллельными и процессированными формами. Термин "ФРЭС" также обозначает ФРЭС из видов животных, таких как мышь, крыса или примат. Иногда ФРЭС из специфических видов обозначают терминами, такими как hVEGF для ФРЭС человека, mVEGF для ФРЭС мыши и т.д. Термин "ФРЭС" также используют для обозначения разветвленных форм полипептида, включающих аминокислоты от 8 до 109 или от 1 до 109 фактора роста эндотелия сосудов человека из 165 аминокислот. В данной заявке могут приводиться обозначения таких форм ФРЭС, например "ФРЭС (8-109)", "ФРЭС (1-109)", "ФРЭС-A_{109}" или "ФРЭС165". Положения аминокислот для "разветв-

ленного" нативного ФРЭС пронумерованы в соответствии в нативной последовательностью ФРЭС. Например, положение аминокислоты 17 (метионин) в разветвленном нативном ФРЭС соответствует положению 17 (метионин) в нативном ФРЭС. Разветвленный нативный ФРЭС обладает аффинностью связывания с KDR и рецепторами Flt-1 в сравнении с нативным ФРЭС.

"Антагонист ФРЭС" обозначает молекулу, способную нейтрализовать, блокировать, ингибировать, отменять, снижать или изменять активность ФРЭС, включая, но не ограничиваясь, его связывание с одним или несколькими рецепторами ФРЭС. Антагонисты ФРЭС включают, без ограничения, антитела к ФРЭС и их антигенсвязующие фрагменты, молекулы рецепторов и производные, которые связываются специфическим образом с ФРЭС, тем самым изолируя его связывания с одним или несколькими рецепторами, антитела к рецепторам ФРЭС, антагонисты рецепторов ФРЭС, такие как низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ ФРЭС, и иммуноадгезины, которые связываются с ФРЭС, такие как ловушка ФРЭС (например, афлиберцепт). Термин "антагонист ФРЭС" в контексте данного изобретения специфически включает молекулы, включая антитела, фрагменты антител, другие связующие полипептиды, пептиды и непептидные небольшие молекулы, которые связываются с ФРЭС и способны нейтрализовать, блокировать, ингибировать, отменять, снижать или препятствовать действию ФРЭС. Таким образом, термин "действие ФРЭС" специфически включает ФРЭС-опосредованное биологическое действие ФРЭС. В контексте данного изобретения термин "ловушка ФРЭС" обозначает белок, такой как молекулу слияния, который связывается с ФРЭС и способен нейтрализовать, блокировать, ингибировать, отменять, снижать или препятствовать действию ФРЭС. Примером ловушки ФРЭС является афлиберцепт.

Термин "антитело к ФРЭС" или "антитело, связывающееся с ФРЭС" относится к антителу, способному связываться с ФРЭС с достаточной аффинностью и специфичностью, таким образом, указанное антитело может использоваться в качестве диагностического и/или терапевтического агента при связывании с ФРЭС. Антитела к ФРЭС супрессируют рост различных опухолевых линий клеток человека у бестимусных мышей (Kim et al., Nature 362:841-844 (1993); Warren et al., J. Clin. Invest. 95:1789-1797 (1995); Borgstrom et al., Cancer Res. 56:4032-4039 (1996); Melnyk et al., Cancer Res. 56:921-924 (1996)) и также ингибируют интраокулярный ангиогенез в моделях ишемических нарушений сетчатки. Adamis et al., Arch. Ophthalmol. 114:66-71 (1996). Например, антитело к ФРЭС может использоваться в качестве терапевтического агента при связывании и взаимодействии с заболеваниями или состояниями, в которых участвует активность ФРЭС. См., например, патенты США No. 6582959, 6703020; WO 98/45332; WO 96/30046; WO 94/10202, WO 2005/044853; EP 0666868B1; заявки на патенты США 20030206899, 20030190317, 20030203409, 20050112126, 20050186208 и 20050112126; Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004); и WO 2005012359. Выбранные антитела обычно будут иметь, по существу, большую аффинность связывания с ФРЭС. Например, антитело может связываться с ФРЭС со значением K_d между 100 нМ -1 пМ. Аффинность антитела может быть определены анализом на основе поверхностного плазмонного резонанса (такого как анализ BIAcore, как это описано в публикации заявки PCT No. WO2005/012359); твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА); и анализами конкурентного связывания (например, RIA). Антитело может быть подвергнуто другим анализам биологической активности, например, для оценки его эффективности как терапевтического средства. Такие анализы известны в науке и зависят от антигена-мишени и предполагаемого использования антитела. Примеры включают анализ ингибирования HUVEC; анализы ингибирования роста опухолевых клеток (как это описано, например, в WO 89/06692); анализы антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) и комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ) (патент США 5500362); и анализы агонистической активности или гематопоэза (см. WO 95/27062). Антитело к ФРЭС не будет обычно связываться с другими гомологами ФРЭС, такими как VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D или VEGF-E, или другими факторами роста, такими как PlGF, PDGF или bFGF.

В одном варианте воплощения изобретения антитела к ФРЭС включают моноклональное антитело, которое связывается с одной и той же самой антигенной детерминантой, что и моноклональное антитело к ФРЭС A4.6.1, произведенное гибридомой ATCC HB 10709; рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело к ФРЭС (см. Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599), включая, но не ограничиваясь, антитело, известное как "бевацизумаб", также известное как "rhuMAb VEGF" или "Авастин®". Авастин® в настоящее время представлен на рынке. Неограничивающие примеры рака, который может быть подвергнут лечению бевацизумабом, включают немелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, рак молочной железы, рак почки, рак яичника, мультиформную глиобластому, остеосаркому у детей, рак желудка и рак поджелудочной железы. Бевацизумаб включает мутированные каркасные участки IgG_1 человека и антигенсвязующие определяющие комплементарность участки из мышиного антитела A.4.6.1, которые блокируют связывание ФРЭС человека со своими рецепторами. Бевацизумаб и другие гуманизированные антитела к ФРЭС дополнительно описаны в патентах США No. 6884879 и 7169901. Дополнительные антитела к ФПЭС описаны в заявках на патенты PCT No. WO2005/012359 и WO 2009/073160; патентах США No. 7060269, 6582959, 6703020; 6054297; WO 98/45332; WO 96/30046; WO 94/10202; EP 0666868B1; публикациях заявок на патенты США No. 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409 и 20050112126; и Popkov et al., Journal of Immunological Methods

288:149-164 (2004).

Термины "субъект" и "пациент" используют здесь взаимозаменяемым образом для обозначения млекопитающего. В некоторых вариантах воплощения изобретения субъект или пациент является человеком. В других вариантах воплощения изобретения также описаны способы лечения других млекопитающих, включая, но не ограничиваясь, грызунов, обезьян, кошек, собак, лошадей, коров, свиней, овец, коз, млекопитающих лабораторных животных, млекопитающих сельскохозяйственных животных, млекопитающих животных спорта и млекопитающих домашних животных. "Рак" и "опухоль" в контексте данного изобретения являются взаимозаменяемыми терминами, обозначающими любой аномальный рост клеток или ткани или пролиферацию у животного. В контексте данного изобретения термины "рак" и "опухоль" охватывают солидный и гематологический/лимфатический рак и также охватывают злокачественный, предзлокачественный и доброкачественный рост, такой как дисплазию. Примеры рака включают, но не ограничиваются, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Дополнительные специфические неограничивающие примеры таких видов рака включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, рак гипофиза, рак пищевода, астроцитому, саркому мягких тканей, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшной полости, гепатоцеллюлярный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак желчного пузыря, гепатому, рак молочной железы, колоректальный рак, рак толстого кишечника, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почек, ренальный рак, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, гепатокарциному, рак головного мозга, рак эндометрия, рак яичек, холангиокарциному, рак мочевого пузыря, рак желудка, меланому и различные типа рака головы и шеи. "Лечение" в контексте данного изобретения включает любое введение или применение лекарственного средства к состоянию у млекопитающего, включая человека, и включает ингибирование состояния или прогрессирования состояния, ингибирование или замедление состояния или его прогрессирования, блокирование его прогрессии, частично или полностью исчезновение состояния, или излечение состояния, например, вызовом регрессии, или восстановление или возобновлением потерянной, утраченной или дефективной функции; или стимуляцию неэффективного процесса. В некоторых вариантах воплощения изобретения «лечение» обозначает клиническое вмешательство в попытке изменить естественный ход у подвергнутого лечению индивидуума или клетки, и может проводиться для профилактики или в ходе клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают предотвращение возникновения или повторного возникновения заболевания, снижение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазов, снижение скорости прогрессирования заболевания, смягчение или временное облегчение состояния заболевания, а также ремиссию или улучшенный прогноз.

"Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" молекулы или комбинации молекул обозначает количество, которого достаточно для лечения состояния и/или ингибирования роста опухолевых клеток у, по меньшей мере, подгруппы субъектов при приеме в виде монотерапии или в комбинации с другими видами лечения. В определенных вариантах воплощения изобретения терапевтически эффективное количество обозначает количество, эффективное в определенных дозах в течение определенных периодов времени и необходимое для достижения необходимого терапевтического или профилактического результата. Терапевтически эффективное количество белка слияния FGFR1 по изобретению может варьировать в зависимости от факторов, таких как состояние заболевания, возраст, пол и вес индивидуума, а также способность белка слияния FGFR1 вызывать необходимый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также является количеством, в котором любые токсичные или губительные эффекты белков слияния FGFR1 перевешиваются терапевтическими полезными эффектами. В случае рака эффективное количество препарата может снизить количество раковых клеток; снизить размер опухоли; ингибировать (т.е. замедлять в некоторой степени и обычно останавливать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (т.е. замедлять в некоторой степени и обычно останавливать) метастазы опухоли; ингибировать, в некоторой степени, рост опухоли; обеспечивать лечение опухоли и/или в некоторой степени снижать один или несколько симптомов, ассоциированных с нарушением. При предотвращении роста и/или гибели существующих раковых клеток с использованием препарата, такие явления могут быть цитостатическими и/или цитотоксическими. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в определенных дозах в течение определенных периодов времени и необходимому для достижения необходимого профилактического результата. Обычно, но не обязательно, профилактически эффективное количество будет меньше терапевтически эффективного количества, поскольку профилактическая доза используется у субъектов до или на ранних стадиях заболевания.

Термины "ингибирование" или "ингибировать" обозначает снижение или прекращение любых фенотипических характеристик или заболеваний или прекращение частоты возникновения, степени или вероятности таких характеристик. Неограничивающий типичный пример ингибирования включает ингибирование роста опухоли.

В тексте данной заявки "сопутственное" введение дозы обозначает введение двух терапевтических

молекул в течение восьмичасового периода. В некоторых вариантах воплощения изобретения две терапевтические молекулы вводят в одно и то же самое время. Считается, что две терапевтические молекулы вводят в одно и тоже самое время (т.е. одновременно), если по меньшей мере часть дозы каждой терапевтической молекулы вводят в течение 1 ч. Две терапевтические молекулы вводят сопутственно, если по меньшей мере одну дозу вводят сопутственно, даже если одну или несколько других доз не вводят сопутственно. В некоторых вариантах воплощения изобретения сопутственное введение включает режим введения доз, когда введение одной или нескольких терапевтических молекул продолжается после отмены введения одной или нескольких терапевтических молекул.

Введение "в комбинации с" одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами включает одновременное (включая сопутствующее) и последовательное (т.е. поэтапное) введение в любом порядке. "Фармацевтически приемлемый носитель" обозначает нетоксический твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал, который введен в композицию дополнительно, или носитель, который обычно используют в науке с терапевтическим агентом, которые вместе составляют "фармацевтическую композицию" для введения субъекту. Фармацевтически приемлемый носитель является нетоксичным для реципиентом в используемых дозах и концентрациях и совместим с другими ингредиентами в композиции. Фармацевтически приемлемый носитель является подходящим для используемой композиции. Например, если терапевтический агент вводят перорально, носитель может быть гелевой капсулой. Если терапевтический агент следует вводить подкожно, носитель в идеале не раздражает кожу и не вызывает реакцию в месте введения.

Терапевтические композиции и способы

Способы лечения рака с использованием FGFR1 ECD и/или молекул слияния FGFR1 ECD в комбинации с другими терапевтическими агентами Изобретение описывает комбинацию внеклеточного домена (ECD) рецептора фактора роста фибробластов 1 (FGFR1) или молекулы слияния FGFR1 ECD с одной или несколькими дополнительными противораковыми терапиями и использование таких комбинаций в лечении рака. Примеры дополнительных противораковых терапий включают, без ограничения, операцию, лучевую терапию (радиотерапию), биотерапию, иммунотерапию и химиотерапию или комбинацию таких терапий. Кроме того, цитотоксические агенты, антиангиогенные и антипролиферативные агенты могут использоваться в комбинации с FGFR1 ECD или молекулой слияния FGFR1 ECD. В определенных аспектах любых способов и применений изобретение описывает лечение рака путем введения терапевтически эффективных количеств FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и одного или нескольких химиотерапевтических агентов субъекту с диагностированным или имеющимся ранее непролеченным раком. В комбинированных способах лечения и применения по изобретению может использоваться целый ряд химиотерапевтических агентов. Типичный и неограничивающий список предусмотренных химиотерапевтических агентов представлен в главе "Определения" и "Сущность изобретения". В другом аспекте изобретение описывает лечение рака путем введения терапевтически эффективных количеств FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и одного или нескольких антиангиогенных агентов субъекту с диагностированным или имеющимся ранее непролеченным раком. В другом аспекте изобретение описывает лечение рака путем введения терапевтически эффективных количеств FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и одного или нескольких антагонистов ФРЭС субъекту с диагностированным или имеющимся ранее непролеченным раком. В еще одном аспекте изобретение описывает лечение рака путем введения терапевтически эффективных количеств FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и одного или нескольких антагонистов ФРЭС в комбинации с одним или несколькими химиотерапевтическими агентами субъекту с диагностированным или имеющимся ранее непролеченным раком. В некоторых вариантах воплощения изобретения один или несколько антагонистов ФРЭС являются антителами к ФРЭС и/или ловушками ФРЭС.

В одном примере описаны способы лечения рака, включающие введение FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом, выбираемым из доцетакселя, паклитакселя, винкристина, карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, доксорубицина, 5-фторурацила (5-ФУ), лейковорина, пеметрекседа, сорафениба, этопозида, топотекана, антагониста ФРЭС, ловушки ФРЭС, антитела к ФРЭС и бевацизумаба. В некоторых вариантах воплощения изобретения описаны способы лечения рака, включающие введение субъекту FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и доцетакселя. В некоторых вариантах воплощения изобретения описаны способы лечения рака, включающие введение субъекту FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и пеметрекседа. В некоторых вариантах воплощения изобретения описаны способы лечения рака, включающие введение субъекту FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и паклитакселя. В некоторых вариантах воплощения изобретения описаны способы лечения рака, включающие введение субъекту FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и цисплатина. В некоторых вариантах воплощения изобретения описаны способы лечения рака, включающие введение субъекту FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и винкристина. В некоторых вариантах воплощения изобретения описаны способы лечения рака, включающие введение субъекту FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и 5-ФУ. В некоторых вариантах воплощения изобретения описаны способы лечения рака, включающие введение субъекту FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и этопозида. В неко-

торых вариантах воплощения изобретения описаны способы лечения рака, включающие введение субъекту FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и топотекана. В некоторых вариантах воплощения изобретения описаны способы лечения рака, включающие введение субъекту FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и антагониста ФРЭС. В некоторых вариантах воплощения изобретения описаны способы лечения рака, включающие введение субъекту FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и антитела к ФРЭС. В некоторых вариантах воплощения изобретения описаны способы лечения рака, включающие введение субъекту FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и ловушки ФРЭС. В некоторых вариантах воплощения изобретения описаны способы лечения рака, включающие введение субъекту FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и бевацизумаба. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере одну дозу FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и по меньшей мере одну дозу по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента вводят сопутственно. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере одну дозу FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и по меньшей мере одну дозу по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента вводят в одно и то же время (т.е. одновременно). В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере одну дозу FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и по меньшей мере одну дозу по меньшей мере двух дополнительных терапевтических агентов вводят одновременно или сопутственно. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере одну дозу FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и по меньшей мере одну дозу по меньшей мере трех дополнительных терапевтических агентов вводят одновременно или сопутственно. В другом примере описаны способы лечения рака, включающие введение субъекту FGFR1-ECD.339-Fc в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом, выбираемым из доцетакселя, паклитакселя, винкристина, карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, доксорубицина, 5-фторурацила (5-ФУ), лейковорина, пеметрекседа, этопозида, топотекана, антагониста ФРЭС, ловушки ФРЭС, антитела к ФРЭС, сорафениба и бевацизумаба. В некоторых вариантах воплощения изобретения описаны способы лечения рака, включающие введение субъекту FGFR1-ECD.339-Fc и доцетакселя. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере одну дозу FGFR1-ECD.339-Fc и по меньшей мере одну дозу по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента вводят сопутственно. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере одну дозу FGFR1-ECD.339-Fc и по меньшей мере одну дозу по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента вводят в одно и то же время.

Фармацевтические композиции, включающие FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD (например, FGFR1-ECD.339-Fc) вводят в терапевтически эффективном количестве в соответствии с отдельными показаниями. Терапевтически эффективное количество обычно зависит от веса подвергнутого лечению субъекта, его или ее физического состояния или состояния здоровья, степени развития состояния, подвергнутого лечению, и/или возраста подвергнутого лечению субъекта. В целом, FGFR1 ECD и/или молекулу слияния FGFR1 ECD (например, FGFR1-ECD.339-Fc) вводят в количестве в диапазоне от около 50 мкг/кг массы тела до около 100 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых случаях FGFR1 ECD и/или молекулу слияния FGFR1 ECD (например, FGFR1-ECD.339-Fc) можно вводить в количестве в диапазоне от около 100 мкг/кг массы тела до около 30 мг/кг массы тела на дозу. Дополнительно в некоторых случаях FGFR1 ECD и/или молекулу слияния FGFR1 ECD (например, FGFR1-ECD.339-Fc) можно вводить в количестве в диапазоне от около 0,5 мг/кг массы тела до около 20 мг/кг массы тела на дозу. В определенных вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD и/или молекулу слияния FGFR1 ECD (например, FGFR1-ECD.339-Fc) вводят в дозе от около 8 мг/кг массы тела до около 20 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD и/или молекулу слияния FGFR1 ECD (например, FGFR1-ECD.339-Fc) вводят в дозе около 8 мг/кг массы тела, около 10 мг/кг массы тела, около 11 мг/кг массы тела, около 12 мг/кг массы тела, около 13 мг/кг массы тела, около 14 мг/кг массы тела, около 15 мг/кг массы тела, около 16 мг/кг массы тела, около 17 мг/кг массы тела, около 18 мг/кг массы тела, около 19 мг/кг массы тела или около 20 мг/кг массы тела. FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD могут быть также введены в диапазонах от одной до другой указанных выше доз. В некоторых вариантах воплощения изобретения дозы могут вводиться два раза в неделю, еженедельно, через неделю, при частоте между каждой неделей и через неделю, каждые три недели, каждые четыре недели, или каждый месяц.

В определенных вариантах воплощения изобретения дозы FGFR1 ECD и/или молекул слияния FGFR1 ECD могут быть рассчитаны двумя способами, в зависимости от используемого коэффициента экстинкции (EC). Коэффициент экстинкции отличается, в зависимости от учета гликозилирования белка. В одном варианте воплощения изобретения используемый коэффициент экстинкции на основе аминокислотной композиции FGFR1-ECD.339-Fc, составляет, например, 1,42 мл/мг·см. В другом варианте воплощения изобретения, если учитывается углеводная часть, а также аминокислотная часть FGFR1-ECD.339-Fc, коэффициент экстинкции составляет 1,11 мл/мг·см. Расчет дозы FGFR1-ECD.339-Fc с использованием EC 1,11 мл/мг·см повышает рассчитанную дозу на 28%, как это указано в табл. 1. Несмотря на то, что дозы с использованием двух коэффициентов экстинкции различаются, молярные концен-

трации или фактические количества введенного препарата идентичны. Если не указано иное, описанные здесь дозы рассчитаны с использованием коэффициента экстинкции без учета гликозилирования. В табл. 1 представлено сравнение таких доз, рассчитанных с использованием коэффициента экстинкции с учетом гликозирования для FGFR1-ECD.339-Fc. Как можно видеть из табл. 1, доза около 8 мг/кг (например, 7,8 и 8,0) с использованием ЕС 1,42 мл/мг·см соответствует дозе около 10 мг/кг (например, 10,0 и 10,2) при расчете с использованием ЕС 1,11 мл/мг·см. Доза около 16 мг/кг (например, 15,6 и 16,0) с использованием ЕС 1,42 мл/мг·см соответствует дозе около 20,0 мг/кг (например, 20,0 и 20,5) при расчете с использованием ЕС 1,11 мл/мг·см. Как это указано в главе "Определения" выше, представленные здесь измеренные значения являются приблизительными и включают значения с дополнительными значащими цифрами, которые округлены. Например, 8 мг/кг включает значения с двумя значащими цифрами, такими как 7,6, 7,8, 8,0, 8,2, 8,4 и 8,45, каждое из которых округляют до 8. Подобным образом, значение 16 мг/кг включает значения с тремя значащими цифрами, которые округляют до 16, например 15,6 и 16,0.

