



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013140625/10, 14.12.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
14.12.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
16.12.2008 EP 08021835.7Номер и дата приоритета первоначальной заявки,  
из которой данная заявка выделена:  
2011129204 16.12.2008

(43) Дата публикации заявки: 10.03.2015 Бюл. № 7

(45) Опубликовано: 27.11.2015 Бюл. № 33

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: EA 10726 B1, 30.10.2008. CA 2799802  
A1, 29.06.2006. WO 2007033216 A2, 22.03.2007.  
WO 2006068953 A2, 29.06.2006. WO 2006045049  
A1, 27.04.2006. WO 2003030833 A2, 17.04.2003.  
RU 2277411 C1, 10.06.2006.

Адрес для переписки:

105082, Москва, Спартаковский пер., д. 2, стр. 1,  
секция 1, этаж 3, "ЕВРОМАРКПАТ"

(72) Автор(ы):

БРИНКМАНН Ульрих (DE),  
ГРИП Ремко-Алберт (NO),  
КАЛУЦА Клаус (DE),  
КАВЛЬЕ Анита (NO),  
КЛАЙН Кристиан (CH),  
РЕГУЛА Йёрг Томас (DE),  
ШОЙЕР Вернер (DE)

(73) Патентообладатель(и):

Ф.ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

## (54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ АНГИОПОЭТИНА-2 ЧЕЛОВЕКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к антителам против ангиопоэтина-2 человека, кодирующим их нуклеиновым кислотам и клеткам-хозяевам, а также к применению антител для получения лекарственного средства для предупреждения метастазирования, лечения

рака или сосудистых заболеваний. Изобретение позволяет повысить специфичность, понизить токсичность и улучшить фармакокинетические свойства антител против ангиопоэтина-2 человека. 8 н. и 3 з.п. ф-лы, 13 ил., 10 табл., 9 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07K 16/22* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2013140625/10, 14.12.2009**

(24) Effective date for property rights:  
**14.12.2009**

Priority:

(30) Convention priority:  
**16.12.2008 EP 08021835.7**

Number and date of priority of the initial application,  
from which the given application is allocated:  
**2011129204 16.12.2008**

(43) Application published: **10.03.2015** Bull. № 7

(45) Date of publication: **27.11.2015** Bull. № 33

Mail address:

**105082, Moskva, Spartakovskij per., d. 2, str. 1,  
seksija 1, ehtazh 3, "EVROMARKPAT"**

(72) Inventor(s):

**BRINKMANN Ul'rikh (DE),  
GRIP Remko-Albert (NO),  
KALUTsA Klaus (DE),  
KAVL'E Anita (NO),  
KLAJN Kristian (CH),  
REGULA Jerg Tomas (DE),  
ShOJER Verner (DE)**

(73) Proprietor(s):

**F. Hoffmann-La Roche AG (CH)**

(54) **ANTIBODIES AGAINST HUMAN ANGIOPOIETIN-2**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry,  
particularly to antibodies against human angiotensin-  
2, nucleic acids encoding said antibodies and host cells,  
as well as use of the antibodies to produce a medicinal  
agent for preventing metastasis, treating cancer or

vascular diseases.

EFFECT: invention increases specificity, lowers  
toxicity and improves pharmacokinetic properties of  
antibodies against human angiotensin-2.

11 cl, 13 dwg, 10 tbl, 9 ex

**R U 2 5 6 9 4 6 1 C 2**

**R U 2 5 6 9 4 6 1 C 2**

Настоящее изобретение относится к антителам против ангиопоэтина-2 человека (анти-ANG-2 антителам), способам их получения, фармацевтическим композициям указанных антител и к их применению.

Предпосылки создания изобретения

5 Ангиогенез участвует в патогенезе различных расстройств, к которым относятся плотные опухоли, синдромы внутриглазной ревазуляризации, например, пролиферативные ретинопатии или возрастная дегенерация желтого пятна (ВДЖП), ревматоидный артрит и псориаз (Folkman J. и др., *J. Biol. Chem.* 267, 1992, сс.10931-10934; Klagsbrun M. и др., *Annu. Rev. Physiol.* 53, 1991, сс.217-239; Garner A. в кн.: «Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach», 1994, под ред. Garner A. и Klintworth G.K., 2-е изд., изд-во Marcel Dekker, Нью-Йорк, сс.1625-1710). В случае солидных опухолей ревазуляризация создает преимущество в росте и пролиферации для опухолевых клеток по сравнению с нормальными клетками. Поэтому наблюдают корреляцию между плотностью микрососудов на срезах опухолей и выживанием пациентов при раке груди, а также при некоторых других формах опухолей (Weidner N. и др., *N. Engl. J. Med.* 324, 15 1991, сс.1-8; Horak E.R. и др., *Lancet* 340, 1992, сс.1120-1124; Macchiarini P. и др., *Lancet* 340, 1992, сс.145-146).

ANG-2 и анти-ANG-2 антитела

Ангиопоэтин-2 человека (Human angiopoietin-2, обозначаемый аббревиатурами ANG-2, или ANGPT2, или ANG2) (SEQ ID No: 107) описан Maisonpierre P.C. и др., *Science* 277, 20 1997, сс.55-60, Cheung A.H. и др., *Genomics* 48, 1998, сс.389-391. Ангиопоэтин-1 и ангиопоэтин-2 (ANG-1 (SEQ ID No: 108) и ANG-2 (SEQ ID No: 107)) описаны в качестве лигандов для представителей семейства тирозинкиназ Tie, которые селективно экспрессируются в эндотелии сосудов. Yancopoulos G.D., и др., *Nature* 407, 2000, сс.242-25 248. В настоящее время известно четыре представителя семейства ангиопоэтина. Ангиопоэтин-3 и ангиопоэтин-4 (Ang-3 и Ang-4) могут представлять в значительной степени дивергированные варианты одного и того же генного локуса у мыши и человека. Kim I. и др., *FEBS Lett.* 443, 1999, сс.353-356; Kim I. и др., *J Biol Chem* 274, 1999, сс.26523-26528. Первоначально ANG-1 и ANG-2 были идентифицированы в экспериментах с культурами тканей в качестве агониста и антагониста, соответственно (см. по ANG-1: Davies S. и др., *Cell*, 87, 1996, сс.1161-1169; и по ANG-2: Maisonpierre P.C. и др., *Science* 277, 1997, сс.55-60). Все известные ангиопоэтины связываются в основном с Tie2, и оба, Ang-1 и -2, связываются с Tie2 со сродством 3 нМ (Kd). Maisonpierre P.C., и др., *Science* 277, 1997, сс.55-60. Показано, что Ang-1 поддерживает выживание клеток эндотелия и индуцирует целостность эндотелия, Davis S. и др., *Cell*, 87, 1996, сс.1161-1169; Kwak H.J. и др., *FEBS Lett* 448, 1999, сс.249-253; Suri C. и др., *Science* 282, 1998, сс.468-471; Thurston G. и др., *Science* 286, 1999, сс.2511-2514; Thurston G. и др., *Nat. Med.* 6, 2000, сс.460-463, причем ANG-2 обладает противоположным эффектом и индуцирует дестабилизацию кровеносных сосудов и их регрессию в отсутствии факторов выживания VEGF или основного фактора роста фибробластов. Maisonpierre P.C. и др., *Science* 277, 1997, сс.55-60. Однако, во многих исследованиях функции ANG-2 показано, что положение более сложное. ANG-2 может быть сложным регулятором ремоделирования сосудов, которое играет роль и в распространении сосудов, и в регрессии сосудов. Подтверждая такие роли для ANG-2, исследование экспрессии показало, что ANG-2 быстро индуцируется вместе с VEGF у взрослых при распространении сосудов при ангиогенезе, хотя ANG-2 индуцируется в отсутствие VEGF при регрессии сосудов. Holash J. и др., *Science* 284, 45 1999, сс.1994-1998; Holash J. и др., *Oncogene* 18, 1999, сс.5356-5362. Согласно с контекстно-зависимой ролью, ANG-2 предпочтительно связывает с тем же

специфическим для эндотелия рецептором, Tie-2, который активируется Ang-1, но оказывает контекстно-зависимые воздействия на его активирование. Maisonpierre P.C. и др., *Science* 277, 1997, сс.55-60.

Исследования ангиогенеза роговицы показали, что и ANG-1, и ANG-2 обладают сходными эффектами, взаимодействуя синергетически с VEGF для индукции роста новых кровеносных сосудов. Asahara T. и др., *Circ. Res.*, 83, 1998, сс.233-240. Вероятность наличия доза-зависимого ответа эндотелия повышается в связи с наблюдением, что *in vitro* в высокой концентрации ANG-2 также может быть проангиогенным. Kim I. и др., *Oncogene* 19, 2000, сс.4549-4552. В высокой концентрации ANG-2 действует в качестве апоптозного фактора выживания для клеток эндотелия во время сывороточного депривационного апоптоза через активирование Tie2 через PI-3 киназу и метаболический путь Akt. Kim I. и др., *Oncogene* 19, 2000, сс.4549-4552.

Кроме того, по результатам экспериментов *in vitro* был сделан вывод о том, что при продолжительном воздействии эффекты ANG-2 могут постепенно сдвигаться от эффекта антагониста к агонисту Tie2, и позднее может непосредственно участвовать в формировании сосудистых трубок и стабилизации новых сосудов. Teichert-Kuliszewska K. и др., *Cardiovasc. Res.* 49, 2001, сс.659-670. Кроме того, если клетки эндотелия культивируют на фибриновом геле, также наблюдают активирование Tie2 за счет ANG-2, что предположительно означает, что действие ANG-2 может зависеть от состояния дифференциации клеток эндотелия. Teichert-Kuliszewska K. и др., *Cardiovasc. Res.* 49, 2001, сс.659-670. В клетках эндотелия микрососудов, культивируемых в трехмерном геле, ANG-2 также может индуцировать активирование Tie2 и формирование структур типа капилляров. Mochizuki Y. и др., *J. Cell. Sci.* 115, 2002, сс.175-183. Применение трехмерного сферического совместного культивирования в качестве модели созревания сосудов *in vitro*, показывает, что прямой контакт между клетками эндотелия и клетками мезенхимы аннулирует способность к реагированию на VEGF, хотя наличие VEGF и ANG-2 индуцирует распространение сосудов. Korff T. и др., *Faseb J.* 15, 2001, сс.447-457. Etoh T.H. и др. показали, что у клеток эндотелия, которые конститутивно экспрессируют Tie2, регуляция экспрессии MMP-1, -9 и u-PA сильно повышается за счет ANG-2 в присутствии VEGF. Etoh T. и др., *Cancer Res.* 61, 2001, сс.2145-2153. На модели зрачковой мембраны *in vivo* Lobov I.B. и др. показали, что ANG-2 в присутствии эндогенного VEGF индуцирует быстрое повышение диаметра капилляров, ремоделируя базальную пластинку, пролиферацию и миграцию клеток эндотелия, и стимулирует распространение новых кровеносных сосудов. Lobov I.B. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2002, сс.11205-11210. Напротив, ANG-2 индуцирует гибель клеток эндотелия и регрессию сосудов без эндогенного VEGF. Lobov I.B. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2002, сс.11205-11210. Сходным образом на модели опухоли *in vivo* Vajkoczy P. и др. показали, что многоклеточные агрегаты инициируют рост сосудов за счет ангиогенного прорастания с помощью одновременной экспрессии VEGFR-2 и ANG-2 организмом хозяина и эндотелием опухоли. Vajkoczy P. и др., *J. Clin. Invest.* 109, 2002, сс.777-785. Эта модель показывает, что сформировавшаяся микрососудистая сеть растущих опухолей отличается постоянным ремоделированием, предположительно опосредованным экспрессией VEGF и ANG-2. Vajkoczy M.A. и др., *J Clin. Invest.* 09, 2002, сс.777-785.

Исследования Tie-2 и ангиопоэтина-1 на модели нокаутных мышей показывают сходные фенотипы и подтверждают, что фосфорилирование Tie-2 после стимуляции ангиопоэтином-1 опосредует ремоделирование и стабилизацию формируемых сосудов, стимулируя полное развитие кровеносных сосудов во время ангиогенеза и поддержание адгезии клеток, поддерживающих клетки эндотелия (Dumont J. и др., *Genes & Development*,

8, 1994, сс.1897-1909; Sato T.N., Nature, 376, 1995, сс.70-74; Thurston G. и др., Nature Medicine, 6, 2000, сс.460-463). Предположительно роль ангиопоэтина-1 сохраняется у взрослых, у которых он экспрессируется в разных местах и конститутивно (Hanahan D., Science, 277, 1997, сс.48-50; Zagzag D. и др., Exp Neurology, 159, 1999, сс.391-400). Напротив, экспрессия ангиопоэтина-2 в основном ограничивается сайтами сосудистого ремоделирования, в которых ангиопоэтин-2 предположительно блокирует конститутивную стабилизации или функцию созревания ангиопоэтина-1, позволяя сосудам ревертировать и сохраниться, пластическое состояние которых может быть в большей степени отвечающим на распространяющиеся сигналы (Hanahan D., 1997; Holash J. и др., Orzcoerze 18, 199, сс.5356-5362; Maisonpierre P.C., 1997). При экспрессии ангиопоэтина-2 при патологическом ангиогенезе установлено, что многие типы опухолей экспрессируют ангиопоэтин-2 (Maisonpierre P.C. и др., Science 277, 1997, сс.55-60). Функциональные исследования показали, что ангиопоэтин-2 вовлечен в опухолевый ангиогенез, и установили ассоциацию сверхэкспрессии ангиопоэтина-2 с повышенным ростом опухолей на модели ксенотрансплантата у мышей (Ahmad S.A. и др., Cancer Res., 61, 2001, сс.1255-1259). В других исследованиях связывают сверхэкспрессию ангиопоэтина-2 с гиперваскуляризацией опухоли (Etoh T. и др., Cancer Res. 61, 2001, сс.2145-2153; Tanaka F. и др., Cancer Res. 62, 2002, сс.7124-7129).

В последнее время было предложено использовать ангиопоэтин-1, ангиопоэтин-2 и/или Tie-2 в качестве возможных мишеней в терапии опухолей. Например, в US 6166185, US 5650490 и US 5814464 описаны анти-Tie-2 лиганд и рецепторные антитела. Исследования с применением растворимого Tie-2 были описаны для снижения числа и размера опухолей у грызунов (Lin, 1997; Lin, 1998). Siemeister G. и др., Cancer Res. 59, 1999, сс.3185-3191, получили линии клеток меланомы человека, экспрессирующих внеклеточный домен от Tie-2, ввели их инъекцией голым мышам и описали растворимый Tie-2 для получения существенного подавления роста опухоли и опухолевого ангиогенеза. Оба рассматриваемых вместе агента, ангиопоэтин-1 и ангиопоэтин-2, связываются с Tie-2, и из этих исследований неясно, является ли ангиопоэтин-1, ангиопоэтин-2 или Tie-2 привлекательной мишенью для противоопухолевой терапии. Однако, эффективная терапия против ангиопоэтина-2 предположительно полезна в лечении заболеваний, например, рака, при котором прогрессирование зависит от aberrантного ангиогенеза, при котором блокируемый процесс может привести к предупреждению прогрессирования заболевания (Follunan J., Nature Medicine. 1, 1995, сс.27-31).

Кроме того, некоторые группы исследователей сообщают о применении антител и пептидов, которые связываются с ангиопоэтином-2. См., например, US 6166185 и US 2003/10124129. WO 03/030833, WO 2006/068953, WO 03/057134 или US 2006/0122370.

Исследование воздействия очаговой экспрессии ангиопоэтина-2 показало, что противоборствующий ангиопоэтин 1/Tie-2 сигнал ослабляет плотную сосудистую структуру, тем самым, подвергая воздействию клетки эндотелия для активации сигналов от индукторов ангиогенеза, например, VEGF (Hanahan, 1997). Такой проангиогенный эффект, возникающий из подавления ангиопоэтина-1, показывает, что терапия против ангиопоэтина-1 может быть эффективным противораковым лечением.

ANG-2 экспрессируется в ходе развития в тех местах, где происходит ремоделирование кровеносных сосудов. Maisonpierre P.C. и др., Science 277, 1997, сс.55-60. У взрослых индивидуумов экспрессия ANG-2 ограничена местами ремоделирования сосудов, а также опухолями с высокой степенью васкуляризации опухолей, включая глиому, Osada H. и др., Int. J. Oncol. 18, 2001, сс.305-309; Koga K. и др., Cancer Res. 61, 2001, сс.6248-6254,

гепатоклеточную карциному, Tanaka S. и др., *J. Clin. Invest.* 103, 1999, сс.341-345, рак желудка, Etoh T. и др., *Cancer Res.* 61, 2001, сс.2145-2153; Lee J.H. и др., *Int. J. Oncol.* 18, 2001, сс.355-361, опухоль щитовидки, Bunone G. и др., *Am J Pathol* 155, 1999, сс.1967-1976, немелкоклеточный рак легких, Wong M.P. и др., *Lung Cancer* 29, 2000, сс.11-22, рак толстой кишки, Ahmad S.A. и др., *Cancer* 92, 2001, сс.1138-43, и рак простаты Wurmbach J.H. и др., *Anticancer Res.* 20, 2000, сс.5217-5220. Установлено, что некоторые раковые клетки экспрессируют ANG-2. Например, Tanaka S. и др., *J. Clin. Invest.* 103, 1999, сс.341-345 обнаружили иРНК ANG-2 в 10 из 12 образцов гепатоклеточной карциномы человека (ГКЧ). Группа Ellis сообщает, что ANG-2 экспрессируется повсеместно в опухолевом эпителии. Ahmad S.A. и др., *Cancer* 92, 2001, сс.1138-1143. Другие исследователи сообщают о сходных результатах. Chen L. и др., *J. Tongji Med. Univ.* 21, 2001, сс.228-235. Путем выявления уровней иРНК ANG-2 в собранных образцах рака груди человека, Sfilogoi C. и др., *Int. J. Cancer* 103, 2003, сс.466-474 установили, что иРНК ANG-2 в значительной степени ассоциирована с инвазией вспомогательных лимфоузлов, кратким периодом отсутствия заболевания и в целом плохим выживанием. Tanaka F. и др., *Cancer Res.* 62, 2002, сс.7124-7129, проанализировали в общей сложности 236 пациентов с немелкоклеточным раком легких (НМКРЛ) на стадиях развития заболевания с I по IIIA, соответственно. С помощью иммуногистохимии они установили, что 16,9% пациентов с НМКРЛ являются ANG-2-положительными. Плотность микрососудов у ANG-2-положительной опухоли существенно выше, чем у ANG-2-отрицательной опухоли. Такой ангиогенный эффект ANG-2 наблюдают только если имеется высокая экспрессия VEGF. Кроме того, положительная экспрессия ANG-2 является существенным фактором для прогноза плохого послеоперационного выживания. Tanaka F. и др., *Cancer Res.* 62, 2002, сс.7124-7129. Однако ими было установлено, что нет существенной корреляции между экспрессией Ang-1 и плотностью микрососудов. Tanaka F. и др., *Cancer Res.* 62, 2002, сс.7124-7129. Эти результаты подтверждают, что ANG-2 является индикатором плохого прогноза у пациентов с некоторыми типами рака.

Ранее, используя модель нокаутных мышей ANG-2, группа исследователей под руководством Yancopoulos установила, что ANG-2 необходим для постнатального ангиогенеза. Gale N.W. и др., *Dev. Cell* 3, 2002, сс.411-423. Они показали, что запрограммированная в ходе развития регрессия сосудистой сети в стекловидном теле в глазу не происходит у нокаутных ANG-2 мышей и их кровеносные сосуды в сетчатке не могут распространяться от центральной артерии сетчатки. Gale N.W. и др., *Dev. Cell* 3, 2002, сс.411-423. Ими также было показано, что делеция ANG-2 приводит к выраженным дефектам в расположении и функционировании системы лимфатических сосудов. Gale N.W. и др., *Dev. Cell* 3, 2002, сс.411-423. Генетический риск с Ang-1 корректирует лимфатические, но не ангиогенные дефекты. Gale N.W. и др., *Dev. Cell* 3, 2002, сс.411-423.

Peters и соавторы сообщают, что растворимый Tie2, при доставке либо в качестве рекомбинантного белка, либо в вирусном векторе экспрессии, подавляет рост *in vivo* карциномы рака груди и меланомы грызунов у модельных мышей. Lin P. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1998, сс.8829-8834; Lin P. и др., *J. Clin. Invest.* 100, 1997, сс.2072-2078. Плотность сосудов в тканях опухолей, обработанных таким образом, существенно снижена. Кроме того, растворимый Tie2 блокирует ангиогенез в роговице крысы после стимуляции соответствующими средами для опухолевых клеток. Lin P. и др., *J. Clin. Invest.* 100, 1997, 2072-2078. Кроме того, Isner с сотрудниками показали, что добавление ANG-2 к VEGF индуцирует существенно более длинную и более сферическую сеть вновь образовавшихся сосудов, чем только один VEGF. Asahara T. и др., *Circ. Res.*, 83, 1998,

сс.233-240. Избыток растворимого рецептора Tie2 предотвращает модулирование под действием ANG-2 реваскуляризации, индуцированной VEGF. Asahara T. и др., *Circ. Res.* 83, 1998, сс.233-240. Siemeister G. и др., *Cancer Res.* 59, 1999, сс.3185-3191, показали на голых мышцах с ксенотрансплантатами, что сверхэкспрессия внеклеточных связывающих лиганды доменов, либо Flt-1, либо Tie2, у ксенотрансплантатов, приводящая к существенному подавлению метаболического пути, не может быть компенсирована сверхэкспрессией другого указанного домена, следовательно, метаболический путь рецептора VEGF и метаболический путь Tie2 не следует рассматривать в качестве двух независимых медиаторов, имеющих существенное значение для процесса ангиогенеза *in vivo*. Siemeister G. и др., *Cancer Res.* 59, 1999, сс.3185-3191. Это было доказано в предшествующей публикации White R.R. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 2003, сс.5028-5033. В этом исследовании показано, что устойчивый к нуклеазе аптамер РНК, который специфически связывается и подавляет ANG-2, существенно подавляет реваскуляризацию, индуцированную bFGF, на модели ангиогенеза в микрокармане роговицы крысы.

#### Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение представляет специфическое связывание с ангиопоэтином-2 человека (ANG-2) антитела, отличающегося включением в качестве области CDR3 переменного домена тяжелой цепи последовательностей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 49.

Предпочтительно антитело отличается тем, что

а) переменный домен тяжелой цепи включает область CDR3 последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 49, область CDR2 последовательности SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 50, и область CDR1 последовательности SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 51, и

б) переменный домен легкой цепи включает область CDR3 последовательности SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 52, область CDR2 последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 45 или SEQ ID NO: 53, и область CDR1 последовательности SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 46 или SEQ ID NO: 54.

Предпочтительно антитело отличается тем, что включает

а) переменный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 55; и

б) переменный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 56.

Предпочтительно антитело отличается тем, что не связывается специфически с ангиопоэтином-1 (ANG-1).

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, включающая антитело по настоящему изобретению.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является применение антитела по настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является применение антитела по настоящему изобретению для предупреждения метастазирования.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является применение антитела по настоящему изобретению для лечения рака.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является применение антитела по настоящему изобретению для лечения сосудистых заболеваний.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является применение антитела по настоящему изобретению для лечения ретинопатии.

5 Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является нуклеиновая кислота, кодирующая переменный домен тяжелой цепи и/или переменный домен легкой цепи антитела по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает векторы экспрессии, содержащие нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, способные  
10 экспрессировать указанную нуклеиновую кислоту в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, содержащих такие векторы, для рекомбинантного получения такого антитела.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает прокариотические или эукариотические клетки-хозяева по настоящему изобретению.

15 Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ выработки рекомбинантного антитела человека или гуманизированного антитела по настоящему изобретению, отличающийся экспрессией нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах и выделением указанного антитела из указанных клеток или супернатанта культуры клеток. Настоящее  
20 изобретение также включает антитело, получаемое таким рекомбинантным способом.

