



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107074941 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201580060833.X

(22)申请日 2015.11.06

(30)优先权数据

14192517.2 2014.11.10 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.05.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2015/075879 2015.11.06

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/075037 EN 2016.05.19

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 马克·贝杜沙

塞巴斯蒂安·布罗伊尔

斯特凡·登格尔

克里斯蒂安·加斯纳 盖伊·乔治

扎比内·格吕纳 古伊多·哈特曼

彼得·迈克尔·许尔斯曼

胡贝特·克滕贝格尔

约尔格·默勒肯

迈克尔·莫尔霍杰

奥拉夫·蒙迪戈

约尔格·托马斯·雷古拉

拉尔夫·舒马赫 芭芭拉·魏泽尔

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 吴小明 程金山

(51)Int.Cl.

C07K 16/24(2006.01)

C07K 16/22(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 27/08(2006.01)

权利要求书4页 说明书92页

序列表141页

(54)发明名称

双特异性抗体和用于眼科学的方法

(57)摘要

本发明报道新型双特异性抗体,其特异性结合选自以下组成的组的两种不同的抗原:人ANG2,人VEGF,人IL-1 β 和人PDGF-B。

1. 特异性结合人IL-1 β 和选自由人ANG2、人VEGF和人PDGF-B组成的组的第二抗原的双特异性抗体,其包含:

a) 包含以下的重链可变结构域:

(a) 包含SEQ ID NO:02的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:03的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:05的氨基酸序列的HVR-H3, 或

(a) 包含SEQ ID NO:07的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:08的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3, 或

(a) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H3,

和

包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L2; 和(c) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L3, 或

a) 包含以下的重链可变结构域: 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H3, 和

包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2; 和(c) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3。

2. 特异性结合人PDGF-B和选自由人ANG2、人VEGF和人IL-1 β 组成的组的第二抗原的双特异性抗体,其包含:

a) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HVR-L2; 和(c) 包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L3,

或

b) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-L2; 和(c) 包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的HVR-L3,

或

c) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的HVR-L2; 和(c) 包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的HVR-L3。

3. 根据权利要求1或2中任一项所述的双特异性抗体,其还特异性结合人ANG-2,其进一步包含:

a) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的HVR-L2; 和(c) 包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的HVR-L3,

或

b) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的HVR-L3,

或

c) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的HVR-L3,

或

d) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的HVR-L3。

4. 根据权利要求1或2中任一项所述的双特异性抗体, 其还特异性结合人VEGF, 并且进一步包含:

a) 包含在SEQ ID NO:107的重链可变结构域中的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3和包含在SEQ ID NO:108的重链可变结构域中的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,

或

b) 包含在SEQ ID NO:109的重链可变结构域中的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3和包含在SEQ ID NO:110的重链可变结构域中的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3。

5. 特异性结合人IL-1 β 和人PDGF-B的双特异性抗体, 其包含:

-特异性结合人IL-1 β 的第一结合位点, 所述第一结合位点包含:

a) 包含以下的重链可变结构域:

(a) 包含SEQ ID NO:02的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:03的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:05的氨基酸序列的HVR-H3, 或

(a) 包含SEQ ID NO:07的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:08的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3, 或

(a) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H3,

和

包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L3,

或

a) 包含以下的重链可变结构域: 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3,

-特异性结合人PDGF-B的第二结合位点, 所述第二结合位点包含:

a) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L3,

或

b) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的HVR-L3,

或

c) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的HVR-L3。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗体, 其中所述抗体是包含以下的二价双特异性抗体:

a) 特异性结合第一抗原的抗体的第一轻链和第一重链, 和

b) 特异性结合第二抗原的抗体的第二轻链和第二重链, 其中第二轻链和第二重链的可变结构域VL和VH彼此替换。

7. 根据权利要求6所述的抗体, 其中所述抗体包含:

i) 在a) 中第一轻链的恒定结构域CL中, 位置124的氨基酸独立地被置换为赖氨酸(K)、精氨酸(R) 或组氨酸(H) (按照Kabat编号) (在一个优选的实施方案中, 独立地被置换为赖氨酸(K) 或精氨酸(R)), 并且, 其中在a) 中第一重链的恒定结构域CH1中, 位置147的氨基酸或位置213的氨基酸独立地被置换为谷氨酸(E) 或天冬氨酸(D) (按照Kabat EU索引编号),

或

ii) 在b) 中第二轻链的恒定结构域CL中, 位置124的氨基酸独立地被置换为赖氨酸(K)、精氨酸(R) 或组氨酸(H) (按照Kabat编号) (在一个优选的实施方案中, 独立地被置换为赖氨酸(K) 或精氨酸(R)), 并且, 其中在b) 中第二重链的恒定结构域CH1中, 位置147的氨基酸或位置213的氨基酸独立地被置换为谷氨酸(E) 或天冬氨酸(D) (按照Kabat EU索引编号)。

8. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗体, 其中所述抗体是包含以下的二价双特异性抗体:

a) 特异性结合第一抗原的抗体的第一轻链和第一重链, 和

b) 特异性结合第二抗原的抗体的第二轻链和第二重链, 其中第二轻链和第二重链的恒定结构域CL和CH1彼此替换。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的抗体, 其中所述抗体包含第一Fc-区多肽和第二Fc-区多肽, 并且

其中

i) 第一Fc-区多肽是人IgG1Fc-区多肽并且第二Fc-区多肽是人IgG1Fc-区多肽, 或

ii) 第一Fc-区多肽是具有突变L234A, L235A的人IgG1Fc-区多肽, 并且第二Fc-区多肽

是具有突变L234A,L235A的人IgG1Fc-区多肽,或

iii) 第一Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,P329G的人IgG1Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,P329G的人IgG1Fc-区多肽,或

iv) 第一Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,S354C,T366W的人IgG1Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,Y349C,T366S,L368A,Y407V的人IgG1Fc-区多肽,或

v) 第一Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,P329G,S354C,T366W的人IgG1Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,P329G,Y349C,T366S,L368A,Y407V的人IgG1Fc-区多肽,或

vi) 第一Fc-区多肽是人IgG4Fc-区多肽并且第二Fc-区多肽是人IgG4Fc-区多肽,或

vii) 第一Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E的人IgG4Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E的人IgG4Fc-区多肽,或

viii) 第一Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,P329G的人IgG4Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,P329G的人IgG4Fc-区多肽,或

ix) 第一Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,S354C,T366W的人IgG4Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,Y349C,T366S,L368A,Y407V的人IgG4Fc-区多肽,或

x) 第一Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,P329G,S354C,T366W的人IgG4Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,P329G,Y349C,T366S,L368A,Y407V的人IgG4Fc-区多肽。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含第一Fc-区多肽和第二Fc-区多肽,并且

其中所述抗体在所述第一Fc-区多肽中和在所述第二Fc-区多肽中包含下述突变组合:

i) I253A,H310A,和H435A,或

ii) H310A,H433A,和Y436A,或

iii) L251D,L314D,和L432D,或

iv) i)-iii)的组合。

11. 一种药物制剂,其包含根据权利要求1-10中任一项所述的抗体和任选地药学上可接受的载体。

12. 根据权利要求1-10中任一项所述的抗体,其用作药物。

13. 权利要求1-10中任一项所述的抗体在制备药物中的应用。

14. 根据权利要求12和13中任一项所述的应用,其中所述药物用于治疗眼血管疾病,优选用于治疗黄斑变性。

双特异性抗体和用于眼科学的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及双特异性抗体和使用其的方法,例如,在眼科学中使用其的方法。

背景技术

[0002] 眼血管疾病,如年龄相关的黄斑变性(age related macular degeneration,AMD)和糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy,DR),分别是由于异常的脉络膜或视网膜新血管形成所导致。它们是工业化国家中视觉丧失的主要原因。由于视网膜由界限明确的神经元、神经胶质和血管元件层组成,相对小的干扰,如在血管增生或水肿中观察到的那些,可以导致显著的视功能丧失。遗传性视网膜变性,诸如色素性视网膜炎(Retinitis Pigmentosa,RP)也与血管异常相关,诸如小动脉狭窄和血管萎缩。它们多至在每3,500名个体中影响1人,并且特征在于进行性的夜盲(progressive night blindness)、视野丧失(visual field loss)、视神经萎缩(optic nerve atrophy)、小动脉变细(arteriolar attenuation)和通常进展为完全的失明的中央视觉丧失(central loss of vision)。

[0003] 缺血性视网膜病变(ischemic retinopathies)特征在于视网膜血管的丧失或功能障碍,其引起血流减少和缺氧。视网膜通过产生生长新血管的信号来响应缺氧,但是这些新血管通常是脆弱的和无组织性的。由于它们可能渗漏、导致出血或导致可能引起视网膜脱离的结瘢痕,因此,正是这些异常新血管的生长产生大部分的视觉威胁。目前对于缺血性视网膜病变的治疗寻找终止病理性血管生长,但是没有解决推动其生长的构成其基础的缺血。此外,对糖尿病性视网膜病变(一种影响数百万人的缺血性视网膜神经病变)的标准治疗包括用激光破坏一部分视网膜,以尝试终止新血管生长并且保持中央视觉。已经应用一些策略来阻断血管内皮生长因子(VEGF)的功能,血管内皮生长因子是血管生长的主要促进剂。短期内,抗-VEGF治疗可以改善视觉,但是其没有解决构成其基础的缺血,并且事实上,由于其抑制所有的血管生长,包括有益的侧支的生长,可能加重这种病症。在老年人和/或糖尿病患者(在缺血性的脑、心脏或肢体中可能需要新血管生长)中,还存在对于系统性暴露于这些药物的严重的关注。

[0004] 典型地,对于通过玻璃体内应用的眼部疾病,通常使用较小的抗体片段,如Fab或Fab₂,原因在于其具有低血清半衰期,并且系统性毒性的危险较低。然而,这种较小的片段通常也具有较低的玻璃体内半衰期(例如,由于较快地扩散到血清中)并且必须通常更频繁地给药。