Таблица 1. Конверсия дозы FGFR1-ECD.339-FC

Доза[a] EC = 1,42 мл/мг*см	Доза[a] EC = 1,11 мл/мг*см
0.5	0.6
0.75	1.0
1.0	1.3
2.0	2.6
3.0	3.8
4.0	5.1
5.0	6.4
6.0	7.7
7.0	9.0
7.8	10.0
8.0	10.2
9.0	11.5
10.0	12.8
11.0	14.1
12.0	15.4
13.0	16.6
14.0	17.9
15.0	19.2
15.6	20.0
16.0	20.5
17.0	21.8
18.0	23.0
19.0	24.3
20.0	25.6
30.0	38.4

Дозы указаны в мг/кг.

Фармацевтические композиции, включающие FGFR1 ECD, молекулы слияния FGFR1 ECD и/или по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент, при необходимости могут быть введены субъектам при необходимости. В определенных вариантах воплощения изобретения эффективную дозу терапевтической молекулы вводят субъекту один или несколько раз. В различных вариантах воплощения изобретения эффективную дозу терапевтической молекулы вводят субъекту по меньшей мере один раз каждые два месяца, по меньшей мере один раз в месяц, по меньшей мере два раза в месяц, раз неделю, два раза в неделю или три раза в неделю. В различных вариантах воплощения изобретения эффективную дозу терапевтической молекулы вводят субъекту в течение, по меньшей мере, недели, по меньшей мере, месяца, по меньшей мере трех месяцев, по меньшей мере шести месяцев или, по меньшей мере, года. В определенных вариантах воплощения изобретения комбинированное введение FGFR1 ECD, молекулы слияния FGFR1 ECD и/или по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента включает сопутственное введение, включая одновременное введение, с использованием отдельных композиций или одной фармацевтической композиции, а также последовательное введение в любом порядке. В некоторых случаях существует временной период, в течение которого оба (или все) активные агенты одновременно проявляют свое биологическое действие. Терапевтически эффективные количества терапевтических агентов, введенных в комбинации с FGFR1 ECD и/или молекулой слияния FGFR1 ECD (например, FGFR1-ECD.339-Fc), будут определяться на усмотрение доктора или ветеринара. Введение и корректировка доз производится для достижения максимального ведения подвергнутого лечению состояния. Доза дополнительно будет зависеть от таких факторов, как тип используемого терапевтического агента, подвергнутый лечению специфический пациент, стадия заболевания и требуемая агрессивность режима лечения. В определенных вариантах воплощения пациент подвергается лечению комбинации FGFR1

ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD (например, FGFR1-ECD.339-Fc) и антагонистом ФРЭС. В некоторых вариантах воплощения изобретения антагонист ФРЭС является ловушкой ФРЭС (например, афлиберцепт). В некоторых вариантах воплощения изобретения антагонист ФРЭС является антителом е ФРЭС. В некоторых вариантах воплощения изобретения антитело е VEGF является бевацизумабом. Одной типичной дозой бевацизумаба является диапазон от около 0,05 до около 20 мг/кг. Таким образом, пациенту может быть введена одна или более доз в размере около 0,5, 2,0, 4,0, 7,5, 10 или 15 мг/кг (или любые их комбинации). Такие дозы могут быть введены прерывисто, например, каждую неделю. Каждые две или три недели.

В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD и/или молекулу слияния FGFR1 ECD (например, FGFR1-ECD.339-Fc) вводят в комбинации с другим терапевтическим агентом, таким как химиотерапевтический агент или антиангиогенный агент, в рекомендуемой или предписанной дозе и/или частоте терапевтического агента.

Пути введения и носители

В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD и/или молекула слияния FGFR1 ECD могут быть введены внутривенно и/или подкожно. В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD и/или молекула слияния FGFR1 ECD могут быть введены другим путем, таким как интраартериально, парентерально, интраназально, внутримышечно, интракардиально, интравентрикулярно, интратрахеально, буккально, ректально, интраперитонеально, внутрикожно, местно, чрескожно или интратекально, или имплантацией или ингаляцией. В различных вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент может быть введен in vivo различными путями, включая внутривенный, интраартериальный, подкожный, парентеральный, интраназальный, внутримышечный, интракардиальный, интравентрикулярный, интратрахеальный, букаальный, ректальный, интраперитонеальный, внутрикожный, местный, чрескожный и интратекальный или имплантацией, или ингаляцией. Каждая отдельная композиция может быть разработана поодиночке или в комбинации с препаратами в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной форме, такой как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, суппозитории, лосьоны, инъекции, растворы для ингаляции и аэрозоли. В различных вариантах воплощения изобретения композиции, включающие FGFR1 ECD, молекулу слияния FGFR1 ECD и/или по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент, описаны в композиции с фармацевтически приемлемыми носителями, целый ряд которых известен науке (см., например, Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)). На рынке представлены различные фармацевтически приемлемые носители, которые включают основы, адъюванты, носители и разбавители. Кроме того, различные фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как агенты для корректировки pH и буферные агенты, агенты для регуляции тоничности, стабилизаторы, смачивающие агенты и т.п., также представлены на рынке. Определенные неограничивающие типичные носители включают физиологический раствор, забуференный физиологический раствор, декстрозу, воду, глицерин, этанол и их комбинации. В некоторых вариантах воплощения изобретения терапевтический агент разработан как препарат под торговым названием, представленным выше в главе Определения, или в виде его генерического эквивалента. В некоторых вариантах воплощения изобретения доцетаксел представлен в виде препарата Таксотер® (Sanofi Aventis) или его генерического эквивалента.

В различных вариантах воплощения изобретения композиции, включающие FGFR1 ECD, молекулы слияния FGFR1 ECD и/или, по меньшей мере, один дополнительный терапевтический агент, могут быть приготовлены в виде композиций для инъекции путем растворения, суспендирования или эмульгирования в водном или неводном растворителе, таком как растительное или другие подобные масла, глицериды синтетических алифатических кислот, эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоль; и, при необходимости, со стандартными добавками, такими как солюбилизаторы, агенты изотоничности, суспендирующие агенты, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты. В различных вариантах воплощения изобретения композиции могут быть представлены для ингаляции, например, с использованием приемлемых пропеллентов под давлением, таких как дихлордифторметан, пропан, азот и т.п. Композиции в различных вариантах воплощения изобретения также могут быть представлены в виде микрокапсул с продолжительным высвобождением, таких как содержащие биоразрушаемые или небиоразрушаемые полимеры. Неограничивающая типичная биоразрушаемая композиция включает полимер полимолочной кислоты-гликолевой кислоты. Неограничивающая типичная композиция, не поддающаяся биоразрушению, включает эфир полиглицерина и жирной кислоты. Определенные способы получения таких композиций описаны, например, в EP 1125584 A1. Также описаны упаковки с фармацевтическими дозами, включающими один или несколько контейнеров, каждый из которых содержит одну или несколько доз FGFR1 ECD, молекулы слияния FGFR1 ECD и/или, по меньшей мере, одного дополнительного терапевтического агента. В некоторых вариантах воплощения изобретения упаковки дозы включают FGFR1 ECD и/или молекулу слияния FGFR1 ECD, но не включает любой дополнительный терапевтический агент, такой как доцетаксел, паклитаксел, винкристин, карбоплатин, цисплатин, оксалиплатин, доксору-

бицин, 5-фторурацил (5-ФУ), лейковорин, пеметрексед, этопозид, топотекан, сорафениб, антагонист ФРЭС, антитело к ФРЭС, ловушку ФРЭС или бевацизумаб. В других вариантах воплощения изобретения упаковки дозы включают, по меньшей мере, один дополнительный терапевтический агент, но не включает FGFR1 ECD или молекулу слияния FGFR1 ECD. В других вариантах воплощения изобретения упаковки дозы включают FGFR1 ECD и/или молекулу слияния FGFR1 ECD и по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент, при этом FGFR1 ECD и/или молекула слияния FGFR1 ECD находится в отдельном контейнере от, по меньшей мере, одного дополнительного терапевтического агента. В других вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD и/или молекула слияния FGFR1 ECD находится в том же самом контейнере что и, по меньшей мере, один дополнительный терапевтический агент. В определенных вариантах воплощения изобретения, в которых используется два или более дополнительных терапевтических агента, два или более дополнительных терапевтических агента могут находиться в одном и том же или разных контейнерах. В определенных вариантах воплощения изобретения описанная единица дозы содержит предварительно определенное количество композиции, включающей FGFR1 ECD, молекулу слияния FGFR1 ECD и/или по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент с или без одного или нескольких дополнительных агентов. В определенных вариантах воплощения изобретения такая единица дозы поставляется в предварительно заполненном шприце для однократного применения для инъекций. В альтернативных вариантах воплощения изобретения композиция, содержащаяся в единице дозы, может включать физиологический раствор, сахарозу или т.п.; буфер, такой как фосфатный или т.п.; и/или иметь стабильный и эффективный диапазон pH. С другой стороны, в определенных вариантах воплощения изобретения композиция может быть представлены в виде лиофилизированного порошка, который может быть восстановлен при добавлении соответствующей жидкости, например, стерильной воды. В определенных вариантах воплощения изобретения композиция включает одно или несколько веществ, которые ингибируют агрегацию белков, включая, но не ограничиваясь, сахарозу и аргинин. В отдельных вариантах воплощения изобретения композиция по изобретению включает гепарин и/или протеогликан. В некоторых вариантах воплощения изобретения упаковка дозы включает FGFR1 ECD и/или молекулу слияния FGFR1 ECD и/или по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент, выбираемый из доцетакселя, паклитаксела, винкристина, карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, доксорубицина, 5-фторурацила (5-ФУ), лейковорина, пеметрекседа, этопозида, топотекана, сорафениба, антагониста ФРЭС, антитела к ФРЭС, ловушки ФРЭС и бевацизумаба. В некоторых вариантах воплощения изобретения упаковка дозы дополнительно включает инструкции по введению FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом пациенту. В некоторых вариантах воплощения изобретения инструкции указывают, что по меньшей мере одна доза FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD должна быть введена сопутственно, по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом. В некоторых вариантах воплощения изобретения инструкции указывают, что по меньшей мере одна доза FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD должна быть введена в одно и то же самое время, что и по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент.

Термин "инструкции" в контексте данного изобретения включает, но не ограничивается, этикетки, вкладыши в упаковку, инструкции, представленные в электронной форме, такие как на считываемом компьютером носителе (например, дискете, компакт-диске или DVD), инструкции, находящиеся в удаленном доступе, таком как посредством интернета и т.д. Считается, что упаковка дозы включает инструкции, если упаковка дозы предоставляет доступ к инструкциям, ссылке на инструкции (такой как унифицированный локатор ресурса, или url) или другой механизм для получения копии инструкций (такой как возвратная карта с ответами, физический адрес, по которому могут быть запрошены инструкции, адрес электронной почты, по которому могут быть запрошены инструкции, номер телефона, по которому можно позвонить для получения инструкций и т.д.).

FGFR1 ECD и молекулы слияния FGFR1 ECD

Неограничивающие типичные FGFR1 ECD включают FGFR1 ECD полной длины, фрагменты FGFR1 ECD и варианты FGFR1 ECD. FGFR1 ECD могут включать или не включать сигнальный пептид. Типичные FGFR1 ECD включают, но не ограничиваются, FGFR1 ECD с аминокислотными последовательностями, выбираемыми из SEQ ID NO.: 1,2,3 и 4.

Неограничивающие типичные фрагменты FGFR1 ECD включают FGFR1 ECD человека, заканчивающегося на аминокислоте 339 (считая от первой аминокислоты в зрелой форме, без сигнального пептида). В некоторых вариантах воплощения изобретения фрагмент FGFR1 ECD заканчивается на аминокислоте между аминокислотой 339 и аминокислотой 360 (считая от первой аминокислоты в зрелой форме, без сигнального пептида). Типичные фрагменты FGFR1 ECD включают, но не ограничиваются, фрагменты FGFR1 ECD с аминокислотными последовательностями, выбираемыми из SEQ ID NO: 3 и 4.

В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD включает последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 1 до 4. В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD включает последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 1 до 4. Если FGFR1 ECD "состоит из" последовательности, выбираемой из SEQ ID NO: 1 до 4, FGFR1 ECD может содержать или не содержать различные пост-трансляционные модификации, такие как гликозирование и сиалирование. Другими словами, если

FGFR1 ECD состоит из отдельной аминокислотной последовательности, он не содержит дополнительных аминокислот в смежной аминокислотной последовательности, но может содержать модификации в боковых аминокислотных цепях, N-терминальной аминогруппе и/или С-терминальной карбоксильной группе. В некоторых вариантах воплощения изобретения молекула слияния FGFR1 ECD включает сигнальный пептид. В некоторых вариантах воплощения изобретения молекула слияния FGFR1 ECD не содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах воплощения изобретения участок FGFR1 ECD молекулы слияния FGFR1 ECD включает последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 1 до 4. В некоторых вариантах воплощения изобретения участок FGFR1 ECD молекулы слияния FGFR1 ECD включает последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 1 до 4. Если участок FGFR1 ECD молекулы слияния FGFR1 ECD «состоит из» последовательности, выбираемой из SEQ ID NO: 1 до 4, участок FGFR1 ECD молекулы слияния FGFR1 ECD может содержать или не содержать различные пост-трансляционные модификации, такие как гликозирование и сиалирование. Другими словами, если участок FGFR1 ECD молекулы слияния FGFR1 ECD состоит из отдельной аминокислотной последовательности, он не содержит дополнительных аминокислот из FGFR1 в смежной аминокислотной последовательности, но может содержать модификации в боковых аминокислотных цепях, N-терминальной аминогруппе и/или С-терминальной карбоксильной группе. Кроме того, принимая во внимание, что FGFR1 ECD присоединен к молекуле слияния, могут существовать дополнительные аминокислоты на N- и/или С-конце FGFR1 ECD, но такие аминокислоты не происходят от последовательности FGFR1 и могут происходить, например, из линкерной последовательности или последовательности партнера слияния. В некоторых вариантах воплощения изобретения участок партнера слияния молекулы слияния FGFR1 ECD выбирают из Fc, альбумина и полиэтиленгликоля. Неограничивающие типичные партнеры слияния обсуждаются в тексте данной заявки. Исследователи обнаружили, что введение FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD и, по меньшей мере, одного дополнительного терапевтического агента, выбираемого из доцетакселя, паклитакселя, винкристина, карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, доксорубицина, 5-фторурацила (5-ФУ), лейковорина, пеметрекседа, сорафениба, этопозида, топотекана, антагониста фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ловушки ФРЭС, антитела к ФРЭС и бевацизумаба, полезно в лечении рака. В некоторых вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD и/или молекулу слияния вводят с доцетакселем.

Партнеры слияния и конъюгаты

Как это обсуждается в тексте данной заявки, FGFR1 ECD может быть скомбинирован, по меньшей мере, с одним партнером слияния, образуя молекулу слияния FGFR1 ECD. Такие партнеры слияния могут облегчать очистку, и молекулы слияния FGFR1 ECD могут обладать повышенным периодом полужизни in vivo. Подходящие партнеры слияния FGFR1 ECD включают, например, полимеры, такие как водорастворимые полимеры, константный домен иммуноглобулинов; полный или часть сывороточного альбумина человека (HSA); фетуин А; фетуин В; домен лейциновой молнии; домен тримеризации тетранектина; белок связывания маннозы (также известен как маннозо-связывающий лектин), например, маннозо-связующий белок 1; и участок Fc, как это описано в тексте данной заявки и дополнительно описано в патенте США № 6686179. Неограничивающие типичные молекулы слияния FGFR1 ECD описаны, например, в патенте США № 7678890.

Молекула слияния FGFR1 ECD может быть получена путем присоединения полиаминокислот или разветвленных аминокислот к FGFR1 ECD. Например, полипаминокислота может быть белком-носителем, который служит для повышения периода полужизни FGFR1 ECD в кровотоке (кроме преимуществ, достигаемых посредством присоединения молекулы). В терапевтических целях данного изобретения такие полиаминокислоты в идеале должны или не должны вызывать нейтрализующий антигенный ответ или другие нежелательные ответы. Такие полиаминокислоты могут быть выбраны или сывороточного альбумина (такого как ЧСА), дополнительного антитела или его участка, например, участка Fc, фетуина А, фетуина В, лейциновой молнии, эритроидного производного ядерного фактора-2 (NFE2), нейроретинальной лейциновой молнии, тетранектина или других полиаминокислот, например, лизина. Как это описано в тексте данной заявки, расположение точки присоединения полиаминокислоты может находиться на N-конце или С-конце, или других местах между ними, и также может присоединяться химической связью функциональной группы к выбранной молекуле.

Полимеры

Полимеры, например, водорастворимые полимеры, могут использоваться в качестве партнеров слияния для снижения преципитации молекулы слияния FGFR1 ECD в водной среде, такой, которая обычно присутствует в физиологической среде. Полимеры, используемые в изобретении, будут фармацевтически приемлемыми для получения терапевтического продукта или композиции.

Подходящие, клинически приемлемые водорастворимые полимеры включают, но не ограничиваются этим, полиэтиленгликоль (ПЭГ); полиэтиленгликоль пропиональдегид; сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля; монометоксиполиэтиленгликоль; карбоксиметилцеллюлозу; декстран; поливиниловый спирт (ПВС); поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан; поли-1,3,6-триоксан; сополимер этилена/малеинового ангидрида; поли-β-аминокислоты (гомополимеры или случайные сополимеры); поли(n-винилпирролидон)полиэтиленгликоль; гомополимеры полипропиленгликоля (ППГ) и другие полиалки-

леновые оксиды; сополимеры полипропиленоксида/этиленоксида; полиоксиэтилированные полиолы (POG) (например, глицерин) и другие полиоксиэтилированные полиолы; полиоксиэтилированный сорбитол или полиоксиэтилированная глюкоза, жирные кислоты или другие углеводные полимеры; а также Фиколл, или декстран и их смеси.

В контексте данного изобретения полиэтиленгликоль (ПЭГ) обозначает любую форму, которую используют для дериватизации других белков, такую как моно-(C_1-C_{10}) алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль. Пропиональдегид полиэтиленгликоля может быть преимущественным в производстве благодаря его устойчивости в воде. Используемые здесь полимеры, например, водорастворимые полимеры, могут иметь любой молекулярный вес и могут быть разветвленными или неразветвленными. В некоторых вариантах воплощения изобретения полимеры имеют средний молекулярный вес между около 2 до около 100 кДа (термин "около" указывает, что в композициях полимера некоторые молекулы будут весить больше, некоторые меньше, чем указанный молекулярный вес). Средний молекулярный вес каждого полимера может быть между около 5 и около 50 кДа, или между около 12 и около 25 кДа. В целом, чем выше молекулярный вес или больше разветвлений, тем выше соотношение полимер:белок. Также могут использоваться другие размеры, в зависимости от требуемого терапевтического профиля; например, продолжительности длительного высвобождения; влияния, при наличии, на биологическую активность; легкости работы; степени или отсутствии антигенности; и других известных эффектов полимера на FGFR1 ECD. Полимеры, используемые в данном изобретении, обычно присоединены к FGFR1 ECD с учетом эффектов на функциональные или антигенные домены полипептида. В целом, химическая дериватизация может проводиться при любом подходящем условии, используемом для реакции белка с активированной полимерной молекулой. Активирующие группы, которые могут использоваться для присоединения полимера к активным молекулам, включают сульфон, малеимид, сульфгидрил, тиол, трифлат, трезилат, азиридин, оксиран и 5-пиридил.

Полимеры по изобретению обычно присоединены к гетерологичному полипептиду в положении альфа (α) или эпсилон (ε) аминогрупп аминокислот или реактивной тиоловой группы, но также предусмотрено, что группа полимера может быть присоединена к любой реакционной группе белка, которая достаточно реакционная для присоединения полимерной группы при подходящих условиях реакции. Таким образом, полимер может быть ковалентно связан с FGFR1 ECD посредством реакционной группы, такой как свободная амино или карбоксильная группа. Аминокислотные остатки со свободными аминогруппами могут включать остатки лизина и N-терминальный аминокислотный остаток. Остатки со свободными карбоксильными группами могут включать остатки аспарагиновой кислоты, остатки глутаминовой кислоты и С-терминальный аминокислотный остаток. Остатки с реакционной тиоловой группой включают остатки цистеина.