Антитела по настоящему изобретению особенно применимы для предупреждения вторичных опухолей/метастаз или для лечения сосудистых заболеваний, например, ретинопатии.

Подробное описание изобретения

25 Настоящее изобретение представляет антитело, специфически связывающееся с ангиопоэтином-2 (ANG-2) человека, отличающееся тем, что включает в качестве переменного домена тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 49.

30 В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело отличается тем, что

а) переменный домен тяжелой цепи включает область CDR3 последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 49, область CDR2 последовательности SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10,  
35 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 50, и область CDR1 последовательности SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 51, и

б) переменный домен легкой цепи включает область CDR3 последовательности SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO:  
40 44 или SEQ ID NO: 52, область CDR2 последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 45 или SEQ ID NO: 53, и область CDR1 последовательности SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 46 или SEQ ID NO: 54.

Предпочтительно антитело отличается включением

45 а) последовательностей переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 55; и

б) последовательностей переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 8, SEQ ID

NO: 16, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 56.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является антитело, специфически связывающееся с ANG-2 человека, которое отличается тем, что антитело не связывается специфически с ангиопоэтином-1 человека (ANG-1). Типичными антителами, специфически связывающимися с ANG-2 человека, но не с ANG-1 человека, являются, например, Ang2s\_R3\_LC03, Ang2s\_LC09, Ang2i\_LC06, Ang2i\_LC07 или антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и Ang2s\_R3\_LC03, Ang2s\_LC09, Ang2i\_LC06, Ang2i\_LC07, Ang2i\_LC10, предпочтительно связывающиеся с тем же эпитопом, что и Ang2i\_LC06. Поэтому в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело, специфически связывающееся с ангиопоэтином-2 человека (ANG-2), но не с ANG-1 человека, связывается с тем же эпитопом, что и Ang2s\_R3\_LC03, Ang2s\_LC09, Ang2i\_LC06, Ang2i\_LC07, Ang2i\_LC10, предпочтительно с тем же эпитопом, что и Ang2i\_LC06. Такие антитела, специфически связывающиеся с ANG-2, но не с ANG-1, могут обладать улучшенными свойствами, например, улучшенной эффективностью, пониженной токсичностью, улучшенными фармакокинетическими свойствами, по сравнению с антителами, специфичными в отношении ANG-2 и ANG-1.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело, специфически связывающееся с ангиопоэтином-2 (ANG-2) человека, но не с ANG-1 человека, отличается тем, что

а) переменный домен тяжелой цепи включает область CDR3 последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 49, область CDR2 последовательности SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 50, и область CDR1 последовательности SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 51, и

б) переменный домен легкой цепи включает область CDR3 последовательности SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 52, область CDR2 последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 53, и область CDR1 последовательности SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 54.

Предпочтительно такое антитело, специфически связывающееся с ангиопоэтином-2 человека (ANG-2), но не с ANG-1 человека, отличается тем, что включает

а) переменный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 55; и

б) переменный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 56.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанное антитело по настоящему изобретению отличается тем, что

а) переменный домен тяжелой цепи включает область CDR3 последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, область CDR2 последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 10, и область CDR1 последовательности SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 11, и

б) переменный домен легкой цепи включает область CDR3 последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 12, область CDR2 последовательности SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 13, и область CDR1 последовательности SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 14.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанное антитело по настоящему изобретению отличается тем, что включает

а) переменный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 7 или SEQ ID

NO: 15; и

б) переменный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 16.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанное антитело по настоящему изобретению отличается тем, что

а) переменный домен тяжелой цепи включает область CDR3 последовательности SEQ ID NO: 1, область CDR2 последовательности SEQ ID NO: 2 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO: 3, и

б) переменный домен легкой цепи включает область CDR3 последовательности SEQ ID NO: 4, область CDR2 последовательности SEQ ID NO: 5 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO: 6.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанное антитело по настоящему изобретению отличается тем, что включает

а) переменный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 7; и

б) переменный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 8.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанное антитело по настоящему изобретению отличается тем, что

а) переменный домен тяжелой цепи включает область CDR3 последовательности SEQ ID NO: 17, область CDR2 последовательности SEQ ID NO: 18, и область CDR1 последовательности SEQ ID NO: 19, и

б) переменный домен легкой цепи включает область CDR3 последовательности SEQ ID NO: 20, область CDR2 последовательности SEQ ID NO: 21 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO: 22.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанное антитело по настоящему изобретению отличается тем, что включает

а) переменный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 23; и

б) переменный домен легкой цепи SEQ ID NO: 24.

Предпочтительно антитело по настоящему изобретению отличается тем, что указанное антитело является антителом подкласса IgG1 человека или антителом подкласса IgG4 человека.

Понятие «антитело» охватывает различные формы структур антител, включая, но ими не ограничиваясь, целые антитела и фрагменты антител, антитело по настоящему изобретению предпочтительно является гуманизированным антителом, химерным антителом или дополнительно генетически сконструированным антителом, изменяемым до тех пор, пока оно сохраняет отличительные свойства по настоящему изобретению.

Понятие «фрагменты антител» включает часть антитела полной длины, предпочтительно его переменного домена, или по меньшей мере его сайт связывания антигена. Примерами фрагментов антитела являются димерные антитела, молекулы одноцепочечных антител (single-chain antibody molecules - scFv или scFab), и полиспецифичные антитела (например, биспецифичные), сформированные из фрагментов антител. Антителами scFv являются, например, антитела, описанные Houston J.S., Methods in Enzymol. 203, 1991, сс.46-88. Кроме того, фрагменты антител включают одноцепочечные полипептиды, обладающие свойствами домена  $V_H$ , а именно объединяться вместе с доменом  $V_L$ , или доменом  $V_L$ , связывающимся с ANG-2, а именно объединяться вместе с доменом  $V_H$  к функциональному сайту связывания антигена, и тем самым обеспечивать определенное свойство. Антителами scFv могут быть стабилизированы, используя, например, а) дисульфидную стабилизацию (см., например,

WO 94/029350; Rajagopal V. и др., Prot. Engin. 1997, сс.1453-1459; Kobayashi H. и др., Nuclear Medicine & Biology, 25, 1998, сс.387-393; или Schmidt M. и др., Oncogene 18, 1999, сс.1711-1721) или б) стабилизированные каркасные участки (например, за счет специфических мутаций см., например, WO 2007/109254, о специфических стабилизированных каркасных участках см., например, US 7258985, Furrer F. и др., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50, 2009, сс.771-778, или Ottiger M. и др., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50, 2009, сс.779-786).

Понятия «моноклональное антитело» или «композиция моноклонального антитела», используемые в настоящем изобретении, относятся к препарату молекул антител одной аминокислотной композиции.

Понятие «химерное антитело» относится к антителу, включающему вариабельную область, т.е. связывающую область, из одного источника или от одного вида и по меньшей мере часть константной области, производной от другого источника или вида, обычно полученному методами рекомбинации ДНК. Химерные антитела, включающие вариабельную область грызуна и константную область человека, являются предпочтительными. К другим предпочтительным формам «химерных антител», относящимся к настоящему изобретению, относятся те, у которых константная область была модифицирована или изменена по сравнению с исходным антителом для получения свойств по настоящему изобретению, особенно в связи со связыванием C1q и/или связыванием рецептора Fc (FcR). Такие химерные антитела также относят к «классу антител-переключателей». Химерные антитела являются продуктом экспрессии генов иммуноглобулина, включающих сегменты ДНК, кодирующие вариабельные области иммуноглобулина, и сегменты ДНК, кодирующие константные области иммуноглобулина. Способы получения химерных антител включают обычную рекомбинацию ДНК и методы генной трансфекции, известные в данной области. См., например, Morrison S.L. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, сс.6851-6855; US 5202238 и US 5204244.

Понятие «гуманизированное антитело» относится к антителам, у которых каркасный участок или «комплементарно детерминируемые области (complementarity determining regions - CDR)» модифицированы для включения CDR иммуноглобулина другой специфичности по сравнению с исходным иммуноглобулином. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения CDR грызуна пересажена в область каркасного участка антитела человека для получения «гуманизированного антитела». См., например, Riechmann L. и др., Nature 332, 1988, сс.323-327; Neuberger M.S. и др., Nature 314, 1985, сс.268-270. Особенно предпочтительные области CDR соответствуют областям, представляющим последовательности, которые распознают антигены, указанные выше, для химерных антител. К другим формам «гуманизированного антитела» в настоящем изобретении относятся те формы, у которых константная область дополнительно модифицирована или изменена по сравнению с исходным антителом для получения свойств по настоящему изобретению, особенно в связи со связыванием C1q и/или со связыванием с рецептором Fc (FcR).

Понятие «антитела человека» в контексте настоящего изобретения означает антитела с вариабельными и константными областями, полученными от последовательностей иммуноглобулинов зародышевых линий человека. Антитела человека известны в данной области (van Dijk M.A., van de Winkel J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 2001, сс.368-374). Антитела человека также могут быть получены у трансгенных животных (например, мышей), которые могут при иммунизации вырабатывать полный спектр или выборочные антитела человека в отсутствие выработки эндогенного иммуноглобулина. Перенос генных последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека у таких

мутантных мышей зародышевой линии может привести к выработке антител человека при наличии антигенного стимула (см., например, Jakobovits A. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс.2551-2555; Jakobovits A. и др., Nature 362, 1993, сс.255-258; Brueggemann M. и др., Year Immunol. 7, 1993, сс.33-40). Антитела человека также могут  
 5 быть получены с помощью библиотек фагового дисплея (Hoogenboom H.R. и Winter G., J. Mol. Biol. 227, 1992, сс.381-388; Marks J.D. и др., J. Mol. Biol. 222, 1991, сс.581-597). Методы Cole S.P.C. и др. и Voerner и др. также могут применяться для получения моноклональных антител человека (Cole S.P.C. и др., Monoclonal Antibodies и Cancer Therapy, Liss, A.R., 1985, сс.77-96; и Voerner P. и др., J. Immunol. 147, 1991, сс.86-95). Уже  
 10 упоминалось для химерных и гуманизированных антител по настоящему изобретению, что понятие «антитело человека», используемое в настоящем изобретении, также включает антитела, которые модифицированы в константной области для выработки свойств по настоящему изобретению, особенно в связи со связыванием с C1q и/или со связыванием с FcR, например, путем «переключения класса», т.е. изменение или мутация  
 15 частей Fc (например, с IgG1 на IgG4 и/или мутация IgG1/IgG4.)

Понятие «рекомбинантное антитело человека» в контексте настоящего изобретения означает все антитела человека, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены методами рекомбинации, например, антитела, выделенные из клеток-хозяев, например, клеток NS0 или CHO, или из животных (например, мышей), которые  
 20 трансгенны по генам иммуноглобулинов человека, или экспрессированные антитела, полученные с применением рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина. Такие рекомбинантные антитела человека содержат переменные и константные области во вновь собранной форме. Рекомбинантные антитела человека по настоящему изобретению подвергают *in vivo* соматической гипермутации. Таким  
 25 образом, аминокислотными последовательностями областей VH и VL рекомбинантных антител являются последовательностями, которые происходят от последовательностей VH и VL зародышевой линии человека или связаны с ними, и могут в норме не существовать в природе в составе зародышевой линии антитела человека *in vivo*.

Понятие «переменный домен (переменный домен легкой цепи (V<sub>L</sub>), переменный домен тяжелой цепи (V<sub>H</sub>))» в контексте настоящего изобретения означает каждую пару доменов тяжелой и легкой цепи, которые участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном. Переменные домены легкой и тяжелой цепей имеют одинаковую  
 30 общую структуру, и каждый домен включает четыре каркасных участка (framework - FR), последовательности которых в высокой степени консервативны, соприкасающиеся  
 35 тремя «гиперпеременными областями» (или комплементарно детерминируемыми областями (complementary determining region - CDR). Каркасные участки принимают конформацию β-слоя и области CDR могут формировать петли, связывающие структуру β-слоя. Области CDR в каждой цепи поддерживают свойственную им трехмерную  
 40 структуру за счет каркасных участков и формируют вместе с областями CDR из другой цепи сайт связывания антигена. Области CDR3 тяжелой и легкой цепи антитела играют особенно важную роль в связывающей специфичности/сродстве антитела по настоящему изобретению и поэтому являются дополнительным объектом в настоящем изобретении.

Понятие «антигенсвязывающая часть антитела» в настоящем изобретении относится к аминокислотным остаткам антитела, ответственным за связывание антигена.  
 45 Антигенсвязывающая часть антитела включает аминокислотные остатки из «комплементарно детерминируемых областей» или из «CDR». К понятию «каркасные участки (Framework - FR)» относятся те области переменного домена, которые отличаются от остатков гиперпеременной области, согласно описанному в настоящем

изобретении. Таким образом, переменные домены легкой и тяжелой цепи антитела включают с N- к C-концу домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Особенно область CDR3 тяжелой цепи представляет ту область, которая вносит основной вклад в связывание антигена и определяет свойства антитела. Области CDR и FR определяют, исходя из стандартного определения Kabat E.A. и др. в кн.: «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 1991, 5-е изд., изд-во Public Health Service, Национальный институт здоровья, Bethesda, Мэриленд, и/или соответствующие остатки из «гиперварибельной петли».

Понятия «нуклеиновая кислота» или «молекула нуклеиновой кислоты» в контексте настоящего изобретения относятся к молекулам ДНК и молекулам РНК. Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, но предпочтительно двухцепочечной ДНК.

Понятие «аминокислота» в настоящем изобретении означает группу природных карбокси-альфа-аминокислот, включая аланин (трехбуквенный код: ala, однобуквенный код: A), аргинин (arg, R), аспарагин (asn, N), аспарагиновая кислота (asp, D), цистеин (cys, C), глутамин (gln, Q), глутаминовая кислота (glu, E), глицин (gly, G), гистидин (his, H), изолейцин (ile, I), лейцин (leu, L), лизин (lys, K), метионин (met, M), фенилаланин (phe, F), пролин (pro, P), серин (ser, S), треонин (thr, T), триптофан (trp, W), тирозин (tyr, Y) и валин (val, V).

Нуклеиновая кислота является «оперативно связанной», если она находится в функциональной связи с другой нуклеиновой кислотой. Например, ДНК предпоследовательности или секреторного лидера оперативно связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в качестве белка-предшественника, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер оперативно связаны с кодирующей последовательностью, если они влияют на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосомы оперативно связан с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, что облегчает трансляцию. Обычно понятие «оперативно связанный» означает, что последовательности ДНК, будучи связанными, являются смежными, и, в случае секреторного лидера, соприкасаются и находятся в рамке считывания. Однако энхансеры необязательно должны быть смежными. Связывание сопровождается лигированием по соответствующим сайтам рестрикции. Если таких сайтов нет, синтетические олигонуклеотидные праймеры или линкеры используют в соответствии с обычной практикой. Обычно понятие «оперативно связанная» означает, что последовательности ДНК, будучи связанными, являются коллинеарными и, в случае секреторного лидера, смежными и в рамке считывания. Однако энхансеры не должны соприкасаться. Связывание дополняется лигированием в соответствующих сайтах рестрикции. Если таких сайтов нет, применяют синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры, что соответствует обычной практике.

В контексте настоящего изобретения понятия «клетка», «линия клеток» и «культура клеток» применяют взаимозаменяемо, и все они включают последующие поколения клеток. Например, понятия «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают первичные клетки субъекта и полученные из них культуры независимо от числа пересевов. Также следует учитывать, что все последующие генерации клеток могут быть полностью неидентичными по ДНК из-за тщательно спланированных или случайных мутаций. К этим понятиям также относятся варианты клеток следующей генерации, которые имеют то же биологическое действие или функцию, выявляемые при скрининге первоначально трансформированных клеток.

В контексте настоящего изобретения понятия «связывание» или «специфическое связывание» относится к связыванию антитела с эпитопом антигена (ANG-2) в анализе *in vitro*, предпочтительно методом плазменного резонанса на установке BIAcore (фирма GE Healthcare, Упсала, Швеция) (пример 3), с очищенным антигеном ANG-2 дикого типа. Сродство при связывании выражают в терминах  $k_a$  (константа скорости реакции для ассоциации антитела из комплекса антитело/антиген),  $k_D$  (константа диссоциации) и  $K_D$  ( $k_D/k_a$ ). Связывание или специфическое связывание означает связывающее сродство ( $K_D$ ), составляющее  $10^{-8}$  молей/л или менее, предпочтительно от  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  молей/л.

Связывание антитела с FcγRIII может быть исследовано методом BIAcore (фирма GE-Healthcare, Упсала, Швеция). Сродство связывания выражают с помощью  $k_a$  (константы ассоциации антитела из комплекса антитело/антиген),  $k_D$  (константы диссоциации), и  $K_D$  ( $k_D/k_a$ ).

В контексте настоящего изобретения понятие «несвязывающееся с ANG-1» или «не связывающееся специфически с ANG-1» означает, что антитело имеет величину EC50, превышающую 8000 нг/мл в исследовании связывания ANG-1 *in vitro* методом ELISA (по примеру 2).

Понятие «эпитоп» включает какой-либо полипептидный детерминант, способный специфически связываться с антителом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эпитопный детерминант включает поверхностные группировки молекул химического действия, например, аминокислоты, цепочки сахаров, фосфорильную или сульфонильную группу, и, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения могут иметь специфические трехмерные структурные свойства и или свойства специфического заряда. Эпитоп является областью антигена, которая связана с антителом.

«Часть Fc» антитела не участвует непосредственно в связывании антитела с антигеном, но проявляет различные эффекторные функции. Понятие «часть Fc антитела» известна специалистам и определяется на основе расщепления папаином антител. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей антитела и иммуноглобулины делят на классы: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них могут быть поделены дополнительно на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, IgA1 и IgA2. По константным областям тяжелой цепи разные классы иммуноглобулинов называются  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ , соответственно. Часть Fc антитела непосредственно участвует в антителозависимой клеточно опосредованной цитотоксичности (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC) и комплементзависимой цитотоксичности (complement-dependent cytotoxicity - CDC), основанных на активации комплемента, связывании C1q и связывании рецептора Fc. Активация комплемента (CDC) инициируется связыванием фактора C1q комплемента с частью Fc антител IgG большинства подклассов. Хотя влияние антитела на систему комплемента зависит от определенных обстоятельств, связывание с C1q вызывается определенными сайтами связывания в части Fc. Такие сайты связывания известны в данной области и описаны, например, Boakle R.J. и др., Nature 282, 1975, сс.742-743, Lukas T.J. и др., J. Immunol. 127, 1981, сс.2555-2560, Brunhouse R. и Sebra J.J., Mol. Immunol. 16, 1979, сс.907-917, Burton D.R. и др., Nature 288, 1980, сс.338-344, Thommesen J.E. и др., Mol. Immunol. 37, 2000, сс.995-1004, Idusogie E.E. и др., J. Immunol. 164, 2000, сс.4178-4184, Hezareh M. и др., J. Virology 75, 2001, сс.12161-12168, Morgan A. и др., Immunology 86, 1995, сс.319-324, EP 0307434. Такими сайтами связывания являются, например, L234,

L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерацию по индексу EU по Kabat см. ниже). Антитела подклассов IgG1, IgG2 и IgG3 обычно проявляют активацию комплемента и связывание C1q и C3, причем IgG4 не активирует систему комплемента и не связывает C1q и C3.

5 Антитело по настоящему изобретению предпочтительно включает часть Fc, происходящую от человека, а именно часть Fc антитела человека подкласса IgG1.

Антитела по настоящему изобретению отличаются тем, что содержат константные цепи, происходящие от человека. Такие константные цепи известны в данной области и описаны, например, Kabat, E.A. (см., например, Johnson G. и Wu T.T., *Nucleic Acids Res.* 10 28, 2000, сс.214-218). Например, применимая константная область тяжелой цепи человека включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 58. Например, применимая константная область легкой цепи человека включает аминокислотную последовательность константной области каппа легкой цепи SEQ ID NO: 59 или последовательность константной области лямбда легкой цепи SEQ ID NO: 15 60.

Понятие «константная область» в контексте настоящего изобретения означает сумму доменов антитела, отличных от варибельной области. Константная область не участвует непосредственно в связывании антигена, но проявляет различные эффекторные функции. В зависимости от аминокислотной последовательности 20 константной области тяжелых цепей антитела соответственно делят на классы: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно поделены на подклассы, например, IgG1, IgG2, IgG3, и IgG4, IgA1 и IgA2. Константные области тяжелой цепи, соответствующие разным классам антител, называются  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ , соответственно. Константные области легкой цепи, обнаруженные во всех пяти классах 25 антител, называются  $\kappa$  (каппа) и  $\lambda$  (лямбда).

Понятие «константная области, производная от антитела человека,» в контексте настоящего изобретения означает константную область тяжелой цепи антитела человека подклассов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 и/или константной области  $\kappa$  легкой цепи. Такие константные области известны в данной области и описаны, например, Kabat E.A. (см., 30 например, Johnson G. и Wu T.T., *Nucleic Acids Res.* 28, 2000, сс.214-218; Kabat E.A. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1975, сс.2785-2788).

Хотя антитела подкласса IgG4 проявляют пониженное связывание с рецептором Fc (Fc $\gamma$ RIIIa), антитела других подклассов IgG проявляют сильное связывание. Однако Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (утрата углевода Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, 35 Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 и His435 являются остатками, которые в случае изменения также проявляют пониженное связывание рецептора Fc (Shields R.L. и др., *J. Biol. Chem.* 276, 2001, сс.6591-6604; Lund J. и др., *FASEB J.* 9, 1995, сс.115-119; Morgan A. и др., *Immunology* 86, 1995, сс.319-324; EP 0307434).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело по 40 настоящему изобретению обладает пониженным связыванием с FcR по сравнению с антителом IgG1 и моноспецифическим двухвалентным исходным антителом в отношении FcR связывания подкласса IgG4, или подкласса IgG1 или IgG2 с мутацией в S228, L234, L235 и/или D265, и/или содержит мутацию PVA236. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения мутациями в моноспецифическом двухвалентном исходном 45 антителе являются S228P, L234A, L235A, L235E и/или PVA236. В другом варианте осуществления настоящего изобретения мутации в моноспецифическом двухвалентном исходном антителе являются S228P в IgG4 S228P и L234A и L235A в IgG1. Константные области тяжелой цепи показаны в SEQ ID NO: 57 и 58. В одном из вариантов

осуществления настоящего изобретения константная область тяжелой цепи моноспецифического двухвалентного исходного антитела является последовательностью SEQ ID NO: 57 с мутациями L234A и L235A. В другом варианте осуществления настоящего изобретения константная область тяжелой цепи моноспецифического двухвалентного исходного антитела является последовательностью SEQ ID NO: 58 с мутацией S228P. В другом варианте осуществления настоящего изобретения константная область легкой цепи моноспецифического двухвалентного исходного антитела является областью капша легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 59 или константной областью лямбда легкой цепи SEQ ID NO: 60. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения константная область тяжелой цепи моноспецифического двухвалентного исходного антитела является последовательностью SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 58 с мутацией S228P.

Константная область антитела непосредственно участвует в антителозависимой клеточно опосредованной цитотоксичности (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC) и комплементзависимой цитотоксичности (complement-dependent cytotoxicity - CDC). Активация комплемента (CDC) инициируется связыванием фактора C1q комплемента с константной областью большинства подклассов IgG антител. Связывание C1q с антителом вызывается определенными межбелковыми взаимодействиями по так называемым сайтам связывания. Такие сайты связывания константной области известны в данной области и описаны, например, Lukas T.J. и др., J. Immunol. 127, 1981, сс.2555-2560; Brunhouse R. и Cebra J.J., Mol. Immunol. 16, 1979, сс.907-917; Burton D.R. и др., Nature 288, 1980, сс.338-344; Thommesen J.E. и др., Mol. Immunol. 37, 2000, сс.995-1004; Idusogie E.E. и др., J. Immunol. 164, 2000, сс.4178-4184; Hezareh M. и др., J. Virol. 75, 2001, сс.12161-12168; Morgan A. и др., Immunology 86, 1995, сс.319-324; EP 0307434. Такие сайты связывания константной области характеризуются, например, аминокислотами L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация по индексу EU нумерации Kabat).