[0005] WO 2009/080252和Schaefer,W.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,108(2011) 11187-11191(其结合在本文中作为参考文献)中记载了在一个结合臂中具有结构域替换/交换的多特异性抗体(CrossMabVH-VL)。它们明显地减少由针对第一抗原的轻链与针对第二抗原的错误重链的错配引起的副产物(与不具有所述结构域交换的方法相比较)。然而,其制备没有完全不含副产物。主要的副产物是基于Bence-Jones-型相互作用。还参见Schaefer,W.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,108(2011) 11187-11191;在补充说明中的图S1I中)。

[0006] 在WO 2011/117329中报道了双特异性二价抗-VEGF/抗-ANG2抗体。WO 2014/177460中报道了结合人FcRn的修饰的抗体和使用方法。Kienast, Y., 等人 (Clin. Canc. Res. 19 (2013) 6730-6740) 报道了Ang-2-VEGF-A CrossMab, 其作为同时阻断VEGF-A 和Ang-2功能的新型双特异性人IgG1抗体, 介导有效的抗肿瘤、抗血管生成和抗转移的功效。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供新型双特异性抗体和使用其的方法。

[0009] 本文报道了一种双特异性抗体, 其特异性结合选自由以下组成的组的两种不同的抗原: 人ANG2, 人VEGF, 人IL-1 β 和人PDGF-B。

[0010] 在一个实施方案中, 所述抗体不是抗-ANG2/VEGF抗体。

[0011] 在一个实施方案中, 所述抗体特异性结合人IL-1 β 并且包含:

[0012] a) 包含以下的重链可变结构域:

[0013] (a) 包含SEQ ID NO:02的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:05的氨基酸序列的HVR-H3, 或

[0014] (a) 包含SEQ ID NO:07的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:08的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3, 或

[0015] (a) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H3,

[0016] 和

[0017] 包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L3,

[0018] 或

[0019] a) 包含以下的重链可变结构域: 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3。

[0020] 在一个实施方案中, 所述抗体特异性结合人PDGF-B并且包含:

[0021] a) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L3,

[0022] 或

[0023] b) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的HVR-L3,

[0024] 或

[0025] c) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的HVR-L2; 和(c) 包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的HVR-L3。

[0026] 在一个实施方案中, 所述抗体特异性结合人ANG2并且包含:

[0027] a) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的HVR-L2; 和(c) 包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的HVR-L3,

[0028] 或

[0029] b) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的HVR-L2; 和(c) 包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的HVR-L3,

[0030] 或

[0031] c) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的HVR-L2; 和(c) 包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的HVR-L3,

[0032] 或

[0033] d) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的HVR-L2; 和(c) 包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的HVR-L3。

[0034] 在一个实施方案中, 所述抗体特异性结合人VEGF并且包含:

[0035] a) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的HVR-L2; 和(c) 包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的HVR-L3,

[0036] 或

[0037] b) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的

HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的HVR-L3。

[0038] 在一个实施方案中, 所述抗体是包含以下的二价双特异性抗体:

[0039] a) 特异性结合第一抗原的抗体的第一轻链和第一重链, 和

[0040] b) 特异性结合第二抗原的抗体的第二轻链和第二重链, 其中第二轻链和第二重链的可变结构域VL和VH彼此替换。

[0041] 在一个优选的实施方案中, 所述抗体包含:

[0042] i) 在a) 中第一轻链的恒定结构域CL中, 位置124的氨基酸独立地被置换为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H) (按照Kabat编号) (在一个优选的实施方案中, 独立地被置换为赖氨酸(K)或精氨酸(R)), 并且, 其中在a) 中第一重链的恒定结构域CH1中, 位置147的氨基酸或位置213的氨基酸独立地被置换为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D) (按照Kabat EU索引编号),

[0043] 或

[0044] ii) 在b) 中第二轻链的恒定结构域CL中, 位置124的氨基酸独立地被置换为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H) (按照Kabat编号) (在一个优选的实施方案中, 独立地被置换为赖氨酸(K)或精氨酸(R)), 并且, 其中在b) 中第二重链的恒定结构域CH1中, 位置147的氨基酸或位置213的氨基酸独立地被置换为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D) (按照Kabat EU索引编号)。

[0045] 在一个实施方案中, 所述抗体是二价双特异性抗体, 其包含:

[0046] a) 特异性结合第一抗原的抗体的第一轻链和第一重链, 和

[0047] b) 特异性结合第二抗原的抗体的第二轻链和第二重链, 其中第二轻链和第二重链的恒定结构域CL和CH1彼此替换。

[0048] 在一个实施方案中, 所述抗体包含第一Fc-区多肽和第二Fc-区多肽, 并且

[0049] 其中

[0050] i) 第一Fc-区多肽是人IgG1 Fc-区多肽并且第二Fc-区多肽是人IgG1 Fc-区多肽, 或

[0051] ii) 第一Fc-区多肽是具有突变L234A, L235A的人IgG1 Fc-区多肽, 并且第二Fc-区多肽是具有突变L234A, L235A的人IgG1 Fc-区多肽, 或

[0052] iii) 第一Fc-区多肽是具有突变L234A, L235A, P329G的人IgG1 Fc-区多肽, 并且第二Fc-区多肽是具有突变L234A, L235A, P329G的人IgG1 Fc-区多肽, 或

[0053] iv) 第一Fc-区多肽是具有突变L234A, L235A, S354C, T366W的人IgG1 Fc-区多肽, 并且第二Fc-区多肽是具有突变L234A, L235A, Y349C, T366S, L368A, Y407V的人IgG1 Fc-区多肽, 或

[0054] v) 第一Fc-区多肽是具有突变L234A, L235A, P329G, S354C, T366W的人IgG1 Fc-区多肽, 并且第二Fc-区多肽是具有突变L234A, L235A, P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V的人IgG1 Fc-区多肽, 或

[0055] vi) 第一Fc-区多肽是人IgG4 Fc-区多肽并且第二Fc-区多肽是人IgG4 Fc-区多肽, 或

[0056] vii) 第一Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E的人IgG4 Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E的人IgG4 Fc-区多肽,或

[0057] viii) 第一Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,P329G的人IgG4 Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,P329G的人IgG4 Fc-区多肽,或

[0058] ix) 第一Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,S354C,T366W的人IgG4 Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,Y349C,T366S,L368A,Y407V的人IgG4 Fc-区多肽,或

[0059] x) 第一Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,P329G,S354C,T366W的人IgG4 Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,P329G,Y349C,T366S,L368A,Y407V的人IgG4 Fc-区多肽。

[0060] 在一个实施方案中,所述抗体包含第一Fc-区多肽和第二Fc-区多肽,并且

[0061] 其中所述抗体在第一Fc-区多肽中和在第二Fc-区多肽中包含下述突变组合:

[0062] i) I253A,H310A,和H435A,或

[0063] ii) H310A,H433A,和Y436A,或

[0064] iii) L251D,L314D,和L432D,或

[0065] iv) i) -iii) 的组合。

[0066] 本文报道的一方面是包含本文报道的抗体和任选地药用载体的药物制剂。

[0067] 本文报道的一方面是本文报道的抗体,其用作药物。

[0068] 本文报道的一方面是本文报道的抗体在制备药物中的应用。

[0069] 在一个实施方案中,所述药物用于治疗眼血管疾病,优选用于治疗黄斑变性。

[0070] 本发明实施方案详述

[0071] I. 定义

[0072] 用于本文的目的的“接纳体人框架”是包含如下文定义的源自人免疫球蛋白框架或人共有框架的轻链可变结构域(VL) 框架或重链可变结构域(VH) 框架的氨基酸序列的框架。“源自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的接纳体人框架可以包含其相同氨基酸序列,或其可以含有氨基酸序列改变。在一些实施方案中,氨基酸改变的数量为10个或更少,9个或更少,8个或更少,7个或更少,6个或更少,5个或更少,4个或更少,3个或更少,或2个或更少。在一些实施方案中,VL接纳体人框架与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列在序列上相同。

[0073] “亲和力”表示分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指出,否则本文中使用的“结合亲和力”表示反映结合对(例如,抗体和抗原)的成员之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对它的配偶体Y的亲和力通常可以由解离常数(k_d)表示。通过本领域已知的常见方法(包括本文描述的那些),可以测量亲和力。在下面描述了用于测量结合亲和力的具体举例性和示例性的实施方案。

[0074] “亲和力成熟的”抗体表示,与不具有这种改变的亲本抗体相比,在一个或多个高变区(HVR)中具有一个或多个改变的抗体,这种改变导致抗体对抗原的亲和力的改善。

[0075] 术语“抗-IL-1 β 抗体”和“结合IL-1 β 的抗体”表示这样的抗体:其能够以足够的亲和力结合IL-1 β ,使得所述抗体可用作靶向IL-1 β 的诊断剂和/或治疗剂。在一个实施方案

中,如例如通过ELISA或表面等离子体共振所测得的,抗-IL-1 β 抗体与无关的、非-IL-1 β 蛋白结合的程度小于所述抗体与IL-1 β 的结合的约10%。在某些实施方案中,结合IL-1 β 的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ (例如, 10^{-8}M 或更低,例如, 10^{-8}M 至 10^{-10}M ,例如, 10^{-9}M 至 10^{-10}M)的解离常数(KD)。在某些实施方案中,抗-IL-1 β 抗体结合在来自不同物种的IL-1 β 之间保守的IL-1 β 的表位。

[0076] 本文中的术语“抗体”以最宽泛的含义使用,并且包括各种抗体结构,包括,但不限于,单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出期望的抗原结合活性。

[0077] “抗体片段”表示除了完整抗体以外的分子,所述分子包含完整抗体的一部分,所述部分结合所述完整抗体所结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于:Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;直链抗体;单链抗体分子(例如,scFv);和由多个抗体片段形成的多特异性抗体。