Способы получения молекул слияния, конъюгированных с полимерами, такими как водорастворимые полимеры, обычно будут включать (а) реакцию FGFR1 ECD с полимером в условиях, при которых полипептид становится присоединенным к одному или нескольким полимерам, и (б) получение продукта реакции. Условия реакции для каждой конъюгации могут быть выбраны из любых известных в науке или впоследствии разработанных, но должны быть выбраны с целью избежания или ограничения воздействия условий реакции, таких как температура, растворители и уровни pH, которые могут деактивировать модифицируемый белок. В целом, оптимальные условия реакции будут определены для каждого отдельного случая на основе известных параметров и требуемого результата. Например, чем больше соотношение в конъюгате полимер:полипептид, тем больше процент конъюгированного продукта. Оптимальное соотношение (в понятиях эффективности реакции не существует избытка непрореагированного полипептида или полимера) может быть определено факторами, такими как требуемая степень дериватизации (например, моно-, ди-, три- и т.д.), молекулярный вес выбранного полимера, разветвленность или неразветвленность полимера, а также используемые условия реакции. Соотношение полимера (например, ПЭГ) к полипептиду будет обычно варьировать от 1:1 до 100:1. Один или несколько очищенных конъюгатов могут быть получены из каждой смеси стандартными способами очистки, включая, помимо всего прочего, диализ, высаливание, ультрафильтрацию, ионообменную хроматографию, хроматографию с гель-фильтрацией и электрофорез. В одних случаях может потребоваться N-терминальный химически модифицированный FGFR1 ECD. В других случаях может потребоваться выбор полимера по молекулярному весу, разветвлению и т.д., пропорции полимера к молекулам FGFR1 ECD в реакционной смеси, типа проводимой реакции и способа получения выбранного N-терминального химически модифицированного FGFR1 ECD. Способ получения N-терминального химически модифицированного FGFR1 ECD (отделение данной молекулы от других монодериватизированных молекул при необходимости) может быть очисткой материала N-терминального химически модифицированного FGFR1 ECD от популяции химически модифицированных молекул белка.

Селективная N-терминальная химическая модификация может сопровождаться восстановительным алкилированием, придающим дифференциальную реакционную способность различным типам первичных аминогрупп (лизин в сравнении с N-терминальной группой), имеющихся для дериватизации отдельного белка. При подходящих условиях реакции достигается, по существу, избирательная дериватизация белка на N-конце с полимером, содержащем карбонильную группу. Например, можно избирательно при-

соединить полимер к N-концу белка путем проведения реакции при pH, обеспечивающим преимущественную разницу в значениях pKa между ε-аминогруппой остатков лизина и α-аминогруппой N-терминального остатка белка. С помощью такой избирательной дериватизации контролируют присоединение полимера к белку: конъюгация с полимером происходит преимущественно на N-конце белка без возникновения модификации по существу других реакционных групп, таких как аминогруппы лизина боковой цепи. С использованием восстановительного алкилирования, полимер может иметь любой описанный выше тип и включать одиночный реакционный альдегид для соединения с белком. Также может использоваться полиэтиленгликоля пропиональдегид, содержащий один реакционный альдегид. В одном варианте воплощения данное изобретение описывает химически дериватизированный FGFR1 ECD для включения моно- или поли- (например, 2-4) молекул ПЭГ. Пэгилирование может проводиться с использованием любой известной реакции пэгилирования. Способы получения пэгилированного белкового продукта обычно будут включать:

(а) реакцию полипептида с полиэтиленгликолем (таким так реакционный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ) в условиях, при которых белок становится присоединенным к одной или нескольким группам ПЭГ; и

(б) получение продукта (-ов) реакции.

В целом, оптимальные условия реакции будут определены для каждого отдельного случая на основе известных параметров и требуемого результата. Науке известен целый ряд способов присоединения ПЭГ. См., например, EP 0401384; Malik et al., Exp. Hematol., 20:1028-1035 (1992); Francis, Focus on Growth Factors, 3(2):4-10 (1992); EP 0 154 316; EP 0401384; WO 92/16221; WO 95/34326 и другие процитированные здесь публикации, относящиеся к пэгилированию. Пэгилирование может проводиться, например, посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционной молекулой полиэтиленгликоля. Таким образом, белковые продукты по данному изобретению включают пэгилированные белки, в которых группа(ы) ПЭГ присоединена(ны) посредством ацильной или алкильной групп. Такие продукты могут быть монопэгилированными или полипэгилированными (например, содержащие 2-6 или 2-5 групп ПЭГ). Группы ПЭГ обычно присоединены к белку на α- или ε-аминогруппах аминокислот, но также предусмотрено, что группы ПЭГ могут быть присоединены к любой аминогруппе, присоединенной к белку, которая является достаточно реакционной для присоединения к группе ПЭГ в подходящих условиях реакции.

Пэгилирование путем ацилирования обычно включает реакцию активного эфирного производного полиэтиленгликоля (ПЭГ) с FGFR1 ECD. Для реакций ацилирования выбранный полимер (-ы) обычно имеют одну реакционную эфирную группу. Для проведения реакции пэгилирования может использоваться любая известная или впоследствии открытая реакционная молекула ПЭГ. Примером подходящего активированного эфира ПЭГ является ПЭГ, этерифицированный до N-гидроксисукцинимида (NHS). В контексте данного изобретения предусмотрено, что ацилирование включает, без ограничения, следующие типы связей между терапевтическим белком и полимером, таким как ПЭГ: амидная, карбаматная, уретана и т.п., см., например, Chamow, Bioconjugate Chem., 5:133-140 (1994). Условия реакции могут быть выбраны из известных в настоящее время и впоследствии открытых, однако следует избегать условий, таких как температура, растворитель и pH, которые могут инактивировать модифицируемый полипептид.

Пэгилирование путем ацилирования обычно приведет к полипэгилированному белку. Соединительная связь может быть амидной. Полученный продукт может быть впоследствии только (например, > 95%) моно-, ди- или три-пэгилированным. Однако могут быть образованы некоторые виды с более высокой степенью пэгилирования в количествах, зависящих от специфических используемых условий реакции. При необходимости, более очищенные пэгилированные виды могут быть отделены от смеси (частично непрореагированными видами) стандартными способами очистки, включая, помимо всего прочего, диализ, высаливание, ультрафильтрацию, ионообменную хроматографию, хроматографию с гельфильтрацией и электрофорез. Пэгилирование путем алкилирования обычно включает реакцию терминального альдегидного производного ПЭГ с полипептидом в присутствии восстановительного агента. Для реакции восстановительного алкилирования выбранный полимер (-ы) должен иметь одну реакционную альдегидную группу. Типичный реакционный альдегид ПЭГ является полиэтиленгликоля пропиональдегидом, который стабилен в воде, или его моно C_1-C_{10} алкокси или арилокси производными, см., например, патент США № 5252714.

Маркеры

Кроме того, FGFR1 ECD по данному изобретению могут быть слиты с маркерными последовательностями, таким как пептид, для облегчения очистки слитого полипептида. Маркерная аминокислотная последовательность может быть гекса-гистидин пептидом, таким как тэг, находящийся в векторе pQE (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada), среди всех прочих, многие их которых представлены на рынке. Как это описано в Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:821-824 (1989), например, гекса-гистидин обеспечивает удобную очистку белка слияния. Другой пептидный тэг, используемый для очистки, тэг гемагглютинина (HA), соответствует антигенной детерминанте, полученной из белка HA гриппа. (Wilson et al.,

Cell 37:767 (1984)). Любое из описанных выше слияний может быть получено рекомбинантным способом с использованием описанных здесь FGFR1 ECD.

Партнеры слияния домена олигомеризации

В различных вариантах воплощения изобретения олигомеризация предоставляет некоторые функциональные преимущества белку слияния, включая, но не ограничиваясь этим, поливалентность, повышенную связующую способность и комбинированную функцию разных доменов. В соответствии с этим в некоторых вариантах воплощения изобретения партнер слияния включает домен олигомеризации, например, домен димеризации. Типичные домены олигомеризации включают, но не ограничиваются этим, биспиральные домены, включая α-биспиральные домены; коллагеновые домены; коллаген-подобные домены; и определенные домены иммуноглобулинов. Типичные биспиральные полипептидные партнеры слияния включают, но не ограничиваются этим, тетранектиновый биспиральный домен; биспиральный домен олигомерного матричного белка хряща; биспиральные домены ангиопоэтина; и домены лейциновых молний. Типичные коллаген или коллаген-подобные домены олигомеризации включают, но не ограничиваются, домены, присутствующие в коллагенах, маннозосвязующем лектине, сурфактантных протеинах A и D легких, адипонектине, фиколине, конглютинине, скавенжер-рецепторе макрофагов и эмилине.

Партнеры слияния домена иммуноглобулина Fc антитела

Множество доменов Fc, которые могут использоваться в качестве партнеров слияния, известны в науке. В некоторых вариантах воплощения изобретения партнер слияния является доменом Fc иммуноглобулина. Партнер слияния Fc может быть Fc дикого типа, встречающимся в естественном антителе, его варианте или фрагменте. Неограничивающие типичные партнеры слияния Fc включают Fc, включающие шарнирный участок и константные домены CH2 и CH3 IgG человека, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. Дополнительные типичные партнеры слияния Fc включают, но не ограничиваются, IgA и IgM человека. В некоторых вариантах воплощения изобретения партнер слияния Fc включает мутацию C237S, например, в IgG1 (см., например, SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах воплощения изобретения партнер слияния Fc включает шарнирный участок, домены CH2 и CH3 IgG2 человека с мутацией P331S, как это описано в патенте США № 6900292. Определенные типичные партнеры слияния - домены Fc - представлены в SEQ ID NO: 8 до 10.

Партнеры слияния альбумина и партнеры слияния альбумин-связующей молекулы. В некоторых вариантах воплощения изобретения партнер слияния является альбумином. Типичные альбумины включают, но ее ограничиваются, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) и фрагменты ЧСА, которые способны повышать период полужизни в сыворотке или биодоступность полипептида, к которому они присоединены. В некоторых вариантах воплощения изобретения партнер слияния является альбумин-связующей молекулой, такой как, например, пептид, который связывает альбумин или молекулу, которая конъюгирует с липидом или другой молекулой, которая связывает альбумин. В некоторых вариантах воплощения изобретения молекула слияния включает ЧСА и ее получают, как это описано, например, в патенте США № 6686179.

Типичное присоединение партнеров слияния

Партнер слияния может быть присоединен ковалентным или нековалентным способом к N-концу или C-концу FGFR1 ECD. Присоединение также может возникнуть в положении внутри FGFR1 ECD, не включая N-конец или C-конец, например, посредством боковой аминокислотной цепи (такой как, например, боковая цепь цистеина, лизина, серина или треонина).

В вариантах воплощения изобретения с ковалентным или нековалентным присоединением линкер может присутствовать между партнером слияния и FGFR1 ECD. Такие линкеры могут состоять, по меньшей мере, из одной аминокислоты или химической молекулы. Типичные способы ковалентного присоединения партнера слияния к FGFR1 ECD включают, но не ограничиваются этим, трансляцию партнера слияния и FGFR1 ECD как единой аминокислотной последовательности и химическое присоединение партнера слияния к FGFR1 ECD. Если партнер слияния и FGFR1 ECD транслируют в виде единой аминокислотной последовательности, между партнером слияния и FGFR1 ECD могут присутствовать дополнительные аминокислоты в качестве линкера. В некоторых вариантах воплощения изобретения линкер выбирают на основе полинуклеотидной последовательности, которая его кодирует, для облегчения клонирования партнера слияния и/или FGFR1 ECD в единый вектор экспрессии (например, полинуклеотид, содержащий отдельный сайт рестрикции, может быть размещен между полинуклеотидом, кодирующим партнер слияния, и полинуклеотидом, кодирующим FGFR1 ECD, при этом полинуклеотид, содержащий сайт рестрикции, кодирует короткую аминокислотную линкерную последовательность). Если партнер слияния и FGFR1 ECD ковалентно соединены химическим способом, линкеры различного размера могут быть обычно включены во время реакции соединения.

Типичные способы нековалентного присоединения партнера слияния с FGFR1 ECD, включают, но не ограничиваются этим, присоединение посредством связующей пары. Типичные связующие пары включают, но не ограничиваются этим, биотин и авидин или стрептавидин, антитело и его антиген и т.д.

Ко-трансляционные и пост-трансляционные модификации

Изобретение описывает введение FGFR1 ECD и молекул слияния FGFR1 ECD, которые дифференциально модифицированы во время или после трансляции, например, гликозилированием, ацетилированием, фосфорилированием, амидированием, дериватизацией известными защитными/блокирующими группами, протеотилическим расщеплением или присоединением к молекуле антитела или другому клеточному лиганду. Любая из многочисленных химических модификаций может проводиться известными способами, включая, но не ограничиваясь этим, специфическое химическое расщепление цианоген бромидом, трипсином, хемотрипсином, папаином, V8 протеазой; $NABH_4$; ацелирование; формилирование; окисление; восстановление; и/или метаболический синтез в присутствии туникамицина.

Дополнительные пост-трансляционные модификации, включенные в изобретение, включают, например, N-присоединенные или O-присоединенные цепи углеводородов, процессинг N-терминальных или C-терминальных концов, присоединение химических молекул к аминокислотному остову, химические модификации N-присоединенных или O-присоединенных цепей углеводородов, а также добавление или удалением N-терминального остатка метионина в качестве экспрессии прокариотической клетки-хозяина. Неограничивающее обсуждение различных пост-трансляционных модификаций FGFR1 ECD и молекул слияния FGFR1 ECD представлено, например, в патенте США № 7678890.

Экспрессия и получение векторов FGFR1 ECD и молекулы слияния FGFR1 ECD

Описаны векторы, включающее полинуклеотиды, кодирующие FGFR1 ECD. Также описаны векторы, включающее полинуклеотиды, кодирующие молекулы слияния FGFR1 ECD. Такие векторы включают, но не ограничиваются этим, векторы ДНК, фаговые векторы, вирусные векторы, ретровирусные векторы и т.д. В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор выбирают таким образом, чтобы он был оптимизирован для экспрессии полипептидов в CHO или полученных из CHO клеток. Такие типичные векторы описаны, например, в Running Deer et al., Biotechnol. Prog. 20:880-889 (2004).

В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор выбирают для in vivo экспрессии FGFR1 ECD и/или молекул слияния FGFR1 ECD у животных, включая человека. В некоторых таких вариантах воплощения изобретения экспрессия полипептида находится под контролем промотора, который функционирует тканеспецифическим образом. Например, описаны специфические для печени промоторы, например, в публикации PCT № WO 2006/076288. Неограничивающее обсуждение различных векторов экспрессии представлено, например, в патенте США № 7678890.

Клетки-хозяева

В различных вариантах воплощения изобретения FGFR1 ECD или молекулы слияния FGFR1 ECD могут экспрессироваться в прокариотических клетках, таких как бактериальные клетки; или в эукариотических клетках, таких как грибковые клетки, клетки растений, клетки насекомых и клетки млекопитающих. Такая экспрессия может проводиться, например, с использованием известных в науке способов. Типичные эукариотические клетки, которые могут использоваться для экспрессии полипептидов, включают, но не ограничиваются этим, клетки COS, включая клетки COS 7; клетки 293, включая клетки 293-6E; клетки CHO, включая клетки CHO-S и DG44; и клетки NSO. В некоторых вариантах воплощения изобретения отдельную эукариотическую клетку-хозяина выбирают на основе ее способности включать определенные пост-трансляционные модификации в FGFR1 ECD или молекулы слияния FGFR1 ECD. Например, в некоторых вариантах воплощения изобретения клетки CHO вырабатывают FGFR1 ECD и/или молекулы слияния FGFR1 ECD, которые имеют более высокий уровень сиалирования, чем полипептид, вырабатываемый в клетках 293. Введение нуклеиновой кислоты в требуемую клетку-хозяина может сопровождаться любым известным в науке способом, включая, но не ограничиваясь этим, трансфекцию кальция фосфатом, DEAE-декстран опосредованную трансфекцию, катионную липид-опосредованную трансфекцию, электропорацию, трансдукцию, инфекцию и т.д. Неограничивающие типичные способы описаны, например, в Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Нуклеиновые кислоты могут быть временно или стабильно трансфицированы в требуемых клетках-хозяевах согласно известным в науке способам. Неограничивающее обсуждение клеток-хозяев и способов полипептидов в клетках-хозяевах может быть представлено, например, в патенте США № 7678890.

В некоторых вариантах воплощения изобретения полипептид может быть получен in vivo в животном, которое было рекомбинировано или трансфицировано молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, согласно известным в науке способам.

Очистка полипептидов FGFR1 ECD

FGFR1 ECD или молекулы слияния FGFR1 ECD могут быть очищены с использованием различных известных в науке способов. Такие способы включают, но не ограничиваются этим, использование матриц аффинности или хроматографию с гидрофобным взаимодействием. Подходящие лиганды аффинности включают любые лиганды FGFR1 ECD или партнера слияния. Подходящие лиганды аффинности в случае антитела, связывающего FGFR1, включают, но не ограничиваются этим, сам FGFR1 и его фрагменты. Кроме того, для связывания с партнером слияния Fc для очистки молекулы слияния FGFR1 ECD может использоваться белок A, белок G, белок A/G или колонка с аффинным антителом. Антитела к FGFR1 ECD также могут использоваться для очистки FGFR1 ECD или молекул слияния FGFR1 ECD.

Хроматография с гидрофобными взаимодействиями, например, колонка с бутилом или фенилом, может также подходить для очистки некоторых полипептидов. Науке известно много способов очистки полипептидов. Неограничивающее обсуждение различных способов очистки полипептидов представлено, например, в патенте США № 7678890.

Примеры

Представленные ниже примеры являются только типичными примерами изобретения и не должны считаться ограничивающими изобретение никоим образом. Примеры не должны рассматриваться как представляющие все или исключительно проведенные эксперименты. Были сделаны попытки повышения точности значений (например, количества, температуры и т.д.), однако следует учитывать некоторые погрешности и отклонения экспериментов. Если не указано иное, части являются частями по весу, молекулярный вес является средним молекулярным весом, температура представлена в градусах по Цельсию, и давление равно или около атмосферного.

Пример 1. Введение FGFR1-ECD.339-Fc и доцетакселя в модели ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) H1703.

Самки мышей SCID в возрасте шести недель были приобретены у Charles River Laboratories (Wilmington, MA) и акклиматизированы в течение 1 недели перед началом исследования. В качестве модели опухоли использовали линию клеток H1703 немелкоклеточного рака легкого человека (NSCLC), которая была приобретена у ATCC (Manassas, VA; Cat. No. CRL-5889). Клетки были культивированы в трех пассажах в RPMI + 10% FBS + 1% L-глутамин при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO_2. Когда культивированные клетки достигли 85-90% конфлюэнтности, клетки были собраны и ресуспендированы в холодном и не содержащем Ca^{2+} и Mg^{2+} забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS), содержащем 50% Matrigel в концентрации $2,5\times10^7$ клеток на мл. Клетки были имплантированы подкожно вдоль правого бока мышей в концентрации $2,5\times10^6$ клеток/100 мкл/мышь. Спустя один день после имплантации опухоли мыши были рандомизированы согласно массе тела в количестве 10 мышей на группу.

FGFR1-ECD.339-Fc был приготовлен в PBS в концентрации 3 мг/мл и введен интраперитонеально (и/п) в дозе 15 мг/кг (300 мкг/100 мкл/мышь) дважды в неделю в течение четырех недель. Доцетаксел был приобретен у Toronto Research Chemicals (North York, Ontario, Canada; Cat. No. D494420) и приготовлен в H_2O с содержанием 5% Твина 80 и 5% глюкозы. Доцетаксел вводили и/п в дозе 25 мг/кг (эквивалентно около 75 мг/м у человека) один раз каждые три недели в количестве двух доз. В комбинированных группах FGFR1-ECD.339-Fc и доцетаксел вводили сопутственно или последовательно с FGFR1-ECD.339-Fc, вводимом за один день перед введением доцетакселя или наоборот. Человеческий альбумин был приобретен у Grifols USA (Los Angeles, CA; Cat. No. NDC 61953-0002-1), приготовлен в PBS при 3 мг/мл и использовали в качестве отрицательного контроля в дозе 300 мкг/100 мкл/мышь (15 мг/кг). График введения доз для каждой подгруппы мышей представлен в табл. 2.