Понятие «антителозависимой клеточной цитотоксичности (antibody-dependent cellular cytotoxicity - ADCC)» относится к лизису клеток-мишеней человека антителом по настоящему изобретению в присутствии эффекторных клеток. ADCC предпочтительно измеряют путем обработки препарата клеток, экспрессирующих CCR5, антителом по настоящему изобретению в присутствии эффекторных клеток, например, свежевыделенных МКПК или очищенных эффекторных клеток из лейкоцитных пленок, например, моноцитов или природных клеток-киллеров (natural killer - NK), или линии постоянно растущих клеток NK.

Понятие «комплементзависимая цитотоксичность (complement-dependent cytotoxicity - CDC)» означает процесс инициации путем связывания фактора C1q комплемента с частью Fc большинства подклассов антител IgG. Связывание C1q с антителом вызывается выраженными межбелковыми взаимоотношениями по так называемым сайтам связывания. Такие сайты связывания части Fc известны в данной области (см. выше). Такие сайты связывания части Fc, например, отличаются по аминокислотам L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация по индексу EU нумерации Kabat). Антитела подклассов IgG1, IgG2 и IgG3 обычно проявляют активирование комплемента, включая связывание C1q и C3, причем IgG4 не активирует систему комплемента и не связывает C1q и/или C3.

Антитело по настоящему изобретению получают методами рекомбинации. Одним из объектов настоящего изобретения является нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по настоящему изобретению, а другим объектом является клетка, включающая

указанную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело по настоящему изобретению. Методы получения путем рекомбинации широко распространены в данной области и включают экспрессию белка в прокариотических и эукариотических клетках с последующим выделением антитела и обычно очисткой до стадии фармацевтически приемлемой чистоты. Для экспрессии антител, согласно указанному выше в клетках-хозяевах, нуклеиновые кислоты, кодирующие соответствующие модифицированные легкую и тяжелую цепи, инсертированы в векторы экспрессии стандартными методами. Экспрессию проводят в соответствующих прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, например, в клетках CHO, в клетках NS0, в клетках SP2/0, в клетках НЕК293, в клетках COS, в клетках PER.C6, в дрожжах или в клетках E.coli, и антитело выделяют из клеток (из супернатанта или клеток после лизиса). Основные методы рекомбинантного получения антител известны в данной области и описаны, например, в обзорах Makrides S.C., Protein Expr. Purif. 17, 1999, сс.183-202; Geisse S. и др., Protein Expr. Purif. 8, 1996, сс.271-282; Kaufman R.J., Mol. Biotechnol. 16, 2000, сс.151-161; Werner R.G., J. Drug Res. 48, 1998, сс.870-880.

Антитела по настоящему изобретению могут быть соответствующим образом отделены от культуральной среды обычными методами очистки иммуноглобулина, например, с применением белка А-сефарозы, хроматографии в гидроксипатите, геле-электрофорезом, диализом или аффинной хроматографией. ДНК и РНК, кодирующие моноклональные антитела, легко выделяют и секвенируют, используя обычные методы. Клетки гибридомы могут быть источником таких РНК и ДНК. После выделения ДНК может быть инсертирована в векторы экспрессии, которые затем трансфецируют в клетки-хозяева, например, клетки НЕК 293, клетки CHO или клетки миеломы, которые иным способом не вырабатывают белок иммуноглобулина, для получения синтеза рекомбинантных моноклональных антител в клетках-хозяевах.

Варианты (или мутанты) аминокислотных последовательностей антитела по настоящему изобретению получают путем внедрения соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК антитела или нуклеотидным синтезом. Такие модификации могут быть произведены, однако, только в весьма ограниченном диапазоне, например, по приведенному выше описанию. Например, модификации не изменяют свойства указанных выше антител, например, изотипа IgG, и связывание антигена, но могут улучшить продуктивность рекомбинанта, стабильность белка или облегчить очистку.

Понятие «клетка-хозяин» в настоящем изобретении означает какой-либо тип клеточной системы, который может быть сконструирован для выработки антитела по настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения клетки НЕК293 и клетки CHO используют в качестве клеток-хозяев. В контексте настоящего изобретения понятия «клетка», «линия клеток» и «культура клеток» используются взаимозаменяемо, и все эти понятия также относятся к потомству этих клеток. Таким образом, понятия «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают первичные клетки субъекта и культуры, полученные от них, независимо от числа пересевов. Так же очевидно, что все потомство не может быть в полной мере идентичным по содержанию ДНК из-за направленно осуществленных или случайных мутаций. К указанным понятиям также относятся варианты последующих генераций клеток, которые имеют ту же функцию или биологическое действие, которые были выявлены для первоначально трансформированных клеток.

Экспрессия в клетках NS0 описана, например, Barnes L.M. и др., Cytotechnology 32, 2000, сс.109-123; Barnes L.M. и др., Biotech. Bioeng. 73, 2001, сс.261-270. Кратковременная экспрессия описана, например, Durocher Y. и др., Nucl. Acids. Res. 30, 2002, E9.

Клонирование переменных доменов описано Orlandi R. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1989, сс.3833-3837; Carter P. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1992, сс.4285-4289; Norderhaug L. и др., J. Immunol. Methods 204, 1997, сс.77-87. Предпочтительная система кратковременной экспрессии (в клетках НЕК 293) описана Schlaeger E.-J. и Christensen К. в Cytotechnology 30, 1999, сс.71-83, и Schlaeger E.-J. в J. Immunol. Methods 194, 1996, сс.191-199.

Контрольные последовательности, которые применимы для прокариот, например, включают промотор, необязательно последовательность оператора, сайт связывания рибосомы. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, энхансеры и сигналы полиаденилирования.

Нуклеиновая кислота является «оперативно связанной», если она установлена в функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК предпоследовательности или секреторного лидера оперативно связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в качестве белка-предшественника, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер оперативно связаны с кодирующей последовательностью, если она влияет на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосомы является оперативно связанным с кодирующей последовательностью, если он располагается таким образом, чтобы способствовать трансляции. Обычно понятие «оперативно связанный» означает, что последовательности ДНК, будучи связанными, являются смежными, и, в случае секреторного лидера, соприкасаются и находятся в рамке считывания. Однако энхансеры необязательно должны быть смежными. Связывание дополняется лигированием по соответствующим сайтам рестрикции. Если таких сайтов нет, синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры используют в соответствии с обычной практикой.

Очистку антител проводят для элиминации клеточных компонентов или других контаминантов, например, других нуклеиновых кислот или белков, стандартными методами, включающими обработку щелочью/SDS, расслоение при центрифугировании в градиенте CsCl, колоночную хроматографию, гель-электрофорез в агарозе и другие известные в данной области методы. См. кн.: «Current Protocols in Molecular Biology», 1987, под ред. Ausubel F. и др., изд-во Greene Publishing and Wiley Interscience, Нью-Йорк. Различные методы были разработаны и широко применяются для очистки белка, например, аффинная хроматография с микробными белками (например, аффинная хроматография с белком А или белком G), ионообменная хроматография (например, катионообменная хроматография (карбоксиметильные смолы), анионообменная хроматография (аминоэтильные смолы) и хроматография смешанного действия), тиофильная адсорбция (например, с бета-меркаптоэтанолом и другими SH лигандами), хроматография гидрофобного взаимодействия или ароматической адсорбции (например, с фенил-сефарозой, аза-аренофильными смолами или м-аминофенилборной кислотой), аффинная хроматография с хелатами металлов (например, с Ni(II)- и Cu(II)-аффинным материалом), эксклюзионная хроматография и электрофоретические методы (например, электрофорез, капиллярный электрофорез) (Vijayalakshmi M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75, 1998, сс.93-102).

Настоящее изобретение включает способ лечения пациента, нуждающегося в таком лечении, отличающийся введением пациенту терапевтически эффективного количества антитела по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение включает применение антитела по настоящему изобретению для лечения.

Настоящее изобретение включает применение антитела по настоящему изобретению для получения лекарственного средства для предупреждения метастазирования.

Настоящее изобретение включает применение антитела по настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения рака.

5 Одним из объектов настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, включающая антитело по настоящему изобретению. Другим объектом настоящего изобретения является применение антитела по настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции. Еще одним объектом настоящего изобретения является способ получения фармацевтической композиции, включающей антитело по настоящему  
10 изобретению. В другом объекте по настоящему изобретению предусмотрена композиция, например, фармацевтическая композиция, содержащая антитело по настоящему изобретению, переработанное вместе с фармацевтическим носителем.

Другим объектом настоящего изобретения является указанная фармацевтическая композиция для предупреждения метастазирования.

15 Другим объектом настоящего изобретения является антитело по настоящему изобретению для предупреждения метастазирования.

Еще одним объектом настоящего изобретения является применение антитела по настоящему изобретению для получения лекарственного средства для предупреждения метастазирования.

20 Другим объектом настоящего изобретения является способ предупреждения метастазирования у пациента с первичным раковым заболеванием, представляющий введение антитела по настоящему изобретению пациенту, нуждающемуся в таком превентивном лечении.

Может быть продемонстрировано высокоэффективное предупреждение спонтанного  
25 метастазирования/вторичных опухолей *in vivo* в ортотопической и подкожной модели рака (см. пример 9) (иным вариантом является модель, в которой опухолевые клетки вносят инъекцией внутривенно. Это напоминает клиническую ситуацию, когда клетки распространяются от первичной опухоли и метастаз к вторичному органу, например, к легким или печени (где формируются вторичные опухоли).

30 Понятие «метастазирование» по настоящему изобретению относится к переносу раковых клеток от первичной опухоли в одно или несколько мест где-либо в организме пациента, где формируются вторичные опухоли. Средства обнаружения метастаз, если рак метастазирует, известны в данной области и включают сканирование костей, рентген грудной клетки, компьютерную хроматографию, магнитно-резонансную томографию  
35 и тестирование опухолевых маркеров.

Понятия «предупреждение метастазирования» или «предупреждение вторичных  
опухолей» в контексте настоящего изобретения имеют одно и то же значение и направляют профилактический агент против метастазирования у пациента с рецидивирующим HER2-положительным раком, и таким образом подавляя или уменьшая  
40 дополнительный перенос раковых клеток от первичной опухоли в одно или несколько мест где-либо в организме пациента. Это означает, что метастазирование первичной опухоли или рака предупреждают, отсрочивают или уменьшают, и таким образом развитие вторичных опухолей предупреждается, отсрочивается или уменьшается. Предпочтительно метастазирование, т.е. вторичные опухоли в легких, предупреждаются  
45 или уменьшаются, что означает, что перенос в ходе метастазирования раковых клеток от первичной опухоли в легкие предупреждается или уменьшается.

Другим объектом настоящего изобретения является указанная фармацевтическая композиция для лечения рака.

Другим объектом настоящего изобретения является антитело по настоящему изобретению для лечения рака.

Еще одним объектом настоящего изобретения является применение антитела по настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения рака.

5 Другим объектом настоящего изобретения является способ лечения пациента с раком путем введения антитела по настоящему изобретению пациенту, нуждающемуся в таком лечении.

10 В контексте настоящего изобретения понятие «фармацевтический носитель» включает какой-либо или все растворители, диспергирующие среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агента, изотонические агенты и агенты отсрочки всасывания, а также другие физиологически совместимые агенты. Предпочтительно носитель применим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, инъекцией или инфузией).

15 Композиция по настоящему изобретению может вводиться разными способами, известными в данной области. Специалистам в данной области известно, что способы введения могут варьировать в зависимости от требуемых результатов. Для введения соединения по настоящему изобретению разными способами может потребоваться нанести покрытие на соединение или одновременно с соединением ввести материал, препятствующий инактивации этого соединения. Например, соединение может вводиться 20 субъекту в соответствующем носителе, например, в липосомах или в растворителе. Фармацевтически приемлемые растворители включают физиологический раствор и водные буферные растворы. К фармацевтическим растворам относятся стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки приготавливаемых непосредственно перед введением препаратов стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Применение таких сред и агентов для фармацевтически действующих 25 веществ известно в данной области.

Фразы «парентеральное введение» и «введенные парентерально», используемые в настоящем изобретении, означают способы введения, отличные от введения внутрь и 30 местного введения, обычно способы введения инъекцией, и включают, но ими не ограничиваются, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, подоболочечное, внутрикапсулярное, внутриглазное, внутрисердечное, внутрикожное, внутрибрюшинное, внутритрахеальное, транстрахеальное, подкожное, подкутикулярное, внутрисуставное, подкапсулярное, надпаутинное, внутриспинальное, эпидуральное и надчревное введение инъекцией и инфузией.

35 Понятие «рак» в контексте настоящего изобретения относится к пролиферативным заболеваниям, например, к лимфоме, лимфоцитарным лейкозам, раку легких, немелкоклеточному раку легких (НМКРЛ), бронхоальвеолярному раку легкого, раку костей, раку поджелудочной железы, раку кожи, раку головы и шеи, кожной или внутриглазной меланоме, раку матки, раку яичника, раку прямой кишки, раку анальной 40 области, раку желудка, раку области желудка, раку толстой кишки, раку груди, раку матки, карциноме фаллопиевых труб, карциноме эндометрия, карциноме шейки матки, карциноме влагалища, карциноме наружных женских половых органов, болезни ходжкина, раку пищевода, раку тонкой кишки, раку эндокринной системы, раку щитовидки, раку парашитовидки, раку надпочечника, саркоме мягких тканей, раку уретры, раку пениса, раку простаты, раку мочевого пузыря, раку почки и мочеточника, раку почки, раку почечных лоханок, мезотелиоме, гепатоклеточному раку, раку желчных 45 путей, новообразованиям центральной нервной системы (ЦНС), раку позвоночника, глиоме ствола мозга, мультиформной глиоме, астроцитоме, шваннозу, эпендимомам,

медуллобластому, менингиоме, плоскоклеточной карциноме, аденоме гипофиза и саркоме Юинга, включая устойчивые версии какой-либо из указанных выше форм рака или комбинацию указанных выше одной или нескольких форм рака.

5 Другим объектом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, используемая в качестве антиангиогенного агента. Такой антиангиогенный агент может применяться для лечения рака, особенно плотных опухолей, и других сосудистых заболеваний.

10 Еще одним объектом настоящего изобретения является применение антитела по настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения сосудистых заболеваний.

Другим объектом настоящего изобретения является антитело по настоящему изобретению для лечения сосудистых заболеваний.

Предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является антитело по настоящему изобретению для лечения ретинопатии.

15 Предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является применение антитела по настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения ретинопатии.

Другим объектом настоящего изобретения является способ лечения пациента с сосудистым заболеванием путем введения антитела по настоящему изобретению пациенту, нуждающемуся в таком лечении.

20 Понятие «сосудистые заболевания» включает рак, воспалительные заболевания, атеросклероз, ишемию, травмы, сепсис, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), астму, диабет, возрастную дегенерацию желтого пятна (ВДЖП), ретинопатию, удар, ожирение, острое повреждение легких, кровоизлияние, сосудистое просачивание, например, индуцированное цитокином, аллергию, базедову болезнь, аутоиммунный тиреоидит Хашимото, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, гигантоклеточный артериит, ревматоидный артрит, системную красную волчанку (СКВ), волчаночный нефрит, болезнь Крона, рассеянный склероз, язвенный колит, особенно солидные опухоли, внутриглазные сосудистые синдромы, (например, пролиферативные ретинопатии или возрастную дегенерацию желтого пятна (ВДЖП)), ревматоидный артрит и псориаз (Folkman J. и др., J. Biol. Chem. 267, 1992, сс.10931-10934; Klagsbrun M. и др., Annu. Rev. Physiol. 53, 1991, сс.217-239; и Garner A. в кн.: «Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach», 1994, под ред. Garner A. и Klintworth G.K., 2-е изд., изд-во Marcel Dekker, Нью-Йорк, сс.1625-1710).

35 Эти композиции также могут содержать адъюванты, например, консерванты, увлажняющие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Гарантированного предупреждения наличия микроорганизмов можно достичь и описанными выше процедурами стерилизации, и включением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и др. Может быть желательным включение в композиции изотонических агентов, например, сахаров, натрия хлорида и других. Кроме того, пролонгированное всасывание инъекционной фармацевтической формы может быть достигнуто, например, включением агентов, которые отсрочивают всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

45 Независимо от выбранного способа введения соединения по настоящему изобретению, которые из них могут применяться в соответствующей гидратированной форме, и/или фармацевтические соединения по настоящему изобретению перерабатывают в фармацевтически приемлемые дозированные формы обычными

методами, известными специалистам в данной области.

Фактические уровни дозирования действующих ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться таким образом, чтобы получить количество действующего ингредиента, которое эффективно для достижения 5 требуемого терапевтического ответа для определенного пациента, композицию и способ введения без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозирования может зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая действие определенных применяемых композиций по настоящему изобретению и способа введения без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозирования может зависеть от 10 различных фармакокинетических факторов, включая действие определенных применяемых композиций по настоящему изобретению, способа введения, времени введения, скорости экскреции определенного применяемого соединения, длительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, использованных в комбинации с определенными применяемыми композициями, от возраста, пола, массы 15 тела, состояния, общего состояния здоровья и истории болезни подвергнутого лечению пациента и других факторов, известных в медицине.

Композиции должны быть стерильными и жидкими до такой степени, чтобы композиция могла войти в шприц. Помимо воды носителем предпочтительно является изотонический буферный солевой раствор.

20 Должная текучесть может поддерживаться, например, применением покровных агентов, например, лецитина, поддержанием требуемого размера частиц в случае дисперсии и применением поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, например, маннит или сорбит, и натрий хлорид.

25 В контексте настоящего изобретения понятия «клетка», «линия клеток» и «культура клеток» используют взаимозаменяемо, и все они также включают последующие поколения клеток. Таким образом, понятия «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают первичные клетки субъекта и производные от них культуры независимо от числа пересевов. Также следует учитывать, что все потомство клеток 30 может быть неидентичным по содержанию ДНК из-за плановых или случайных мутаций. К этим понятиям также относятся варианты клеток следующей генерации, которые имеют то же биологическое действие или функцию, выявляемые при скрининге первоначально трансформированных клеток. Если подразумеваются другие обозначения, это будет ясно из контекста.

35 Понятие «трансформация», используемое в настоящем изобретении, относится к процессу переноса вектора/нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Если используют клетки без труднопреодолимой стенки в качестве клеток-хозяев, трансфекцию выполняют, например, методом осаждения кальцием фосфатом согласно описанию 40 Graham F.L. и van der Eb, Virology 52, 1973, сс.456-467. Однако также могут применяться другие методы внедрения ДНК в клетки, например, ядерной инъекции или слияния протопластов. Если используют прокариотические клетки или клетки, у которых имеется прочное строение клеточной стенки, один из методов трансфекции, например, представляет обработку кальцием, используя кальций хлорид согласно описанию Cohen F.N. и др., PNAS. 69, 1972, сс.7110 и последующие.

45 В контексте настоящего изобретения понятие «экспрессия» относится к процессу, с помощью которого нуклеиновая кислота транскрибируется в иРНК, и/или к процессу, с помощью которого транскрибированная иРНК (также называемая транскриптом) позднее транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Транскрипты и кодируемые

полипептиды вместе называются генными продуктами. Если полинуклеотид происходит от геномной ДНК, экспрессия в эукариотических клетках может включать сплайсинг и РНК.

5 Понятие «вектор» означает молекулу нуклеиновой кислоты, в частности самореплицирующуюся, которая переносит инсертированную молекулу нуклеиновой кислоты в клетки-хозяева и/или между клетками-хозяевами. К этому понятию относятся векторы, которые действуют в основном для инсерции ДНК или РНК в клетку (например, интеграция в хромосому), репликации векторов, функция которых преимущественно заключается в репликации ДНК или РНК, и векторы экспрессии, 10 которые действуют для транскрипции и/или трансляции ДНК или РНК. Также к этому понятию относятся векторы, которые обеспечивают более одной из описанных функций.

Понятие «вектор экспрессии» относится к полинуклеотиду, который интродуцирован в соответствующую клетку-хозяина и может быть транскрибирован и транслирован в полипептид. Понятие «система экспрессии» обычно относится к соответствующей 15 клетке-хозяину, включающей вектор экспрессии, который может функционировать для выработки требуемого продукта экспрессии.

Приводимые ниже примеры, перечни последовательностей и фигуры предусмотрены для лучшего понимания настоящего изобретения, истинная область охвата которого изложена ниже в формуле настоящего изобретения. Следует учитывать, что модификации 20 могут быть произведены в ходе описанных ниже действий, не отклоняясь от духа настоящего изобретения.

Описание аминокислотных последовательностей

SEQ ID NO: 1	CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC06
25 SEQ ID NO: 2	CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 3	CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 4	CDR3 легкой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 5	CDR2 легкой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC06
30 SEQ ID NO: 6	CDR1 легкой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 7	вариабельный домен тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 8	вариабельный домен легкой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC06
35 SEQ ID NO: 9	CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 10	CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 11	CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 12	CDR3 легкой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC07
40 SEQ ID NO: 13	CDR2 легкой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 14	CDR1 легкой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC07

45

SEQ ID NO: 15	вариабельный домен тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 16	вариабельный домен легкой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 17	CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2k_LC08
5 SEQ ID NO: 18	CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO: 19	CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO: 20	CDR3 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC08
10 SEQ ID NO: 21	CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO: 22	CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO: 23	вариабельный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO: 24	вариабельный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC08
15 SEQ ID NO: 25	CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 26	CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 27	CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09
20 SEQ ID NO: 28	CDR3 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 29	CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 30	CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09
25 SEQ ID NO: 31	вариабельный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 32	вариабельный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 33	CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 34	CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10
30 SEQ ID NO: 35	CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 36	CDR3 легкой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 37	CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10
35 SEQ ID NO: 38	CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 39	вариабельный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 40	вариабельный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 41	CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11
40 SEQ ID NO: 42	CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO: 43	CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO: 44	CDR3 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11
45 SEQ ID NO: 45	CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO: 46	CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO: 47	вариабельный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11

- SEQ ID NO: 48      вариабельный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2k\_LC11
- SEQ ID NO: 49      CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03
- SEQ ID NO: 50      CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03
- 5   SEQ ID NO: 51      CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03
- SEQ ID NO: 52      CDR3 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03
- SEQ ID NO: 53      CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03
- 10   SEQ ID NO: 54      CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03
- SEQ ID NO: 55      вариабельный домен тяжелой цепи, <ANG-2>  
Ang2s\_R3\_LC03
- SEQ ID NO: 56      вариабельный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03
- 15   SEQ ID NO: 57      константная область тяжелой цепи человека, производная от  
IgG1
- SEQ ID NO: 58      константная область тяжелой цепи человека, производная от  
20   IgG4
- SEQ ID NO: 59      константная область каппа легкой цепи
- SEQ ID NO: 60      константная область лямбда легкой цепи
- SEQ ID NO: 61      рецептор Tie-2 человека
- 25   SEQ ID NO: 62      ангиопозтин-2 человека (ANG-2) с лидерной  
последовательностью и His-меткой
- SEQ ID NO: 63      ангиопозтин-1 человека (ANG-1) с лидерной  
30   последовательностью и His-меткой
- Описание фигур
- Фиг.1. Клонирование IgG для кратковременной экспрессии в векторах экспрессии  
для кратковременной экспрессии А) Ang2i-LC06 (фиг.1А), Б) Ang2i-LC06 (фиг.1Б).
- Фиг.2. Очистка в геле SDS-PAGE анти-ANG-2 антител Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 и  
35   Ang2k-LC08.
- Фиг.3. Исследование взаимодействия ангиопозтина-Tie2 методом ELISA.
- Фиг.4. Подавление связывания ANG-2 с Tie2 за счет Ang2i-LC06 и Ang2k-LC08.
- Фиг.5. Подавление связывания ANG-1 с Tie2 за счет Ang2i-LC06 и Ang2k-LC08.
- Фиг.6. Модель ксенотрансплантата Colo205 для тестирования in vivo эффективности  
40   анти-ANG-2 антител.
- Фиг.7. Модель ксенотрансплантата KPL-4 для тестирования in vivo эффективности  
анти-ANG-2 антител.
- Фиг.8. Связывание ANG-1 с помощью сенсограмм Biacore.
- Фиг.9. Предупреждение метастаз/вторичных опухолей в легких антителами по  
45   настоящему изобретению в первичном ксенотрансплантате опухоли толстой кишки  
(9А) и первичном ксенотрансплантате груди (9В).
- Фиг.10. Подавление ретинопатии антителами по настоящему изобретению.
- Эксперимент 1

## Материалы и основные методы

Общая информация, касающаяся нуклеотидных последовательностей легкой и тяжелой цепей иммуноглобулинов человека, приведена в кн.: Kabat E.A. и др. «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 1991, 5-е изд., изд-во Public Health Service,

5 Национальный институт здоровья, Bethesda, Мэриленд. Аминокислоты цепочек антител нумеруют и указывают по нумерации EU (Edelman G.M. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 1969, сс.78-85; в кн.: Kabat E.A. и др. «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 1991, 5-е изд., изд-во Public Health Service, Национальный институт здоровья, Bethesda, Мэриленд).