[0078] 与参比抗体“结合相同表位的抗体”是指与所述参比抗体一样具有与至少一些相同的氨基酸残基相互作用的抗体。例如,这些相互作用是带电荷氨基酸残基之间的离子相互作用或疏水氨基酸残基之间的疏水相互作用。

[0079] 术语“嵌合的”抗体表示这样的抗体,其中重链和/或轻链的一部分源自特定来源或物种,同时重链和/或轻链的剩余部分源自不同的来源或物种。

[0080] 抗体的“类型”表示其重链具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五种主要的抗体类型:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的一些可以进一步分为亚类(同种型),例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应于不同类型的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0081] 术语“免疫缀合物”表示抗体与非抗体结构部分之间的共价缀合物。所述非抗体结构部分可以是检测标记、效应分子或细胞毒性剂。

[0082] 本文中使用的术语“细胞毒性剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或造成细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂包括,但不限于:放射性同位素(例如,At²¹¹,I¹³¹,I¹²⁵,Y⁹⁰,Re¹⁸⁶,Re¹⁸⁸,Sm¹⁵³,Bi²¹²,P³²,Pb²¹²和Lu的放射性同位素);化学治疗剂或药物(例如,甲氨蝶呤(methotrexate)、阿霉素(adriamycin)、长春花生物碱(vinca alkaloids)(长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide))、多柔比星(doxorubicin)、美法仑(melphalan)、丝裂霉素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、柔红霉素(daunorubicin)或其他嵌入剂);生长抑制剂;酶及其片段诸如溶核酶;抗生素;毒素诸如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,包括其片段和/或变体;和下面公开的各种抗肿瘤剂或抗癌剂。

[0083] “效应子功能”表示可归因于抗体的Fc区的那些生物学活性,其随抗体种类改变。抗体效应子功能的例子包括:C1q结合和补体依赖性的细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如,B细胞受体)的下调;和B-细胞活化。

[0084] 试剂(例如,药物制剂)的“有效量”表示在必要的剂量和持续必要的时间段,有效地实现期望的治疗或预防结果的量。

[0085] 术语“Fc区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的C-端区域,该区域含有恒定区的

至少一部分。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基端。但是,Fc区的C-端赖氨酸(Lys447)或C端甘氨酸-赖氨酸二肽(Gly446Lys447)可以存在或可以不存在。除非在本文中另外指出,在Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,也称为EU索引,如在Kabat,E.A.等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学感兴趣的蛋白的序列),第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991),NIH出版物91-3242中所述。

[0086] “框架”或“FR”表示除了高变区(HVR)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列通常以下述顺序出现在VH(或VL)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0087] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“完整的抗体”在本文中互换地用于表示这样的抗体:其具有与天然抗体结构基本上类似的结构或具有含有如本文中定义的Fc区的重链。

[0088] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”、和“宿主细胞培养物”互换使用,且表示其中已经引入外源核酸的细胞,包括这种细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,其包括原代转化的细胞和由其来源的后代(不考虑传代次数)。后代在核酸内容物方面可以与亲本细胞不完全相同,而是可以含有突变。针对最初转化的细胞筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变体后代包括在本文中。

[0089] “人抗体”是这样的抗体:其氨基酸序列对应于由人或人细胞产生的抗体或源自利用人抗体组库(repertoires)或其他人抗体编码序列的非人来源的抗体的氨基酸序列。该人抗体的定义特别排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0090] “人共有框架”是代表在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常出现的氨基酸残基的框架。通常,从可变结构域序列的亚组选择人免疫球蛋白VL或VH序列。通常,序列的亚组是如Kabat,E.A.等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学感兴趣的蛋白的序列),第5版,Bethesda MD(1991),NIH出版物91-3242,第1-3卷中的亚组。在一个实施方案中,对于VL,所述亚组是如在Kabat等人(出处同上)中的亚组κI。在一个实施方案中,对于VH,所述亚组是如在Kabat等人(出处同上)中的亚组III。

[0091] “人源化”抗体表示包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体将包含基本上全部的至少一个和通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有的HVR(例如,CDR)对应于非人抗体的那些,并且所有或基本上所有FR对应于人抗体的那些。人源化抗体任选地可以包含源自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如,非人抗体)的“人源化形式”表示已经经历人源化的抗体。

[0092] 本文中使用的术语“高变区”或“HVR”表示抗体可变结构域的在序列上高变(“互补性决定区”或“CDR”)和/或形成在结构上确定的环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的每个区域。通常,抗体包含六个HVR;三个在VH中(H1、H2、H3),并且三个在VL(L1、L2、L3)中。

[0093] 本文的HVR包括:

[0094] (a) 在氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)处存在的高变环(Chothia,C.和Lesk,A.M.,J.Mol.Biol.196(1987)901-917);

[0095] (b) 在氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)和

95-102 (H3) 处存在的CDR (Kabat,E.A.等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest (免疫学感兴趣的蛋白的序列),第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD (1991),NIH出版物91-3242.);

[0096] (c) 在氨基酸残基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2) 和 93-101 (H3) 处存在的抗原接触点 (MacCallum等人J.Mol.Biol.262:732-745 (1996)); 和

[0097] (d) (a)、(b) 和/或 (c) 的组合,其包括HVR氨基酸残基46-56 (L2),47-56 (L2),48-56 (L2),49-56 (L2),26-35 (H1),26-35b (H1),49-65 (H2),93-102 (H3),和94-102 (H3)。

[0098] 除非另有说明,可变结构域中的HVR残基和其他残基 (例如,FR残基) 在本文中根据 Kabat等人 (出处同上) 编号。

[0099] “免疫缀合物”是与一个或多个异源分子缀合的抗体。

[0100] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括,但不限于,驯养动物 (例如牛、绵羊、猫、狗和马),灵长类动物 (例如,人和非人灵长类动物诸如猴),兔,和啮齿类动物 (例如,小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,所述个体或受试者是人。

[0101] “分离的”抗体是已经与它的天然环境的组分分离的抗体。在一些实施方案中,将抗体纯化至大于95%或99%纯度,所述纯度通过例如电泳 (例如,SDS-PAGE、等电聚焦 (IEF)、毛细管电泳) 或色谱 (例如,离子交换或反相HPLC) 来确定。关于评价抗体纯度的方法的综述,参见,例如,Flatman,S.等人,J.Chromatogr.B 848 (2007) 79-87。

[0102] “分离的”核酸表示已经与它的天然环境的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括通常含有核酸分子的细胞中包含的核酸分子,但是所述核酸分子存在于染色体外或在不同于其天然染色体位置的染色体位置。

[0103] “分离的编码抗-IL-1 β 抗体的核酸”表示编码抗体重链和轻链 (或其片段) 的一个或多个核酸分子,包括在单个载体或分开的载体中的这样的核酸分子、以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置的这样的核酸分子。

[0104] 本文中使用的术语“单克隆抗体”表示得自基本上同源的抗体的群体的抗体,即,构成所述群体的各个抗体是相同的和/或结合相同表位,除了可能的变体抗体 (例如,含有天然存在的突变或在单克隆抗体制品的生产过程中产生) 以外,这样的变体通常以微量存在。与通常包括针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体的多克隆抗体制品不同,单克隆抗体制品的每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。因而,修饰语“单克隆”指示所述抗体得自基本上同源的抗体群体的特征,并且不应解释为需要通过任何特定方法生产所述抗体。例如,要根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术来制备,所述技术包括,但不限于,杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法、和使用包含人免疫球蛋白基因座的全部或部分的转基因动物的方法,本文描述了这样的方法和其他示例性的制备单克隆抗体的方法。

[0105] “裸抗体”表示没有与异源结构部分 (例如,细胞毒性的结构部分) 或放射性标记缀合的抗体。裸抗体可以存在于药物制剂中。

[0106] “天然抗体”表示具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由二硫键合的两条相同的轻链和两条相同的重链组成。从N-端至C-端,每个重链具有可变区 (VH),也称为可变重链结构域或重链可变结构域,接着是三个恒定结构域 (CH1、CH2和CH3)。类似地,从N-端至C-端,每个轻链具有可变区 (VL),也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域,接着是恒定轻链 (CL) 结构域。抗体的轻链

可以基于其恒定结构域的氨基酸序列归入两种类型 (称为kappa (κ) 和lambda (λ)) 中的一种。

[0107] 术语“包装说明书”用于表示治疗性产品的商业包装中通常包括的使用说明,其含有关于这样的治疗性产品的使用的适应证、用法、剂量、施用、联合治疗、禁忌和/或告诫的信息。

[0108] 相对于参比多肽序列而言的“氨基酸序列同一性百分比(%)”被定义为,比对所述序列,如果必要的话引入间隙以实现最大序列同一性百分比,且不考虑任何保守置换作为序列同一性的一部分,候选序列中与参比多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可以以本领域技术中的多种方式实现,例如,使用公众可得到的计算机软件诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于比对的适当参数,包括实现在要对比的序列的全长上的最大比对所需的任何算法。但是,为了本文的目的,使用序列对比计算机程序ALIGN-2产生%氨基酸序列同一性值。ALIGN-2序列对比计算机程序由Genentech, Inc. 创造,并且源代码已经在美国版权局 (U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559) 与用户文档一起提交,其在美国版权登记号TXU510087下登记。ALIGN-2程序可以从Genentech, Inc., South San Francisco, California公开获得,或可以从源代码编译。应该编译ALIGN-2程序以在UNIX操作系统 (包括数字UNIX V4.0D) 上使用。所有序列对比参数由ALIGN-2程序设定并且不改变。

[0109] 在采用ALIGN-2进行氨基酸序列对比的情况下,按下述计算给定氨基酸序列A相对、与、或针对给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性 (其可以可替换地叙述为相对、与、或针对给定氨基酸序列B具有或包含特定%氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列A) :