Таблица 2. График введения дозы

Группа	n	Путь введения	Лечение	График
1	10	и/п	Альбумин	2 раза в неделю x 6 недель
2	10	и/п	FGFR1-ECD.339-Fc	2 раза в неделю x 6 недель
3	10	и/п	Доцетаксел	1 раз в течение 3 недель x 2 дозы
4	10	и/п и/п	FGFR1-ECD.339-Fc Доцетаксел	2 раза в неделю x 6 недель 1 раз в течение 3 недель x 2 дозы
5	10	и/п и/п	FGFR1-ECD.339-Fc Доцетаксел (1 день после)	2 раза в неделю x 6 недель 1 раз в течение 3 недель x 2 дозы
6	10	и/п и/п	FGFR1-ECD.339-Fc Доцетаксел (1 день до)	2 раза в неделю x 6 недель 1 раз в течение 3 недель x 2 дозы

Объем опухоли и массу тела мышей контролировали дважды в неделю в течение всего исследова-

ния. Объем опухоли был измерен по внешним параметрам для определения наибольшего продольного диаметра (длины) и наибольшего поперечного диаметра (ширины). Объем опухоли затем был рассчитан с использованием следующей формулы:

$$\text{Объем опухоли } (\text{мм}^3) = (\text{длина} \times \text{ширина}^2)/2$$

На день 38, когда средний объем опухоли в группе альбумина достиг 850 мм^3, мыши были умерщвлены ингаляцией изофлурана и смещением шейных позвонков. Средний объем опухоли в течение исследования для каждой подгруппы мышей представлен на фиг. 1. В этом эксперименте последовательное введение FGFR1-ECD.339-Fc и доцетакселя ингибировало рост опухоли в большей степени по сравнению только с препаратом. Кроме того, в этом эксперименте сопутственное введение FGFR1-ECD.339-Fc и доцетакселя было более эффективным, чем последовательное введение при ингибировании роста опухоли. В течение хода исследования потери веса не отмечалось (данные не указаны).

Объем опухоли в каждой группе мышей на день 38 был проанализирован однофакторным дисперсионным анализом с последующим проведением критерия Тьюки.

Результаты данного анализа приведены в табл. 3.

Таблица 3. Анализ объема опухоли на день 38

	Средний объем опухоли мм^3(±CO)	Ингибирование роста опухоли (%)	Значение p в сравнении с контролем (критерий Тьюки)
Альбумин	835 (±151)	-	-
FGFR1-ECD.339-Fc	557 (±151)	33	<0,01
Доцетаксел	209 (±303)	74	<0,001
FGFR1-ECD.339-Fc/Доцетаксел сопутственно	27 (±55)	96	<0,001
FGFR1-ECD.339-Fc/Доцетаксел последовательно	99 (±117)	88	<0,001
Доцетаксел/FGFR1-ECD.339-Fc последовательно	72 (±109)	91	<0,001

Введение только FGFR1-ECD.339-Fc привело к 33% ($p<0,01$) ингибированию роста опухоли, а введение только доцетакселя привело к 74% ($p<0,001$) ингибированию роста опухоли. Последовательное введение FGFR1-ECD.339-Fc вначале привело к 88% ($p<0,001$) ингибированию роста опухоли, и последовательное введение вместе с доцетакселем привело к 91% ($p<0,001$) ингибированию роста опухоли. Наконец, сопутственное введение FGFR1-ECD.339-Fc и доцетакселя привело к 96% ($p<0,001$) ингибированию роста опухоли.

Фракционный анализ объема опухоли использовали для оценки степени повышенного (аддитивного или синергического) или пониженного (антагонистического) ингибирования роста опухоли в комбинациях последовательного или сопутственного введения FGFR1-ECD.339-Fc и доцетакселя. Результаты данного анализа приведены в табл. 4.

Таблица 4. Анализ фракционного объема опухоли[a] на день 38

	FGFR1-ECD.339-Fc	Доцетаксел	Ожидаемое значение[b]	Наблюдаемое значение	Ожидаемое/Наблюдаемое значение[c]
Сопутственно	0.68	0.25	0.17	0.03	5.67
FGFR1-ECD.339-Fc/ Доцетаксел последовательно	0.68	0.25	0.17	0.11	1.55
Доцетаксел/ FGFR1-ECD.339-Fc последовательно	0.68	0.25	0.17	0.09	1.89

[a] Фракционный объем опухоли (FTV) = (Средний объем опухоли, подвергнутой воздействию (TV))/(Средний TV контроля)

[b] Ожидаемое значение = (FTV препарата 1)×(FTV препарата 2)

[c] Соотношение ожидаемых и наблюдаемых значений, >2=синергичное; ~1=аддитивное; <0,5=антагонистическое.

Такие результаты показывают, что сопутственное введение FGFR1-ECD.339-Fc и доцетакселя привело к синергичному ингибированию роста опухоли, в то время как последовательное введение FGFR1-ECD.339-Fc и доцетакселя привело к аддитивному ингибированию.

Пример 2. Введение FGFR1-ECD.339-Fc и пеметрекседа в модели ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) H520

Самки мышей SCID в возрасте шести-восьми недель были приобретены у Charles River Laboratories (Wilmington, MA) и акклиматизированы в течение 1 недели перед началом исследования. В качестве модели опухоли использовали линию клеток NCI-H520 рака чешуйчатых клеток легкого человека, которая была приобретена у ATCC (Manassas, VA; Cat. No. HTB-182). Клетки были культивированы от трех до четырех пассажей в RPMI + 10% FBS + 1% L-глутамин при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO_2. Когда культивированные клетки достигли 85-90% конфлюэнтности, клетки были собраны и ресуспендированы в холодном и не содержащем Ca^{2+} и Mg^{2+} PBS, содержащем 50% Matrigel в концентрации $3,5\times10^7$ клеток/мл. Клетки были имплантированы подкожно вдоль правого бока мышей в концентрации $3,5\times10^6$ клеток/100 мкл/мышь. Спустя один день после имплантации опухоли мыши были рандомизированы согласно массе тела в количестве 10 мышей на группу. Введение дозы всем группам было начато на один день после имплантации опухоли.

FGFR1-ECD.339-Fc был приготовлен а PBS в концентрации 3 мг/мл и введен интраперитонеально (и/п) в дозе 15 мг/кг (300 мкг/100 мкл/мышь) дважды в неделю в течение шести недель. Пеметрекседа динатрий был приобретен у Fisher Scientific (Pittsburgh, PA; Cat. No. NC9564691) и приготовлен в физиологическом растворе USP при 12,5, 25 и 50 мг/мл. Пеметрексед вводили и/п в трех разных уровнях доз: 62,6 мг/кг (1,25 мг/100 мкл/мышь); 125 мг/кг (2,5 мг/100 мкл/мышь) и 250 мг/кг (5 мг/100 мкл/мышь) ежедневно в течение пяти недель в первую неделю и ежедневно в течение пяти дней в неделю 2. В комбинированных группах FGFR1-ECD.339-Fc и пеметрексед вводили с этим же самым графиком, что при введении отдельных агентов и вводили сопутственно на дни 1, 4, 8 и 11. Человеческий альбумин был приобретен у Grifols USA (Los Angeles, CA; Cat. No. NDC 61953-0002-1), приготовлен в PBS при 3 мг/мл и использован в качестве отрицательного контроля в дозе 300 мкг/100 мкл/мышь (15 мг/кг). График введения доз для каждой группы мышей представлен в табл. 5.

Таблица 5. График введения дозы

Группа	n	Путь введения	Лечение	Доза	График
1	10	и/п	Альбумин	15 мг/кг	2 раза в неделю x 6 недель
2	10	и/п	FGFR1-ECD.339-Fc	15 мг/кг	2 раза в неделю x 6 недель
3	10	и/п	Пеметрексед	62,5 мг/кг	Каждый день x 5 x 2 цикла
4	10	и/п	Пеметрексед	125 мг/кг	Каждый день x 5 x 2 цикла
5	10	и/п	Пеметрексед	250 мг/кг	Каждый день x 5 x 2 цикла
6	10	и/п и/п	FGFR1-ECD.339-Fc Пеметрексед	15 мг/кг 62,5 мг/кг	2 раза в неделю x 6 недель Каждый день x 5 x 2 цикла
7	10	и/п и/п	FGFR1-ECD.339-Fc Пеметрексед	15 мг/кг 125 мг/кг	2 раза в неделю x 6 недель Каждый день x 5 x 2 цикла
8	10	и/п и/п	FGFR1-ECD.339-Fc Пеметрексед	15 мг/кг 250 мг/кг	2 раза в неделю x 6 недель Каждый день x 5 x 2 цикла

Объем опухоли и массу тела мышей контролировали дважды в неделю в течение всего исследования. Объем опухоли был измерен и рассчитан с использованием способа и формулы, описанных в примере 1.

Животные были умерщвлены, если перед окончанием исследования отмечался любой из следующих признаков: потеря массы тела ≥ 15% от начальной массы тела; изъязвление опухоли ≥30% от площади поверхности опухоли; мыши были агонизирующими; или отдельный объем опухоли был ≥2000 мм^3. Мыши были умерщвлены ингаляцией изофлураном и смещением шейных позвонков. Средний объем опухоли в течение исследования в группах с введением низкой дозы пеметрекседа, средней дозы пеметрекседа и высокой дозы пеметрекседа представлены на фиг. 2A, 3A и 4A, соответственно. Фиг. 2B, 3B и 4B представляют массу тела мышей в каждой группе в течение курса исследования. Оказалось, что 250 мг/кг пеметрекседа является максимально переносимой дозой у мышей, основываясь на потери массы тела после введения такой дозы. См. фиг. 4B. Введение FGFR1-ECD.339-Fc или пеметрекседа в низкой или средней дозе привело к ингибированию опухоли в течение хода исследования. Самая высокая доза взятого отдельно пеметрекседа не ингибировала рост опухоли. Сопутственное введение дозы FGFR1-ECD.339-Fc и пеметрекседа привело к большему ингибированию роста опухоли, однако ингибирование опухоли, отмечаемое для комбинации FGFR1-ECD.339-Fc и наивысшей дозы пеметрекседа, не было статистически значимым. Графики массы тела отображают, что мыши хорошо переносили низкую и среднюю дозы пеметрекседа. При высокой дозе пеметрекседа мыши вначале теряли массу тела по существу. Таким образом, введение дозы было остановлено спустя первые 5 дней введения. Таким образом, в группе высокой дозы животные принимали только первые пять доз и пропустили вторые пять доз.

Объем опухоли в каждой группе мышей на день 49 был проанализирован однофакторным дисперсионным анализом с последующим проведением критерия Тьюки. Результаты данного анализа приведены в табл. 6.

Таблица 6.Анализ объема опухоли на день 49

	Средний объем опухоли мм^3(±CO)	Ингибирование роста опухоли (%)	Значение p в сравнении с контролем (критерий Тьюки)
Альбумин	917.3 (±313.9)	-	-
FGFR1-ECD.339-Fc	630.4 (±461.5)	31	>0.05
Пеметрексед 62,5 мг/кг	544.7 (±341.5)	40	>0.05
FGFR1-ECD.339-Fc/Пеметрексед 62,5 мг/кг	292.5 (±198.5)	68	<0.01
Пеметрексед 125 мг/кг	689.5 (±328.7)	24	>0.05
FGFR1-ECD.339-Fc/Пеметрексед 125 мг/кг	389.2 (±271.3)	57	<0.05
Пеметрексед 250 мг/кг	926.6 (±339.9)	1	>0.05
FGFR1-ECD.339-Fc/Пеметрексед 250 мг/кг	489.3 (±231.0)	46	>0.05

Введение только FGFR1-ECD.339-Fc привело к 31% (p>0,05) ингибированию роста опухоли, и введение только пеметрекседа в дозах 62,5, 125 или 250 мг/кг привело к 40, 24 или 1% (p>0,05) ингибированию роста опухоли, соответственно. Сопутственное введение FGFR1-ECD.339-Fc (15 мг/кг) и пеметрекседа в дозах 62,5, 125 или 250 мг/кг привело к 68% (p<0,01), 57% (p<0,05) или 46% (p>0,05) ингибированию роста опухоли соответственно.

Фракционный анализ объема опухоли использовали для оценки степени повышенного (аддитивного или синергического) или пониженного (антагонистического) ингибирования роста опухоли после введения FGFR1-ECD.339-Fc и пеметрекседа. Результаты данного анализа приведены в табл. 7.

Таблица 7. Анализ фракционного объема опухоли[a] на день 49

	FGFR1-ECD.339-Fc	Пеметрексед	Ожидаемое значение[b]	Наблюдаемое значение	Ожидаемое/ Наблюдаемое значение[c]
Пеметрексед 62,5	0.68	0.59	0.40	0.31	1.29
Пеметрексед 125	0.68	0.75	0.51	0.42	1.21
Пеметрексед 250	0.68	1.00	0.68	0.53	1.28

[a] Фракционный объем опухоли (FTV) = (Средний объем опухоли, подвергнутой воздействию (TV))/(Средний TV контроля)

[b] Ожидаемое значение = (FTV препарата 1)×(FTV препарата 2)

[c] Соотношение ожидаемых и наблюдаемых значений, >2=синергичное; ~1=аддитивное; <0,5=антагонистическое.

Эти результаты показывают, что введение FGFR1-ECD.339-Fc и пеметрекседа привело к аддитивному ингибированию роста опухоли.

Пример 3. Введение FGFR1-ECD.339-Fc в комбинации с различными препаратами химиотерапии в модели ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) A549

Самки мышей SCID в возрасте шести недель были приобретены у Charles River Laboratories (Wilmington, MA) и акклиматизированы в течение 1 недели перед началом исследования. Клетки A549 были приобретены у ATCC (Manassas, VA; Cat. No. CCL-185) и были культивированы в трех пассажах в RPMI + 10% FBS + 1% L-глутамин при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO_2. Когда культивированные клетки достигли 85-90% конфлюэнтности, клетки были собраны и ресуспендированы в холодном и не содержащем Ca^{2+} и Mg^{2+} забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS), содержащем 50% Matrigel в концентрации 5×10^7 клеток на мл. Клетки были имплантированы подкожно вдоль правого бока мышей в концентрации 5×10^6 клеток/100 мкл/мышь. Спустя один день после имплантации опухоли мыши были рандомизированы согласно массе тела в количестве 10 мышей на группу.

Объем опухоли и массу тела мышей контролировали дважды в неделю в течение каждого исследования. Объем опухоли был измерен и рассчитан с использованием способа и формулы, описанных в примере 1.

Объем опухоли в каждой группе мышей по окончании каждого исследования был проанализирован однофакторным дисперсионным анализом с последующим проведением критерия Тьюки. Фракционный анализ объема опухоли затем использовали для оценки степени повышенного (аддитивного или синергического) или пониженного (антагонистического) ингибирования роста опухоли после введения FGFR1-ECD.339-Fc с одним или несколькими дополнительными молекулами химиотерапии. Определенные детали исследования и результаты каждой комбинации обсуждаются ниже.

A. FGFR1-ECD.339-FC и цисплатин.

FGFR1-ECD.339-Fc был приготовлен в 0,9% растворе натрия хлорида для инъекций USP (Henry Schein, Inc., Melville, NY; Cat. No. 1533826) при 4 мг/мл и введен интраперитонеально (и/п) в дозе 20 мг/кг (400 мкг/100 мкл/мышь) два раза в неделю в течение шести недель. Цисплатин был приобретен у Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; Cat. No. P4394), приготовлен в 0,9% физиологическом растворе и введен и/п в дозе 3,5 мг/кг (17 мкг/100 мкл на мышь) один раз в неделю в течение шести недель. Физиологический раствор использовали в качестве отрицательного контроля и вводили и/п в дозе 100 мкл на мышь два раза в неделю в течение шести недель.

На день 42, когда средний объем опухоли в группе носителя достиг 1300 $мм^3$, мыши были умерщвлены ингаляцией изофлурана и смещением шейных позвонков. Средний объем опухоли в течение исследования для каждой подгруппы мышей представлен на фиг. 5. В этом эксперименте введение FGFR1-ECD.339-Fc и цисплатина ингибировало рост опухоли в большей степени по сравнению только с препаратом. Кроме того, в течение данного исследования мыши не теряли свой вес (данные не указаны).

Объем опухоли в каждой группе мышей на день 42 был проанализирован однофакторным дисперсионным анализом с последующим проведением критерия Тьюки. Результаты данного анализа приведены в табл. 8.

Таблица 8. Анализ объема опухоли на день 42

	Средний объем опухоли $мм^3$(±СО)	Ингибирование роста опухоли (%)	Значение p в сравнении с контролем (критерий Тьюки)
Носитель – физиологический раствор	1339 (±411)	-	-
FGFR1-ECD.339-Fc	807 (±431)	39	<0,01
Цисплатин	682 (±195)	49	<0,001
FGFR1-ECD.339-Fc	382 (±210)	71	<0,001
+ цисплатин			

Для определения того, привела ли комбинация FGFR1-ECD.339-Fc и цисплатина к повышенной (аддитивной или синергической) или пониженной (антагонистической) противоопухолевой активности, фракционный объем опухоли был проанализирован, как это описано в примере 1. Результаты данного анализа приведены в табл. 9.

Таблица 9. Анализ фракционного объема опухоли[a] на день 42 в сравнении с контролем

	FGFR1-ECD.339-Fc	Цисплатин	Ожидаемое значение [b]	Наблюдаемое значение	Ожидаемое/Наблюдаемое значение[c]
FGFR1-ECD.339-Fc + цисплатин	0.60	0.5	0.30	0.28	1.07

[a] Фракционный объем опухоли (FTV) = (Средний объем опухоли, подвергнутой воздействию (TV))/(Средний TV контроля)

[b] Ожидаемое значение = (FTV препарата 1)×(FTV препарата 2)

[c] Соотношение ожидаемых и наблюдаемых значений, >2=синергичное; ~1=аддитивное; <0,5=антагонистическое.

Эти результаты показывают, что комбинация FGFR1-ECD.339-Fc и цисплатина привела к аддитивному ингибированию роста опухоли в данном эксперименте.

B. FGFR1-ECD.339-FC и паклитаксел.

Комбинация FGFR1-ECD.339-Fc и паклитакселя была тестирована в модели ксенотрансплантата A549 немелкоклеточного рака легкого человека, описанной выше. FGFR1-ECD.339-Fc был приготовлен в 0,9% физиологическом растворе для инъекций USP при 3 мг/мл. Паклитаксел был приобретен у Bedford Laboratories (Bedford, OH; Cat. No. 1075029) и был приготовлен в 0,9% физиологическом растворе для инъекций, содержащем 5% декстрозы, в концентрации 3,6 мг/мл для дозы 18 мг/кг. FGFR1-ECD.339-Fc вводили интраперитонеально (и/п) в дозе 15 мг/кг дважды в неделю в течение 5 недель. Паклитаксел вводили и/п в дозе 18 мг/кг на дни 8, 12 и 15.

Когда средний объем опухоли в группе носителя достиг ~500 мм^3, мыши были умерщвлены ингаляцией изофлурана и смещением шейных позвонков. Средний объем опухоли в течение исследования для каждой подгруппы мышей представлен на фиг. 6. В этом эксперименте комбинация FGFR1-ECD.339-Fc и паклитакселя ингибировала рост опухоли в большей степени по сравнению только с препаратом. Кроме того, в течение данного исследования мыши не теряли свой вес (данные не указаны).

Для определения того, привела ли комбинация FGFR1-ECD.339-Fc и паклитакселя к аддитивной, синергической или антагонистической активности, был проанализирован фракционный объем опухоли на день 31 и день 38, как это описано в примере 1. Результаты данного анализа приведены в табл. 10.

Таблица 10. Анализ фракционного объема опухоли[a] на день 31 и день 38

День	FGFR1-ECD.339-Fc	Паклитаксел	Ожидаемое значение[b]	Наблюдаемое значение	Ожидаемое/Наблюдаемое значение[c]
31	0.84	0.57	0.48	0.26	1.81
38	0.89	0.50	0.45	0.39	1.13

[a] Фракционный объем опухоли (FTV) = (Средний объем опухоли, подвергнутой воздействию (TV))/(Средний TV контроля)

[b] Ожидаемое значение = (FTV препарата 1)×(FTV препарата 2)

[c] Соотношение ожидаемых и наблюдаемых значений, >2=синергичное; ~1=аддитивное; <0,5=антагонистическое.

Эти результаты показывают, что введение FGFR1-ECD.339-Fc и паклитакселя привело к аддитивному ингибированию роста опухоли.

C. FGFR1-ECD.339-FC и 5-ФУ.

Комбинация FGFR1-ECD.339-Fc и 5-фторурацила (5-ФУ) была тестирована в модели ксенотрансплантата A549 немелкоклеточного рака легкого человека, описанной выше. FGFR1-ECD.339-Fc был приготовлен в 0,9% физиологическом растворе для инъекций USP при 3 мг/мл. 5-ФУ был приобретен у Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; Cat. No. F6627) и был изначально растворен в диметилсульфоксиде (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Cat. No. D8418-50) при концентрации 50 мг/мл в качестве маточного раствора. Маточный раствор был дополнительно разведен 0,9% раствором натрия хлорида для инъекций USP до 6,6 мг/мл (для дозы 33 мг/мл). FGFR1-ECD.339-Fc вводили интраперитонеально (и/п) в дозе 15 мг/кг дважды в неделю в течение четырех недель. 5-ФУ вводили и/п в дозе 33 мг/кг дважды в неделю в течение трех недель. Мыши были умерщвлены на день 31 ингаляцией изофлурана и смещением шейных позвонков.