### 10 Методы рекомбинации ДНК

Стандартные методы применяют для работы с ДНК согласно описанному Sambrook J. и др. в кн.: «Molecular cloning: A laboratory manual», 1989, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк. Реагенты для молекулярной биологии используют по инструкциям производителя.

### 15 Генный синтез

Требуемые генные сегменты получают из олигонуклеотидов химическим синтезом. Генные сегменты, фланкированные единственными сайтами расщепления эндонуклеазами, собирают путем отжига и лигирования олигонуклеотидов, включая ПЦР-амплификацию, и затем клонируют через указанные сайты рестрикции, например, 20 KpnI/SacI или AscI/PacI, в векторе клонирования pGA4, основанном на pPCRScripT (фирма Stratagene). Последовательности ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждают сиквенсом ДНК. Фрагменты генного синтеза упорядочивают в соответствии с техническими требованиями фирмы Geneart (Regensburg, Германия).

### Определение последовательности ДНК

25 Последовательности ДНК определяют двухцепочечным секвенированием, выполняемым фирмами MediGenomix GmbH (Martinsried, Германия) или Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Германия).

Анализ последовательностей ДНК и белка и использование данных по последовательностям

30 Используют версию 10.2 пакета программного обеспечения GCG (Genetics Computer Group, Мэдисон, Висконсин) и Infomax's Vector NT1 Advance suite версию 8.0 для создания последовательностей, картирования, анализа, пояснений и иллюстраций.

### Векторы экспрессии

35 Для экспрессии требуемых антител используют варианты экспрессирующих плазмид для кратковременной экспрессии (например, в клетках НЕК293 EBNA или НЕК293-F) или для стабильной экспрессии (например, в клетках CHO), основанные на организации кДНК с промотором CMV-интрона А или на геномной организации с промотором CMV (например, фиг.1).

Помимо кассеты экспрессии антитела векторы содержат:

40 - начало репликации, которое позволяет осуществлять репликацию этой плазмиды в E.coli, и

- ген β-лактамазы, который обуславливает устойчивость к ампициллину у E.coli.

Единица транскрипции гена антитела состоит из следующих элементов:

- уникального сайта (сайтов) рестрикции с 5'-конца,
- 45 - прямого раннего энхансера и промотора от цитомегаловируса человека,
- последующей последовательности интрона А в случае организации кДНК,
- 5'-нетранслируемой области гена антитела человека,
- сигнальной последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина,

- цепи антитела человека (тяжелой цепи, модифицированной тяжелой цепи или легкой цепи), либо в качестве кДНК, либо в качестве геномной организации с организацией экзона-интрона иммуноглобулина,

- 3'-нетранслируемой области с сигнальной последовательностью

5 полиаденилирования, и

- уникального сайта (сайтов) рестрикции с 3'-конца.

Гибридные гены, включающие последовательности тяжелой цепи выбранного антитела, согласно описанному ниже, получают методом ПЦР и/или генным синтезом и собирают известными методами рекомбинации путем соединения соответствующих

10 сегментов нуклеиновой кислоты, например, используя уникальные сайты NsiI и EcoRI в геномных векторах тяжелой цепи. Субклонированные последовательности нуклеиновой кислоты выверяют сиквенсом ДНК. Для временной и стабильной трансфекции повышенные количества плазмид получают выделением плазмид из трансформированных культур E.coli (колонки Nucleobond AX, фирма Macherey-Nagel).

15 Методы культуры клеток

Стандартные методы культур клеток применяют согласно описанию в кн.: «Current Protocols in Cell Biology», 2000, под ред. Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J. и Yamada K.M., изд-во John Wiley & Sons, Inc.

Кратковременные трансфекции в системе НЕК293-F

20 Антитела получают кратковременной трансфекцией двух плазмид, кодирующих тяжелую или модифицированную тяжелую цепи, соответственно, и соответствующую легкую цепь, используя систему НЕК293-F (фирма Invitrogen) по инструкции производителя. Вкратце, клетки НЕК293-F (фирма Invitrogen), растущие в суспензии, или в качалочной колбе, или в ферментере с перемешиванием в среде для экспрессии

25 без сыворотки FreeStyle 293 (фирма Invitrogen), трансфецируют смесью двух соответствующих экспрессирующих плазмид, а также 293 фектина или фектина (фирма Invitrogen). Например, качалочные колбы объемом 2 л (фирма Corning) засевают клетками НЕК293-F плотностью  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл в 600 мл и инкубируют при 120 об/

30 мин, 8% CO<sub>2</sub>. Через сутки после трансфекции при плотности клеток примерно  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл примерно с 42 мл смеси А) 20 мл Opti-MEM (фирма Invitrogen) с 600 мкг суммарной плазмидной ДНК (1 мкг/мл), кодирующей тяжелую или модифицированную тяжелую цепь, соответственно, и соответствующую легкую цепь в эквимольном соотношении и Б) 20 мл Opti-MEM + 1,2 мл 293 фектина или фектина (2 мкл/мл). По

35 мере потребления глюкозы добавляют раствор глюкозы на протяжении курса ферментации. Супернатант, содержащий секретированное антитело, собирают через 5-10 суток и антитела или очищают прямо из супернатанта, или супернатант замораживают и хранят.

Определение белка

40 Концентрацию белка очищенных антител и их производных определяют по оптической плотности (ОП) при 280 нм, используя коэффициент молярной экстинкции, рассчитанный на основе аминокислотной последовательности по Pace C.N. и др., Protein Science, 4, 1995, сс.2411-1423.

Определение концентрации антител в супернатантах

45 Концентрацию антител и их производных в супернатантах культуры клеток оценивают по иммунопреципитации с применением агарозных гранул с белком А (фирма Roche). 60 мкл агарозных гранул с белком А промывают трижды с помощью TBS-NP40 (50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40). Затем 1-15 мл супернатантов культуры

клеток наносят на агарозные гранулы с белком А, предварительно уравновешенные в TBS-NP40. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре гранулы промывают в колонке Ultrafree-MS-filter (фирма Amicon) однократно с помощью 0,5 мл TBS-NP40, дважды с помощью 0,5 мл 2× фосфатно-солевого буфера (2×ФСБ, фирма Roche) и четыре раза быстро промывают 0,5 мл 100 мМ Na цитрата pH 5,0. Связанное антитело элюируют добавлением 35 мкл буфера для образцов NuPAGE® LDS (фирма Invitrogen). Половину образца комбинируют с агентом NuPAGE®, восстанавливающим образец, или образец оставляют невосстановленным, соответственно, и нагревают в течение 10 мин при 70°C. Затем 20 мкл наносят на 4-12% NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE (фирма Invitrogen) (с буфером MOPS для метода SDS-PAGE в отсутствие восстановителя и с буфером MES с добавлением антиоксидантного подвижного буфера (фирма Invitrogen) для метода SDS-PAGE в присутствии восстановителя) и окрашивают кумасси синим.

Концентрация антител и их производных в супернатантах культур клеток измеряют хроматографией ВЭЖХ с белком А. Вкратце, супернатанты культур клеток, содержащие антитела и их производные, несущие белок А, вносят в колонку HiTrap Protein A (фирма GE Healthcare) в 50 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 мМ NaCl, pH 7,3 и элюируют из матрикса с помощью 50 мМ уксусной кислоты, pH 2,5, в системе ВЭЖХ Dionex. Количество элюированного белка подсчитывают по поглощению в УФ и по интеграции пиковых областей. Очищенное стандартное антитело IgG1 служит стандартом.

В другом варианте концентрацию антител и их производных в супернатантах культур клеток измеряют методом сэндвич-IgG-ELISA. Вкратце, 96-луночные планшеты для микротитрования Strepta Well High Bind Strepatavidin (фирма Roche) покрывают в количестве 100 мкл/лунку биотинилированной захваченной молекулы антитела против IgG человека F(ab')<sub>2</sub><h-Fcγ>BI (фирма Dianova) в концентрации 0,1 мкг/мл в течение 1 ч при комнатной температуре или в другом варианте в течение ночи при 4°C и затем промывают трижды с помощью 200 мкл/лунку ФСБ, 0,05% Tween (ФСБ-Твин (ФСБТ), фирма Sigma). По 100 мкл/лунку серийных разведений в ФСБ (фирма Sigma) супернатантов культур клеток, содержащих соответствующее антитело, вносят в лунки и инкубируют в течение 1-2 ч на встряхивателе для микропланшетов при комнатной температуре. Лунки промывают трижды с помощью 200 мкл/лунку ФСБТ и связанное антитело выявляют с помощью 100 мкл F(ab')<sub>2</sub><h-Fcγ>POD (фирма Dianova) в концентрации 0,1 мкг/мл в качестве выявляющего антитела в течение 1-2 ч на встряхивателе для микропланшетов при комнатной температуре. Несвязанное выявляющее антитело трижды промывают 200 мкл/лунку ФСБТ и связанное выявляющее антитело обнаруживают добавлением 100 мкл АВТС/лунку. Поглощение определяют на спектрометре Tecan Fluor при волне измерения 405 нм (контрольная длина волны 492 нм).

#### Очистка белка

Белки очищают из отфильтрованных супернатантов клеток по стандартным протоколам. Вкратце, антитела вносят в колонку сефарозы с белком А (фирма GE Healthcare) и промывают ФСБ. Элюцию антител проводят при кислой величине pH с последующей немедленной нейтрализацией образца. Агрегированный белок отделяют от мономерных антител эксклюзионной хроматографией (Superdex 200, фирма GE Healthcare) в 20 мМ гистидине, 140 мМ NaCl, pH 6,0. Фракции мономерных антител объединяют, при необходимости концентрируют, используя, например, центрифугирующий концентратор MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO) и хранят при -80°C. Часть образцов предоставляют в дальнейшем для анализа и описания белка,

например, методом SDS-PAGE, эксклюзионной хроматографией, масс-спектрометрией и определением эндотоксина (см. фиг.2).

Натрий додецил сульфат - полиакриламидный гель электрофорез (sodium dodecyl sulphate polyacrilamid gel electrophoresis - SDS-PAGE)

5 Гель-систему NuPAGE® заводской сборки (фирма Invitrogen) используют по инструкции производителя. В частности, используют гели 4-20% NuPAGE® Novex® TRIS-Glycine Pre-Cast и подвижный буфер Novex® TRIS-Glycine SDS. (см., например, фиг.1). Восстановление образцов достигается добавлением восстанавливающего образец агента NuPAGE® перед движением в геле.

10 Аналитическая эксклюзионная хроматография

Эксклюзионную хроматографию для определения агрегирования и олигомерного состояния антител проводят методом ВЭЖХ. Вкратце, очищенные с применением белка А антитела вносят в колонку Tosoh TSKgel G3000SW в 300 мМ NaCl, 50 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,5 в системе ВЭЖХ Dionex или в колонку Superdex 200 (фирма GE Healthcare) в 2×ФСБ в систему ВЭЖХ Dionex. Элюированный белок подсчитывают путем поглощения в УФ и интеграции областей пиков. В качестве стандарта применяют BioRad Gel Filtration Standard 151-1901.

Масс-спектрометрия

15 Общую гликозилированную массу антител определяют и подтверждают методом электро-спрей ионизирующей масс-спектрометрии (electrospray ionization mass spectrometry - ESI-MS). Вкратце, 100 мкг очищенных антител дегликозилируют с помощью 50 мЕд N-гликозидазы F (PNGaseF, ProZyme) в 100 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7 при 37°C в течение 12-24 ч при концентрации белка до 2 мг/мл и затем обессоливают с помощью ВЭЖХ на колонке Sephadex G25 (фирма GE Healthcare). Массу соответствующих тяжелой и легкой цепей определяют методом масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем (ESI-MS) после дегликозилирования и восстановления. Вкратце, 50 мкг антитела в 115 мкл инкубируют с 60 мкл 1 М ТСЕР и 50 мкл 8 М гуанидиния гидрохлорида затем обессоливают. Общую массу и массу восстановленных тяжелой и легкой цепей определяют с помощью ESI-MS в системе Q-Star Elite MS, оборудованной источником NanoMate.

Оценка связывания ANG-1 и ANG-2 медом ELISA

20 Связывающие свойства антител, направленных против ANGPT (ангиопоэтина-1 и ангиопоэтина-2) оценивают методом ELISA с белком полной длины ангиопоэтином-2-His (фирма R&D Systems #623-AN/CF или с самостоятельно полученным материалом) или ангиопоэтином-1-His (фирма R&D systems #923-AN). Для этого 96-луночные планшеты (усиленные прозрачные планшеты для микротитрования из полистирола Falcon или Nunc Maxisorb) покрывают 100 мкл рекомбинантного ангиопоэтина-1 или ангиопоэтина-2 человека (без носителя) в концентрации 1 мкг/мл в ФСБ (фирма Sigma) в течение 2 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C. Лунки промывают трижды с помощью 300 мкл ФСБТ (0,2% Tween 20) и блокируют 200 мкл 2% БСА 0,1% Tween 20 в течение 30 мин при комнатной температуре, затем промывают трижды 300 мкл ФСБТ. Добавляют по 100 мкл/лунку серийных разведений (от 40 пМ до 0,01 пМ) очищенного исследуемого антитела против <ANG-2> и в качестве контроля антитела Mab536 (Oliner J. и др., Cancer Cell. Nov 6, 2004, сс.507-516, US 2006/0122370) в ФСБ и инкубируют в течение 1 ч на встряхивателе для микропланшетов при комнатной температуре. Лунки промывают трижды 300 мкл ФСБТ (0,2% Tween 20) и выявляют связанное антитело с помощью 100 мкл/лунку 0,1 мкг/мл F(ab')<hk>POD (фирма Biozol, номер в каталоге 206005) в 2% БСА 0,1% Tween 20 в качестве выявляемого антитела в

течение 1 ч на встряхивателе для микропланшетов при комнатной температуре. Несвязанное выявляемое антитело отмывают трижды с помощью 300 мкл/лунку ФСБТ и связанное выявляемое антитело обнаруживают добавлением 100 мкл АВТС/лунку. Поглощение определяют на спектрометре Tecan Fluor при длине волны 405 нм

5 (контрольная длина волны 492 нм).

#### Определение связывания ANG-2 методом BIACORE

Связывание антител с антигеном, например, ANG-2 человека, исследуют методом поверхностного плазменного резонанса, используя прибор BIACORE T100 (фирма GE Healthcare Biosciences AB, Упсала, Швеция). Вкратце, для измерений связывания козы

10 <hIgG-Ггамма> поликлональные антитела иммобилизуют на чипе CM4 через аминное соединение для презентации антител против ANG-2 человека. Связывание измеряют в буфере HBS (HBS-P: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7,4), 25°C. Очищенный ANG-2-His (фирма R&D systems или очистку проводят самостоятельно) добавляют в разных концентрациях от 0,41 нМ до 200 нМ в раствор. Ассоциацию

15 измеряют путем 3-минутной инъекции ANG-2; диссоциацию измеряют промывкой поверхности чипа буфером HBS в течение 5 мин, и величину KD оценивают, используя 1:1 модель связывания Ленгмюра. Из-за гетерогенности препарата ANG-2 можно не наблюдать связывания 1:1; таким образом, величины KD получают только относительные оценки. Данные по отрицательному контролю (например, кривые

20 буфера) вычитают из кривых образцов для коррекции смещения системного исходного уровня и для уменьшения шума сигнала. Для анализа сенсограмм и для подсчета данных по связыванию применяют программное обеспечение Biacore T100 Evaluation Software, версия 1.1.1. В другом варианте антиген Ang-2 может быть захвачен с уровнем захвата 2000-1700 KE через PentaHis антитело (PentaHis-Ab без БСА, фирма Qiagen, номер в

25 каталоге 34660), которое иммобилизовано на чипе CM5 путем аминной связи (без БСА) (см. ниже).

#### Подавление связывания ANG-2 человека с Tie-2 (метод ELISA)

Взаимодействие методом ELISA проводят в 384-луночных планшетах для микротитрований (фирма MicroCoat, DE, номер в каталоге 464718) при комнатной

30 температуре. После каждой стадии инкубирования планшеты промывают трижды буфером ФСБТ. Планшеты ELISA покрывают 0,5 мкг/мл белка Tie-2 (фирма R&D Systems, Великобритания, номер в каталоге 313-ТI) в течение по меньшей мере 2 ч. Затем лунки блокируют ФСБ, обогащенным 0,2% Tween-20 и 2% БСА (фирма Roche Diagnostics GmbH, DE) в течение 1 ч. Разведения очищенных антител в ФСБ инкубируют вместе с

35 0,2 мкг/мл ангиопоэтином-2 человека (фирма R&D Systems, Великобритания, номер в каталоге 623-AN) в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывания смесь 0,5 мкг/мл биотинилированного анти-ангиопоэтин-2 клона ВАМ0981 (фирма R&D Systems, Великобритания) и разведенного 1:3000 стрептавидина HRP (фирма Roche Diagnostics GmbH, Делавэр, номер в каталоге 11089153001) добавляют на 1 ч. Затем

40 планшеты промывают 6 раз с помощью ФСБТ. Планшеты обрабатывают свежеприготовленным реагентом АВТС (фирма Roche Diagnostics GmbH, Делавэр, буфер #204530001, таблетки #11112422001) в течение 30 мин при комнатной температуре. Поглощение измеряют при 405 нм.

#### Подавление связывания ANG-1 человека с Tie-2 (ELISA)

45 Взаимодействие методом ELISA проводят в 384-луночных планшетах для микротитрований (фирма MicroCoat, DE, номер в каталоге 464718) при комнатной температуре. После каждой стадии инкубирования планшеты промывают трижды буфером ФСБТ. Планшеты ELISA покрывают 0,5 мкг/мл белка Tie-2 (фирма R&D

Systems, Великобритания, номер в каталоге 313-Т1) в течение по меньшей мере 2 ч. Затем лунки блокируют ФСБ, обогащенным 0,2% Tween-20 и 2% БСА (фирма Roche Diagnostics GmbH, DE) в течение 1 ч. Разведения очищенных антител в ФСБ инкубируют вместе с 0,2 мкг/мл ангиопоэтином-2 человека (фирма R&D Systems, Великобритания, номер в каталоге 923-AN/CF или полученным самостоятельно) в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывания смесь 0,5 мкг/мл биотинилированного анти-ангиопоэтин-1 клона (фирма R&D Systems, номер в каталоге BAF923) и разведенного 1:3000 стрептавидина HRP (фирма Roche Diagnostics GmbH, Делавэр, номер в каталоге 11089153001) добавляют на 1 ч. Затем планшеты промывают 6 раз с помощью ФСБТ. Планшеты обрабатывают свежеприготовленным реагентом АВТС (фирма Roche Diagnostics GmbH, Делавэр, буфер #204530001, таблетки #11112422001) в течение 30 мин при комнатной температуре. Поглощение измеряют при 405 нм.

#### Получение линии клеток HEK293-Tie2

Для определения интерференции антител против ангиопоэтина-2 со стимулируемым ANGPT2 фосфорилированием Tie2 и связыванием ANGPT2 с Tie2 на клетках получают рекомбинантную линию клеток HEK293-Tie. Вкратце, плазмиду на основе pcDNA3 (RB22-pcDNA3 Торо hTie2), кодирующая Tie2 человека полной длины (SEQ ID 61) под контролем промотора CMV и маркер устойчивости к неомицину, трансфецируют, используя Eugene (фирма Roche Applied Science) в качестве реагента трансфекции в клетки HEK293 (ATCC), и устойчивые клетки отбирают на среде DMEM 10% ФСТ, 500 мкг/мл G418. Отдельные клоны выделяют с помощью цилиндра для клонирования и затем анализируют на наличие экспрессии Tie2 методом FACS. Клон 22 идентифицируют в качестве клона с высокой и стабильной экспрессией Tie2 при отсутствии G418 (HEK293-Tie2 клон 22). HEK293-Tie2 клон 22 затем используют для клеточных исследований: исследования индуцированного ANGPT2 фосфорилирования Tie2 и исследования связывания клеточного лиганда ANGPT2.

#### Исследование индуцированного ANGPT2 фосфорилирования Tie2

Подавление индуцированного ANGPT2 фосфорилирования Tie2 антителами ANGPT2 измеряют следующим образом. HEK293-Tie2 клон 22 стимулируют с применением ANGPT2 в течение 5 мин при отсутствии или при наличии ANGPT2 антитела и p-Tie2 подсчитывают методом сэндвич ELISA. Вкратце,  $2 \times 10^5$  клеток HEK293-Tie2 клона 22 на лунку выращивают в течение ночи в 96-луночных планшетах для микротитрования, покрытых поли-D-лизином в 100 мкл DMEM, 10% ФСТ, с 500 мкг/мл генетицина. На следующий день ряд титрования антител ANGPT2 получают в планшете для микротитрования (4-кратное концентрирование, конечный объем 75 мкл/лунку, повторы) и перемешивают с 75 мкл ANGPT2 (фирма R&D systems, номер в каталоге 623-AN) разведения (3,2 мкг/мл в качестве раствора 4-х кратной концентрации). Антитела и ANGPT2 предварительно инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре. 100 мкл вносят к клеткам HEK293-Tie2 клона 22 (предварительно инкубированным в течение 5 мин с 1 mM  $\text{NaV}_3\text{O}_4$ , фирма Sigma, номер в каталоге S6508) и инкубируют в течение 5 мин при 37°C. Затем клетки промывают 200 мкл ледяного ФСБ + 1 mM  $\text{NaV}_3\text{O}_4$  на лунку и лизируют добавлением 120 мкл лизирующего буфера (20 mM Tris, pH 8,0, 137 mM NaCl, 1% NP-40, 10% глицерин, 2 mM EDTA, 1 mM  $\text{NaV}_3\text{O}_4$ , 1 mM PMSF и 10 мкг/мл апротинина) на лунку на льду. Клетки лизируют в течение 30 мин при 4°C на встряхивателе для микропланшетов для титрования при комнатной температуре и 100 мкл лизата переносят непосредственно в планшет для микротитрования p-Tie2 ELISA (фирма R&D Systems, R&D #DY990) без предварительного центрифугирования и без

определения суммарного белка. Количества P-Tie2 подсчитывают по инструкциям производителя и величины IC50 по подавлению определяют, используя подключение XLfit4 анализа для Excel (один участок доза-ответ, модель 205). Величины IC50 могут сопоставляться в рамках эксперимента, но могут варьировать от эксперимента к эксперименту.