[0110] $100 \times \text{分数} X/Y$

[0111] 其中X是通过序列比对程序ALIGN-2 (在该程序的A和B的比对中) 评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,并且其中Y是B中的氨基酸残基的总数。应当理解,在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度的情况下,A相对B的%氨基酸序列同一性将不等于B相对A的%氨基酸序列同一性。除非另外特别说明,本文使用的所有%氨基酸序列同一性值如在紧邻的上一段中所述使用ALIGN-2计算机程序获得。

[0112] 术语“药物制剂”表示这样的制品:其呈使得包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式,并且所述制剂不含有对所述制剂要施用的受试者有不可接受的毒性的额外组分。

[0113] “药学上可接受的载体”表示药物制剂中除了活性成分之外的成分,其对受试者无毒。药学上可接受的载体包括,但不限于,缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0114] 用在本文中的术语“IL-1 β ”是指人IL-1 β 。该术语包括“全长”、未加工的IL-1 β 以及由于在细胞内加工导致的任何形式的IL-1 β 。该术语还包括天然存在的IL-1 β 变体,例如,剪接变体或等位基因变体。人IL-1 β 的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:92中。

[0115] 本文中使用的“治疗 (treatment)” (和其语法变体诸如“治疗 (treat)”或“治疗 (treating)”) 表示试图改变治疗的个体的天然进程的临床干预,并且可以为了预防或在临床病理学进程中执行。期望的治疗效果包括,但不限于:防止疾病的发生或复发,缓解症状,减少疾病的任何直接或间接病理学后果,防止转移,降低疾病进展的速度,改善或减轻疾病

状态,以及减轻或改善的预后。在一些实施方案中,本发明的抗体用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0116] 术语“可变区”或“可变结构域”指抗体重链或轻链的参与所述抗体与抗原的结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL)通常具有类似的结构,其中每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个高变区(HVR)。(参见,例如,Kindt,T.J.等人Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman&Co.,N.Y.(2007),第91页)。单个VH或VL结构域可能足以赋予抗原-结合特异性。此外,使用来自结合抗原的抗体的VH或VL结构域分别筛选互补VL或VH结构域的文库,可以分离结合特定抗原的抗体(参见,例如,Portolano,S.等人,J.Immunol.150(1993)880-887;Clackson,T.等人,Nature 352(1991)624-628)。

[0117] 本文中使用的术语“载体”表示能够扩增与其连接的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制的核酸结构的载体以及整合进它已经引入其中的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作地连接的核酸的表达。这样的载体在本文称为“表达载体”。

[0118] II.组合物和方法

[0119] 本文报道特异性结合选自由(人)ANG2、(人)VEGF、(人)IL-1 β 和(人PDGF-B)组成的组的不同抗原的新型双特异性抗体,其中所述抗体不是抗-ANG2/VEGF双特异性抗体。例如,本发明的抗体可用于治疗眼血管疾病,诸如黄斑变性。

[0120] A.示例性的抗体

[0121] A.1本文报道的双特异性抗体的抗-IL-1 β 结合位点可能来源的抗-IL1 β 抗体

[0122] 本文提供四种新型的抗-人IL-1 β 抗体。

[0123] 第一种抗-IL-1 β 抗体是新型的鼠抗-人IL-1 β 抗体,其具有SEQ ID NO:20的VH和SEQ ID NO:25的VL。该抗体在下文中称为IL-1 β -mumAb。该抗体结合人、食蟹猴、兔、大鼠和小鼠IL-1 β ,并且抑制IL-1 β 与人IL-1受体I和II之间的相互作用。

[0124] 该抗体具有下述特性:

[0125]	结合人 IL-1 β	ka [1/Ms * 10 ⁶]	kd [1/s * 10 ⁻⁴]	KD [nM]
	IL-1 β -mumAb	1.12	0.75	0.07

[0126]	结合食蟹猴 IL-1 β	ka [1/Ms * 10 ⁶]	kd [1/s * 10 ⁻⁴]	KD [nM]
	IL-1 β -mumAb	1.15	0.95	0.08

[0127]	结合小鼠 IL-1 β	ka [1/Ms * 10 ⁶]	kd [1/s * 10 ⁻⁴]	KD [nM]
	IL-1 β -mumAb	2.47	12.2	0.49
	Gevokizumab	2.48	5.35	0.22

[0128]

结合大鼠 IL-1 β	ka [1/Ms * 10 ⁶]	kd [1/s * 10 ⁻⁴]	KD [nM]
IL-1 β -mumAb	2.04	6.36	0.31
Gevokizumab	2.79	0.20	0.007

[0129]

结合兔 IL-1 β	KD [nM]
mumAb (SEQ ID NO: 9 和 10)	1.4
Gevokizumab	n.a.

[0130] 上述数据是通过BIAcore确定的。

[0131]

IL-1 β 的来源	EC ₅₀ [ng/mL]	EC ₅₀ (基于 MWC 150kDa) [10 ⁻¹⁰ M]	实例
人 1	34.02	2.27	4 变体 1
人 2	15.16	1.01	4 变体 2
鼠	23.07	1.54	6
食蟹猴	21.27	1.42	5

[0132] 上述数据是通过ELISA确定的。

[0133] 对IL-1 β 与IL-1受体I和II结合的抑制:

[0134]

	IC ₅₀ [ng/mL]	IC ₅₀ (基于 MWC 150kDa) [10 ⁻⁹ M]	实例
IL-1 β 受体 I	230.9	1.54	7
IL-1 β 受体 II	132.4	0.88	8

[0135] 上述数据是通过ELISA确定的。

[0136] 在刺激实验中,其可以表明,当用IL-1 β 刺激A549细胞时,本文报道的鼠抗体能够抑制ICAM-1表达(见下表)。

[0137]

抗体	IC ₅₀ [nM]
IL-1 β -mumAb	0.7

[0138] 在下表中,显示了当用IL-1 β 刺激HUVEC细胞时抑制ICAM-1表达的IC₅₀值。

[0139]

抗体	IC ₅₀ [nM]
IL-1 β -mumAb	16.50

[0140] 在刺激实验中,其可能表明,当用IL-1 β 刺激A549细胞时,本文报道的人源化抗体减少IL-6表达(见下表)。

[0141]

抗体	EC ₅₀ [nM]
IL-1 β -mumAb	1.09

[0142] 另外,鼠抗体在应激试验中表现出稳定性。结合活性使用表面等离子体共振确定(见下表)。

[0143]

抗体	相对结合活性	
	在 37 °C pH 7.5 下 2 周	在 40 °C pH 6.0 下 2 周
IL-1 β -mumAb	103 %	102 %

[0144] 100% = 保存在-80℃的样品

[0145] 当确定高分子量内容物时,可以观察到相同的稳定性(见下表)。

[0146]

抗体	高分子量级分		
	开始时	在 37 °C pH 7.4 下 2 周	在 40 °C pH 6.0 下 2 周
IL-1 β -mumAb	0.97 %	1.24 %	1.00 %

[0147] 在CE-SDS分析中可以观察到相同的稳定性(见下表)。

[0148]

抗体	相对面积%		
	开始时	在 37 °C pH 7.4 下 2 周	在 40 °C pH 6.0 下 2 周
IL-1 β -mumAb	91.9 %	86.5 %	90.0 %

[0149] 通过确定聚集开始温度 (Tagg) 和解链温度 (Tm) 评价鼠抗体的热稳定性 (见下表)。

[0150]

抗体	Tagg[°C]	Tm[°C]
IL-1 β -mumAb	约60	约64

[0151] 其余三种抗体是鼠抗-IL1- β 抗体H34的人源化变体: huH34-1 (SEQ ID NO:01-05, 和16), huH34-2 (SEQ ID NO:06-10, 和16) 以及 huH34-3 (SEQ ID NO:11-16)。

[0152] 本文报道了人源化抗-IL-1 β 抗体。该抗体衍生自鼠抗-IL-1 β 抗体H34。

[0153] 基于鼠H34抗体的氨基酸序列, 产生相对应的人源化抗-IL-1 β 抗体 (huH34-2)。人源化变体VH是基于人VBase_VH1_1和人IGHJ4-01-3种系的J-元件 (huH34-1)。为了恢复亲和力, 在框架区2的位置48引入一个回复突变 (M48I)。在框架区3中, 4个位置被回复突变: V67A, M69F, R71V和A93V。另外, HVR-H2的位置52a的半胱氨酸被替换为丝氨酸。对于VL, 人源化变体是基于具有IGKJ2-01J-元件的人IMGT_hVK_3_11种系。在框架区2的位置36引入一个回复突变 (Y36S)。人源化VH的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:04中, 人源化VL的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:06中。

[0154] 鼠抗-IL-1 β 抗体H34在HVR-H2中包含半胱氨酸 (C52a, Kabat编号), 为了开发能够大规模生产的治疗剂候选物, 该半胱氨酸需要被去除。通过在鼠抗体中的C52aS突变去除该Cys导致针对IL-1 β 的亲和力降低约6-7倍 (见下表)。

[0155]	结合人 IL-1 β 抗体	ka [1/Ms * 10 ⁶]	kd [1/s * 10 ⁻⁴]	KD [nM]
	H34	1.85	1.27	0.07
	H34 + C52aS 突变	1.60	6.45	0.40
[0156]	结合食蟹猴 IL-1 β 抗体	ka [1/Ms * 10 ⁶]	kd [1/s * 10 ⁻⁴]	KD [nM]
	H34	1.99	0.98	0.05
	H34 + C52aS 突变	1.43	7.28	0.51

[0157] 上述数据通过BIAcore确定。

[0158] 对于H34 (huH34-2) 的人源化版本, 在C52aS突变时亲和力丧失得到补偿, 并且该抗体具有与鼠亲本抗体H34相当的亲和力 (以及在细胞测定中相当的功能性功效)。