Средний объем опухоли в течение исследования для каждой подгруппы мышей представлен на фиг. 7. В этом эксперименте комбинация FGFR1-ECD.339-Fc и 5-ФУ ингибировала рост опухоли в большей степени по сравнению только с препаратом. Кроме того, в течение данного исследования мыши не теряли свой вес (данные не указаны.) Для определения того, привела ли комбинация FGFR1-ECD.339-Fc и 5-

ФУ к аддитивной, синергической или антагонистической активности, был проанализирован фракционный объем опухоли на день 31, как это описано в примере 1. Результаты данного анализа приведены в табл. 11.

Таблица 11. Анализ фракционного объема опухоли[a] на день 31

День	FGFR1-ECD.339-Fc	5-ФУ	Ожидаемое значение[b]	Наблюдаемое значение	Ожидаемое/Наблюдаемое значение[c]
31	0.84	1.04	0.89	0.38	2.33

[a] Фракционный объем опухоли (FTV) = (Средний объем опухоли, подвергнутой воздействию (TV))/(Средний TV контроля)

[b] Ожидаемое значение = (FTV препарата 1)×(FTV препарата 2)

[c] Соотношение ожидаемых и наблюдаемых значений, >2=синергичное; ~1=аддитивное; <0,5=антагонистическое.

Эти результаты показывают, что введение FGFR1-ECD.339-Fc и 5-ФУ привело к синергическому ингибированию роста опухоли в данном эксперименте. Исследователи отмечают, что подобные эксперименты с использованием 20 или 50 мг/кг 5-ФУ не привели к синергии (данные не указаны.)

D. FGFR1-ECD.339-FC и доцетаксел.

Комбинация FGFR1-ECD.339-Fc и доцетакселя была тестирована в модели ксенотрансплантата A549 немелкоклеточного рака легкого человека, описанной выше. FGFR1-ECD.339-Fc был приготовлен в PBS в концентрации 3 мг/мл и введен интраперитонеально (и/п) в дозе 15 мг/кг (300 мкг/100 мкл/мышь) дважды в неделю в течение четырех недель. Доцетаксел вводили и/п в дозе 3 или 10 мг/кг дважды в неделю в течение четырех недель.

Мыши в группе контроля альбумином были умерщвлены на день 31 ингаляцией изофлурана и смещением шейных позвонков, когда средний размер опухоли в группе достиг 1000 мм^3.

Средний размер опухоли в течение исследования в каждой подгруппе мышей показан на фиг. 8A (3 мг/кг доцетакселя) и 8B (10 мг/кг доцетакселя). В этом эксперименте комбинация FGFR1-ECD.339-Fc и доцетакселя ингибировала рост опухоли в большей степени по сравнению только с препаратом при любой дозе доцетакселя.

Кроме того, в течение данного исследования мыши не теряли свой вес при любой дозе доцетакселя (данные не указаны).

Для определения того, привела ли комбинация FGFR1-ECD.339-Fc и доцетакселя к аддитивной, синергической или антагонистической активности, был проанализирован фракционный объем опухоли на день 32, как это описано в примере 1.

Результаты данного анализа приведены в табл. 12.

Таблица 12. Анализ фракционного объема опухоли[a] на день 32

День	FGFR1-ECD.339-Fc	Доцетаксел	Ожидаемое значение[b]	Наблюдаемое значение	Ожидаемое/ Наблюдаемое значение[c]
32 (3 мг/кг доцетакселя)	0.54	0.79	0.43	0.44	0.95
32 (10 мг/кг доцетакселя)	0.54	0.58	0.31	0.42	0.73

[a] Фракционный объем опухоли (FTV) = (Средний объем опухоли, подвергнутой воздействию (TV))/(Средний TV контроля)

[b] Ожидаемое значение = (FTV препарата 1)×(FTV препарата 2)

[c] Соотношение ожидаемых и наблюдаемых значений, >2=синергичное; ~1=аддитивное; <0,5=антагонистическое.

Эти результаты показывают, что введение FGFR1-ECD.339-Fc и доцетакселя привело к аддитивному ингибированию роста опухоли в данном эксперименте.

E. FGFR1-ECD.339-FC и винкристин.

Комбинация FGFR1-ECD.339-Fc и винкристина была тестирована в модели ксенотрансплантата A549 немелкоклеточного рака легкого человека, описанной выше. FGFR1-ECD.339-Fc был приготовлен в 0,9% физиологическом растворе для инъекций USP при 1,5 мг/мл для введения в дозе 15 мг/кг (300 мкг/200 мкл на мышь), или 2 мг/мл для введения в дозе 20 мг/кг (400 мкг/200 мкл на мышь). Винкристин был получен у Fluka-Sigma (St. Louis, MO 63103, Catalog #V8879) и был приготовлен в 0,9% физиологическом растворе для инъекций USP при 0,1 или 0,15 мг/мл для введения в дозе 1 мг/кг (0,02 мкг/100 мкл на мышь) или 1,5 мг/кг (0,03 мкг/200 мкл на мышь), соответственно.

В первом эксперименте FGFR1-ECD.339-Fc вводили интраперитонеально (и/п) в дозе 15 мг/кг два-

жды в неделю, начиная с дня 1 в течение шести недель, и винкристин вводили и/п в дозе 1 мг/кг на дни 8, 15 и 22. Во втором эксперименте FGFR1-ECD.339-Fc вводили интраперитонеально (и/п) в дозе 20 мг/кг дважды в неделю, начиная с дня 19 в течение семи недель, и винкристин вводили и/п в дозе 1,5 мг/кг на дни 27, 34 и 41. Мыши из первого эксперименты были умерщвлены на день 46 после имплантации опухоли. Во втором исследовании мыши в группе контроля альбумином и мыши в группе FGFR1-ECD.339-Fc были умерщвлены на 70 день после имплантации опухоли, в то время как мыши в группе винкристина были умерщвлены на день 77 после имплантации опухоли. Все мыши были умерщвлены ингаляцией изофлураном и смещением шейных позвонков.

Средний объем опухоли в течение исследования каждой группы мышей представлен на фиг. 9A (1 мг/кг винкристина; доза, начиная со дня 1) и 9B (1,5 мг/кг винкристина; доза, начиная со дня 19). В этом эксперименте комбинация FGFR1-ECD.339-Fc и винкристина ингибировала рост опухоли в большей степени по сравнению только с препаратом при любой дозе винкристина и при любом графике введения доз. Кроме того, при низкой дозе винкристина мыши не теряли в весе (данные не указаны). При более высокой дозе винкристина мыши теряли в весе, что указывало на то, что более высокая доза приближается к максимально переносимой дозе. См. фиг. 9C. Для определения того, привела ли комбинация FGFR1-ECD.339-Fc и винкристина к аддитивной, синергической или антагонистической активности, был проанализирован фракционный объем опухоли на день 39 и день 46 для первого эксперимента и день 70 для второго эксперимента, как это описано в примере 1. Результаты данного анализа приведены в табл. 13.

Таблица 13. Анализ фракционного объема опухоли[a]

Доза FGFR1-ECD.339-Fc	Доза винкристина	День	FGFR1-ECD.339-Fc	Винкристин	Ожид.[b]	Наблюд.	Ожидаемое/ Наблюдаемое значение[c]
15 мг/кг (начиная с дня 1)	1 мг/кг	39	0.50	0.53	0.27	0.23	1.16
15 мг/кг (начиная с дня 1)	1 мг/кг	46	0.40	0.55	0.22	0.24	0.91
20 мг/кг (начиная с дня 19)	1,5 мг/кг	70	0.71	0.41	0.29	0.14	2.07

[a] Фракционный объем опухоли (FTV) = (Средний объем опухоли, подвергнутой воздействию (TV))/(Средний TV контроля)

[b] Ожидаемое значение = (FTV препарата 1)×(FTV препарата 2)

[c] Соотношение ожидаемых и наблюдаемых значений, >2=синергичное; ~1=аддитивное; <0,5=антагонистическое.

Эти результаты показывают, что введение FGFR1-ECD.339-Fc и винкристина привело к аддитивному ингибированию роста опухоли при более низкой дозе винкристина, и синергическому ингибированию роста опухоли при более высокой дозе винкристина.

F. FGFR1-ECD.339-Fc, карбоплатин и паклитаксел.

Комбинация FGFR1-ECD.339-Fc, карбоплатина и паклитакселя была тестирована в модели ксенотрансплантата A549 немелкоклеточного рака легкого человека, описанной выше. FGFR1-ECD.339-Fc был приготовлен в 0,9% физиологическом растворе для инъекций USP при 3 мг/мл (для введения в дозе 15 мг/кг). Карбоплатин был получен у Sigma-Aldrich (St. Luis, MO 63103, Catalog # C2538) и приготовлен в 0,9% физиологическом растворе для инъекций USP при 2,5 мг/мл для введения в дозе 25 мг/кг (500 мкг/200 мкл на мышь). Паклитаксел был получен у LC Laboratories (Woburn, MA 01801; Catalog # P-9600) и приготовлен в растворе 50,3% Кремофора® и 49,7% дегидратированного спирта при 20 мг/мл в качестве маточного раствора. Маточный раствор был дополнительно разведен в 5% декстрозе в 0,9% физиологическом растворе для инъекций USP при 3 мг/мл для введения в дозе 30 мг/кг (600 мкг/200 мкл на мышь).

FGFR1-ECD.339-Fc вводили интраперитонеально (и/п) в дозе 15 мг/кг дважды в неделю в течение трех недель, начиная на день 7. Карбоплатин вводили и/п в дозе 25 мг/кг дважды в неделю в течение трех недель, начиная на день 7. Паклитаксел вводили и/п в дозе 30 мг/кг дважды в неделю в течение трех недель, начиная на день 8.

Мыши были умерщвлены на день 34 в группах с введением одного агента и на день 41 в комбинированных группах. Мыши были умерщвлены ингаляцией изофлураном и смещением шейных позвонков.

Средний объем опухоли в течение исследования для каждой подгруппы мышей представлен на фиг. 10. В этом эксперименте комбинация FGFR1-ECD.339-Fc, карбоплатина и паклитакселя ингибировала

рост опухоли в большей степени, чем любой из препаратов поодиночке, и также в большей степени, чем комбинация карбоплатина и паклитакселя. В течение хода исследования потери веса не отмечалось (данные не указаны).

Для определения того, привела ли комбинация FGFR1-ECD.339-Fc, карбоплатина и паклитакселя к аддитивной, синергической или антагонистической активности, был проанализирован фракционный объем опухоли на день 28, как это описано в примере 1. Результаты данного анализа приведены в табл. 14.

Таблица 14. Анализ фракционного объема опухоли[a]

День	FGFR1-ECD.339-Fc	Паклитаксел + карбоплатин	Ожидаемое значение[b]	Наблюдаемое значение	Ожидаемое/ Наблюдаемое значение[c]
28	0.58	0.27	0.16	0.14	1.15

[a] Фракционный объем опухоли (FTV) = (Средний объем опухоли, подвергнутой воздействию (TV))/(Средний TV контроля)

[b] Ожидаемое значение = (FTV препарата 1)×(FTV препарата 2)

[c] Соотношение ожидаемых и наблюдаемых значений, >2=синергичное; ~1=аддитивное; <0,5=антагонистическое.

Эти результаты показывают, что введение FGFR1-ECD.339-Fc, карбоплатина и паклитакселя привело к аддитивному ингибированию роста опухоли в данном эксперименте.

Пример 4: Введение FGFR1-ECD.339-F в комбинации с различными препаратами химиотерапии в модели ксенотрансплантата Colo205 рака толстой кишки.

Клетки Colo205 были приобретены у ATCC (Manassas, VA; Cat. No. CCL-222) и культивированы в 3 пассажах в среде RPMI1640, 10% FBS и 1% L-глутамина при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO_2. Клетки были ресуспендированы в растворе 50%/o PBS и 50%/o Matrigel в концентрации 25 миллионов клеток/мл. Ресуспендированные клетки хранили на льду перед имплантацией. Самки мышей SCID в возрасте шести недель были приобретены у Charles River Laboratories (Wilmington, MA) и акклиматизированы в течение 1 недели перед началом исследования. На день 0 2,5 млн клеток/100 мкл были имплантированы вдоль правого бока каждой мыши с использованием иглы 27G1/2. Спустя один день после имплантации мыши были рандомизированы согласно массе тела. Объем опухоли и массу тела мышей контролировали дважды в неделю в течение каждого исследования. Объем опухоли был измерен и рассчитан с использованием способа и формулы, описанных в примере 1.

Объем опухоли в каждой группе мышей по окончании каждого исследования был проанализирован однофакторным дисперсионным анализом с последующим проведением критерия Тьюки. Фракционный анализ объема опухоли затем использовали для оценки степени повышенного (аддитивного или синергического) или пониженного (антагонистического) ингибирования роста опухоли после введения FGFR1-ECD.339-Fc с одним или несколькими дополнительными молекулами химиотерапии. Определенные детали исследования и результаты каждой комбинации обсуждаются ниже.

A. FGFR1-ECD.339-Fc, 5-ФУ, лейковорин и бевацизумаб.

FGFR1-ECD.339-Fc был приготовлен в 0,9% растворе натрия хлорида для инъекций USP (Henry Schein, Inc, Melville, NY; Cat. No. 1533826) при 2 мг/мл и хранили в пробирках для микроцентрифугирования с закручивающейся крышкой при -80°C. Реагент отрицательного контроля, человеческий альбумин, был получен у Grifols USA (Los Angeles, CA; Cat. No. NDC 61953-0002-1) и был приготовлен в PBS при 3 мг/мл. 5-ФУ был приобретен у Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; Cat. No. F6627) и был изначально растворен в диметилсульфоксиде (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Cat. No. D8418-50) при концентрации 50 мг/мл в качестве маточного раствора. Маточный раствор был дополнительно разведен в 0,9% растворе натрия хлорида для инъекций USP до 2 мг/мл (для дозы 10 мг/кг), до 4 мг/мл (для дозы 20 мг/кг) и до 6 мг/мл (для дозы 30 мг/кг). Лейковорин (LV) был также приобретен у Sigma-Aldrich (Cat. No. F8259) и был приготовлен в 0,9% растворе натрия хлорида для инъекций USP до 2 мг/мл (для дозы 10 мг/кг), до 4 мг/мл (для дозы 20 мг/кг) и до 6 мг/мл (для дозы 30 мг/кг). Бевацизумаб был приобретен у Genentech, Inc (South San Francisco, CA; Cat. No. 15734) и был разведен в 0,9% растворе натрия хлорида для инъекций USP до 0,2 мг/мл (для дозы 1 мг/кг).

В первом эксперименте FGFR1-ECD.339-Fc был скомбинирован с тремя разными концентрациями 5-ФУ/лейковорина. Во втором эксперименте FGFR1-ECD.339-Fc был скомбинирован с бевацизумабом или 5-ФУ/лейковорином, или обоими вариантами. Группировка и график введения доз для экспериментов представлены в табл. 15. Двойная линия отделяет группы из двух экспериментов.

Таблица 15. График введения доз (введение дозы, начиная с одного дня после имплантации опухоли)

N	Лечение	Препарат 1 (Доза, путь введения, график)	Препарат 2 (Доза, путь введения, график)	Препарат 3 (Доза, путь введения, график)
10	Альбумин+ Носитель	Альбумин (10 мг/кг, и/п, 3х/неделя х 4 недель)	Физиологический раствор (100 мкл, каждый день х 5 дней)	-
10	FGFR1-ECD.339-Fc	FGFR1-ECD.339-Fc (15 мг/кг, и/п, 3х/неделя х 4 недель)	-	-
10	5-ФУ/LV	5-ФУ (10 мг/кг, и/п, каждый день х 5 дней)	LV (10 мг/кг, и/п, каждый день х 5 дней)	
	FGFR1-ECD.339-Fc + 5-ФУ/LV (10 мг/кг)	FGFR1-ECD.339-Fc (15 мг/кг, и/п, 3х/неделя х 4 недель)	5-ФУ (10 мг/кг, и/п, каждый день х 5 дней)	LV (10 мг/кг, и/п, каждый день х 5 дней)
10	5-ФУ/LV	5-ФУ (20 мг/кг, и/п, каждый день х 5 дней)	LV (20 мг/кг, и/п, каждый день х 5 дней)	
	FGFR1-ECD.339-Fc + 5-ФУ/LV (20 мг/кг)	FGFR1-ECD.339-Fc (15 мг/кг, и/п, 3х/неделя х 4 недель)	5-ФУ (20 мг/кг, и/п, каждый день х 5 дней)	LV (20 мг/кг, и/п, каждый день х 5 дней)
10	5-ФУ/LV	5-ФУ (30 мг/кг, и/п, каждый день х 5 дней)	LV (30 мг/кг, и/п, каждый день х 5 дней)	

	FGFR1-ECD.339-Fc + 5-ФУ/LV (30 мг/кг)	FGFR1-ECD.339-Fc (15 мг/кг, и/п, 3х/неделя х 4 недель)	5-ФУ (30 мг/кг, и/п, каждый день х 5 дней)	LV (30 мг/кг, и/п, каждый день х 5 дней)
10	Бевацизумаб	Бевацизумаб (1 мг/кг, и/п, 2х/неделя х 4 недель)		-
10	Бевацизумаб + 5-ФУ/LV	Бевацизумаб (1 мг/кг, и/п, 2х/неделя х 4 недель)	5-ФУ/LV (10 мг/кг каждый, и/п, каждый день х 5 дней)	-
10	FGFR1-ECD.339-Fc	FGFR1-ECD.339-Fc (15 мг/кг, и/п, 3х/неделя х 4 недель)	-	-
10	FGFR1-ECD.339-Fc + бевацизумаб	FGFR1-ECD.339-Fc (15 мг/кг, и/п, 3х/неделя х 4 недель)	Бевацизумаб (1 мг/кг, и/п, 2х/неделя х 4 недель)	-
10	FGFR1-ECD.339-Fc + Бевацизумаб + 5-ФУ/LV	FGFR1-ECD.339-Fc (15 мг/кг, и/п, 3х/неделя х 4 недель)	Бевацизумаб (1 мг/кг, и/п, 2х/неделя х 4 недель)	5-ФУ/LV (10 мг/кг каждый, и/п, каждый день х 5 дней)

Когда средний объем опухоли в группе достиг около 600 мм^3, мыши в этой группе были умерщвлены ингаляцией изофлурана и смещением шейных позвонков. Средний объем опухоли в течение исследования для каждой подгруппы мышей представлен на фиг. 11. При 20 мг/кг 5-ФУ/лейковорина и 30 мг/кг 5-ФУ/лейковорина мыши потеряли около 3 г и около 4 г массы тела, соответственно (около 14 и 19%, соответственно) (данные не указаны). В любой оставшейся группе потеря массы тела у мышей не отмечалась. (Данные не указаны.)

Степень эффективности различных способов лечения была оценена двумя способами:

1) средний объем опухоли в каждой группе в отдельной временной точке (день) и

2) время для среднего объема опухоли в каждой группе для достижения 500 мм^3 (см. пунктирную линию на фиг. 11E).

Результаты данного эксперимента согласно обоим способам указывают, что противоопухолевый эффект в различных группах лечения был в следующем порядке: FGFR1-ECD.339-Fc, бевацизумаб и 5-ФУ/лейковорин > FGFR1-ECD.339-Fc и бевацизумаб > бевацизумаб и 5-ФУ/лейковорин = бевацизумаб > FGFR1-ECD.339-Fc > носитель. Средний объем опухоли в каждой группе мышей во втором эксперименте на день 24 был проанализирован однофакторным дисперсионным анализом с последующим проведением критерия Тьюки. Результаты данного анализа приведены в табл. 16.

Таблица 16. Анализ объема опухоли на день 24

	Средний объем опухоли мм^3(±CO)	Ингибирование роста опухоли (%)	Значение p в сравнении с контролем (критерий Тьюки)
Альбумин+носитель	693 (±159)	-	-
FGFR1-ECD.339-Fc	509 (±144)	26	<0.05
5-ФУ/LV	511 (±196)	26	>0.05
Бевацизумаб	405 (±56)	41	<0,001
Бевацизумаб + 5-ФУ/LV	399 (±131)	42	<0,001
FGFR1-ECD.339-Fc + бевацизумаб	322 (±116)	53	<0,001
FGFR1-ECD.339-Fc + бевацизумаб + 5-ФУ/LV	269 (±83)	61	<0,001

Для определения факта, что введение FGFR1-ECD.339-Fc и 5-ФУ/лейковорина при различных кон-

центрациях; FGFR1-ECD.339-Fc и бевацизумаба; или FGFR1-ECD.339-Fc, бевацизумаба и 5-ФУ/лейковорина привело к аддитивной, синергической или антагонистической активности, фракционный объем опухоли был проанализирован, как это описано в примере 1. Результаты данного анализа приведены в табл. 17.