Исследование индуцированного ANGPT2 фосфорилирования Tie2

Подавление индуцированного ANGPT1 фосфорилирования Tie2 антителами ANGPT1 измеряют следующим образом. HEK293-Tie2 клон 22 стимулируют с применением ANGPT1 в течение 5 мин при отсутствии или при наличии ANGPT1 антитела и P-Tie2

подсчитывают методом сэндвич ELISA. Вкратце,  $2 \times 10^5$  клеток HEK293-Tie2 клон 22 на лунку выращивают в течение ночи в 96-луночных планшетах для микротитрования, покрытых поли-D-лизином в 100 мкл DMEM, 10% ФСТ, 500 мкг/мл генетицина. На следующий день ряд титрования антител ANGPT1 получают в планшете для микротитрования (4-кратное концентрирование, конечный объем 75 мкл/лунку, повторы) и перемешивают с 75 мкл ANGPT12 (фирма R&D systems, номер в каталоге 923-AN) разведения (0,8 мкг/мл в качестве раствора 4-х кратной концентрации). Антитела и ANGPT1 предварительно инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре. 100 мкл вносят к клеткам HEK293-Tie2 клон 22 (предварительно инкубированным в течение 5 мин с 1 мМ  $\text{NaV}_3\text{O}_4$ , фирма Sigma, номер в каталоге S6508) и инкубируют в течение 5 мин при 37°C. Затем клетки промывают 200 мкл ледяного ФСБ + 1 мМ  $\text{NaV}_3\text{O}_4$  на лунку и лизируют добавлением 120 мкл лизирующего буфера (20 мМ Tris, pH 8,0, 137 мМ NaCl, 1% NP-40, 10% глицерин, 2 мМ EDTA, 1 мМ  $\text{NaV}_3\text{O}_4$ , 1 мМ PMSF и 10 мкг/мл апротинина) на лунку на льду. Клетки лизируют в течение 30 мин при 4°C на встряхивателе для микропланшетов для титрования и 100 мкл лизата переносят непосредственно в планшет для микротитрования p-Tie2 ELISA (фирма R&D Systems, R&D #DY990) без предварительного центрифугирования и без определения суммарного белка. Количества P-Tie2 подсчитывают по инструкциям производителя и величины IC50 по подавлению определяют, используя подключение XLfit4 анализа для Excel (один участок доза-ответ, модель 205). Величины IC50 могут сопоставлять в рамках эксперимента, но могут варьировать от эксперимента к эксперименту.

Пример 1. Экспрессия и очистка моноклональных <ANG-2> антител Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 и Ang2k-LC08

Легкие и тяжелые цепи соответствующих антител Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 и Ang2k-LC08 конструируют в векторах экспрессии согласно описанному выше. Тяжелую цепь и область каппа легкой цепи клонируют в геномной кассете экспрессии, а область лямбда легкой цепи клонируют в качестве кДНК с интроном А (фиг.1Б). Плазмиды амплифицируют в E.coli, очищают и затем трансфецируют для кратковременной экспрессии рекомбинантных белков в клетках HEK293-F (используя систему FreeStyle 293 фирмы Invitrogen). Через 7 суток супернатанты клеток HEK293-F собирают, фильтруют и антитела очищают с помощью белка А и эксклюзионной хроматографии. Гомогенность всех антител подтверждают методом SDS-PAGE в условиях восстановления и отсутствия восстановления и аналитической эксклюзионной хроматографией. В условиях восстановления (фиг.1) тяжелые полипептидные цепи антител <ANG-2> четко показывают при анализе методом SDS-PAGE, что молекулярная масса составляет около 50 кДа, что соответствует расчетным молекулярным массам, а легкие полипептидные цепи антител четко показывают, что молекулярная масса составляет около 25 кДа, что соответствует расчетным молекулярным массам. Масс-

спектрометрией подтверждают идентичность очищенных антител. Уровни экспрессии всех конструкций анализируют ВЭЖХ с белком А.

Анализ методом эксклюзионной хроматографии очищенных антител. Все антитела получают и описывают аналитически по методике, наподобие описанной выше. Данные эксклюзионной хроматографии SEC соответствующих антител суммированы ниже в таблице.

	Цепь антитела	Теоретически рассчитанная масса (Да)	Экспериментально полученная масса (Да)	SEC (%) средний пик	
10	<ANG-2>Ang-2i_LC07	HC	50343	50325 (pyro-Glu)	99,7%
		LC	22738	22720 (pyro-Glu)	
	<ANG-2>Ang-2i_LC06	HC	50343	50325 (pyro-Glu)	99,8%
		LC	22620	22605 (pyro-Glu)	
15	<ANG-2>Ang-2k_LC08	HC	49544	49527 (pyro-Glu)	99,8%
		LC	22685	22667 (pyro-Glu)	

Пример 2. Исследование связывания методом ELISA с ANG-1 человека и ANG-2 человека

Связывание <ANG-2> антител Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 и Ang2k-LC08 с ANG-1 человека и ANG-2 человека определяют описанным выше методом ELISA связывания ANG-1 или ANG-2. Вкратце, анализ типа ELISA основан на иммобилизации ангиопоэтина-1 или ангиопоэтина-2 человека в планшете для микротитрования. Связывание антитела, направленного против иммобилизованного ANG-1 или ANG-2, измеряют с помощью <Fc человека> (анти-IgG) антитела с конъюгатом POD. Серии разведений антитела <ANG-2> позволяют определить величину концентрации EC50. В качестве контроля анти-ANG-2 антитело человека <ANG-2> используют антитело Mab536 (Oliner и др., Cancer Cell. Nov 6, 2004, cc.507-516, US 2006/0122370). Определенные концентрации EC50 суммированы ниже в таблице.

Антитело	EC50 связывания hANG-1	EC50 связывания hANG-2
<ANG-2>Mab536	2538 нг/мл	133 нг/мл
<ANG-2>Ang2i-LC06	>8000 нг/мл	84 нг/мл
<ANG-2>Ang2i-LC07	>8000 нг/мл	3006 нг/мл
<ANG-2>Ang2i-LC08	4044 нг/мл	105 нг/мл

Все антитела, специфически связывающиеся с ANG-2, Mab536 и Ang2k-LC08 также проявляют специфическое связывание с ANG-1, хотя Ang2i-LC06 и Ang2i-LC07 не связываются специфически с ANG-1, поскольку они имеют величину EC50 примерно 8000 нг/мл (предел выявления).

Пример 3. Связывание с ANG-2 методом Biacore

Связывающее средство с ANGPT2 человека исследуют методом Biacore, описанным выше. Вкратце, в этом исследовании захватывающее антитело (анти-Fc) иммобилизуют на поверхности чипа Biacore, который захватывает и презентует соответствующее антитело (например, Ang2i-LC06). Лиганд (в данном случае ANGPT2) захватывается из раствора. Средство при таком взаимодействии определяют при допущении, что взаимодействие происходит при соотношении 1:1. С подробностями настоящего эксперимента можно ознакомиться в общем разделе методов. Величины средства, определенные для связывания ANGPT2 (KD), суммированы в таблице внизу.

Ang-2 человека	Эксперимент 1	Эксперимент 2	Среднее значение (по двум экспериментам 1+2)

	KD (пМ)	kd (1/сек)	$t_{(1/2)diss}$ (мин)	KD (пМ)	kd (1/сек)	$t_{(1/2)diss}$ (мин)	KD (пМ)	$t_{(1/2)diss}$ (мин)
Ang2i-LC06	11	$7,16 \cdot 10^{-05}$	161	21	$1,14 \cdot 10^{-04}$	102	16	132
Ang2k-LC08	16	$1,61 \cdot 10^{-04}$	72	27	$2,28 \cdot 10^{-04}$	51	22	61

5

Ang-2 человека	Эксперимент 1			Эксперимент 2			Среднее значение (по двум экспериментам 1+2)	
MAb536	29	$1,44 \cdot 10^{-04}$	80	29	$1,25 \cdot 10^{-04}$	92	29	86

Антитела Ang2i-LC06 и Ang2k связываются с высоким сродством с ANGPT2.

10

Пример 4. Нейтрализация взаимодействия ANGPT1/2-Tie2 (человека)

10

Блокирование взаимодействия ANGPT-2 человека с Tie2 человека показано по by receptor interaction ELISA. 384-луночные планшеты Maxisorp (фирма Nunc) покрывают 0,5 мкг/мл Tie2 человека (фирма R&D Systems, Великобритания, номер в каталоге 313-TI, или материал получают самостоятельно) в течение 2 ч при комнатной температуре и блокируют ФСБ, обогащенным 0,2% Tween-20 и 2% БСА (фирма Roche Diagnostics GmbH, Дэлавер) в течение 1 ч при комнатной температуре в условиях встряхивания. Тем временем разведения очищенных антител в ФСБ инкубируют вместе с 0,2 мкг/мл ангиопоэтина-1/2 человека (фирма R&D Systems, номер в каталоге 923-AN/CF, фирма R&D Systems, Великобритания, номер в каталоге 623-AN или материал получают самостоятельно) в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки смесь 0,5 мкг/мл биотинилированного анти-ангиопоэтина-1/2 клона (фирма R&D Systems, номер в каталоге BAF923, фирма R&D Systems, номер в каталоге BAMB0981, Великобритания) и разведенного стрептавидина HRP 1:3000 (фирма Roche Diagnostics GmbH, Дэлавер, номер в каталоге 11089153001) добавляют на 1 ч. Затем планшеты промывают 6 раз с помощью ФСБТ. Планшеты обрабатывают свежеприготовленным реагентом ABTS (фирма Roche Diagnostics GmbH, DE, буфер с номером в каталоге 204530001, таблетки с номером в каталоге 11112422001) в течение 30 мин при комнатной температуре. Поглощение измеряют при 405 нм.

15

20

25

Полученные подавляющие концентрации суммированы в следующей таблице.

30

Антитело	Взаимодействие ANGPT1/Tie2 методом ELISA	Взаимодействие ANGPT2/Tie2 методом ELISA
Ang2i-LC06	>100 нМ	0,1 нМ
Ang2k-LC08	11 нМ	0,17 нМ
MAb536	Нет данных	0,15 нМ

35

Представленная выше таблица проявляет разные профили селективности для двух антител - Ang2i-LC06 и Ang2k-LC08. Антитело Ang2i-LC06 избирательно в отношении ANGPT2, а антитело Ang2k-LC08 обладает перекрестной реакционной способностью в отношении ANGPT1/2 по подавлению взаимодействия ANGPT1/2 Tie2.

Пример 5. Фосфорилирование Tie2

40

Способность идентифицированных антител к ANGPT2 интерферировать с ANGPT2- и ANGPT1-опосредованным фосфорилированием Tie2 определяют в исследованиях индуцированного под действием ANGPT2 и ANGPT1 фосфорилирования Tie2 согласно описанному выше. Схема исследования представлена на фиг.3.

45

Оба антитела, Ang2i-LC06 и Ang2k-LC08, показывают дозозависимую интерференцию со стимулируемым ANGPT2 фосфорилированием Tie2, что показано на фиг.4, по сравнению с величинами IC50. Антитело Ang2i-LC06 интерферирует со стимулируемым ANGPT2 фосфорилированием Tie2 с величиной IC50 примерно 508 нг/мл и антитело Ang2k-LC08 интерферирует со стимулируемым ANGPT2 фосфорилированием Tie2 с величиной IC50 примерно 499 нг/мл. Напротив, только антитело Ang2k-LC08

интерферирует со стимулируемым ANGPT1 фосфорилированием Tie2 с величиной IC50 примерно 391 нг/мл, причем Ang2i-LC06 не интерферирует со стимулируемым ANGPT2 фосфорилированием Tie2 в одном и том же исследованном диапазоне концентраций (фиг.5).

5 Пример 6. Эффективность *in vivo*. Воздействие анти-ANGPT антител на рост ксенотрансплантата Colo205

*In vivo* эффективность <ANGPT2> антител Ang2i-LC06 и Ang2k-LC08 по сравнению с антителом <ANGPT2> Mab536 в ступенчатой подкожной модели ксенотрансплантата Colo205

10 Очищенные антитела Ang2i-LC06 и Ang2k-LC08 сравнивают с антителом Mab536 в ступенчатой подкожной модели ксенотрансплантата Colo205 (Ang2\_PZ\_Colo205\_006) у самок бежевых мышей линии Scid.

#### Антитела

Антитело Mab536 получают в виде замороженного исходного раствора (концентрация = 4,5 мг/мл), Ang2i-LC06 и Ang2k-LC08 получают в виде замороженного исходного  
15 раствора (концентрация = 1 мг/мл) в 20 мМ гистидине, 140 мМ NaCl, pH 6,0. Раствор антитела был разведен соответствующим образом в ФСБ из исходного раствора перед проведением инъекций в тех случаях, когда это требуется, и ФСБ использовали в качестве растворителя. Гуманизированное IgG1 анти-IgE антитело Xolair (продукт  
20 Omalizumab) выступает в качестве контроля и было куплено в аптеке.

#### Линии клеток и условия культивирования

Клетки рака кишечника человека линии Colo205 первоначально получают из коллекции АТСС и после размножения депонируют во внутреннем банке клеток фирмы Roche Penzberg. Опухолевые клетки обычным образом культивируют в среде RPMI 1640  
25 (РАА, Laboratories, Австрия), обогащенной 10% фетальной сыворотки теленка (РАА Laboratories, Австрия) и 2 мМ L-глутамина при 37°C во влажной атмосфере при содержании CO<sub>2</sub> 5%. Третий пересев культуры используют для трансплантации.

#### Животные

30 Самок бежевых мышей линии SCID (фирма Charles River, Германия) выдерживают в специфических условиях без патогенов при суточном цикле 12 ч света/12 ч темноты согласно одобренным нормам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол экспериментальных условий был рассмотрен и одобрен местными властями. После получения животных их выдерживают в карантинном отсеке помещения для животных в течение одной  
35 недели для привыкания к новой среде и для наблюдения. Постоянный мониторинг дыхания проводят на регулярной основе. Диетический корм (Provimi Kliba 3337) и воду (подкисленную до величины pH 2,5-3) предоставляют по потребности. В начале исследования возраст животных составляет примерно 12-14 недель.

#### Мониторинг

40 У животных ежедневно проверяют клинические симптомы и выявляют побочные эффекты. Для мониторинга по мере проведения эксперимента определяют массу тела животных и объем опухолей с помощью циркуля после определения стадии заболевания.

#### Инъекция опухолевых клеток

В день проведения инъекции собирают опухолевые клетки линии Colo205 центрифугированием, промывают однократно и ресуспендируют в ФСБ. После  
45 дополнительной промывки с помощью ФСБ концентрацию клеток и размер клеток определяют, используя счетчик клеток и систему анализа (Vi-CELL, Beckman Coulter).

Для инъекции клеток Colo205 конечный титр доводят до  $5,0 \times 10^7$  клеток/мл, жизнеспособность клеток примерно 90%. Затем 100 мкл такой суспензии,

соответствующей  $2,5 \times 10^6$  клеток на животное, вводят подкожно в правый бок мышцы.

#### Лечение животных

Лечение животных начинают в день рандомизирования, через 16 суток после трансплантации клеток (исследование Ang2\_PZ\_Colo205\_006) при среднем объеме опухоли 178 мм<sup>3</sup>.

Схема дозирования при исследовании Ang2\_PZ\_Colo205\_006:

Группа	Количество животных	Соединение	Доза (мг/кг)	Способ введения	Число обработок	Кумулятивная доза (мг/кг)
1	10	Растворитель		Внутрибрюшинно, раз в неделю	5	
2	10	Контрольное антитело Xolaig	10	Внутрибрюшинно, раз в неделю	5	50
3	10	Антитело Ang2i-LC06	10	Внутрибрюшинно, раз в неделю	5	50
4	10	Антитело Ang2k-LC08	10	Внутрибрюшинно, раз в неделю	5	50
5	10	Антитело MAb536	10	Внутрибрюшинно, раз в неделю	5	50

Подавление роста опухолей до 50 суток показано на фиг.6. Эти данные показывают, что антитело Ang2i-LC06, избирательное в отношении ANGPT2, является наиболее сильно действующим антителом (величина степени уничтожения опухоли (Tumor control ratio - TCR) составляет 0,39). Антитело Ang2i-LC06 более эффективно в подавлении роста опухоли по сравнению с антителом MAb536 (TCR составляет 0,47) и избирательное в отношении ANGPT2, перекрестно-реакционноспособное ANGPT1 антитело Ang2k-LC08 (TCR составляет 0,46).

Действие анти-ANGPT антител на рост ксенотрансплантата KPL-4

In vivo эффективность <ANGPT2> антител Ang2i-LC06 и Ang2k-LC08 по сравнению с <ANGPT2> Mab536 в ступенчатой ортотопической модели ксенотрансплантата KPL-4

Очищенные антитела Ang2i-LC06 и Ang2k-LC08 сравнивают с антителом Mab536 в ступенчатой ортотопической модели ксенотрансплантата KPL-4 (Ang2\_PZ\_KPL-4\_002) у самок бежевых мышей линии Scid.

Антитела

Антитело Mab536 получают в качестве замороженного раствора (концентрация = 4,5 мг/мл), Ang2i-LC06 и Ang2k-LC08 получают в качестве замороженного раствора (концентрация = 1 мг/мл) в 20 мМ гистидине, 140 мМ NaCl, pH 6,0. Раствор антитела разводят соответствующим образом в ФСБ из исходного раствора перед проведением инъекций в тех случаях, когда это требуется, и ФСБ используют в качестве растворителя.

Линии клеток и условия культивирования

Клетки рака груди человека KPL-4 первоначально получают из злокачественной плевральной инфузии пациента с раком груди с воспалительными метастазами кожи. Клетки KPL-4 cells были любезно предоставлены профессором J. Kurebayashi (Kawasaki Medical School, Kurashiki, Япония). Опухолевые клетки обычным образом культивируют в среде DMEM (фирма PAN Biotech, Германия), обогащенной 10% фетальной сыворотки теленка (фирма PAN Biotech, Германия), и 2 мМ L-глутамина (фирма PAN Biotech, Германия) при 37°C во влажной атмосфере при содержании CO<sub>2</sub> 5%. Пересев культуры проводят с трипсином/EDTA 1x (PAN), расщепляя ее трижды в неделю.

Животные

Самок бежевых мышей линии SCID (фирма Charles River, Германия) выдерживают в специфических условиях без патогенов при суточном цикле 12 ч света/12 ч темноты согласно ободренным нормам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол экспериментальных

условий был рассмотрен и одобрен местными властями. После получения животных их выдерживают в карантинном отсеке помещения для животных в течение одной недели для привыкания к новой среде и для наблюдения. Постоянный мониторинг дыхания проводят на регулярной основе. Диетический корм (Provimi Kliba 3337) и воду (подкисленную до величины рН 2,5-3) предоставляют по потребности. В начале исследования возраст животных составляет примерно 12 недель.

#### Мониторинг

У животных ежедневно проверяют клинические симптомы и выявляют побочные эффекты. По мере проведения эксперимента определяют массу тела животных и объем опухолей с помощью циркуля после определения стадии заболевания.

#### Инъекция опухолевых клеток

В день проведения инъекции собирают опухолевые клетки (трипсин-EDTA) из флаконов для культивирования (фирма Greiner TriFlask) и переносят в 50 мл культуральной среды, промывают однократно и ресуспендируют в ФСБ. После стадии дополнительного промывания в ФСБ и фильтрации (сито для клеток; Falcon™; 100 мкм) конечный титр клеток доводят до  $1,5 \times 10^8$ /мл. Суспензию опухолевых клеток тщательно перемешивают с помощью пипетки, чтобы избежать агрегирования клеток. Анестезию проводят, используя блок для ингаляции Stephens для мелких животных в камере предварительного инкубирования (из плексиглаза), индивидуальные носовые маски для мышей (из силикона) и не воспламеняющееся и не взрывчатое анестезирующее соединение изофлуран (Pharmacia-Urjohn, Германия) в закрытой системе циркуляции. За двое суток до проведения инъекции животным выстригают шерсть. Для инъекции внутрь жировой подушки молочной железы клетки вносят инъекцией ортотопически в объеме 20 мкл ( $3 \times 10^6$  клеток/животное) каждой анестезированной мыши в правую предпоследнюю паховую жировую подушку молочной железы. Для ортотопической имплантации суспензию клеток вносят инъекцией через кожу под сосок, используя шприц на микролитр Hamilton и иглу 30G×1/2".

Лечение животных начинают в день рандомизирования при наличии опухолей, варьирующих в размере от 60 до 180 мм<sup>3</sup> через 35 суток после трансплантации клеток (исследование Ang2\_PZ\_KPL-4\_002) при среднем объеме опухоли примерно 90 мм<sup>3</sup>.

Схема дозирования при исследовании Ang2\_PZ\_KPL-4\_002:

Группа	Количество животных	Соединение	Доза (мг/кг)	Способ введения	Число обработок	Кумулятивная доза (мг/кг)
1		Растворитель		Внутрибрюшинно раз в неделю	5	
2	10	Контрольное антитело Xolaig	10	Внутрибрюшинно раз в неделю	5	50
3	10	Антитело Ang2i-LC06	10	Внутрибрюшинно раз в неделю	5	50
5	10	Антитело Ang2k-LC08	10	Внутрибрюшинно раз в неделю	5	50
6	10	Антитело MAb536	10	Внутрибрюшинно раз в неделю	5	50

Подавление роста опухоли до 64 суток показано на фиг.7. Данные показывают, что селективное антитело Ang2i-LC06 против ANGPT2 является наиболее сильно действующим антителом (TCR составляет 0,55) на модели KPL-4. Антитело Ang2i-LC06 более эффективно в подавлении роста опухоли по сравнению с антителом MAb536 (TCR составляет 0,57) и избирательное в отношении ANGPT2, перекрестно-реакционноспособное ANGPT1 антитело Ang2k-LC08 (TCR составляет 0,57).

### Пример 7. Связывание с ANG-1 методом Biacore

Связывающее сродство с ANG-1 человека исследуют методом Biacore: huAng-1 иммобилизуют на биосенсорном чипе CM5, используя аминные химические связи. Белок вводят инъекцией в течение 20 мин в ацетате натрия pH 4,5 при концентрации 10 мкг/мл при скорости тока 5 мкл/мин. Полученная на поверхности плотность составляет примерно 20000 KE. В контрольной проточной кювете БСА иммобилизуют в тех же условиях. Антитела разводят в HBS-P до 100 нМ и вводят инъекцией в течение 3 мин (фаза ассоциации). После промывки подвижным буфером в течение 3 мин (фаза диссоциации) поверхность регенерируют инъекцией 10 мМ натрия гидроксида в течение 1 мин при 5 мкл/мин. Результаты показаны на фиг.8: период 50% полной диссоциации Ang2k\_LC08 составляет примерно 50 сек, антитела Ang2i\_LC06 составляет примерно 5 сек, а Ang2i\_LC10 не проявляет связывания с ANG-1.

Пример 8. Предупреждение метастаз/вторичных опухолей in vivo при первичных опухолях

а) Предупреждение метастаз/вторичных опухолей у мышей с ксенотрансплантатом первичных опухолей Colo205

Линии клеток и условия культивирования

Клетки рака кишечника человека Colo205, первоначально получают из ATCC и затем размножают и депонируют во внутреннем банке клеток фирмы Roche Penzberg. Линию опухолевых клеток обычным образом культивируют в среде RPMI 1640 (РАА, Laboratories, Австрия), обогащенной 10% фетальной сыворотки теленка (фирма РАА Laboratories, Австрия) и 2 мМ L-глутамина, при 37°C во влажной атмосфере при содержании CO<sub>2</sub> 5%. Третий пересев используют для трансплантации.

Животные

Самок бежевых мышей линии SCID, возраст 4-5 недель в момент получения животных (фирма Charles River, Германия), выдерживают в специфических условиях без патогенов при суточном цикле 12 ч света/12 ч темноты согласно ободренным нормам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол экспериментальных условий был рассмотрен и одобрен местными властями. После получения животных их выдерживают в карантинном отсеке помещения для животных в течение одной недели для привыкания к новой среде и для наблюдения. Постоянный мониторинг дыхания проводят на регулярной основе. Диетический корм (Provimi Kliba 3337) и воду (подкисленную до величины pH 2,5-3) предоставляют по потребности. В начале исследования возраст животных составляет примерно 10 недель.