[0159] 该补偿作用可归因于选择用于人源化的种系序列和在框架IGHJ4-01-3与IMGT_

hVK_3_11内的回复突变的选择。基于相同的人种系分别为VH (IGHJ4-01-3) 和VL (IMGT_hVK_3_11) 设计另外的变体。从VH和VL序列 (SEQ ID NO:7和8) 中省略关于huH34-2所述的回复突变。

[0160]	结合人 IL-1 β 抗体	ka [1/Ms * 10 ⁶]	kd [1/s * 10 ⁻⁴]	KD [nM]
	H34	1.85	1.27	0.07
	H34 + C52aS 突变	1.60	6.45	0.40
	huH34-1	1.49	15.1	1.02
	huH34-2	1.93	1.10	0.06
	huH34-2 FAB	1.81	1.11	0.06
	huH34-3	1.97	3.02	0.15
	Gevokizumab	3.01	0.52	0.02
	Canakinumab	2.78	0.52	0.02
	结合食蟹猴 IL-1 β 抗体	ka [1/Ms * 10 ⁶]	kd [1/s * 10 ⁻⁴]	KD [nM]
	H34	1.99	0.98	0.05
	H34 + C52aS 突变	1.43	7.28	0.51
	huH34-1	1.61	21.2	1.31
	huH34-2	2.20	1.18	0.05
	huH34-3	2.21	4.91	0.22
	Gevokizumab	3.21	0.67	0.02
Canakinumab	2.15	284	13.2	

[0161] 上述数据通过BIAcore确定。

[0162] 在一个实施方案中,所述人源化抗-IL-1 β 抗体结合人和食蟹猴IL-1 β 。

[0163] 在人IL-1 β 的存在下,在表面等离子体共振实验中的结合信号从Gevokizumab起增加。因此,抗体结合的IL-1 β 仍然结合IL-1受体I。因此,Gevokizumab的作用模式是对IL-1RAc结合的别构抑制(别构抗体)。

[0164] 对于Canakinumab,在抗体结合后,防止了H34和mumAb IL-1 β 与IL-1受体I的结合。因此,对于Canakinumab、H34和mumAb,作用模式是受体阻断(竞争性抗体)。

[0165]	抗体	存在@ 10 nM IL-1 β 时的 IC ₅₀ [nM]
	Canakinumab	1.6
	mumAb	2.5
	H34	3.5

[0166] 在刺激实验中,可能表明本文报道的人源化抗体具有与鼠亲本抗体相同的活性。在下表中,显示了不同抗体在用IL-1 β 刺激A549细胞时抑制ICAM-1表达的IC₅₀值。

[0167]	抗体	IC ₅₀ [nM]
	H34	0.18
	huH34-1	> 7
	huH34-2	0.23
	huH34-3	2.23
	Gevokizumab	0.94
	Canakinumab	0.31

[0168] 在下表中,显示了在用IL-1 β 刺激HUVEC细胞时抑制ICAM-1表达的IC₅₀值。

[0169]	抗体	IC ₅₀ [nM]
	H34	0.24
	huH34-2	0.30
	Canakinumab	9.02

[0170] 在刺激实验中,可能表明本文报道的人源化抗体在用IL-1 β 刺激A549细胞时减少IL-6表达(见下表)。

[0171]

抗体	EC ₅₀ [nM]
huH34-1	5.52
huH34-2	0.11
huH34-3	1.09
Gevokizumab	0.11
Canakinumab	0.12

[0172] 在增殖抑制实验中,可能表明本文报道的人源化抗体抑制D10细胞的增殖(见下表)。

[0173]

抗体	IC ₅₀ [nM]
huH34-2	0.83
Gevokizumab	3.36
Canakinumab	1.99

[0174] 在下表中,显示了对于不同抗体在用MSU刺激THP1细胞时对TNF α 表达抑制的IC₅₀值。

[0175]

抗体	IC ₅₀ [nM]
H34	0.43
huH34-2	2.38
Canakinumab	0.41

[0176] 另外,与鼠H34亲本抗体相比,在应激试验中,人源化抗体表现出改善的稳定性。结合活性使用表面等离子体共振确定(见下表)。

	抗体	相对结合活性	
		在 37 °C pH 7.4 下 2 周	在 40 °C pH 6.0 下 2 周
[0177]	H34	70 %	101 %
	huH34-1	96 %	99 %
	huH34-2	94 %	99 %
	huH34-3	96 %	100 %

[0178] 100% = 保存在-80℃的样品

[0179] 当确定高分子量内容物时,可以观察到相同的稳定性(见下表)。

	抗体	高分子量级分		
		开始时	在 37 °C pH 7.4 下 2 周	在 40 °C pH 6.0 下 2 周
[0180]	huH34-1	4.57 %	4.13 %	4.39 %
	huH34-2	0.21 %	0.15 %	0.13 %
	huH34-3	0.19 %	0.17 %	0.13 %

[0181] 在CE-SDS分析中可以观察到相同的稳定性(见下表)。

	抗体	相对面积%		
		开始时	在 37 °C pH 7.4 下 2 周	在 40 °C pH 6.0 下 2 周
[0182]	huH34-1	96.1 %	92.9 %	93.8 %
	huH34-2	96.4 %	92.5 %	95.2 %
	huH34-3	96.0 %	92.1 %	95.1 %

[0183] 通过确定聚集开始温度(T_{agg})和解链温度(T_m)评价不同人源化抗体的热稳定性(见下表)。

[0184]

抗体	T _{agg} [°C]	T _m [°C]
huH34-1	61.5	69.1
huH34-2	63.0	72.0
huH34-3	63.0	70.6

[0185] 与人IL-1β结合的huH34-2 Fab-片段的高分辨率晶体结构显示出关于该抗体的功能性表位的详细信息。将该结构与三元IL-1b信号传导复合物(与IL-1受体1(即IL-1R1)和IL-1辅助蛋白IL-1RAcP结合的人IL-1b,PDB编号为4DEP)的结构相比。发现huH34的表位与

IL-1R1和IL-1RAcP二者的相互作用位点重合。因此,所述抗体在其组装的第一步阻断IL-1 β 信号传导复合物的形成,该第一步是IL-1 β 和IL-1R1的缔合。

[0186] 抗体0031是一种双特异性抗-ANG2/IL-1 β 抗体,其包含huH34-2的VH和VL结构域作为IL-1 β 结合特异性。

[0187] 抗体0032是一种双特异性抗-VEGF/IL-1 β 抗体,其包含huH34-2的VH和VL结构域作为IL-1 β 结合特异性。

[0188] 为了确定动力学结合值,使用实施例52中报道的测定。

[0189]

ANG2	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD* [nM]	t1/2 [s]
抗体-0031	1.45E+05	1.15E-03	8	604

[0190]

VEGF	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD* [nM]	t1/2 [s]
抗体-0032	2.77E+04	<1E-06	<0.1	—

[0191]	IL-1 β	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD* [nM]	t1/2 [s]
	huH34-2 二价	2.43E+06	1.15E-04	0.05	101
	抗体-0031	2.56E+06	3.02E-04	0.12	38
	抗体-0032	2.49E+06	3.05E-04	0.12	38

[0192] 通过SPR分析已经证明所有的双特异性抗体具有同时与其两个抗原结合的特性。

[0193] 在ANG2特异性pTie2-ELISA中,抗体0031的活性是WO 2014/09465中报道的抗-ANG2/VEGF抗体的6倍。

[0194] 在一个实施方案中,所述人源化抗-IL-1 β 抗体结合人和食蟹猴IL-1 β 。

[0195] 在下表中,显示当用IL-1 β 刺激A549细胞时对ICAM-1表达抑制的IC₅₀值。

[0196]	抗体	IC ₅₀ [ng/mL]
	抗体 0031	103.9
	Gevokizumab	204.4

[0197] 在下表中,显示当用IL-1 β 刺激HUVEC细胞时对ICAM-1表达抑制的IC₅₀值。

[0198]	抗体	IC ₅₀ [ng/mL]
	huH34-2	1.2-0.9
	huH34-2 Fab	1.1-2.5
	抗体 0031	2.0-5.5
	抗体 0032	3.5-6.3

[0199] 在刺激实验中,可能表明本文报道的人源化抗体在用IL-1 β 刺激A549细胞时减少IL-6表达(见下表)。

[0200]	抗体	EC ₅₀ [ng/mL]
	抗体 0031	17.0
	抗体 0032	38.7
	Gevokizumab	62.0
	Canakinumab	86.4

[0201] 通过确定聚集开始温度(T_{agg})和解链温度(T_m)评价不同双特异性抗体的热稳定性(见下表)。

[0202]

抗体	T _{agg} [°C]	T _m [°C]
0031	61	67.5
0032	55	62.5

[0203] 记载抗体huH34-2具有SEQ ID NO:06-10和16的序列(结合位点,HVR,VH,VL)。在序列SEQ ID NO:102-103和182-189中记载了抗体huH34-2的双特异性形式。所有这些序列单独地或组合地组成本发明的各个方面。

[0204] 在一个优选的实施方案中,所述抗-IL-1 β 抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:07的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:08的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3。在一个实施方案中,所述抗体进一步包含:(d)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L3。

[0205] 在一个优选的实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:06和SEQ ID NO:16中的VH和VL序列,包括这些序列的翻译后修饰。

[0206] 在一个优选的实施方案中,所述抗-人IL-1 β 抗体特异性结合人和食蟹猴IL-1 β ,并且包含:(a)包含SEQ ID NO:07的氨基酸序列的HVR-H1,(b)包含SEQ ID NO:08的氨基酸序列的HVR-H2,(c)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3,(d)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-L1,(e)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L2,和(f)包含SEQ ID NO:19