Таблица 17. Анализ фракционного объема опухоли[a]

День 16	FGFR1-ECD.339-Fc	5-ФУ/LV (10 мг/кг)	Ожидаемое значение [b]	Наблюдаемое значение	Ожидаемое/Наблюдаемое значение[c]
	0.76	0.86	0.67	0.62	1.08
День 16	FGFR1-ECD.339-Fc	5-ФУ/LV (20 мг/кг)	Ожидаемое значение [b]	Наблюдаемое значение	Ожидаемое/Наблюдаемое значение[c]
	0.76	0.56	0.42	0.42	1.00
День 16	FGFR1-ECD.339-Fc	5-ФУ/LV (30 мг/кг)	Ожидаемое значение [b]	Наблюдаемое значение	Ожидаемое/Наблюдаемое значение[c]
	0.76	0.36	0.27	0.28	0.96
День 24	FGFR1-ECD.339-Fc	Бевацизумаб	Ожидаемое значение [b]	Наблюдаемое значение	Ожидаемое/Наблюдаемое значение[c]
	0.73	0.58	0.42	0.46	0.91
День 24	FGFR1-ECD.339-Fc	Бевацизумаб / 5-ФУ/LV	Ожидаемое значение [b]	Наблюдаемое значение	Ожидаемое/Наблюдаемое значение[c]
	0.73	0.57	0.42	0.38	1.10

[a] Фракционный объем опухоли (FTV) = (Средний объем опухоли, подвергнутой воздействию (TV))/(Средний TV контроля)

[b] Ожидаемое значение = (FTV препарата 1)×(FTV препарата 2)

[c] Соотношение ожидаемых и наблюдаемых значений, >2=синергичное; ~1=аддитивное; <0,5=антагонистическое.

Такие результаты показывают, что введение FGFR1-ECD.339-Fc и 5-ФУ/лейковорина при различных концентрациях; FGFR1-ECD.339-Fc и бевацизумаба; или FGFR1-ECD.339-Fc, бевацизумаба и 5-ФУ/лейковорина привело к аддитивному ингибированию роста опухоли.

B. FGFR1-ECD.339-Fc, 5-ФУ, лейковорин и оксалиплатин.

Комбинация FGFR1-ECD.339-Fc, 5-ФУ, лейковорина и оксалиплатина была протестирована в модели ксенотрансплантата человека Colo205 и рака толстой кишки, как это описано выше. FGFR1-ECD.339-Fc был приготовлен в PBS при 3 мг/мл (для введения в дозе 15 мг/кг). 5-ФУ был приобретен у Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; Cat. No. F6627) и был изначально растворен в диметилсульфоксиде (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Cat. No. D8418-50) при концентрации 50 мг/мл в качестве маточного раствора. Маточный раствор был дополнительно разведен 0,9% раствора натрия хлорида для инъекций USP до 2 мг/мл (для дозы 10 мг/мл). Лейковорин также был приобретен у Sigma-Aldrich (Cat. No. F8259) и был приготовлен в 0,9% раствора натрия хлорида для инъекций USP до 2 мг/мл (для дозы 10 мг/мл). Оксалиплатин был получен у LC laboratories (Woburn, MA 01801; Catalog # O-7111) и был приготовлен в 5% растворе декстрозы для инъекций (Baxter, Deerfield, IL 60015; Catalog # 2B0082) при 1 мг/мл, 2 мг/мл и 3 мг/мл для введения в дозе 5 мг/кг (100 мкг/100 мкл на мышь), 10 мг/кг (200 мкг/100 мкл на мышь) и 15 мг/кг (300 мкг/100 мкл на мышь).

FGFR1-ECD.339-Fc вводили интраперитонеально (и/п) в дозе 15 мг/кг дважды в неделю в течение четырех недель, начиная на день 1. 5-ФУ и лейковорин каждый вводили и/п при 10 мг/кг ежедневно в течение пяти дней. Оксалиплатин вводили и/п в дозе 5, 10 или 15 мг/кг в одной дозе на день 1.

Мыши были умерщвлены на день 28 ингаляцией изофлурана и смещением шейных позвонков.

Средний объем опухоли в течение исследования для каждой подгруппы мышей представлен на фиг. 12. В этом эксперименте комбинация FGFR1-ECD.339-Fc, 5-ФУ, лейковорина и оксалиплатина ингибировала рост опухоли в большей степени, чем только FGFR1-ECD.339-Fc или комбинация 5-ФУ, лейковорина и оксалиплатина. Минимальная потеря массы тела у мышей отмечалась при введении 5 мг/кг оксалиплатина (0,78 г, или 4% массы тела); умеренная потеря массы тела отмечалась при введении 10 мг/кг (2,6 г, или 13% массы тела); и более сильная потеря массы тела отмечалась при введении 15 мг/кг оксалиплатина дважды в неделю (3,7 г, или 19% массы тела) (Данные не указаны).

Для определения того, привела ли комбинация FGFR1-ECD.339-Fc, 5-ФУ, лейковорина и оксалип-

латина к аддитивной, синергической или антагонистической активности, был проанализирован фракционный объем опухоли на день 17, как это описано в примере 1. Результаты данного анализа приведены в табл. 18.

Таблица 18. Анализ фракционного объема опухоли[a] на день 17

Доза оксалиплатина	FGFR1-ECD.339-Fc	Оксалиплатин/5-ФУ/LV	Ожидаемое значение[b]	Наблюдаемое значение	Ожидаемое/Наблюдаемое значение[c]
5 мг/кг	0.77	0.78	0.60	0.47	1.27
10 мг/кг	0.77	0.63	0.48	0.5	0.96
15 мг/кг дважды в неделю	0.77	0.46	0.35	0.36	0.97

[a] Фракционный объем опухоли (FTV) = (Средний объем опухоли, подвергнутой воздействию (TV))/(Средний TV контроля)

[b] Ожидаемое значение = (FTV препарата 1)×(FTV препарата 2)

[c] Соотношение ожидаемых и наблюдаемых значений, >2=синергичное; ~1=аддитивное; <0,5=антагонистическое.

Эти результаты показывают, что введение FGFR1-ECD.339-Fc, 5-ФУ, лейковорина и оксалиплатина привело к аддитивному ингибированию роста опухоли при каждой исследуемой дозе оксалиплатина в данном эксперименте.

Пример 5: Введение FGFR1-ECD.339-Fc, доксорубицина и паклитакселя в модели ксенотрансплантата JIMT-1 рака молочной железы.

Самки мышей SCID в возрасте шести недель были приобретены у Charles River Laboratories (Wilmington, MA) и акклиматизированы в течение 1 недели перед началом исследования. Линия клеток рака молочной железы человека JIMT-1 использовалась в качестве модели опухоли и была приобретена у Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ, Braunschweig, Germany; Cat. No. ACC 589). Клетки были культивированы в десяти пассажах в DMEM + 10% FBS + 1% L-глутамин и 1% пенициллина/стрептомицина при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO_2. Когда культивированные клетки достигли 85-90% конфлюэнтности, клетки были собраны и ресуспендированы в холодном и не содержащем Ca^{2+} и Mg^{2+} забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS), содержащем 50% Matrigel в концентрации 5×10^7 клеток на мл. Клетки были имплантированы подкожно вдоль правого бока мышей в концентрации 5×10^6 клеток/100 мкл/мышь. Спустя один день после имплантации опухоли, мыши были рандомизированы согласно массе тела в количестве 10 мышей на группу.

FGFR1-ECD.339-Fc был приготовлен в 0,9% физиологическом растворе для инъекций USP в концентрации 3 мг/мл и введен интраперитонеально (и/п) в дозе 15 мг/кг (300 мкг/100 мкл/мышь) дважды в неделю в течение пяти недель, начиная на день 7. Доксорубицин был получен у Sigma-Aldrich (St. Luis, MO; Catalog # 44583) и был приготовлен в 0,9% физиологическом растворе для инъекций USP в концентрации 0,05 мг/мл для введения в дозе 0,5 мг/кг (10 мкг/200 мкл на мышь) один раз в неделю в течение пяти недель, начиная на день 7. Паклитаксел был получен у Bedford Laboratories (Bedford, OH; Cat. No. 1075029) и был приготовлен в растворе 50,3% Кремофора® и 49,7% дегидратированного спирта. Маточный раствор был разведен 5% декстрозой/0,9% физиологическим раствором для инъекций USP до финальной концентрации 3 мг/мл паклитаксела в 16,8% Кремофора®, 16,6% дегидратированного спирта, 3,3% декстрозы, 0,6% физиологического раствора для инъекций USP. Паклитаксел вводили в дозе 30 мг/кг (60 мкг/200 мкл на мышь) дважды в неделю в течение пяти недель, начиная с дня 7. Объем опухоли и массу тела мышей контролировали дважды в неделю в течение всего исследования. Объем опухоли был измерен и рассчитан с использованием способа и формулы, описанных в примере 1.

Мыши были умерщвлены на день 42 ингаляцией изофлурана и смещением шейных позвонков.

Средний объем опухоли в течение исследования для каждой подгруппы мышей представлен на фиг. 13. В этом эксперименте комбинация FGFR1-ECD.339-Fc, доксорубицина и паклитаксела ингибировала рост опухоли в большей степени, чем только FGFR1-ECD.339-Fc или комбинация доксорубицина и паклитаксела без FGFR1-ECD.339-Fc. В течение хода исследования потери веса не отмечалось. (Данные не указаны.) Фракционный анализ объема опухоли использовали для оценки степени повышенного (аддитивного или синергического) или пониженного (антагонистического) ингибирования роста опухоли после введения комбинации FGFR1-ECD.339-Fc, доксорубицина и паклитаксела. Результаты данного анализа приведены в табл. 19.

Таблица 19. Анализ фракционного объема опухоли[a] на день 21

	FGFR1-ECD.339-Fc	Доксорубицин и паклитаксел	Ожидаемое значение[b]	Наблюдаемое значение	Ожидаемое/Наблюдаемое значение[c]
День 21	0.93	0.59	0.55	0.50	1.10

[a] Фракционный объем опухоли (FTV) = (Средний объем опухоли, подвергнутой воздействию (TV))/(Средний TV контроля)

[b] Ожидаемое значение = (FTV препарата 1)×(FTV препарата 2)

[c] Соотношение ожидаемых и наблюдаемых значений, >2=синергичное; ~1=аддитивное; <0,5=антагонистическое.

Эти результаты показывают, что комбинация FGFR1-ECD.339-Fc, доксорубицина и паклитакселя привела к аддитивному ингибированию роста опухоли в данном эксперименте.

Пример 6: Лечение FGFR1-ECD.339-Fc и KDR ECD-Fc у мышей с опухолевыми клетками ксенотрансплантата легкого H520 привело к ингибированию опухоли.

Мышам SCID CB17 в возрасте 8 недель вводили носитель, кДНК рецептора, содержащего домен вставки киназы (KDR) (Five Prime Therapeutics, South San Francisco, CA) (который экспрессирует белок, действующий в качестве антагониста ФРЭС и ловушки ФРЭС), кДНК FGFR1 (Five Prime Therapeutics, South San Francisco, CA) или комбинацию KDR и FGFR1, способом гидроксидинамической трансфекции хвостовой вены (TVT), по существу как это описано в Chen et al., Human Gene Therapy 16(1): 126-131 (2005), и затем спустя 4 дня мышам инокулировали 5×10^6 H520 опухолевых клеток трансплантата легкого п/к на боковой стороне, клетки были в смеси 1:1 с Matrigel в общем объеме 100 мкл. Векторы кДНК KDR и FGFR1 каждый содержали соответствующие внеклеточные домены, слитые с доменом IgG1 Fc. Измерения объема опухоли проводили с интервалом около 10 дней. На день 29 объем опухоли был снижен в группах лечения отдельными агентами в сравнении с носителем (критерий Манна-Уитни $P<0,05$). На день 29 объем опухоли был снижен в группах комбинированного лечения в сравнении с группами лечения отдельными агентами (критерий Манна-Уитни $P<0,001$).

Пример 7. Введение FGFR1-ECD.339-Fc и цисплатина/этопозида в модели ксенотрансплантата мелкоклеточного рака легкого (SCLC) DMS 53.

Самки мышей SCID в возрасте шести недель были приобретены у Charles River Laboratories (Wilmington, MA) и акклиматизированы в течение 1 недели перед началом исследования. В качестве модели опухоли использовали линию клеток DMS 53 мелкоклеточного рака легкого человека (SCLC), которая была приобретена у ATCC (Manassas, VA; Cat. No. CRL-2062). Клетки были культивированы в трех пассажах в среде Waymouth's MB 752/1 + 10% FBS + 2 мМ L-глутамина при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO_2. Когда культивированные клетки достигли 85-90% конфлюэнтности, клетки были собраны и ресуспендированы в холодном и не содержащем Ca^{2+} и Mg^{2+} забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS), содержащем 50% Matrigel в концентрации 5×10^7 клеток на мл. Клетки были имплантированы подкожно вдоль правого бока мышей в концентрации 5×10^6 клеток/100 мкл/мышь. После того, как размер опухоли достиг размера 100-125 $мм^3$, мыши были отсортированы и рандомизированы таким образом, что каждая группа (n=10) имела около одинаковый средний объем опухоли, и лечение было начато в соответствии с табл. 20 ниже. FGFR1-ECD.339-Fc был приготовлен в PBS в концентрации 3 мг/мл и введен интраперитонеально (и/п) в дозе 15 мг/кг (300 мкг/100 мкл/мышь) дважды в неделю в течение четырех недель. Цисплатин был приобретен у Amatheon, Inc., Miami, FL (Cat No. 5539-0112-50) и предварительно приготовлен в концентрации 1 мг/мл. 0,45 мл маточного раствора цисплатина (1 мг/мл) было добавлено к 1,05 мл 5% раствору декстрозы для получения 1,5 мл рабочего раствора с концентрацией 0,3 мг/мл. Каждая мышь получала 100 мкл рабочего раствора (0,3 мг/мл) для обеспечения дозы 3 мг/кг каждые 7 или 21 день, в зависимости от группы. Этопозид был приобретен у Amatheon, Inc (Cat. No. 5539-0291-01) и предварительно приготовлен в концентрации 20 мг/мл. 0,140 мл маточного раствора (20 мг/мл) было добавлено к 3,36 мл 5% раствору декстрозы для получения 3,5 мл рабочего раствора с концентрацией 0,8 мг/мл. Каждая мышь получала 50 мкл рабочего раствора (0,8 мг/мл) для обеспечения дозы 4 мг/кг каждые 3 дня, в зависимости от группы. Введение дозы этопозида было повторено каждые 7 или 21 день, в зависимости от группы. В комбинированных группах FGFR1-ECD.339-Fc и цисплатин/этопозид вводили сопутственно. Человеческий альбумин был приобретен у Grifols USA (Los Angeles, CA; Cat. No. NDC 61953-0002-1), разведен до маточного раствора (3 мг/мл) в 0,9% натрия хлорида и использован в качестве отрицательного контроля в дозе 300 мкг/100 мкл/мышь (15 мг/кг). График введения доз для каждой подгруппы мышей представлен в табл. 20.

Таблица 20

Группа	Препараты	Цисплатин (мг/кг, график)	Этопозид (мг/кг, график)	FGFR1-ECD.339-Fc (мг/кг, график)	Путь введения
1	Альбумин 15 мг/кг	0	0	0	и/п
2	FGFR1-ECD.339-Fc	0	0	15 , 2х/неделя	и/п
3	Цисплатин/этопозид	3, один раз каждый 21 день	4, каждый день х 3 каждый 21 день	0	и/п
4	Цисплатин/этопозид /FGFR1-ECD.339-Fc	3, один раз каждый 21 день	4, каждый день х 3 каждый 21 день	15 , 2х/неделя	и/п
5	Цисплатин/этопозид	3, один раз каждый 7	4, каждый день х 3	0	и/п
		день	каждый 7 день		
6	Цисплатин/этопозид /FGFR1-ECD.339-Fc	3, один раз каждый 7 день	4, каждый день х 3 каждый 7 день	15 , 2х/неделя	и/п

Пример 8. Введение FGFR1-ECD.339-Fc и топотекана в модели ксенотрансплантата мелкоклеточного рака легкого (SCLC) DMS 53.

Самки мышей SCID в возрасте шести недель были приобретены у Charles River Laboratories (Wilmington, MA) и акклиматизированы в течение 1 недели перед началом исследования. В качестве модели опухоли использовали линию клеток DMS 53 мелкоклеточного рака легкого человека (SCLC), которая была приобретена у ATCC (Manassas, VA; Cat. No. CRL-2062). Клетки были культивированы в трех пассажах в среде Waymouth's MB 752/1 + 10% FBS + 2 мМ L-глутамина при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO_2. Когда культивированные клетки достигли 85-90% конфлюэнтности, клетки были собраны и ресуспендированы в холодном и не содержащем Ca^{2+} и Mg^{2+} забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS), содержащем 50% Matrigel в концентрации 5×10^7 клеток на мл. Клетки были имплантированы подкожно вдоль правого бока мышей в концентрации 5×10^6 клеток/100 мкл/мышь. После того, как размер опухоли достиг размера 100-125 $мм^3$, мыши были отсортированы и рандомизированы таким образом, что каждая группа (n=10) имела около одинаковый средний объем опухоли, и лечение было начато в соответствии с табл. 21 ниже. FGFR1-ECD.339-Fc был приготовлен в PBS в концентрации 3 мг/мл и введен интраперитонеально (и/п) в дозе 15 мг/кг (300 мкг/100 мкл/мышь) дважды в неделю в течение четырех недель. Порошок топотекана был приобретен у Sigma-Aldrich, Inc. (Cat No. T2705-50MG), и 5 мг/мл маточного раствора было приготовлено в 5% растворе декстрозы. Разведения также были сделаны с использованием 5% раствора декстрозы. 0,6 мл маточного раствора (5 мг/мл) было добавлено к 5,4 мл 5% раствора декстрозы для получения 6 мл рабочего раствора с концентрацией 0,5 мг/мл. Каждая мышь получала 100 мкл рабочего раствора (0,5 мг/мл) для обеспечения дозы 2,5 мг/кг. Введение дозы топотекана было повторено каждые 7 или 21 день, в зависимости от группы. В комбинированных группах FGFR1-ECD.339-Fc и топотекан вводили сопутственно. Человеческий альбумин был приобретен у Grifols USA (Los Angeles, CA; Cat. No. NDC 61953-0002-1), разведен до маточного раствора (3 мг/мл) в 0,9% натрия хлорида и использован в качестве отрицательного контроля в дозе 300 мкг/100 мкл/мышь (15 мг/кг). График введения доз для каждой подгруппы мышей представлен в табл. 21.

Таблица 21

Группа	Препараты	Топотекан (мг/кг, график)	FGFR1-ECD.339-Fc (мг/кг, график)	Путь введения
1	Альбумин 15 мг/кг	0	0	и/п
2	FGFR1-ECD.339-Fc	0	15 , 2х/неделя	и/п
3	Топотекан	2,5, каждый день х 5 каждый 21 день	0	и/п
4	Топотекан/FGFR1-ECD.339-Fc	2,5, каждый день х 5 каждый 21 день	15 , 2х/неделя	и/п
5	Топотекан	2,5, каждый день х 5 каждый 7 день	0	и/п
6	Топотекан/FGFR1-ECD.339-Fc	2,5, каждый день х 5 каждый 7 день	15 , 2х/неделя	и/п

Таблица последовательностей

В табл. 22 перечислены определенные последовательности, описанные в тексте данной заявки. Последовательности FGFR1 представлены без сигнального пептида, если не указано иное.

Таблица 22. Последовательности и описания.

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	FGFR1 ECD полной длины человека (с сигнальным пептидом); SP-hFGFR1-ECD.353	MWSWKCLLFW AVLVTATLCT ARPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLRDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEVEVQD SVPADSGLYA CVTSSPSGSD TTYFSVNVSD ALPSSEDDDD DDDSSSEEKE TDNTKPNPVA PYWTSPEKME KKLHAVPAAK TVKFKCPSSG TPNPTLRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIGP DNLPYVQILK TAGVNTTDKE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL EERPAVMTSP LYLE
2	FGFR1 ECD полной длины человека (без сигнального пептида); hFGFR1-ECD.353	RPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLRDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEVEVQD SVPADSGLYA CVTSSPSGSD TTYFSVNVSD ALPSSEDDDD DDDSSSEEKE TDNTKPNPVA PYWTSPEKME KKLHAVPAAK TVKFKCPSSG TPNPTLRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIGP DNLPYVQILK TAGVNTTDKE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL EERPAVMTSP LYLE
3	SP-hFGFR1-ECD.339	MWSWKCLLFW AVLVTATLCT ARPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLRDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEVEVQD SVPADSGLYA CVTSSPSGSD TTYFSVNVSD ALPSSEDDDD DDDSSSEEKE TDNTKPNPVA PYWTSPEKME KKLHAVPAAK TVKFKCPSSG TPNPTLRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIGP DNLPYVQILK TAGVNTTDKE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL
4	hFGFR1-ECD.339	RPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLRDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEVEVQD SVPADSGLYA CVTSSPSGSD TTYFSVNVSD ALPSSEDDDD

		DDDSSSEEKE TDNTKPNPVA PYWTSPEKME KKLHAVPAAK TVKFKCPSSG TPNPTLRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIGP DNLPYVQILK TAGVNTTDKE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL
5	SP-hFGFR1-ECD.339-Fc	MWSWKCLLFW AVLVTATLCT ARPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLRDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEVEVQD SVPADSGLYA CVTSSPSGSD TTYFSVNVSD ALPSSEDDDD DDDSSSEEKE TDNTKPNPVA PYWTSPEKME KKLHAVPAAK TVKFKCPSSG TPNPTLRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIGP DNLPYVQILK TAGVNTTDKE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
6	hFGFR1-ECD.339-Fc	RPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLRDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEVEVQD SVPADSGLYA CVTSSPSGSD TTYFSVNVSD ALPSSEDDDD DDDSSSEEKE TDNTKPNPVA PYWTSPEKME KKLHAVPAAK TVKFKCPSSG TPNPTLRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIGP DNLPYVQILK TAGVNTTDKE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
7	Сигнальный пептид	MWSWKCLLFWAVLVTATLCTA
	hFGFR1	
8	Fc C237S	EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
9	Типичный Fc №1	ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
10	Типичный Fc №2	ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Five Prime Therapeutics, Inc.