Инъекция опухолевых клеток

В день проведения инъекции собирают опухолевые клетки Colo205 (трипсин-EDTA) из флаконов для культивирования (фирма Greiner TriFlask) и переносят в 50 мл культуральной среды, промывают однократно и ресуспендируют в ФСБ. После стадии дополнительного промывания в ФСБ и фильтрации (сито для клеток; Falcon™; диаметр пор 100 мкм) конечный титр клеток доводят до  $2,5 \times 10^7$ /мл. Суспензию опухолевых клеток тщательно перемешивают с помощью пипетки, чтобы избежать агрегирования клеток. Затем суспензией клеток заполняют туберкулиновый шприц объемом 1,0 мл (фирма Braun Melsungen), используя широкую иглу (1,10×40 мм); для инъекции иглу заменяют (на иглу 0,45×25 мм) и для каждой инъекции используют новую иглу. Анестезию проводят, используя блок для ингаляции Stephens для мелких животных в камере предварительного инкубирования (из плексиглаза), индивидуальные носовые маски для мышей (из силикона) и не воспламеняющееся и не взрывчатое анестезирующее соединение изофлуран (sp-pharma) в закрытой системе циркуляции. За двое суток до

проведения инъекции животным выстригают шерсть, при внесении инъекцией клеток кожу анестезированных животных тщательно оттягивают анатомическим пинцетом и 100 мкл суспензии клеток ( $2,5 \times 10^6$  клеток) закалывают животным подкожно в правый бок. Проводят мониторинг роста опухолей (данные не представлены).

Мониторинг вторичных опухолей, например, в легких, путем подсчета последовательностей Alu-повторов человека

В конце исследования (103 сутки) у животных из всех групп удаляют легкие. Вкратце, образцы немедленно переносят в жидкий азот. На следующей стадии суммарную ДНК выделяют из образцов с помощью прибора MagNA Pure LC по инструкциям производителя. Специфические праймеры Alu-повторов человека выбирают для селективной амплификации последовательностей Alu-повторов методом количественной ПЦР (прибор LightCycler). (T. Schneider и др., Clin. Exp. Metas. 19, 2002, сс.571-582).

Лечение животных

Лечение животных авастинном (10 мг/кг внутривнутрибрюшинно раз в неделю) начинают через 14 суток после трансплантации клеток (исследование Ang2\_PZ\_Colo205\_008) при среднем объеме опухоли  $340 \text{ мм}^3$ . Через 7 недель мышей рандомизируют для последующей вторичной обработки, начиная с 51 суток, соединениями, перечисленными в таблице ниже. Вторую обработку начинают с 51 суток исследования Ang2\_PZ\_Colo205\_008.

Группа	Количество животных	Соединение	Доза (мг/кг)	Способ введения	Число обработок	Кумулятивная доза (мг/кг)
1	10	Авастин	10	Внутрибрюшинно раз в неделю	11	110
2	10	LC06 +	10	Внутрибрюшинно раз в неделю	6	60
		авастин	10	Внутрибрюшинно раз в неделю	11	110
3	10	LC06	10	Внутрибрюшинно раз в неделю	6	60

Результаты предупреждения метастазирования/вторичных опухолей (в легких) перечислены в таблице ниже и показаны на фиг.9А

	Авастин		Авастин + Ang2i-LC06		Ang2i_LC06	
	101	0,0264	201	0,0042	301	0,0047
	102	5,6740	202	0,0044	302	0,0055
	103	0,0307	203	0,0065	303	0,0050
	104	0,0203	204	0,0081	304	0,0064
	105	0,0215	205	0,0063	305	0,0062
	106	0,0338	206	0,0061	306	0,0066
	107	0,0075	207	0,0053	307	0,0250
	108	0,0113	208	0,0506	308	0,0062
	109	0,0087	209	0,0065	309	0,0067
	110	0,0587	210	0,0160	310	0,0064
Среднее значение		0,5893		0,0114		0,0079
Срединное значение выборки		0,0240		0,0064		0,0063

Результаты показывают очевидно улучшенное предупреждение вторичных опухолей/метастаз антителом ANG2i-LC06 по сравнению с авастинном.

б) Предупреждение вторичных опухолей/метастаз у мышей с ксенотрансплантатами первичных опухолей KPL-4

### Линия опухолевых клеток

Линия клеток рака груди человека KPL-4 (любезно предоставленная профессором J. Kurebayashi) первоначально была получена из злокачественной плевральной инфузии пациента с раком груди с воспалительными метастазами кожи. Клетки опухоли культивируют обычным образом в среде DMEM (фирма PAN Biotech, Германия), обогащенной 10% фетальной сыворотки теленка (фирма PAN Biotech, Германия), и 2 mM L-глутамина (фирма PAN Biotech, Германия) при 37°C во влажной атмосфере при содержании CO<sub>2</sub> 5%. Пересев культуры проводят с трипсином/EDTA 1× (PAN), расщепляя ее трижды в неделю.

### Мыши

После приобретения мышей (самок бежевых мышей линии SCID в возрасте 10-12 недель с массой тела 18-20 г) на фирме Charles River, Sulzfeld, Германия, их выдерживают в карантинном отсеке помещения для животных в течение одной недели для привыкания к новой среде и для наблюдения. Постоянный мониторинг дыхания проводят на регулярной основе. Мышей содержат в SPF-условиях согласно международным правилам (GV-Solas; Felasa; TierschG) при суточном цикле 12 ч света/12 ч темноты. Диетический корм (Provimi Kliba 3337) и воду (фильтрованную) предоставляют по потребности. Протокол экспериментальных исследований был рассмотрен и одобрен местными властями (Regierung von Oberbayern; регистрационный номер 211.2531.2-22/2003).

### Инъекция опухолевых клеток

В день проведения инъекции собирают опухолевые клетки (трипсин-EDTA) из флаконов для культивирования (фирма Greiner TriFlask) и переносят в 50 культуральной среды, промывают однократно и ресуспендируют в ФСБ. После стадии дополнительного промывания в ФСБ и фильтрации (сито для клеток; Falcon™; диаметр 100 мкм) конечный титр клеток доводят до  $1,5 \times 10^8$ /мл. Суспензию опухолевых клеток тщательно перемешивают с помощью пипетки, чтобы избежать агрегирования клеток. Анестезию проводят, используя блок для ингаляции Stephens для мелких животных в камере предварительного инкубирования (из плексиглаза), индивидуальные носовые маски для мышей (из силикона) и не воспламеняющееся и не взрывчатое анестезирующее соединение изофлуран (Pharmacia-Upjohn, Германия) в закрытой системе циркуляции. За двое суток до проведения инъекции животным выстригают шерсть. Для инъекции внутрь жировой подушки молочной железы клетки вносят инъекцией ортотопически в объеме 20 мкл каждой анестезированной мыши в правую предпоследнюю паховую жировую подушку молочной железы. Для ортотопической имплантации суспензию клеток вносят инъекцией через кожу под сосок, используя шприц на микролитр Hamilton и иглу 30G×1/2". Проводят мониторинг роста первичных опухолей (данные не представлены).

Мониторинг вторичных опухолей, например, в легких, путем подсчета последовательностей Alu-повторов человека

В конце исследования (103 сутки) у животных из всех групп удаляют легкие. Вкратце, образцы немедленно переносят в жидкий азот. На следующей стадии суммарную ДНК выделяют из образцов с помощью прибора MagNA Pure LC Instrument по инструкциям производителя. Специфические праймеры Alu-повторов\_человека выбирают для селективной амплификации последовательностей Alu-повторов\_методом количественной ПЦР (прибор LightCycler). (T. Schneider и др., Clin. Exp. Metas. 19, 2002, сс.571-582).

### Лечение животных

Лечение животных начинают через 35 суток после трансформации клеток при среднем

объеме опухоли 60-160 мм<sup>3</sup>. Соединения и схема дозирования перечислены в таблице ниже.

5	Группа	Количество животных	Соединение	Доза (мг/кг)	Способ введения	Число обработок	Кумулятивная доза (мг/кг)
	4	10	Растворитель		Внутрибрюшинно дважды в неделю	5	
	5	10	Контрольное антитело Xolair	10	Внутрибрюшинно дважды в неделю	5	50
	6	10	Ang2i_LC06	10	Внутрибрюшинно раз в неделю	4	40
10	7	10	Ang2i_LC07	10	Внутрибрюшинно раз в неделю	4	40
	8	10	Ang2k_LC08		Внутрибрюшинно раз в неделю	4	40

Результаты предупреждения метастаз/вторичных опухолей (в легких) перечислены ниже в таблице и представлены на фиг.9Б

15

Таблица 2									
Количественная оценка ДНК Alu-повторов человека в легких мышей, изначально несущих опухоли KPL4, после лечения разными антителами									
Растворитель		Контрольное антитело Xolair		Ang2i_LC06		Ang2i_LC07		Ang2i_LC08	
101	0,0098	201	0,0157			401	0,0273	501	0,0069

20

Растворитель		Контрольное антитело Xolair		Ang2i_LC06		Ang2i_LC07		Ang2i_LC08		
102	0,0090	202	0,0516	302	0,0076	402	0,0060	502	0,0261	
103	0,0119	203	0,0108	303	0,0413	403	0,0046	503	0,0067	
104	0,0405	204	0,0148	304	0,0042	404	0,0164	504	0,0044	
		205	0,0020	305	0,0041	405	0,0040	505	0,0039	
25	106	0,0381	206	0,0340	306	0,0093	406	0,0044	506	0,0051
	107	0,0281	207	0,0141	307	0,0038	407	0,0060	507	0,0037
			208	0,0422	308	0,0044	408	0,0174	508	0,0037
	109	0,0121	209	0,0227	309	0,0036	409	0,0314	509	0,0051
	110	0,0143	210	0,0383	310	0,0094	410	0,0083	540	0,0200
30	Среднее значение	0,0132		0,0192		0,0044		0,0072		0,0051
	Среднее значение выборки	0,0205		0,0246		0,0098		0,0126		0,0086

35

Результаты показывают высоко эффективное предупреждение вторичных опухолей/метастаз антителами ANG2i-LC06, ANG2i-LC07, ANG2k-LC08.

Пример 9. Результаты лечения ретинопатии

Методы

Щенков линии C57/B16 перекрестно воспитывают CD1 кормящие суки, и их подвергают воздействию 75% кислорода между днями постнатальной жизни с P7 по P12 (камера контроля кислорода PRO-OX 110, фирма Biospherix Ltd, Рэдфилд, Нью-Йорк), в результате чего индуцируется уничтожение сосудов и отключение капилляров в центре сетчатки. Щенков и кормящих сук помещают в условия нормальной атмосферы, что приводит к относительной гипоксии и индукции неоваскуляризации. В день P13 постнатального периода щенков анестезируют, используя изофлуран (5% для индукции, 3% для поддержания в комбинации с 1,5% кислорода), глаз обнажают и проводят внутриглазные инъекции объемом 1 мкл, используя шприц Nanofil, наполненный с помощью иглы размером 35 (фирма WPI, Сарасота, Флорида), в левый глаз. В день

P17 постнатального периода удаляют оба глаза, фиксируют в 4% параформальдегиде в течение 4 ч при 4°C и сетчатки нарезают. Сетчатки насыщают в ФСБ, содержащем 0,5% Triton X-100 и 1% бычьего сывороточного альбумина, окрашивают 20 мкг/мл биотинилированного изолейцина B4 (фирма Sigma Aldrich, Gillingham, Великобритания) в ФСБ pH 6,8, 1% Triton-X100, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>, затем 20 мкг/мл ALEXA 488-стрептавидина (фирма Molecular Probes, Eugene, Орегон) и погружают в среду Vectashield (фирма Vector Laboratories, Burlingame, Калифорния). Образцы сетчатки визуализируют, используя эпифлюоресцентный микроскоп Nikon с четырехкратным увеличением. Качественную оценку областей неоваскуляризации и ишемии проводят слепым методом, используя программу Photoshop CS3 с Image J (НИИ), и выражают в виде процента от общей площади сетчатки (= нормальная + ишемическая + неовакулярная).

#### Результаты

Фиг.10А показывает препараты сетчатки с сосудистой сетью сетчатки, визуализированной путем окрашивания изолейцином. Центральные области ишемии индуцируют неоваскуляризацию и вторичный рост сосудов сетчатки путем повышения регуляции индукторов ангиогенеза. Фронт неоваскуляризации является гиперпролиферативным, приводящим к извитым нерегулярно расположенным сосудам. Большинство внешних областей содержит нормальные не подверженные воздействию сосуды. Количественная оценка препаратов сетчатки показывает, что подавление VEGF с помощью авастина снижает неоваскуляризацию сетчатки (см. фиг.10Б, с 36,7±1,8% без инъекции до 22,4±3,0% в случае инъекции), что подтверждает ожидания. Подавление Ang2, используя антитела LC06 или LC08, также приводит к снижению неоваскуляризации (с 31,5±1,1% до 18,8±1,3% и с 34,0±3,1% до 25,4±3,4%). Контрольная инъекция IgG человека не влияет на неоваскуляризацию (см. фиг.10Б, с 38,±1,1% до 38,3±0,8%).

#### Формула изобретения

1. Антитело или фрагмент антитела, специфически связывающиеся с ангиопоэтином-2 человека (ANG-2), где

а) переменный домен тяжелой цепи включает область CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 33, область CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 34 и область CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 35 и

б) переменный домен легкой цепи включает область CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 36, область CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 37 и область CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 38.

2. Антитело или фрагмент антитела по п.1, отличающиеся включением

а) переменного домена тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 39 и

б) переменного домена легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 40.

3. Антитело или фрагмент антитела по любому из п.1 или п.2, где антитело не связывается с ангиопоэтином-1 человека (ANG-1).

4. Антитело или фрагмент антитела по п.1, где указанное антитело является антителом подкласса IgG4 человека или антителом подкласса IgG1 человека.

5. Фармацевтическая композиция для предупреждения метастазирования, а также лечения рака и сосудистых заболеваний, содержащая терапевтически эффективное количество антитела или фрагмента по пп.1-3.

6. Применение антитела или фрагмента антитела по пп.1-3 для получения лекарственного средства для предупреждения метастазирования.

7. Применение антитела или фрагмента антитела по пп.1-3 для получения лекарственного средства для лечения рака.

8. Применение антитела или фрагмента антитела по пп.1-3 для получения лекарственного средства для лечения сосудистых заболеваний.

5 9. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, специфически связывающегося с ангиопоэтином 2 человека (ANG-2), отличающаяся тем, что указанное антитело или фрагмент включает

а) переменный домен тяжелой цепи включает область CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 33, область CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 34 и область CDR1  
10 с последовательностью SEQ ID NO: 35 и

б) переменный домен легкой цепи включает область CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 36, область CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 37 и область CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 38.

10. Вектор экспрессии, отличающийся тем, что включает нуклеиновую кислоту по п.9 для экспрессии антитела или фрагмента антитела, специфически связывающегося с ангиопоэтином 2 человека (ANG-2) в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах.

11. Прокариотическая или эукариотическая клетка-хозяин, предназначенная для получения антитела или фрагмента антитела по пп.1-3 и включающая вектор по п.10.

20

25

30

35

40

45

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Ф.Хоффманн-Ля Рош АГ  
 <120> Антитела против ангиопоэтина-2 человека  
 <130> 25688  
 <150> EP 08021835.7  
 <151> 2008-12-16  
 <160> 63  
 <170> PatentIn version 3.2  
 <210> 1  
 <211> 20  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная  
 <220>  
 <223> область CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2i\_LC06  
 <400> 1  
 Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly  
 1 5 10 15  
  
 Ala Phe Asp Ile  
 20  
  
 <210> 2  
 <211> 17  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная  
 <220>  
 <223> область CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2i\_LC06  
 <400> 2  
 Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15  
  
 Gly  
  
 <210> 3  
 <211> 5  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная  
 <220>  
 <223> область CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2i\_LC06  
 <400> 3  
 Gly Tyr Tyr Met His  
 1 5  
  
 <210> 4  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; область CDR3 легкой цепи, &lt;ANG-2&gt;Ang2i\_LC06

&lt;400&gt; 4

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val  
 1 5 10

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; область CDR2 легкой цепи, &lt;ANG-2&gt;Ang2i\_LC06

&lt;400&gt; 5

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
 1 5

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; область CDR1 легкой цепи, &lt;ANG-2&gt;Ang2i\_LC06

&lt;400&gt; 6

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His  
 1 5 10

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 129

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; переменный домен тяжелой цепи, &lt;ANG-2&gt;Ang2i\_LC06

&lt;400&gt; 7

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr  
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser  
 115 120 125

Ser

<210> 8  
 <211> 110  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> переменный домен легкой цепи, <ANG-2>Ang2i\_LC06

<400> 8

Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
 35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His  
 85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln  
 100 105 110

<210> 9  
 <211> 20  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> область CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2i\_LC07

<400> 9

Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly  
 1 5 10 15

Ala Phe Asp Ile  
 20

<210> 10

<211> 17  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> область CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2i\_LC07

<400> 10

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

<210> 11  
 <211> 5  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> область CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2i\_LC07

<400> 11

Gly Tyr Tyr Met His  
 1 5

<210> 12  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Область CDR3 легкой цепи, <ANG-2>Ang2i\_LC07

<400> 12

Gln Val Trp Asp Ser Asp Ser Asp Gln Gly Val  
 1 5 10

<210> 13  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Область CDR2 легкой цепи, <ANG-2>Ang2i\_LC07

<400> 13

Asp Asp Ser Glu Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 14  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Область CDR1 легкой цепи, <ANG-2>Ang2i\_LC07

<400> 14

Gly Gly Asn Phe Ile Gly Gly Lys Ser Val His



Asp Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Ile Ile Thr Arg Ala Glu Ala Gly  
 65 70 75

Asp Glu Ala Asp Tyr His Cys Gln Val Trp Asp Ser Asp Ser Asp Gln  
 85 90 95

Gly Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln  
 100 105 110

<210> 17  
 <211> 15  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> область CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2k\_LC08  
 <400> 17

Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10 15

<210> 18  
 <211> 17  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> область CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2k\_LC08  
 <400> 18

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 19  
 <211> 5  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> область CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2k\_LC08  
 <400> 19

Ser Tyr Gly Met His  
 1 5

<210> 20  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Область CDR3 легкой цепи, <ANG-2>Ang2k\_LC08

<400> 20

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val  
1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Область CDR2 легкой цепи, <ANG-2>Ang2k\_LC08

<400> 21

Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser  
1 5

<210> 22

<211> 13

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Область CDR1 легкой цепи, <ANG-2>Ang2k\_LC08

<400> 22

Ser Gly Phe Ala Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Asn  
1 5 10

<210> 23

<211> 124

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> переменный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k\_LC08

<400> 23

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

100

105

110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 24  
 <211> 112  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> переменный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2k\_LC08

<400> 24

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Phe Ala Ser Asn Ile Gly Ser Asn  
 20 25 30

Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
 85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln  
 100 105 110

<210> 25  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> область CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s\_LC09

<400> 25

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val  
 1 5

<210> 26  
 <211> 19  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> область CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s\_LC09

<400> 26

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 27  
<211> 5  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная

<220>  
<223> область CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s\_LC09  
<400> 27

Asn Ala Trp Met Ser  
1 5

<210> 28  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная

<220>  
<223> light chain CDR3, <ANG-2> Ang2s\_LC09  
<400> 28

Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro  
1 5

<210> 29  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная

<220>  
<223> Область CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s\_LC09  
<400> 29

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser  
1 5

<210> 30  
<211> 16  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная

<220>  
<223> Область CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s\_LC09  
<400> 30

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp  
1 5 10 15

<210> 31  
<211> 119  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная

<220>  
<223> переменный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s\_LC09

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala  
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala  
50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 32

<211> 109

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> переменный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2s\_LC09

<400> 32

Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile  
1 5 10 15

Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro Phe  
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr

100

105

<210> 33  
 <211> 20  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> область CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i\_LC10

<400> 33

Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly  
 1 5 10 15

Ala Phe Asp Ile  
 20

<210> 34  
 <211> 17  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> область CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i\_LC10

<400> 34

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

<210> 35  
 <211> 5  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> область CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i\_LC10

<400> 35

Gly Tyr Tyr Met His  
 1 5

<210> 36  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Область CDR3 легкой цепи, <ANG-2> Ang2i\_LC10

<400> 36

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val  
 1 5 10

<210> 37  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Область CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2i\_LC10

<400> 37

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
1 5

<210> 38

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Область CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Ang2i\_LC10

<400> 38

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His  
1 5 10

<210> 39

<211> 129

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> переменный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i\_LC10

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr  
100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser  
115 120 125

Ser

<210> 40  
 <211> 105  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> переменный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2i\_LC10

<400> 40

Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr  
 1 5 10 15

Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln  
 20 25 30

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg  
 35 40 45

Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr  
 50 55 60

Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr  
 65 70 75 80

Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val Phe Gly Gly  
 85 90 95

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln  
 100 105

<210> 41  
 <211> 15  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> область CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k\_LC11

<400> 41

Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10 15

<210> 42  
 <211> 17  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> область CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k\_LC11

<400> 42

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 43  
 <211> 5  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> область CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k\_LC11

<400> 43

Ser Tyr Gly Met His  
 1 5

<210> 44  
 <211> 12  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Область CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k\_LC11

<400> 44

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Pro Gly Val  
 1 5 10

<210> 45  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Область CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k\_LC11

<400> 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 46  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Область CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k\_LC11

<400> 46

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His  
 1 5 10

<210> 47  
 <211> 124  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> переменный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k\_LC11

<400> 47

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

RU 2569461 C2

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 48  
 <211> 106  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> переменный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2k\_LC11

<220>  
 <221> прочие признаки  
 <222> (98)..(98)  
 <223> Хаа может быть какой-либо природной аминокислотой

<220>  
 <221> прочие признаки  
 <222> (102)..(102)  
 <223> Хаа может быть какой-либо природной аминокислотой  
 <400> 48

Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr  
 1 5 10 15

Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln  
 20 25 30

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg  
 35 40 45

Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr  
 50 55 60

Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr  
 65 70 75 80

Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Pro Gly Val Phe Gly

85

90

95

Gly Xaa Thr Lys Leu Xaa Val Leu Gly Gln  
 100 105

<210> 49  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> область CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03

<400> 49

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val  
 1 5

<210> 50  
 <211> 19  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> область CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03

<400> 50

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro  
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 51  
 <211> 5  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> область CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03

<400> 51

Asn Ala Trp Met Ser  
 1 5

<210> 52  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Область CDR3 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03

<400> 52

Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Met Tyr Thr  
 1 5 10

<210> 53  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Область CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03

<400> 53

His Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
1 5

<210> 54

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> Область CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03

<400> 54

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Arg Leu Asn  
1 5 10

<210> 55

<211> 118

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> переменный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03

<400> 55

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala  
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala  
50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 56

<211> 110

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная

<220>

<223> вариабельный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03

<400> 56

Asp Ile Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Arg  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr His Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Met  
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr  
100 105 110

<210> 57

<211> 330

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 57

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

RU 2569461 C2

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 58  
 <211> 327  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 58

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

RU 2 569 461 C2

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

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

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
325

<210> 59  
<211> 107  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<400> 59

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

<210> 60  
<211> 104  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<400> 60

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu  
1 5 10 15

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr  
20 25 30

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys  
35 40 45

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr  
50 55 60

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His  
65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

85

90

95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
100

<210> 61  
<211> 1124  
<212> BEJOK  
<213> Homo sapiens

<400> 61

Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Ser Gly Thr Val Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu  
20 25 30

Pro Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly  
35 40 45

Trp Arg Pro His Glu Pro Ile Thr Ile Gly Arg Asp Phe Glu Ala Leu  
50 55 60

Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg  
65 70 75 80

Glu Trp Ala Lys Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile  
85 90 95

Asn Gly Ala Tyr Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg  
100 105 110

Ile Arg Thr Met Lys Met Arg Gln Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr  
115 120 125

Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn Ile Ser Phe Lys  
130 135 140

Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser  
145 150 155 160

Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val  
165 170 175

His Leu Pro His Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg  
180 185 190

Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val  
195 200 205

Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn His Leu Cys  
210 215 220

RU 2569461 C2

Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys  
 225 230 235 240

Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu  
 245 250 255

Leu His Thr Phe Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu  
 260 265 270

Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser  
 275 280 285

Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys His Pro  
 290 295 300

Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly  
 305 310 315 320

Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln  
 325 330 335

Gly Leu Gln Cys Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Thr Pro Lys Ile  
 340 345 350

Val Asp Leu Pro Asp His Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys Phe Asn Pro  
 355 360 365

Ile Cys Lys Ala Ser Gly Trp Pro Leu Pro Thr Asn Glu Glu Met Thr  
 370 375 380

Leu Val Lys Pro Asp Gly Thr Val Leu His Pro Lys Asp Phe Asn His  
 385 390 395 400

Thr Asp His Phe Ser Val Ala Ile Phe Thr Ile His Arg Ile Leu Pro  
 405 410 415

Pro Asp Ser Gly Val Trp Val Cys Ser Val Asn Thr Val Ala Gly Met  
 420 425 430

Val Glu Lys Pro Phe Asn Ile Ser Val Lys Val Leu Pro Lys Pro Leu  
 435 440 445

Asn Ala Pro Asn Val Ile Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Val Ile Asn  
 450 455 460

Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Pro Ile Lys Ser Lys Lys  
 465 470 475 480

Leu Leu Tyr Lys Pro Val Asn His Tyr Glu Ala Trp Gln His Ile Gln  
 485 490 495

Val Thr Asn Glu Ile Val Thr Leu Asn Tyr Leu Glu Pro Arg Thr Glu  
 500 505 510

RU 2569461 C2

Tyr Glu Leu Cys Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly Gly Glu Gly  
 515 520 525  
 His Pro Gly Pro Val Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro  
 530 535 540  
 Pro Pro Arg Gly Leu Asn Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Thr Leu Asn  
 545 550 555 560  
 Leu Thr Trp Gln Pro Ile Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Val  
 565 570 575  
 Glu Val Glu Arg Arg Ser Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys  
 580 585 590  
 Val Pro Gly Asn Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu His Pro Arg  
 595 600 605  
 Glu Gln Tyr Val Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu  
 610 615 620  
 Trp Ser Glu Asp Leu Thr Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro  
 625 630 635 640  
 Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val  
 645 650 655  
 Ile Ser Trp Thr Ile Leu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Thr Ile  
 660 665 670  
 Arg Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Val Asp Val Lys  
 675 680 685  
 Ile Lys Asn Ala Thr Ile Thr Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro  
 690 695 700  
 Glu Thr Ala Tyr Gln Val Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser  
 705 710 715 720  
 Ser Asn Pro Ala Phe Ser His Glu Leu Val Thr Leu Pro Glu Ser Gln  
 725 730 735  
 Ala Pro Ala Asp Leu Gly Gly Gly Lys Met Leu Leu Ile Ala Ile Leu  
 740 745 750  
 Gly Ser Ala Gly Met Thr Cys Leu Thr Val Leu Leu Ala Phe Leu Ile  
 755 760 765  
 Ile Leu Gln Leu Lys Arg Ala Asn Val Gln Arg Arg Ми дра Gln Ala  
 770 775 780

RU 2569461 C2

Phe Gln Asn Val Arg Glu Glu Pro Ala Val Gln Phe Asn Ser Gly Thr  
 785 790 795 800  
 Leu Ala Leu Asn Arg Lys Val Lys Asn Asn Pro Asp Pro Thr Ile Tyr  
 805 810 815  
 Pro Val Leu Asp Trp Asn Asp Ile Lys Phe Gln Asp Val Ile Gly Glu  
 820 825 830  
 Gly Asn Phe Gly Gln Val Leu Lys Ala Arg Ile Lys Lys Asp Gly Leu  
 835 840 845  
 Arg Met Asp Ala Ala Ile Lys Arg Met Lys Glu Tyr Ala Ser Lys Asp  
 850 855 860  
 Asp His Arg Asp Phe Ala Gly Glu Leu Glu Val Leu Cys Lys Leu Gly  
 865 870 875 880  
 His His Pro Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Glu His Arg Gly  
 885 890 895  
 Tyr Leu Tyr Leu Ala Ile Glu Tyr Ala Pro His Gly Asn Leu Leu Asp  
 900 905 910  
 Phe Leu Arg Lys Ser Arg Val Leu Glu Thr Asp Pro Ala Phe Ala Ile  
 915 920 925  
 Ala Asn Ser Thr Ala Ser Thr Leu Ser Ser Gln Gln Leu Leu His Phe  
 930 935 940  
 Ala Ala Asp Val Ala Arg Gly Met Asp Tyr Leu Ser Gln Lys Gln Phe  
 945 950 955 960  
 Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn Tyr  
 965 970 975  
 Val Ala Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ser Arg Gly Gln Glu Val Tyr  
 980 985 990  
 Val Lys Lys Thr Met Gly Arg Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Ile Glu  
 995 1000 1005  
 Ser Leu Asn Tyr Ser Val Tyr Thr Thr Asn Ser Asp Val Trp Ser  
 1010 1015 1020  
 Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Val Ser Leu Gly Gly Thr Pro  
 1025 1030 1035  
 Tyr Cys Gly Met Thr Cys Ala Glu Leu Tyr Glu Lys Leu Pro Gln  
 1040 1045 1050  
 Gly Tyr Arg Leu Glu Lys Pro Leu Asn Cys Asp Asp Glu Val Tyr  
 1055 1060 1065

Asp Leu Met Arg Gln Cys Trp Arg Glu Lys Pro Tyr Glu Arg Pro  
 1070 1075 1080

Ser Phe Ala Gln Ile Leu Val Ser Leu Asn Arg Met Leu Glu Glu  
 1085 1090 1095

Arg Lys Thr Tyr Val Asn Thr Thr Leu Tyr Glu Lys Phe Thr Tyr  
 1100 1105 1110

Ala Gly Ile Asp Cys Ser Ala Glu Glu Ala Ala  
 1115 1120

<210> 62  
 <211> 504  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Ангиопоэтин-2 (ANG-2) человека с лидерной последовательностью и His-меткой

<400> 62

Met Trp Gln Ile Val Phe Phe Thr Leu Ser Cys Asp Leu Val Leu Ala  
 1 5 10 15

Ala Ala Tyr Asn Asn Phe Arg Lys Ser Met Asp Ser Ile Gly Lys Lys  
 20 25 30

Gln Tyr Gln Val Gln His Gly Ser Cys Ser Tyr Thr Phe Leu Leu Pro  
 35 40 45

Glu Met Asp Asn Cys Arg Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Val Ser Asn Ala  
 50 55 60

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

Gln Val Leu Glu Asn Ile Met Glu Asn Asn Thr Gln Trp Leu Met Lys  
 85 90 95

Leu Glu Asn Tyr Ile Gln Asp Asn Met Lys Lys Glu Met Val Glu Ile  
 100 105 110

Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn Gln Thr Ala Val Met Ile Glu Ile Gly  
 115 120 125

Thr Asn Leu Leu Asn Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys Leu Thr Asp  
 130 135 140

Val Glu Ala Gln Val Leu Asn Gln Thr Thr Arg Leu Glu Leu Gln Leu  
 145 150 155 160

Leu Glu His Ser Leu Ser Thr Asn Lys Leu Glu Lys Gln Ile Leu Asp



Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln  
 450 455 460

Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser  
 465 470 475 480

Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala Asp Phe  
 485 490 495

Ser Gly His His His His His His  
 500

<210> 63  
 <211> 506  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Ангиопоэтин-1 (ANG-1) человека с лидерной последовательностью и His-меткой

<400> 63

Met Thr Val Phe Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Ala Ile Leu Thr His  
 1 5 10 15

Ile Gly Cys Ser Asn Gln Arg Arg Ser Pro Glu Asn Ser Gly Arg Arg  
 20 25 30

Tyr Asn Arg Ile Gln His Gly Gln Cys Ala Tyr Thr Phe Ile Leu Pro  
 35 40 45

Glu His Asp Gly Asn Cys Arg Glu Ser Thr Thr Asp Gln Tyr Asn Thr  
 50 55 60

Asn Ala Leu Gln Arg Asp Ala Pro His Val Glu Pro Asp Phe Ser Ser  
 65 70 75 80

Gln Lys Leu Gln His Leu Glu His Val Met Glu Asn Tyr Thr Gln Trp  
 85 90 95

Leu Gln Lys Leu Glu Asn Tyr Ile Val Glu Asn Met Lys Ser Glu Met  
 100 105 110

Ala Gln Ile Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr Met Leu  
 115 120 125

Glu Ile Gly Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys  
 130 135 140

Leu Thr Asp Val Glu Thr Gln Val Leu Asn Gln Thr Ser Arg Leu Glu  
 145 150 155 160

Ile Gln Leu Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln  
 165 170 175

RU 2569461 C2

Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser  
 180 185 190  
 Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu  
 195 200 205  
 Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr  
 210 215 220  
 Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Asn Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu Met Asp  
 245 250 255  
 Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu  
 260 265 270  
 Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp  
 275 280 285  
 Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile  
 290 295 300  
 Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn  
 305 310 315 320  
 Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp  
 325 330 335  
 Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser  
 340 345 350  
 Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln  
 355 360 365  
 Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg  
 370 375 380  
 Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn  
 385 390 395 400  
 Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser  
 405 410 415  
 Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn  
 420 425 430  
 Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp  
 435 440 445

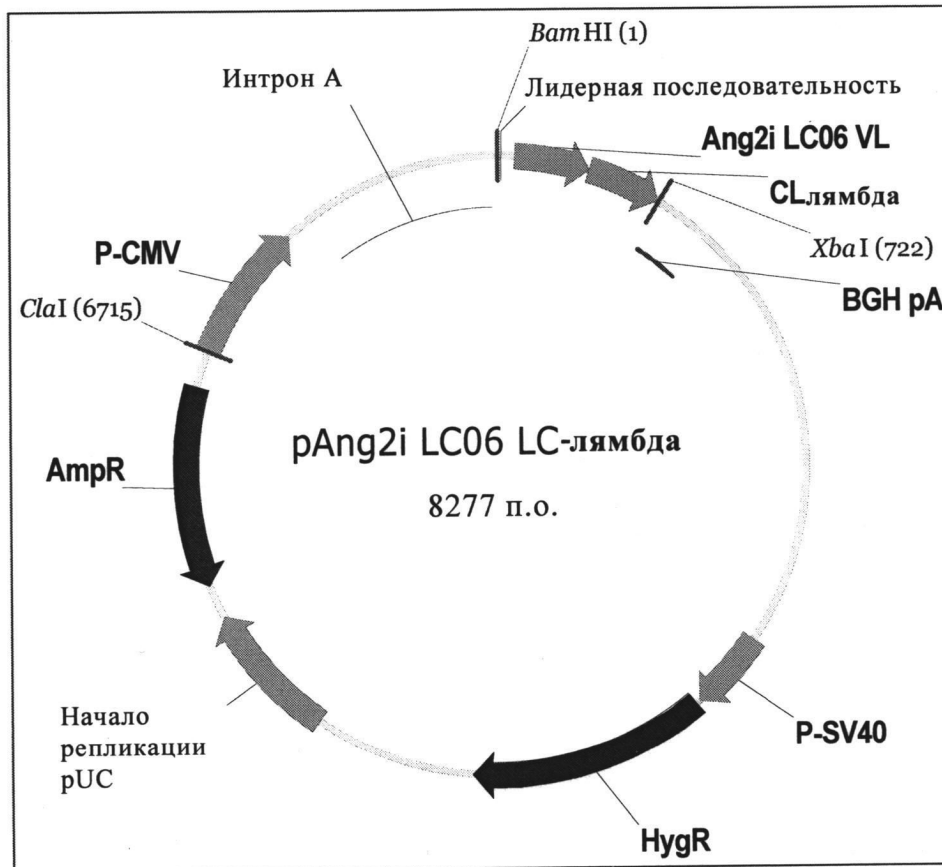
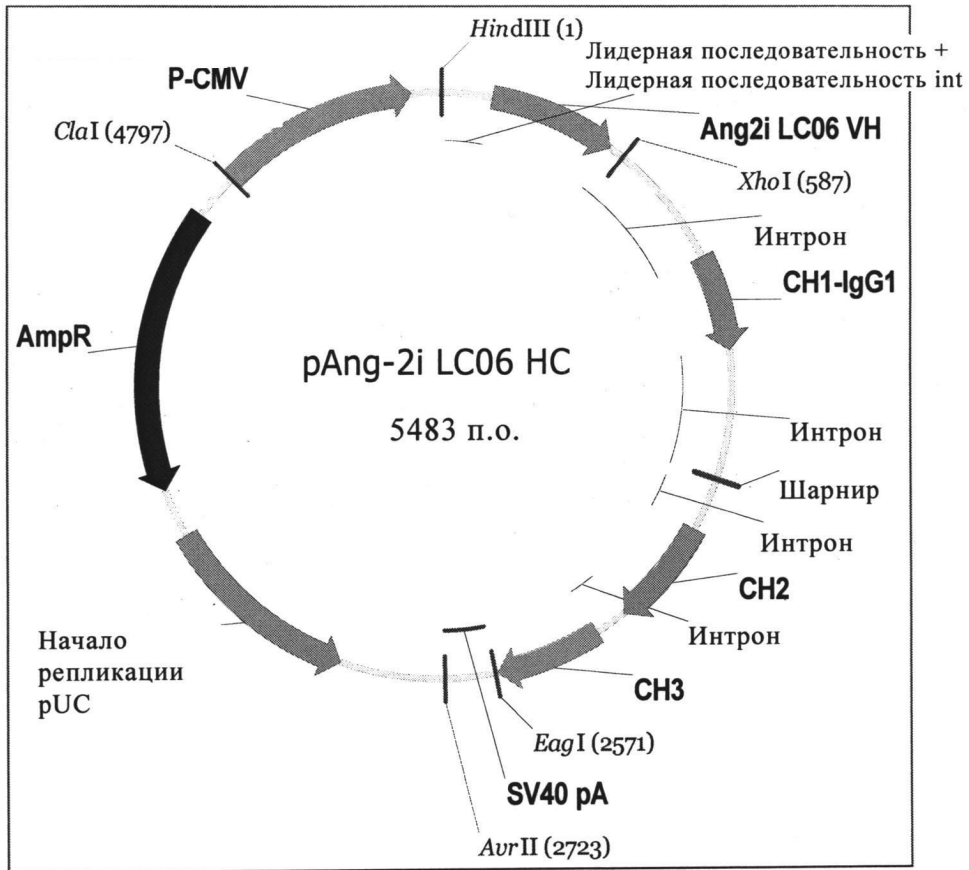
RU 2569461 C2

Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala  
450 455 460

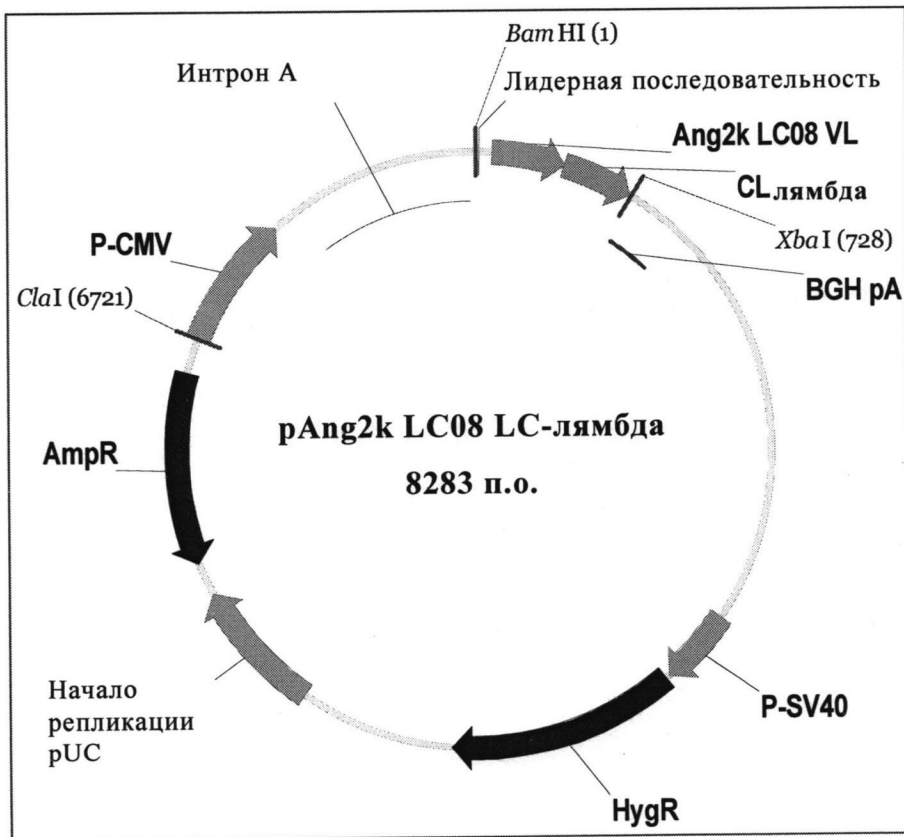
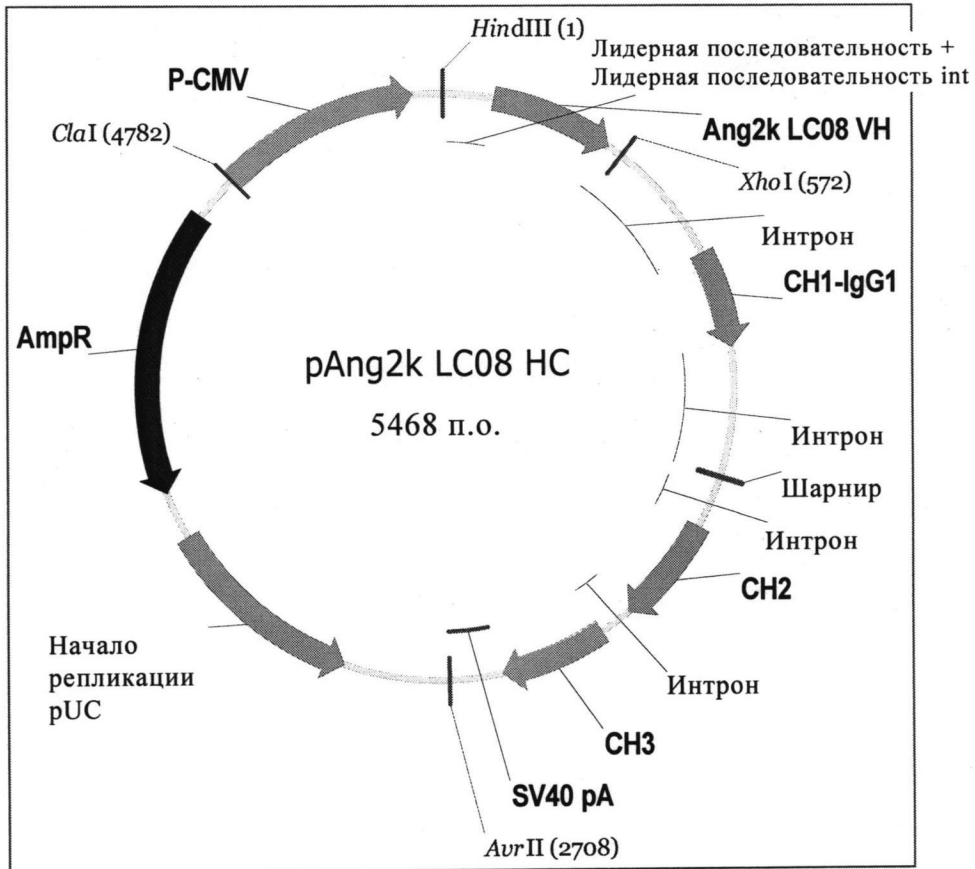
Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys  
465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu  
485 490 495

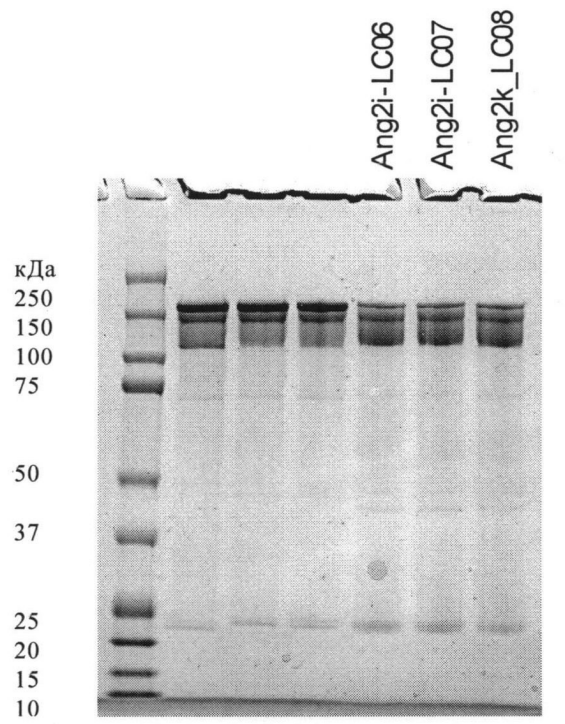
Asp Phe Ser Gly His His His His His His  
500 505