的氨基酸序列的HVR-L3。在一个优选的实施方案中,所述抗-人IL-1 β 抗体具有含有SEQ ID NO:06的氨基酸序列的重链可变结构域和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变结构域。

[0207] A.2本文报道的双特异性抗体的抗-PDGF-B结合位点可能来源的抗-PDGF-B抗体

[0208] 本文提供了不同的新型抗-人PDGF-B抗体。

[0209] 第一抗-PDGF-B抗体是新型的鼠抗-人PDGF-B抗体,其具有SEQ ID NO:29的VH和SEQ ID NO:34的VL。该抗体在下文中称为PDGF-B-mumAb。该抗体结合人、食蟹猴、兔、大鼠和小鼠PDGF-B,并且抑制PDGF-B与其受体之间的相互作用。

[0210] 该抗体具有在下表中列出的下述特性:

[0211]

	huPDGF-BB (EC50)	muPDGF-BB (EC50)	ratPDGF-BB (EC50)	huPDGF-AA (EC50)
	[ng/mL]	[ng/mL]	[ng/mL]	[ng/mL]
PDGF-B-mumAb	16.3	8.8	5.124	2.04

[0212]

	PPII huPDGF-BB::huPDGF-R β IC50 [ng/ml]
PDGF-B-mumAb	12.16

[0213]

	收率	规模	收率	单体 (分析级 SEC)	主峰 (CE-SDS/SDS PAGE)
	[mg]	[l]	[mg/L 上 清]	[%]	[%]
PDGF-B-mumAb	6.4	0.2	32	99	98

[0214]

	IC ₅₀ 磷酸-抑制作用		IC ₅₀ 增殖 3T3	
PDGF-B-mumAb	1.7	ng/ml	55.1	ng/ml

[0215]

	周细胞		Balb-C3T3	
	迁移 EC ₅₀ [nM]	增殖 EC ₅₀ [nM]	增殖 EC ₅₀ [nM]	
人 PDGF-BB	0.02/0.03/0.03	0.03/0.02/0.019	0.028/0.026/0.031	
	IC50 [nM] %中和	IC50 [nM] %中和	IC50 [nM] %中和	
R&D 多克隆参比	1.13/0.78/0.4 100	0.49/0.36/0.41 100	0.79/0.69/0.65 100	

[0216]

抗体						
PDGF-B-mumAb	0.08	100	0.21	100	0.179	100

[0217]

	周细胞		Balb-C3T3
	Fab 迁移 [nM]	Fab 增殖 [nM]	Fab 增殖 [nM]
PDGF-B-mumAb	0.24	2.17	2.3

[0218]

	kd [1/s]	t1/2 [min]
PDGF-B-mumAb	4.50E-04	26

[0219]

Fab	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD [nM]	t1/2 [s]
PDGF-B-mumAb Fab	4.39E+05	2.01E-03	5	345

[0220]

	表观 KD [nM]	T1/2 [s]		表观 KD** [nM]	T1/2 (s)
PDGF-B-mumAb FAB	5	345	mumAb	0.042	2867

[0221] 下表显示了所述抗体的存储稳定性(具有参比表面的活性浓度)。

[0222]

	2w/40°C pH 6.0 具有参比[%]	2w/37°C pH 7.4 具有参比[%]
PDGF-B-mumAb	103	103

[0223] 通过确定聚集起始温度 (Tagg) 和解链温度 (Tm) 评价所述抗体的热稳定性(见下表)。

[0224]

抗体	Tagg [°C]	Tm [°C]
PDGF-B-mumAb	57	62-63.5

[0225] 其余的抗体是从人Ig基因座转基因兔获得的人抗体。所述抗体具有下表中列出的结合特性。

[0226] 抗体0085是包含SEQ ID NO:38的VH和SEQ ID NO:43的VL的抗-PDGF-B抗体。抗体0086是包含SEQ ID NO:47的VH和SEQ ID NO:52的VL的抗-PDGF-B抗体。

[0227]

	huPDGF-BB [EC50] [ng/mL]	muPDGF-BB [EC50] [ng/mL]	ratPDGF-BB [EC50] [ng/mL]	cynPDGF-BB [EC50] [ng/mL]	huPDGF-AA [EC50] [ng/mL]	huPDGF-CC [EC50] [ng/mL]
抗体0085	7.55	24.96	15.96	15.33	n.d.	n.d.
抗体0086	12.04	14.08	10.57	16.19	n.d.	n.d.

[0228]

	通过 SPR 确定的 huPDGF-BB -抗体亲抗 原性 [M]	通过 SPR 确定的 huPDGF-BB - kon [M-1s-1]	通过 SPR 确定的 huPDGF-BB - koff [s-1]	通过 SPR 确 定的 cynPDGF-BB -抗体亲抗原 性 [M]	通过 SPR 确 定的 cynPDGF-BB - kon [M-1s-1]	通过 SPR 确 定的 cynPDGF-BB - koff [s-1]
抗体0085	4.76E-11	0.93E6	0.44E-4	4.78E-11	0.94E6	4.52E-5
抗体0086	2.18E-11	1.04E6	0.23E-4	1.78E-11	1.04E6	1.84E-5

[0229]

	PPII huPDGF-BB::huPDGF-R β IC50 [ng/ml]
抗体 0085	17.76
抗体 0086	11.73

[0230] 在一个实施方案中,所述人源化抗-PDGF-B抗体结合人、大鼠、小鼠和食蟹猴PDGF-B。

[0231]

	收率	规模	收率	单体 (分析级 SEC)	主峰 (CE-SDS/SDS PAGE) [%]
	[mg]	[l]	[mg/l 上清]	[%]	
抗体 0085	22.5	0.25	90	99	96
抗体 0086	20.8	0.25	83	99	96
抗体 0106	12.0	0.3	40	98	99
抗体 0107	10.5	0.3	35	98	99
抗体 0144	37.7	1.5	25.1	>98	>95
抗体 0117	46.3	1	46.3	>98	>95
抗体 0145	21.5	1	21.5	>98	>95
抗体 0146	14.6	0.5	29.2	>98	>95

[0232]

	IC ₅₀ 磷酸-抑制作用		IC ₅₀ 增殖 3T3	
抗体 0085	n.d.	n.d.	31.8	ng/ml
抗体 0086	n.d.	n.d.	56.0	ng/ml

[0233] 在多样性活性测定中,所述抗体表现出可以从下表中所列的数据所看出的生物学活性。

[0234]

	周细胞		Balb-C3T3
	迁移	增殖	增殖
	EC50[nM]	EC50[nM]	EC50[nM]
huPDGF-BB	0.03/0.04	0.02/0.03	0.025/0.023
	IC50(nM) % 中和	IC50(nM) % 中和	IC50(nM) %中和
R&D 多克隆 抗体	0.56/0.32 100	0.36/0.41 100	0.69/0.65 100
抗体 0085	0.15 90	0.11 100	0.06 100
抗体 0086	0.09 100	0.09 100	0.11 100

[0235]		Fab 迁移抑制 [nM]	Fab 增殖抑制 [nM]	Fab 增殖抑制 [nM]
	抗体 0085	0.41	1.02	1.36
	抗体 0086	0.14	0.62	1.18

[0236] 使用表面等离子共振技术确定不同抗体的动力学结合特性(见下表)。

[0237]

	kd (1/s)	t1/2 [min]
抗体-0085	1.02E-04	114
抗体-0086	7.93E-05	146

[0238]	Fab	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD* (nM)	t1/2 (s)
	抗体-0106	2.02E+05	3.74E-04	2	1853
	抗体-0107	1.95E+05	3.62E-04	2	1915

[0239]	Fab	App. KD* (nM)	T1/2 (s)	IgG	App. KD** (nM)	T1/2 (s)
	抗体-0106	2	1853	抗体-0085	0.023	8739
	抗体-0107	2	1915	抗体-0086	0.030	2461

[0240] 下表显示抗体0086的存储稳定性(具有参比表面的活性浓度)。

[0241]		2w/40°C pH 6.0 具 有参比(%)	2w/37°C pH 7.4 具 有参比(%)
	抗体-0086	99	98

[0242] 通过确定聚集起始温度(Tagg)和解链温度(Tm)评价所述抗体的热稳定性(见下表)。

[0243]

	Tagg [°C]	Tm [°C]
抗体-0086	64	64.5-68

[0244] 抗体0144是一种双特异性抗-ANG2/PDGF-B抗体,其包含抗体0085的VH和VL结构域作为PDGF-B结合特异性。

[0245] 抗体0117是一种双特异性抗-VEGF/PDGF-B抗体,其包含抗体0085的VH和VL结构域作为PDGF-B结合特异性。

[0246] 为了确定动力学结合值,使用实施例52中报道的测定。

[0247]	ANG2	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD* [nM]	t1/2 [s]
	抗体 0144	9.06E+04	1.55E-03	17	446

[0248]	VEGF	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD* [nM]	t1/2 [s]
	抗体 0117	2.46E+04	<1E-06	<0.1	-

[0249]	PDGF-BB	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD* [nM]	t1/2 [s]
	抗体 0106	2.94E+05	2.91E-04	1	40
	抗体 0117	7.67E+04	2.45E-04	3	47
	抗体 0144	8.31E+04	2.15E-04	3	53

[0250] 通过SPR分析已经证明所有的双特异性抗体具有同时与其两个抗原结合的特性。

[0251] 所述双特异性抗体在基于细胞的测定中表现出结合和生物学活性。

[0252]		IC₅₀ 增殖人周细胞		IC₅₀ 增殖 3T3	
	抗体 0117	0.016	nM	0.019	nM
	抗体 0144	0.030	nM	0.020	nM
	抗体 0085 FAB	0.012	nM	未检测	

[0253]		IC₅₀ 磷酸-抑制作用 人周细胞		IC₅₀ 迁移-抑制作用 人周细胞	
	抗体 0117	0.055	nM	0.06	nM
	抗体 0144	0.055	nM	0.06	nM
	抗体 0085 FAB	未检测		0.27	nM