<120> КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫМ ДОМЕНОМ FGFR1

<130> P1004

<150> US 61/413,940
<151> 2010-11-15

<150> US 61/421,462
<151> 2010-12-09

<160> 10

<170> Патентная версия 3.5

<210> 1
<211> 374
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 1

Met Trp Ser Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala
1 5 10 15

Thr Leu Cys Thr Ala Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Ala Gln
20 25 30

Pro Trp Gly Ala Pro Val Glu Val Glu Ser Phe Leu Val His Pro Gly
35 40 45

Asp Leu Leu Gln Leu Arg Cys Arg Leu Arg Asp Asp Val Gln Ser Ile
50 55 60

Asn Trp Leu Arg Asp Gly Val Gln Leu Ala Glu Ser Asn Arg Thr Arg
65 70 75 80

Ile Thr Gly Glu Glu Val Glu Val Gln Asp Ser Val Pro Ala Asp Ser
85 90 95

Gly Leu Tyr Ala Cys Val Thr Ser Ser Pro Ser Gly Ser Asp Thr Thr
100 105 110

Tyr Phe Ser Val Asn Val Ser Asp Ala Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp
115 120 125

Asp Asp Asp Asp Asp Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr
130 135 140

```
Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu
145                 150                 155                 160

Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys
                165                 170                 175

Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly
            180                 185                 190

Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr
        195                 200                 205

Ala Thr Trp Ser Ile Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly
    210                 215                 220

Asn Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr
225                 230                 235                 240

Tyr Gln Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln
                245                 250                 255

Ala Gly Leu Pro Ala Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu
            260                 265                 270

Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu
        275                 280                 285

Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro
    290                 295                 300

Tyr Val Gln Ile Leu Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu
305                 310                 315                 320

Met Glu Val Leu His Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu
                325                 330                 335

Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala
            340                 345                 350

Trp Leu Thr Val Leu Glu Ala Leu Glu Glu Arg Pro Ala Val Met Thr
        355                 360                 365

Ser Pro Leu Tyr Leu Glu
    370
```

<210> 2

<211> 353
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 2

```
Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Ala Gln Pro Trp Gly Ala Pro
1               5                  10                  15

Val Glu Val Glu Ser Phe Leu Val His Pro Gly Asp Leu Leu Gln Leu
            20                  25                  30

Arg Cys Arg Leu Arg Asp Asp Val Gln Ser Ile Asn Trp Leu Arg Asp
        35                  40                  45

Gly Val Gln Leu Ala Glu Ser Asn Arg Thr Arg Ile Thr Gly Glu Glu
    50                  55                  60

Val Glu Val Gln Asp Ser Val Pro Ala Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys
65                  70                  75                  80

Val Thr Ser Ser Pro Ser Gly Ser Asp Thr Thr Tyr Phe Ser Val Asn
                85                  90                  95

Val Ser Asp Ala Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
            100                 105                 110

Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr Lys Pro Asn Pro Val
        115                 120                 125

Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu Lys Lys Leu His Ala
    130                 135                 140

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

Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro
                165                 170                 175

Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr Trp Ser Ile
            180                 185                 190

Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Ile
        195                 200                 205

Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr Gln Leu Asp Val
    210                 215                 220
```

Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala
225 230 235 240

Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu Phe Met Cys Lys Val
245 250 255

Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Glu Val
260 265 270

Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro Tyr Val Gln Ile Leu
275 280 285

Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Met Glu Val Leu His
290 295 300

Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala
305 310 315 320

Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu
325 330 335

Glu Ala Leu Glu Glu Arg Pro Ala Val Met Thr Ser Pro Leu Tyr Leu
340 345 350

Glu

<210> 3
<211> 360
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 3

Met Trp Ser Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala
1 5 10 15

Thr Leu Cys Thr Ala Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Ala Gln
20 25 30

Pro Trp Gly Ala Pro Val Glu Val Glu Ser Phe Leu Val His Pro Gly
35 40 45

Asp Leu Leu Gln Leu Arg Cys Arg Leu Arg Asp Asp Val Gln Ser Ile
50 55 60

Asn Trp Leu Arg Asp Gly Val Gln Leu Ala Glu Ser Asn Arg Thr Arg

65 70 75 80

Ile Thr Gly Glu Glu Val Glu Val Gln Asp Ser Val Pro Ala Asp Ser
85 90 95

Gly Leu Tyr Ala Cys Val Thr Ser Ser Pro Ser Gly Ser Asp Thr Thr
100 105 110

Tyr Phe Ser Val Asn Val Ser Asp Ala Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp
115 120 125

Asp Asp Asp Asp Asp Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr
130 135 140

Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu
145 150 155 160

Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys
165 170 175

Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly
180 185 190

Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr
195 200 205

Ala Thr Trp Ser Ile Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly
210 215 220

Asn Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr
225 230 235 240

Tyr Gln Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln
245 250 255

Ala Gly Leu Pro Ala Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu
260 265 270

Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu
275 280 285

Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro
290 295 300

Tyr Val Gln Ile Leu Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu
305 310 315 320

Met Glu Val Leu His Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu
325 330 335

Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala
340 345 350

Trp Leu Thr Val Leu Glu Ala Leu
355 360

<210> 4
<211> 339
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 4

Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Ala Gln Pro Trp Gly Ala Pro
1 5 10 15

Val Glu Val Glu Ser Phe Leu Val His Pro Gly Asp Leu Leu Gln Leu
20 25 30

Arg Cys Arg Leu Arg Asp Asp Val Gln Ser Ile Asn Trp Leu Arg Asp
35 40 45

Gly Val Gln Leu Ala Glu Ser Asn Arg Thr Arg Ile Thr Gly Glu Glu
50 55 60

Val Glu Val Gln Asp Ser Val Pro Ala Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys
65 70 75 80

Val Thr Ser Ser Pro Ser Gly Ser Asp Thr Thr Tyr Phe Ser Val Asn
85 90 95

Val Ser Asp Ala Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
100 105 110

Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr Lys Pro Asn Pro Val
115 120 125

Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu Lys Lys Leu His Ala
130 135 140

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

```
Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro
                165                 170                 175

Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr Trp Ser Ile
            180                 185                 190

Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Ile
        195                 200                 205

Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr Gln Leu Asp Val
    210                 215                 220

Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala
225                 230                 235                 240

Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu Phe Met Cys Lys Val
                245                 250                 255

Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Glu Val
            260                 265                 270

Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro Tyr Val Gln Ile Leu
        275                 280                 285

Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Met Glu Val Leu His
    290                 295                 300

Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala
305                 310                 315                 320

Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu
                325                 330                 335

Glu Ala Leu
```

<210> 5
<211> 592
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 5

```
Met Trp Ser Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala
1               5                   10                  15

Thr Leu Cys Thr Ala Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Ala Gln
            20                  25                  30
```

```
Pro Trp Gly Ala Pro Val Glu Val Glu Ser Phe Leu Val His Pro Gly
        35                  40                  45

Asp Leu Leu Gln Leu Arg Cys Arg Leu Arg Asp Asp Val Gln Ser Ile
    50                  55                  60

Asn Trp Leu Arg Asp Gly Val Gln Leu Ala Glu Ser Asn Arg Thr Arg
65                  70                  75                  80

Ile Thr Gly Glu Glu Val Glu Val Gln Asp Ser Val Pro Ala Asp Ser
                85                  90                  95

Gly Leu Tyr Ala Cys Val Thr Ser Ser Pro Ser Gly Ser Asp Thr Thr
            100                 105                 110

Tyr Phe Ser Val Asn Val Ser Asp Ala Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp
        115                 120                 125

Asp Asp Asp Asp Asp Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr
    130                 135                 140

Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu
145                 150                 155                 160

Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys
                165                 170                 175

Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly
            180                 185                 190

Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr
        195                 200                 205

Ala Thr Trp Ser Ile Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly
    210                 215                 220

Asn Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr
225                 230                 235                 240

Tyr Gln Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln
                245                 250                 255

Ala Gly Leu Pro Ala Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu
            260                 265                 270
```

```
Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu
        275                 280                 285

Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro
    290                 295                 300

Tyr Val Gln Ile Leu Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu
305                 310                 315                 320

Met Glu Val Leu His Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu
                325                 330                 335

Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala
            340                 345                 350

Trp Leu Thr Val Leu Glu Ala Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
        355                 360                 365

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
    370                 375                 380

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
385                 390                 395                 400

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                405                 410                 415

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            420                 425                 430

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
        435                 440                 445

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    450                 455                 460

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
465                 470                 475                 480

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                485                 490                 495

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
            500                 505                 510
```

```
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
        515                 520                 525

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
    530                 535                 540

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
545                 550                 555                 560

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                565                 570                 575

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            580                 585                 590
```

<210> 6
<211> 571
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 6

```
Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Ala Gln Pro Trp Gly Ala Pro
1               5                   10                  15

Val Glu Val Glu Ser Phe Leu Val His Pro Gly Asp Leu Leu Gln Leu
            20                  25                  30

Arg Cys Arg Leu Arg Asp Asp Val Gln Ser Ile Asn Trp Leu Arg Asp
        35                  40                  45

Gly Val Gln Leu Ala Glu Ser Asn Arg Thr Arg Ile Thr Gly Glu Glu
    50                  55                  60

Val Glu Val Gln Asp Ser Val Pro Ala Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys
65                  70                  75                  80

Val Thr Ser Ser Pro Ser Gly Ser Asp Thr Thr Tyr Phe Ser Val Asn
                85                  90                  95

Val Ser Asp Ala Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
            100                 105                 110

Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr Lys Pro Asn Pro Val
        115                 120                 125

Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu Lys Lys Leu His Ala
    130                 135                 140
```

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

Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro
                165                 170                 175

Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr Trp Ser Ile
            180                 185                 190

Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Ile
        195                 200                 205

Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr Gln Leu Asp Val
    210                 215                 220

Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala
225                 230                 235                 240

Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu Phe Met Cys Lys Val
                245                 250                 255

Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Glu Val
            260                 265                 270

Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro Tyr Val Gln Ile Leu
        275                 280                 285

Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Met Glu Val Leu His
    290                 295                 300

Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala
305                 310                 315                 320

Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu
                325                 330                 335

Glu Ala Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
            340                 345                 350

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
        355                 360                 365

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
    370                 375                 380
```

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
385 390 395 400

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
405 410 415

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
420 425 430

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
435 440 445

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
450 455 460

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
465 470 475 480

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
485 490 495

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
500 505 510

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
515 520 525

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
530 535 540

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
545 550 555 560

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
565 570

<210> 7
<211> 21
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 7

Met Trp Ser Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala
1 5 10 15

Thr Leu Cys Thr Ala

20

<210> 8
<211> 232
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 8

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

```
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 9
<211> 228
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 9

```
Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
1               5                   10                  15

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
```

180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys
225

<210> 10
<211> 229
<212> БЕЛОК
<213> Человек

<400> 10

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

```
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                165                 170                 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
            180                 185                 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
        195                 200                 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225
```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения немелкоклеточного рака лёгких, включающий введение субъекту внеклеточного домена (ECD) рецептора фактора роста фибробластов 1 (FGFR1), слитого с доменом Fc иммуноглобулина, и дополнительного терапевтического агента, выбираемого из доцетакселя, винкристина и топотекана, в котором FGFR1 ECD включает аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 1-4.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является доцетакселем.

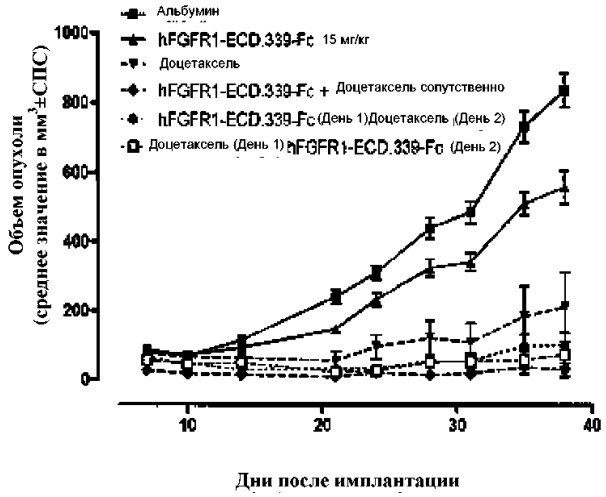
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является винкристином.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент является топотеканом.

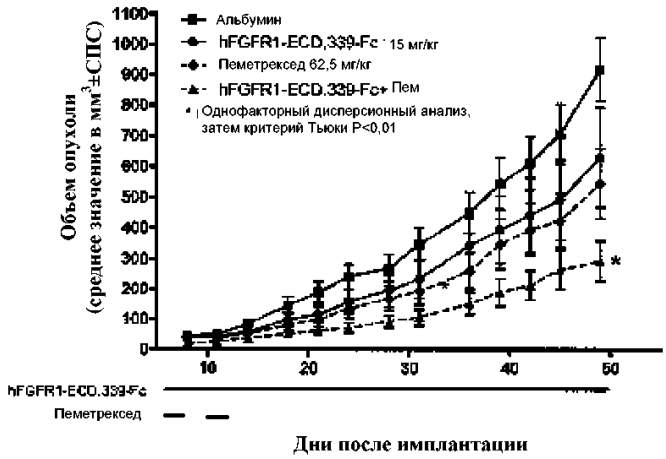
5. Способ по п.1, отличающийся тем, что FGFR1 ECD и Fc включает последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6.

6. Упаковка с фармацевтическими дозами, включающая молекулу слияния внеклеточного домена (ECD) рецептора фактора роста фибробластов 1 (FGFR1) с доменом Fc иммуноглобулина, где FGFR1 ECD включает аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 1-4, и дополнительный терапевтический агент, выбираемый из доцетакселя, винкристина и топотекана.

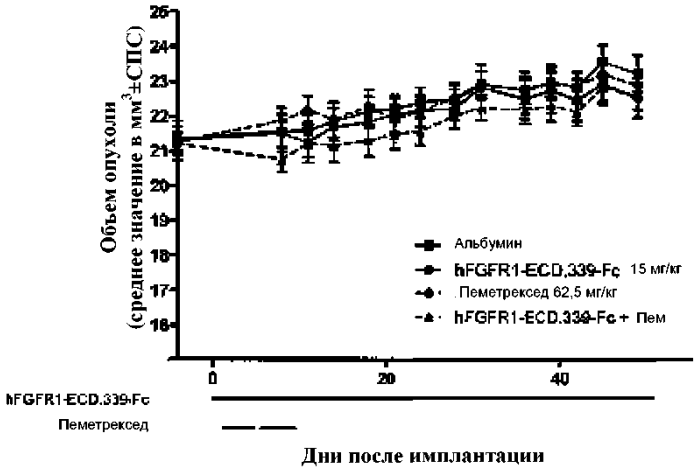
7. Применение комбинации внеклеточного домена (ECD) рецептора фактора роста фибробластов 1 (FGFR1), слитого с доменом Fc иммуноглобулина, где FGFR1 ECD включает аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 1-4, и дополнительного терапевтического агента, выбираемого из доцетакселя, винкристина и топотекана, для лечения немелкоклеточного рака легких.