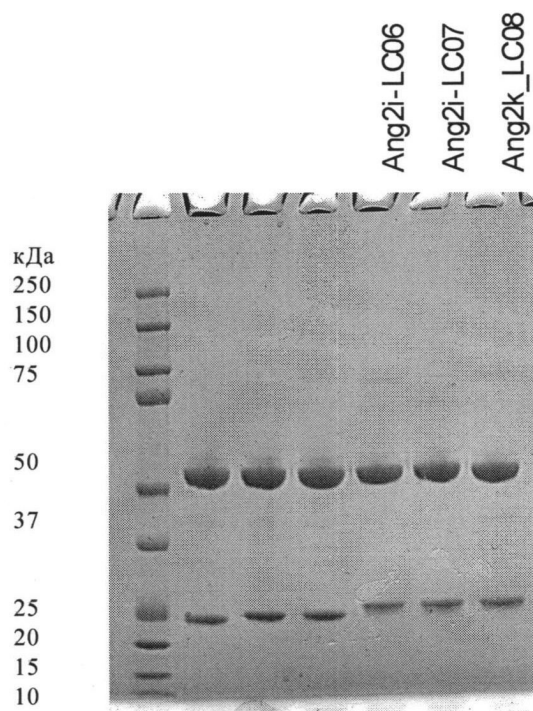
Фиг. 1А



Фиг. 1Б

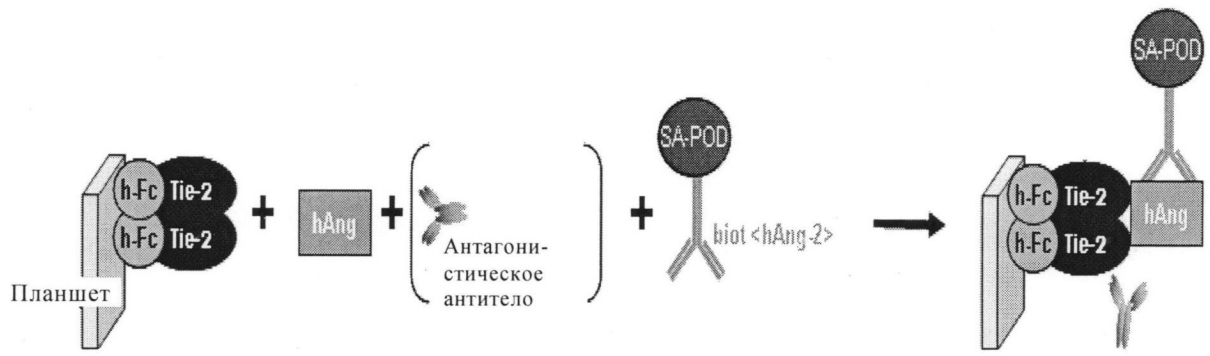


Невосстановленные антитела

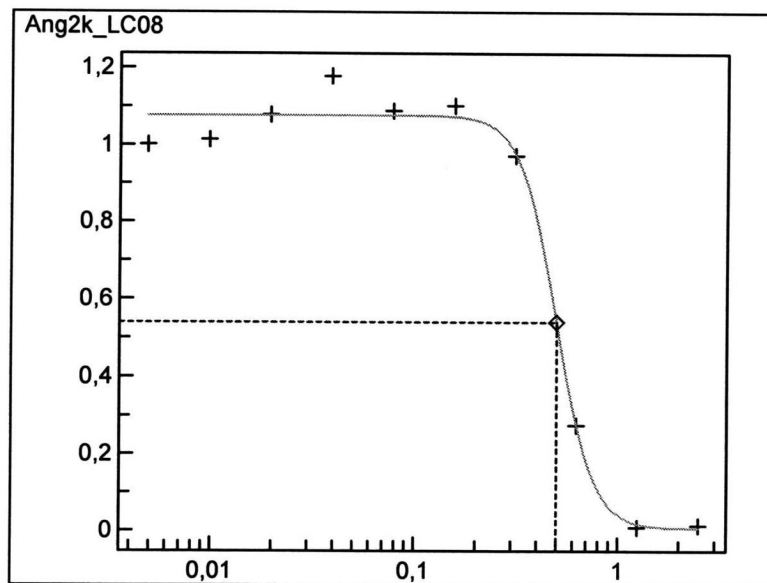
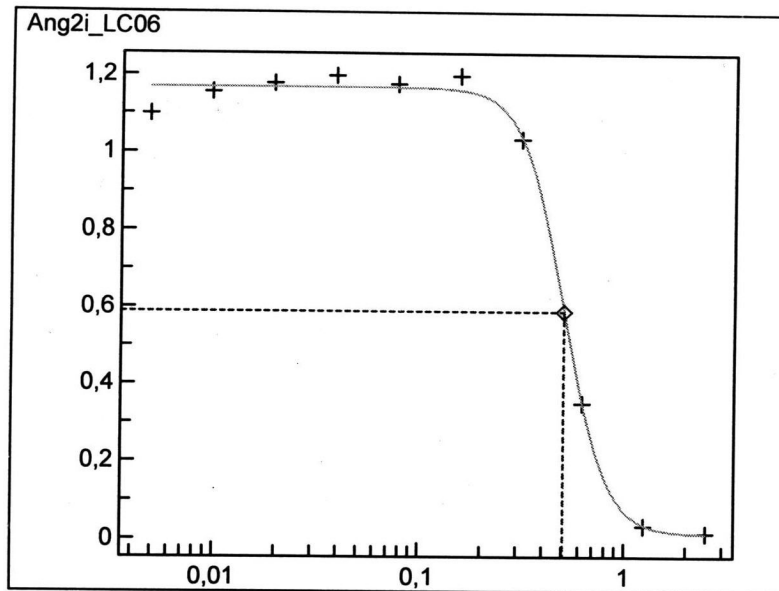


Восстановленные антитела

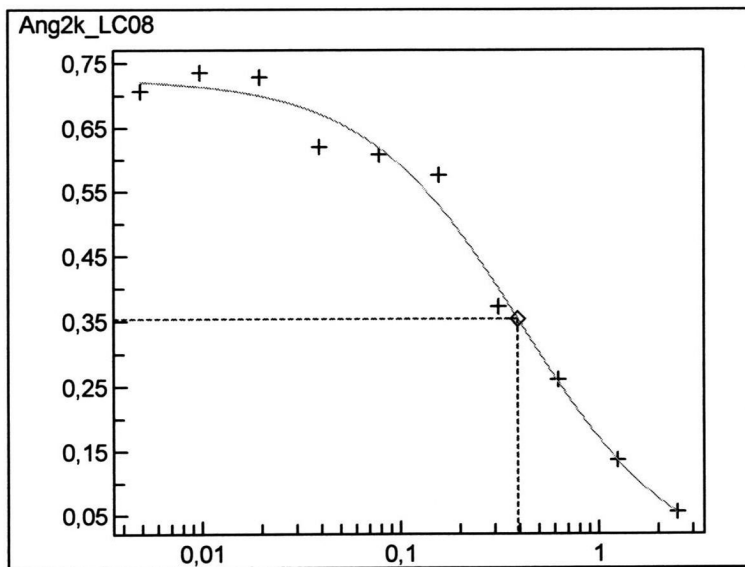
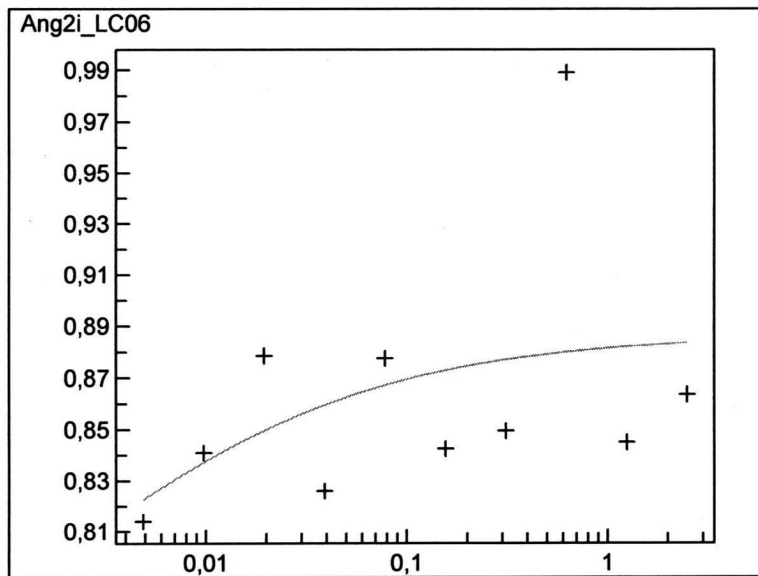
Фиг. 2



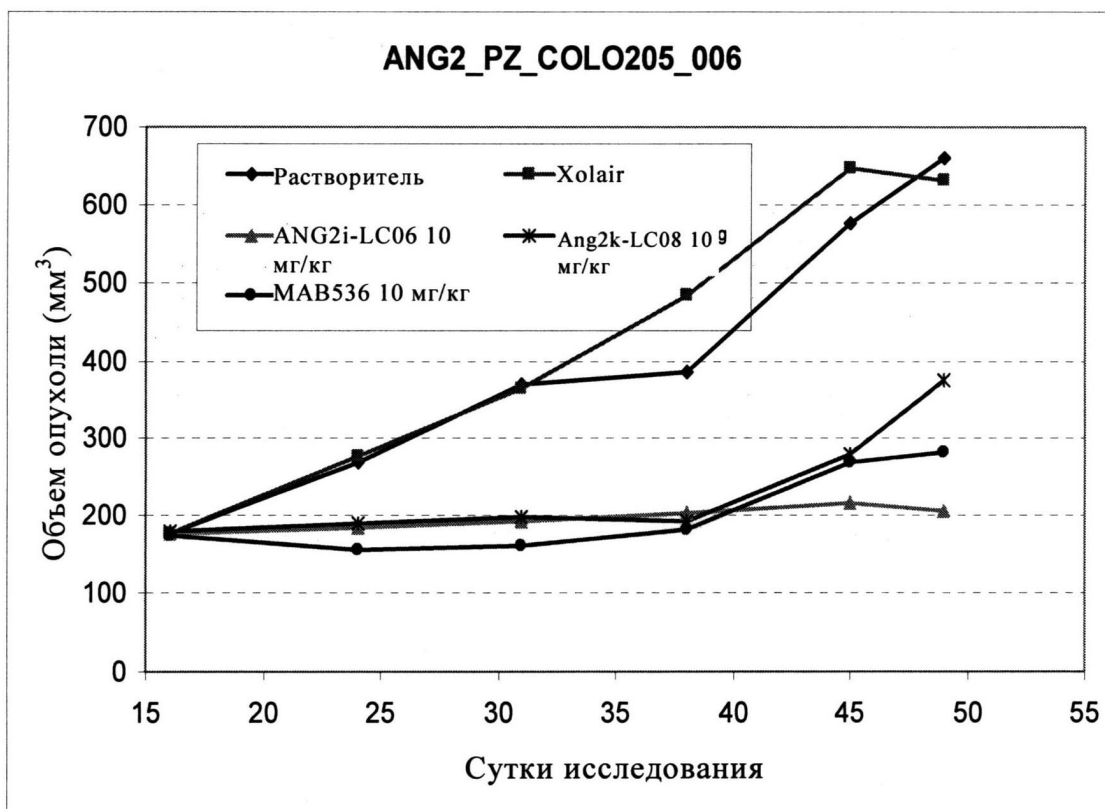
Фиг. 3



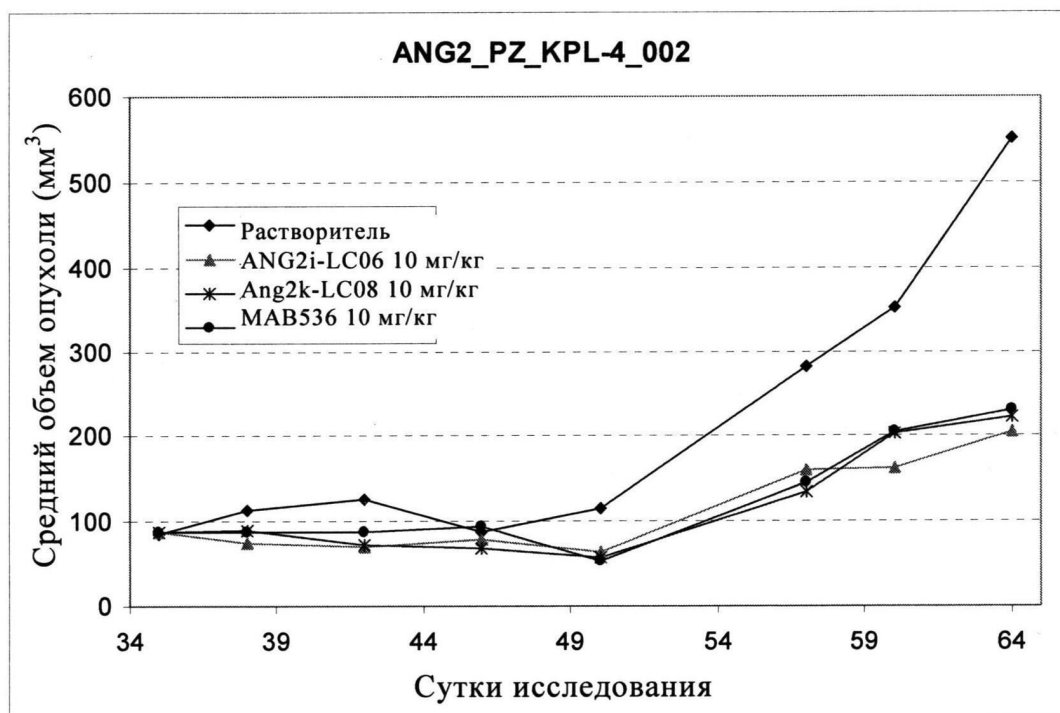
Фиг. 4



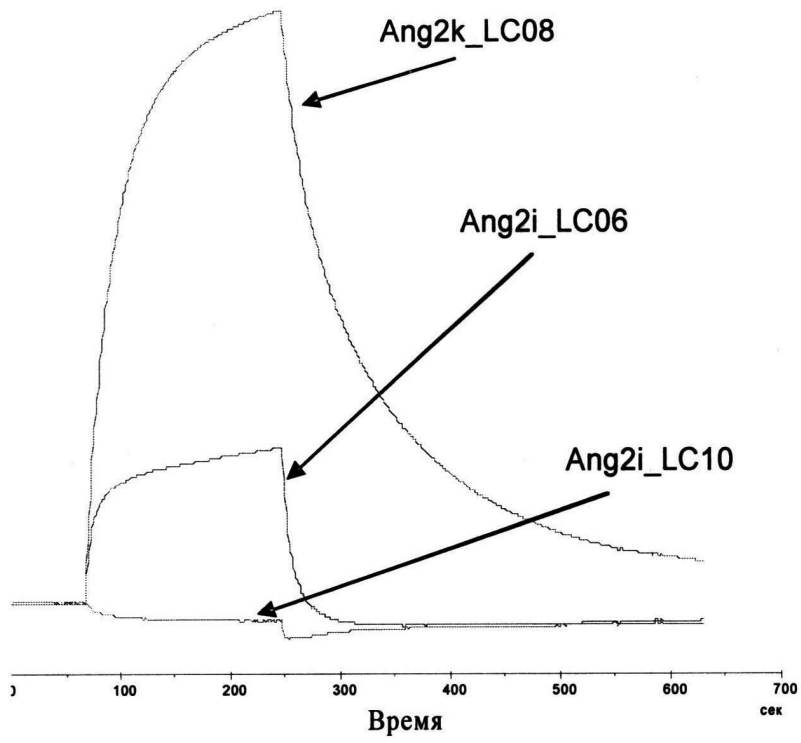
Фиг. 5



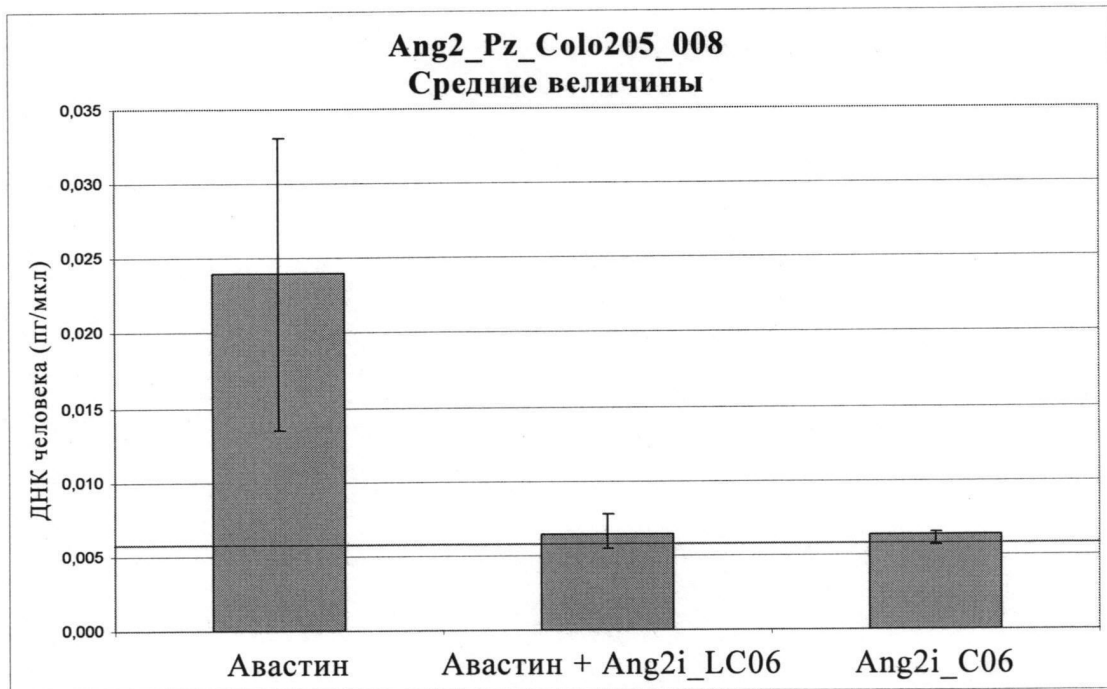
Фиг. 6



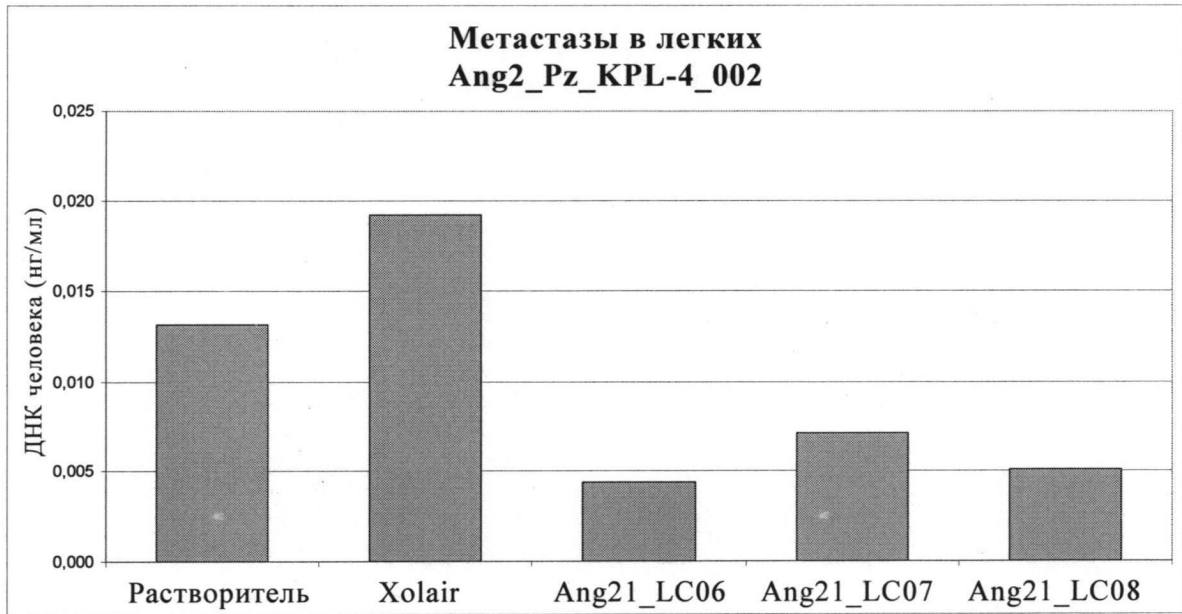
Фиг. 7



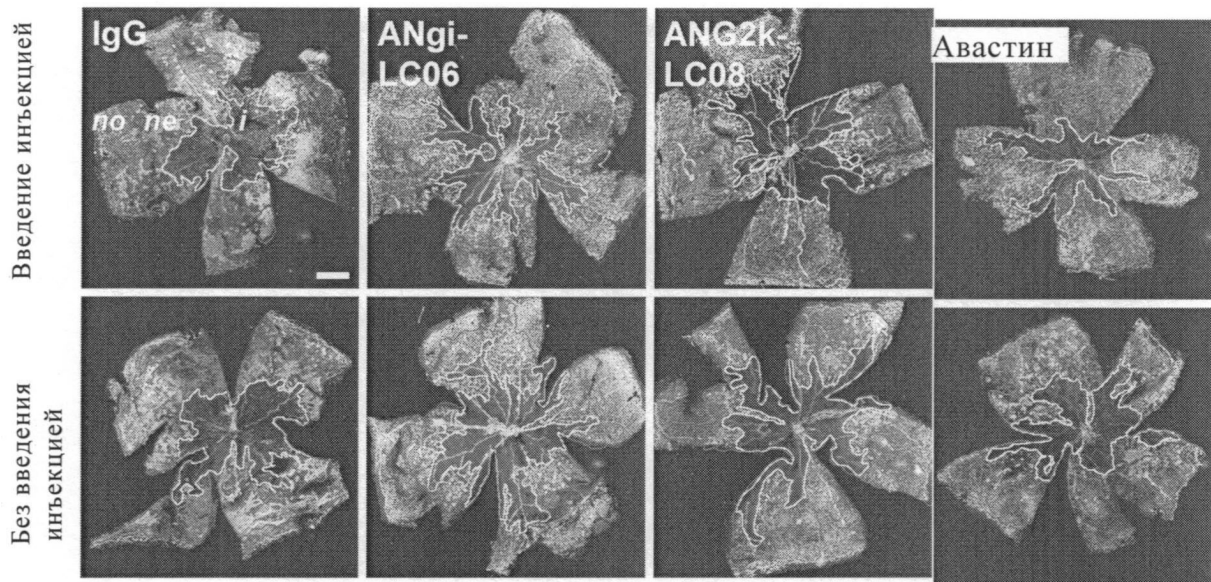
Фиг. 8



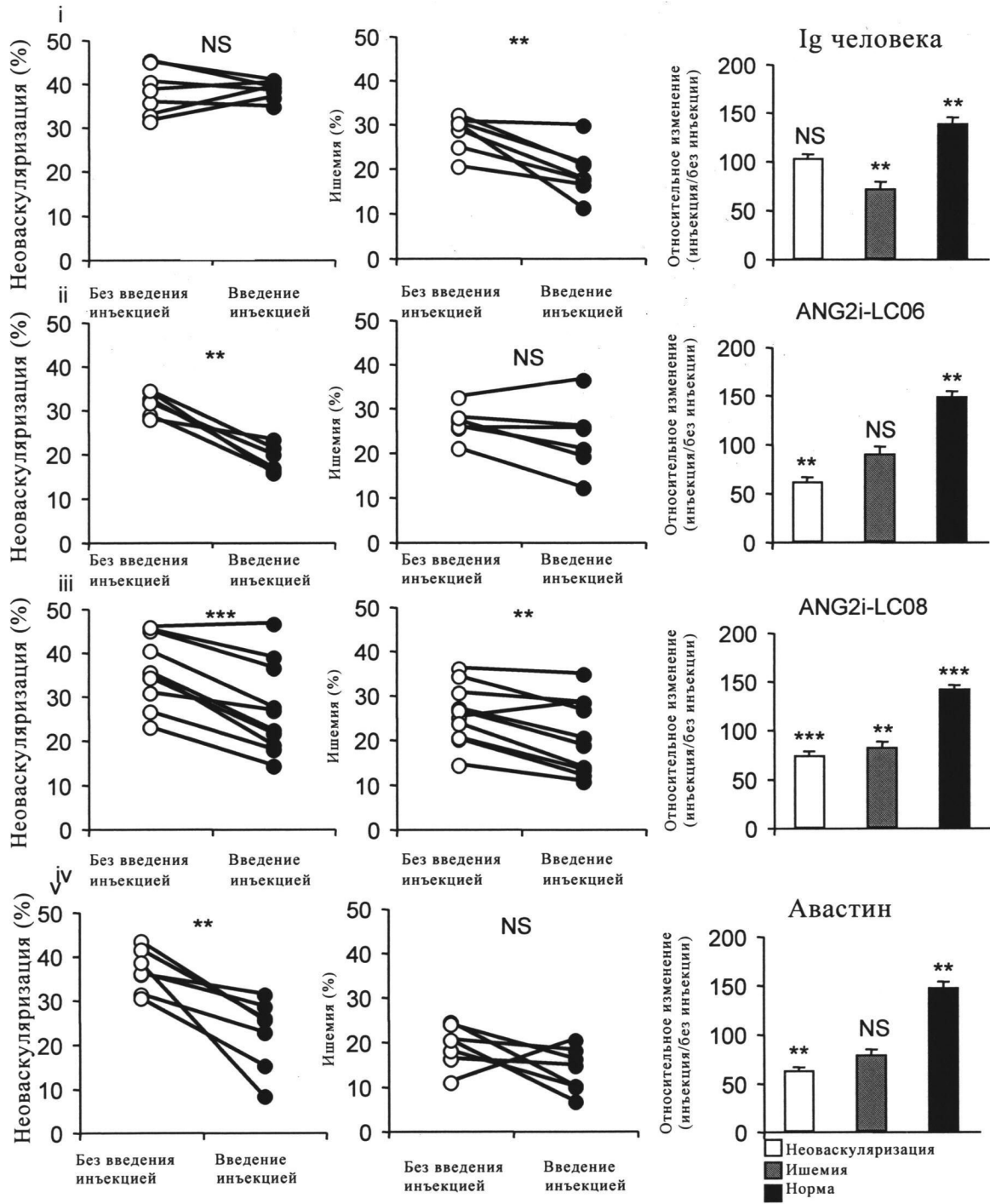
Фиг. 9А



Фиг. 9Б



Фиг. 10А



Фиг. 10Б