[0254] 在ANG2特异性pTie2-ELISA中,抗体0144的活性是WO 2014/09465中报道的抗-ANG2/VEGF抗体的6倍。

[0255] 在VEGF特异性报道子测定中,抗体0117具有与WO 2014/09465中报道的抗-ANG2/VEGF抗体相似的活性。

[0256] 记载抗体0085具有SEQ ID NO:38-46的序列(结合位点,HVR,VH,VL)。抗体0085的双特异性形式记载在序列SEQ ID NO:129-130,150-153,162-165和174-177中。所有这些序列单独地或组合地组成本发明的各个方面。

[0257] 记载抗体0086具有SEQ ID NO:47-55的序列(结合位点,HVR,VH,VL)。抗体0086的双特异性形式记载在序列SEQ ID NO:131,154-157,166-169和178-181中。所有这些序列单独地或组合地组成本发明的各个方面。

[0258] 记载抗体0144具有SEQ ID NO:162-165的序列(CrossMab形式,2条重链,2条轻链)。

[0259] 将抗体0144和0145在不同pH值温育2周,然后分别确定它们与PDGF-BB和ANG2的结合。

[0260]	抗体 0144	与下述结合	相对结合[%]	SD
	开始时的参比值	PDGF-BB	100	
	在 pH 6 温育		101	4
	在 pH 7.4 温育		94	6
	开始时的参比值	ANG2	100	
	在 pH 6 温育		100	1
	在 pH 7.4 温育		91	4
[0261]	抗体 0145	与下述结合	相对结合[%]	SD
	开始时的参比值	PDGF-BB	100	
	在 pH 6 温育		99	1
	在 pH 7.4 温育		95	2
	开始时的参比值	ANG2	100	
	在 pH 6 温育		99	2
	在 pH 7.4 温育		94	0

[0262] 在一个优选的实施方案中,所述抗-PDGF-B抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HVR-H3。在一个实施方案中,所述抗体进一步包含:(d)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L3。

[0263] 在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:34中的VH和VL序列的人源化变体,包括这些序列的翻译后修饰。

[0264] 在一个优选的实施方案中,所述抗-PDGF-B抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HVR-H3。在一个实施方案中,所述抗体进一步包含:(d)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的HVR-L3。

[0265] 在一个优选的实施方案中,本文报道的抗-PDGF-B抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-L3。在另一个优选的实施方案中,本文报道的抗-PDGF-B抗体包含具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VL。在另一个优选的实施方案中,所述抗-PDGF-B抗体是一种双特异性抗体。

[0266] 在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:43中的VH和VL序列,包括这些序列的翻译后修饰。

[0267] 在一个优选的实施方案中,所述抗-PDGF-B抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:

51的氨基酸序列的HVR-H3。在一个实施方案中,所述抗体进一步包含:(d)包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的HVR-L3。

[0268] 在一个优选的实施方案中,所述抗-PDGF-B抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的HVR-L3。在另一个优选的实施方案中,本文报道的抗-PDGF-B抗体包含具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VL。在另一个优选的实施方案中,所述抗-PDGF-B抗体是一种双特异性抗体。

[0269] 在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:52中的VH和VL序列,包括这些序列的翻译后修饰。

[0270] A.3本文报道的双特异性抗体的抗-ANG2结合位点可能来源的抗-ANG2抗体

[0271] 人ANG2结合动力学:

分子	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)*	$t_{1/2}$ (s)
0009	1.92E+06	0.07565	39	9
0041	3.85E+06	3.17E-03	1	219
[0272] 0075	2.22E+06	3.10E-02	14	22
0090	2.16E+06	2.53E-03	1	274
0098	1.56E+07	1.58E-04	10*	
0099	2.61E+07	1.10E-04	4*	
[0273] 0100	2.06E+07	1.67E-04	8*	
0101	1.83E+07	1.20E-04	7*	

[0274] *抗体亲抗原性。

[0275] 食蟹猴ANG2结合动力学:

[0276]

分子	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM) *	$t_{1/2}$ (s)
0009	1.45E+06	8.81E-02	61	8
0041	2.14E+06	3.60E-03	2	193
0075	1.34E+06	3.25E-02	24	21
0090	2.02E+06	3.08E-03	2	225

[0277] 本文报道的抗体的相对生物学活性在下表中给出。

[0278]

分子	相对生物学活性 (nM)
0009	72
0041	838
0075	128
0090	706

0098	100
------	-----

[0279] 通过确定聚集开始温度 (Tagg) 和解链温度 (Tm) 评价不同抗体的热稳定性 (见下表)。

[0280]

分子	Tagg[°C]	Tm[°C]
0009	62.2	65.9
0041	63.1	66.0
0075	63.6	67.0
0090	64.0	67.4

[0281] 另外,所述抗体在应激试验中表现出良好的稳定性。结合活性使用表面等离子体共振确定 (见下表)。

分子	相对结合活性	
	在 37 °C pH 7.4 下 2 周	在 40 °C pH 6.0 下 2 周
0009	99 %	91 %
0041	100 %	101 %
0075	101 %	105 %
0090	112 %	100 %

[0283] 100% = 保存在-80°C的样品

[0284] 在CE-SDS分析中可以观察到相同的稳定性 (见下表)。

分子	相对面积%		
	开始时	在 37 °C pH 7.4 下 2 周	在 40 °C pH 6.0 下 2 周
0009	98.9	98.5	98.8
0041	98.9	98.6	98.6
0090	99.2	98.5	98.2

[0286] 在一个优选的实施方案中,所述抗-ANG2抗体包含:(a) 包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的HVR-H1;(b) 包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的HVR-H2;和(c) 包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的HVR-H3。在一个实施方案中,所述抗体进一步包含:(d) 包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的HVR-L1;(e) 包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的HVR-L2;和(f) 包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的HVR-L3。

[0287] 在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:79中的VH和VL序列,包括这些序列的翻译后修饰。

[0288] A.4 本文报道的双特异性抗体的抗-VEGF结合位点可能来源的抗-VEGF抗体

[0289] 在一个优选的实施方案中,所述抗-VEGF抗体包含在SEQ ID NO:107的重链可变结构域中所包含的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3。依据Kabat,所述HVR包含CDR。在一个实施方案中,所述抗体进一步包含在SEQ ID NO:108的重链可变结构域中所包含的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3。依据Kabat,所述HVR包含CDR。

[0290] 在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:107和SEQ ID NO:108中的HC和LC序列,包括这些序列的翻译后修饰。

[0291] 在一个优选的实施方案中,抗-VEGF抗体包含在SEQ ID NO:109的重链可变结构域中所包含的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3。依据Kabat,所述HVR包含CDR。在一个实施方案中,所述抗体进一步包含在SEQ ID NO:110的重链可变结构域中所包含的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3。依据Kabat,所述HVR包含CDR。

[0292] 在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:109和SEQ ID NO:110中的HC和LC序列,包括这些序列的翻译后修饰。

[0293] A.5双特异性抗体

[0294] 本文报道的一方面是包含以下的二价双特异性抗体:

[0295] a) 特异性结合第一抗原的抗体的第一轻链和第一重链,和

[0296] b) 特异性结合第二抗原的抗体的第二轻链和第二重链,其中第二轻链和第二重链的可变结构域VL和VH彼此替换,

[0297] 其中第一和第二抗原是选自由以下组成的组的不同抗原:(人) ANG2, (人) VEGF, (人) IL-1 β 和(人) PDGF-B。

[0298] a) 中的抗体不包含b) 中报道的修饰,并且a) 中的重链和轻链是分离的链。

[0299] 在b) 中的抗体中,

[0300] 在所述轻链中

[0301] 可变轻链结构域VL替换为所述抗体的可变重链结构域VH,

[0302] 并且

[0303] 在所述重链中

[0304] 可变重链结构域VH替换为所述抗体的可变轻链结构域VL。

[0305] 在一个实施方案中,

[0306] i) 在a) 中第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸(按照Kabat编号)被置换为带正电荷的氨基酸,并且,其中在a) 中第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸或位置213的氨基酸(按照Kabat EU索引编号)被置换为带负电荷的氨基酸,

[0307] 或

[0308] ii) 在b) 中第二轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸(按照Kabat编号)被置换为带正电荷的氨基酸,并且,其中在b) 中第二重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸或位置213的氨基酸(按照Kabat EU索引编号)被置换为带负电荷的氨基酸。

[0309] 在一个优选的实施方案中,

[0310] i) 在a) 中第一轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸独立地被置换为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)(按照Kabat编号)(在一个优选的实施方案中,独立地被置换为赖氨酸(K)或精氨酸(R)),并且,其中在a) 中第一重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸或位置213的氨基酸独立地被置换为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)(按照Kabat EU索引编号),

[0311] 或

[0312] ii) 在b) 中第二轻链的恒定结构域CL中,位置124的氨基酸独立地被置换为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)(按照Kabat编号)(在一个优选的实施方案中,独立地被置换为

赖氨酸(K)或精氨酸(R)),并且,其中在b)中第二重链的恒定结构域CH1中,位置147的氨基酸或位置213的氨基酸独立地被替换为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)(按照Kabat EU索引编号)。

[0313] 在一个实施方案中,在第二重链的恒定结构域CL中,位置124和123的氨基酸被替换为K(按照Kabat EU索引编号)。

[0314] 在一个实施方案中,在第二轻链的恒定结构域CH1中,位置147和213的氨基酸被替换为E(按照Kabat的EU索引编号)。

[0315] 在一个优选的实施方案中,在第一轻链的恒定结构域CL中,位置124和123的氨基酸被替换为K,并且,在第一重链的恒定结构域CH1中,位置147和213的氨基酸被替换为E(按照Kabat EU索引编号)。