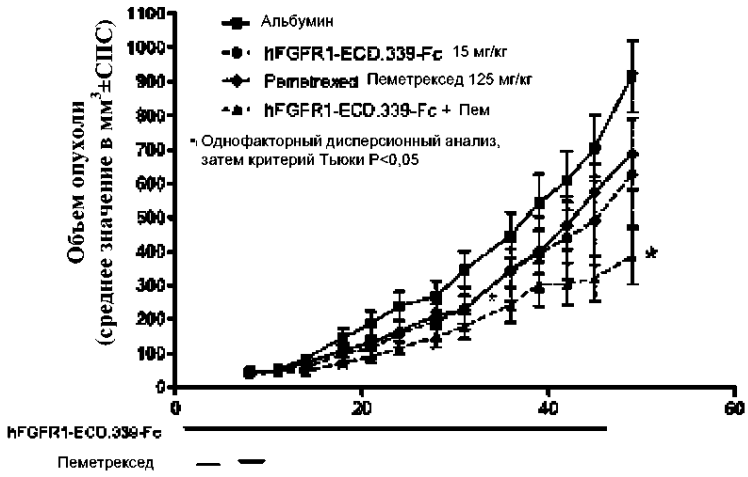
Фиг. 1



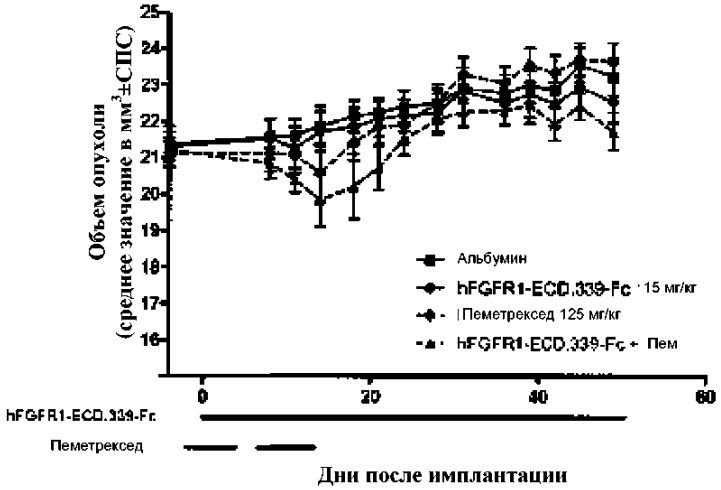
Фиг. 2А



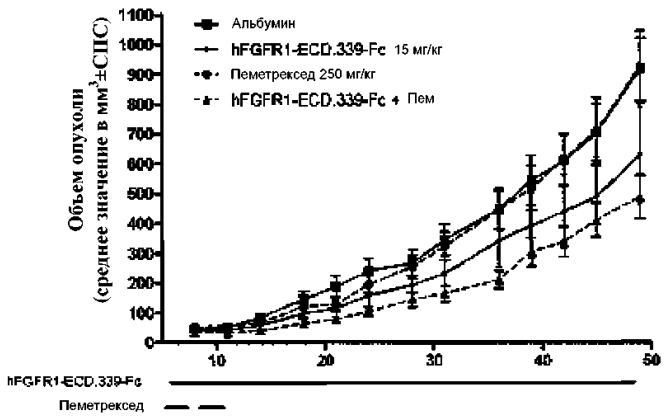
Фиг. 2B



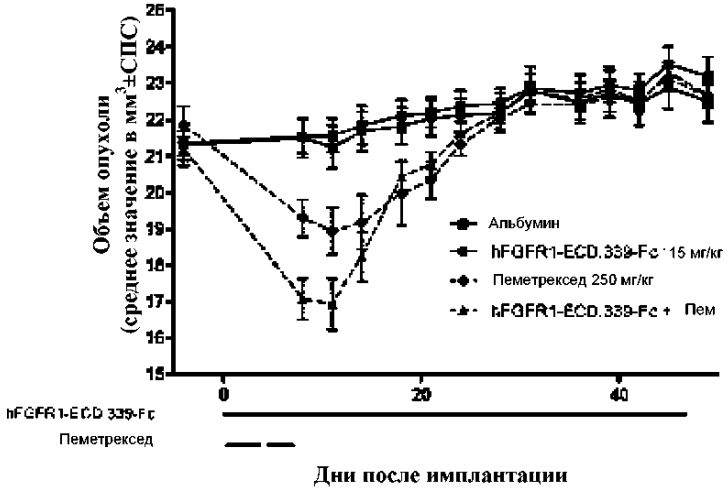
Фиг. 3A



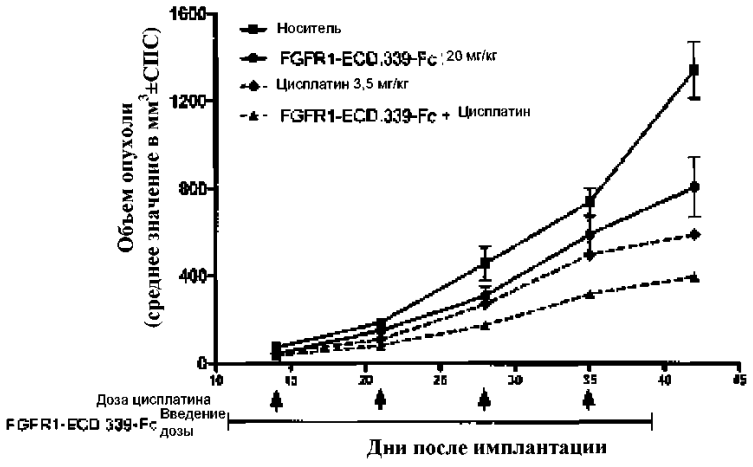
Фиг. 3B



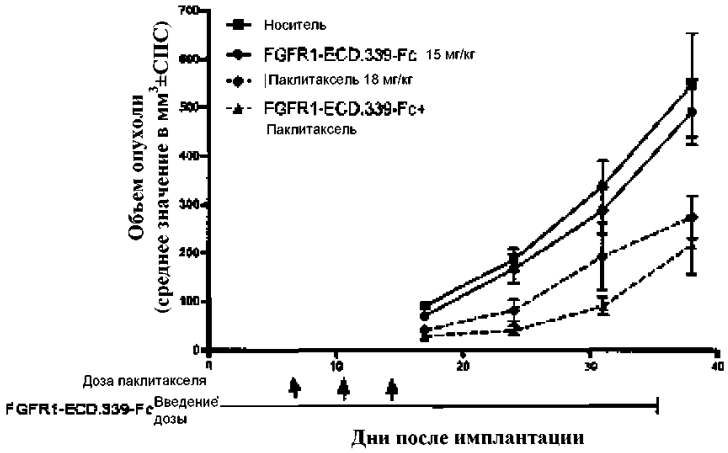
Фиг. 4А



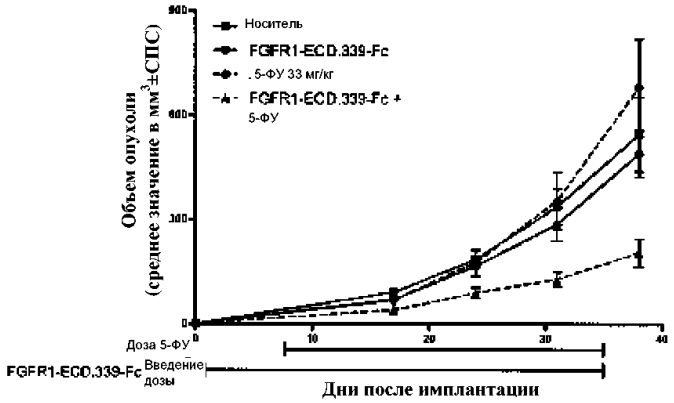
Фиг. 4В



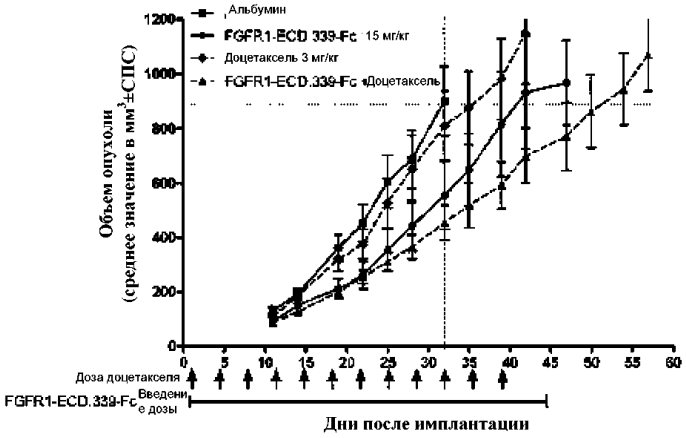
Фиг. 5



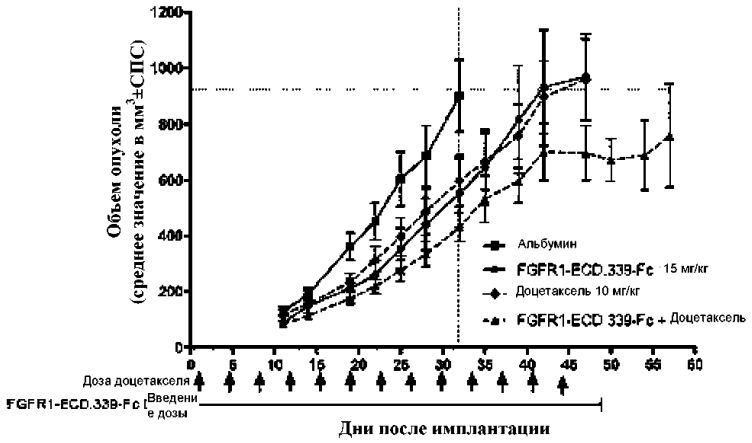
Фиг. 6



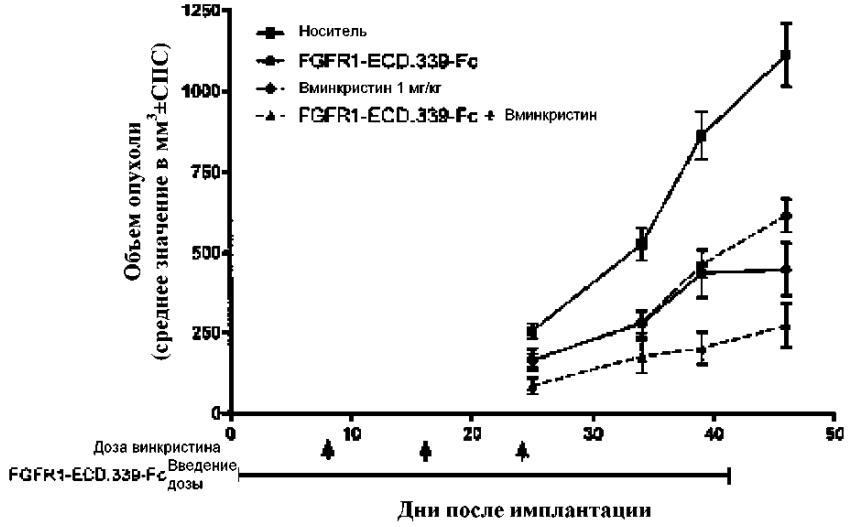
Фиг. 7



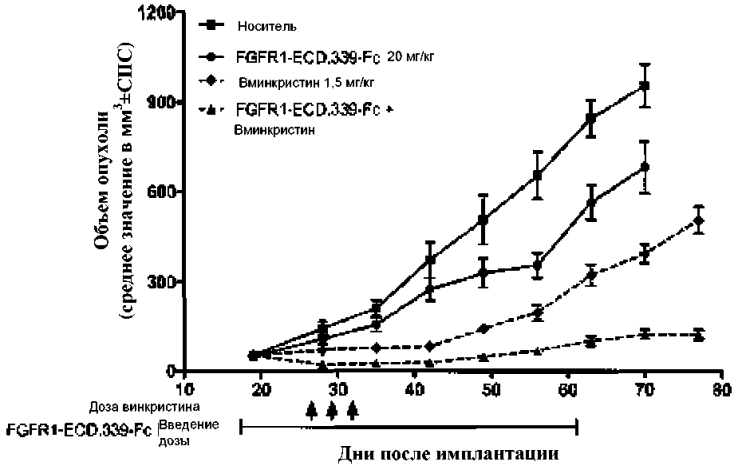
Фиг. 8А



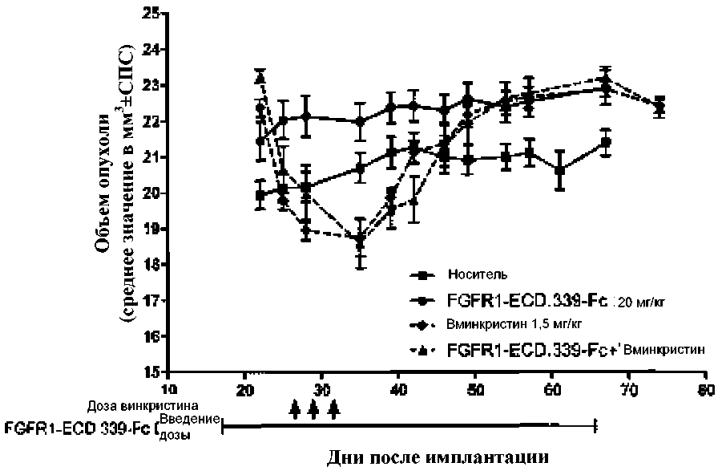
Фиг. 8В



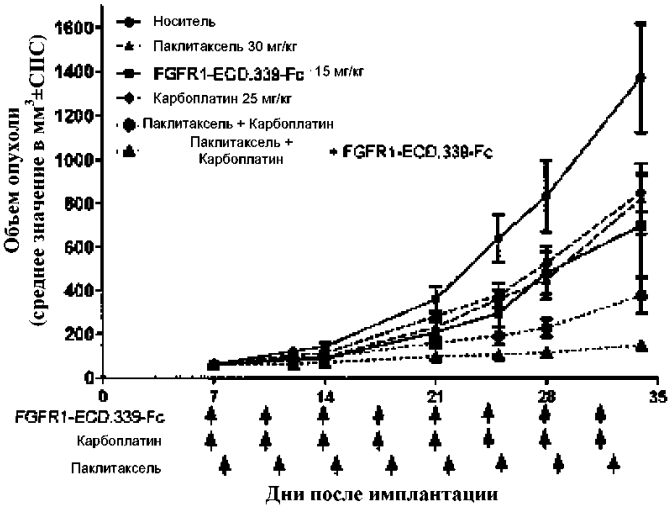
Фиг. 9А



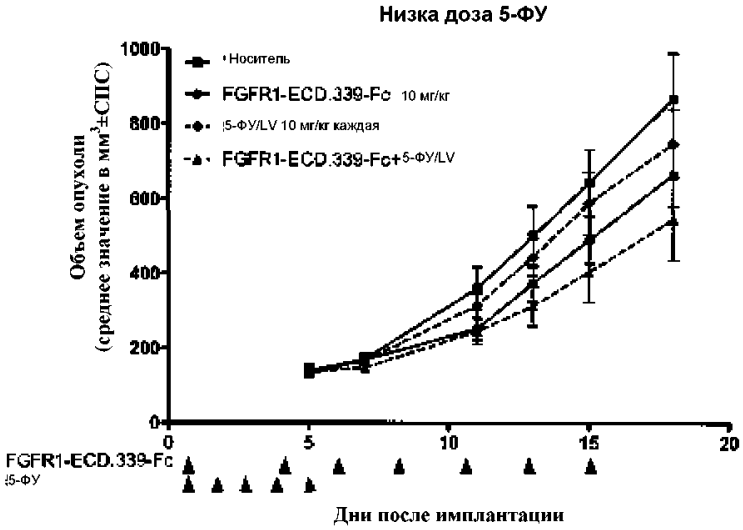
Фиг. 9В



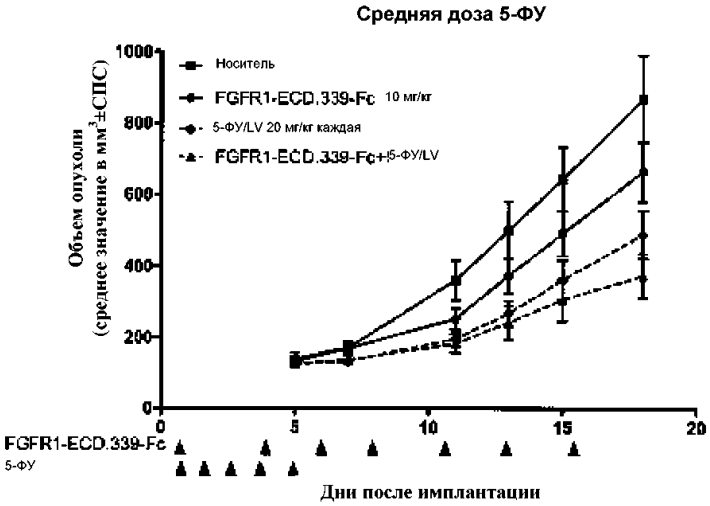
Фиг. 9С



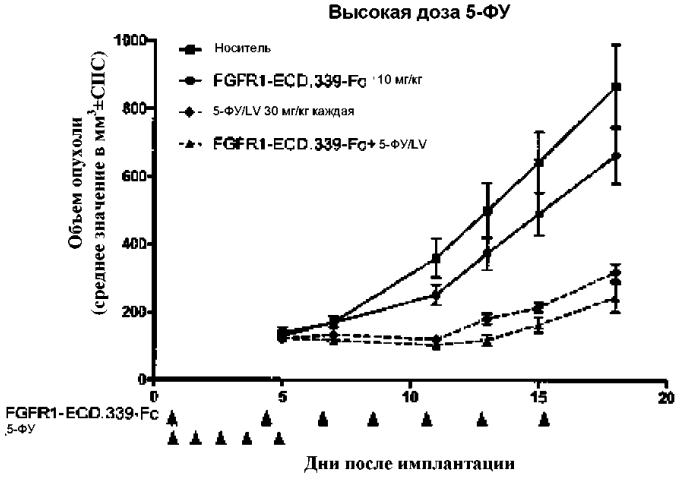
Фиг. 10



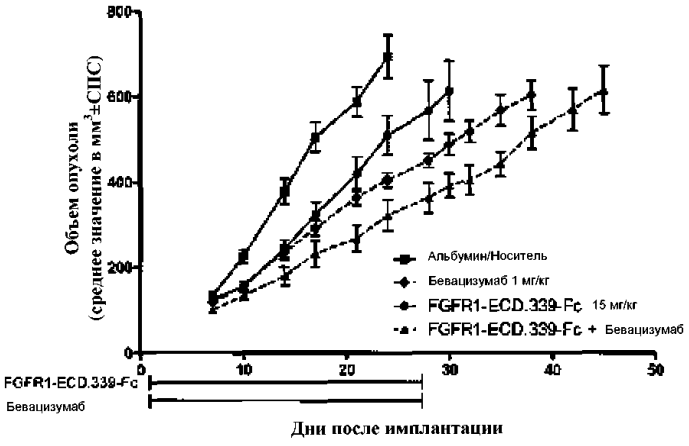
Фиг. 11А



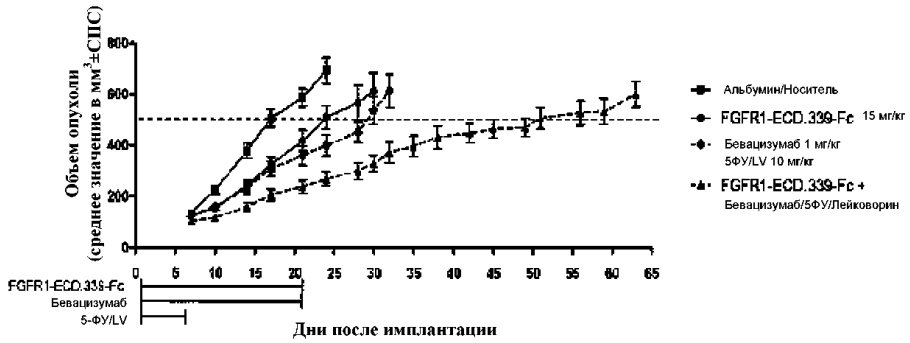
Фиг. 11B



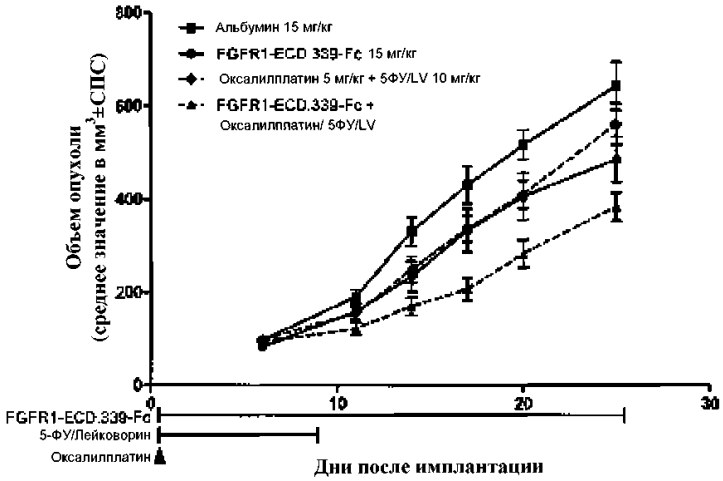
Фиг. 11C



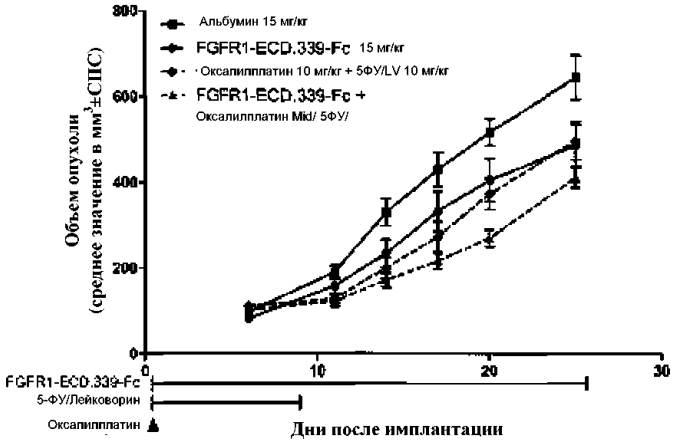
Фиг. 11D



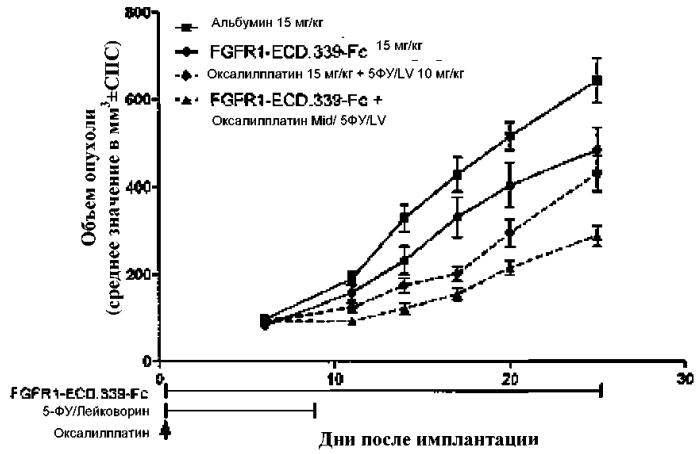
Фиг. 11E



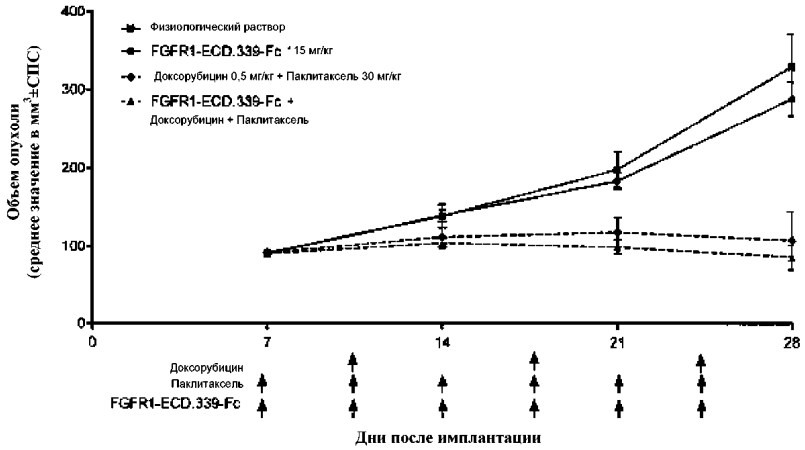
Фиг. 12A



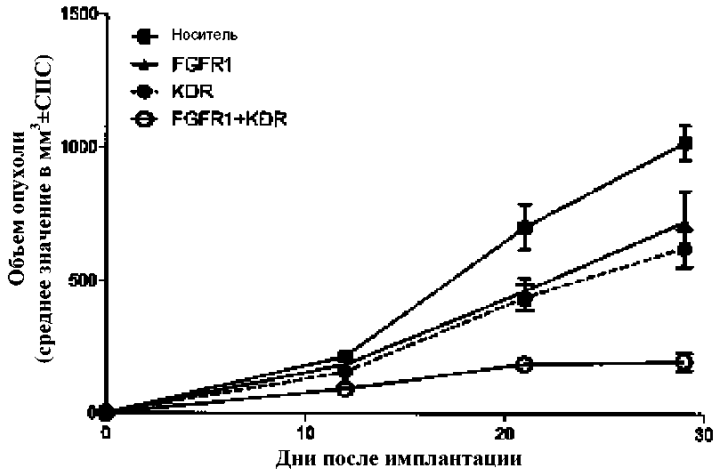
Фиг. 12B



Фиг. 12С



Фиг. 13



Фиг. 14