[0316] 在一个实施方案中,在第二重链的恒定结构域CL中,位置124和123的氨基酸被替换为K,并且,其中在第二轻链的恒定结构域CH1中,位置147和213的氨基酸被替换为E,并且在第一轻链的结构域VL中,位置38的氨基酸被替换为K,在第一重链的可变结构域VH中,位置39的氨基酸被替换为E,在第二重链的可变结构域VL中,位置38的氨基酸被替换为K,并且在第二轻链的可变结构域VH中,位置39的氨基酸被替换为E(按照Kabat EU索引编号)。

[0317] 本文报道的一方面是二价双特异性抗体,其包含:

[0318] a) 特异性结合第一抗原的抗体的第一轻链和第一重链,和

[0319] b) 特异性结合第二抗原的抗体的第二轻链和第二重链,其中第二轻链和第二重链的可变结构域VL和VH彼此替换,并且,其中第二轻链和第二重链的恒定结构域CL和CH1彼此替换,

[0320] 其中第一和第二抗原是选自由以下组成的组的不同抗原:(人)ANG2,(人)VEGF,(人)IL-1 β 和(人)PDGF-B。

[0321] a) 中的抗体不包含b)中报道的修饰,并且a)中的重链和轻链是分离的链。

[0322] 在b)中的抗体中,

[0323] 在所述轻链中

[0324] 可变轻链结构域VL被所述抗体的可变重链结构域VH替换,并且恒定轻链结构域CL被所述抗体的恒定重链结构域CH1替换;

[0325] 并且

[0326] 在重链中

[0327] 可变重链结构域VH被所述抗体的可变轻链结构域VL替换,并且恒定重链结构域CH1被所述抗体的恒定轻链结构域CL替换。

[0328] 本文报道的一方面是二价双特异性抗体,其包含:

[0329] a) 特异性结合第一抗原的抗体的第一轻链和第一重链,和

[0330] b) 特异性结合第二抗原的抗体的第二轻链和第二重链,其中第二轻

[0331] 链和第二重链的恒定结构域CL和CH1彼此替换,

[0332] 其中第一和第二抗原是选自由以下组成的组的不同抗原:(人)ANG2,(人)VEGF,(人)IL-1 β 和(人)PDGF-B。

[0333] a) 中的抗体不包含b)中报道的修饰,并且a)中的重链和轻链是分离的链。

[0334] 在b)中的抗体中,

- [0335] 在所述轻链中
- [0336] 恒定轻链结构域CL被所述抗体的恒定重链结构域CH1替换；并且在重链中
- [0337] 恒定重链结构域CH1被所述抗体的恒定轻链结构域CL替换。
- [0338] 本文报道的一方面是多特异性抗体，其包含：
- [0339] a) 全长抗体，其特异性结合第一抗原并且由两条抗体重链和两条抗体轻链组成，和
- [0340] b) 一个、两个、三个或四个单链Fab片段，其特异性结合一至四种其他抗原（即，第二和/或第三和/或第四和/或第五抗原，优选地，特异性结合一种其他抗原，即第二抗原），
- [0341] 其中b) 中所述的单链Fab片段通过在所述全长抗体的重链或轻链的
- [0342] C-或N-端的肽接头融合到a) 中所述的全长抗体上，
- [0343] 其中第一和第二抗原是选自由以下组成的组的不同抗原：(人) ANG2，(人) VEGF，(人) IL-1 β 和(人) PDGF-B。
- [0344] 在一个实施方案中，与第二抗原结合的一个或两个相同的单链Fab片段通过在所述全长抗体的重链或轻链的C-端的肽接头融合到所述全长抗体上。
- [0345] 在一个实施方案中，与第二抗原结合的一个或两个相同的单链Fab片段通过在所述全长抗体的重链的C-端的肽接头融合到所述全长抗体上。
- [0346] 在一个实施方案中，与第二抗原结合的一个或两个相同的单链Fab片段通过在所述全长抗体的轻链的C-端的肽接头融合到所述全长抗体上。
- [0347] 在一个实施方案中，与第二抗原结合的两个相同的单链Fab片段通过在所述全长抗体的每个重链或轻链的C-端的肽接头融合到所述全长抗体上。
- [0348] 在一个实施方案中，与第二抗原结合的两个相同的单链Fab片段通过在所述全长抗体的每个重链的C-端的肽接头融合到所述全长抗体上。
- [0349] 在一个实施方案中，与第二抗原结合的两个相同的单链Fab片段通过在所述全长抗体的每个轻链的C-端的肽接头融合到所述全长抗体上。
- [0350] 本文报道的一方面是三价双特异性抗体，其包含：
- [0351] a) 全长抗体，其特异性结合第一抗原并且由两条抗体重链和两条抗体轻链组成，
- [0352] b) 第一多肽，其由以下组成：
- [0353] ba) 抗体重链可变结构域 (VH)，
- [0354] 或
- [0355] bb) 抗体重链可变结构域 (VH) 和抗体恒定结构域1 (CH1)，
- [0356] 其中所述第一多肽通过肽接头以其VH结构域的N-端融合到所述全长抗体的两条重链中的一条的C-端，
- [0357] c) 第二多肽，其由以下组成：
- [0358] ca) 抗体轻链可变结构域 (VL)，
- [0359] 或
- [0360] cb) 抗体轻链可变结构域 (VL) 和抗体轻链恒定结构域 (CL)，
- [0361] 其中所述第二多肽通过肽接头以VL结构域的N-端融合到所述全长抗体的两条重链中的另一条的C-端，
- [0362] 并且

[0363] 其中第一多肽的抗体重链可变结构域(VH)和第二多肽的抗体轻链可变结构域(VL)一起形成特异性结合第二抗原的抗原-结合位点,

[0364] 并且

[0365] 其中第一和第二抗原是选自由以下组成的组的不同抗原:(人)ANG2,(人)VEGF,(人)IL-1 β 和(人)PDGF-B。

[0366] 在一个实施方案中,b)中多肽的抗体重链可变结构域(VH)与c)中多肽的抗体轻链可变结构域(VL)通过在下述位置之间引入二硫键而经由链间二硫键桥连接起来并稳定:

[0367] i) 重链可变结构域位置44与轻链可变结构域位置100,或

[0368] ii) 重链可变结构域位置105与轻链可变结构域位置43,或

[0369] iii) 重链可变结构域位置101与轻链可变结构域位置100(总是按照Kabat EU索引编号)。

[0370] 引入二硫键桥用于稳定的技术在例如W0 94/029350,Rajagopal,V.,等人,Prot.Eng.(1997)1453-59;Kobayashi,H.,等人,Nuclear Medicine&Biology,Vol.25,(1998)387-393;或Schmidt,M.,等人,Oncogene(1999)18 1711-1721中描述。在一个实施方案中,在b)和c)的多肽的可变结构域之间的任选的二硫键在重链可变结构域位置44与轻链可变结构域位置100之间。在一个实施方案中,在b)和c)的多肽的可变结构域之间的任选的二硫键在重链可变结构域位置105与轻链可变结构域位置43之间(总是按照Kabat的EU索引编号)。在一个实施方案中,优选在单链Fab片段的可变结构域VH与VL之间不具有所述任选的二硫化物稳定的三价双特异性抗体。

[0371] 本文报道的一方面是三特异性或四特异性的抗体,其包含:

[0372] a) 特异性结合第一抗原的全长抗体的第一轻链和第一重链,和

[0373] b) 特异性结合第二抗原的全长抗体的第二(修饰的)轻链和第二(修饰的)重链,其中可变结构域VL和VH彼此替换,和/或其中恒定结构域CL和CH1彼此替换,和

[0374] c) 其中特异性结合一种或两种其他抗原(即,第三和/或第四抗原)的一至四种抗原结合肽经由肽接头融合到a)和/或b)的轻链或重链的C-或N-端,

[0375] 其中第一和第二抗原是选自由以下组成的组的不同抗原:(人)ANG2,(人)VEGF,(人)IL-1 β 和(人)PDGF-B。

[0376] a) 中的抗体不包含b)中报道的修饰,并且a)中的重链和轻链是分离的链。

[0377] 在一个实施方案中,所述三特异性或四特异性的抗体在c)中包含特异性结合一种或两种其他抗原的一种或两种抗原结合肽。

[0378] 在一个实施方案中,所述抗原结合肽选自scFv片段和scFab片段的组。

[0379] 在一个实施方案中,所述抗原结合肽是scFv片段。

[0380] 在一个实施方案中,所述抗原结合肽是scFab片段。

[0381] 在一个实施方案中,所述抗原结合肽融合在a)和/或b)的重链的C-端。

[0382] 在一个实施方案中,所述三特异性或四特异性的抗体在c)中包含一种或两种特异性结合一种其他抗原的抗原结合肽。

[0383] 在一个实施方案中,所述三特异性或四特异性的抗体在c)中包含两个特异性结合第三抗原的相同的抗原结合肽。在一个优选的实施方案中,所述两个相同的抗原结合肽均经由相同的肽接头融合在a)和b)的重链的C-端。在一个优选的实施方案中,所述两个相同

的抗原结合肽是scFv片段或scFab片段。

[0384] 在一个实施方案中,所述三特异性或四特异性的抗体在c)中包含特异性结合第三和第四抗原的两个抗原结合肽。在一个实施方案中,所述两个抗原结合肽均经由相同的肽连接体融合在a)和b)的重链的C-端。在一个优选的实施方案中,所述两个抗原结合肽是scFv片段或scFab片段。

[0385] 本文报道的一方面是双特异性的四价抗体,其包含:

[0386] a) 抗体的两条轻链和两条重链,其特异性结合第一抗原(并且包含两个Fab片段),

[0387] b) 抗体的两个另外的Fab片段,其特异性结合第二抗原,其中所述另外的Fab片段均经由肽接头分别融合到a)的重链的C-或N-端,

[0388] 并且

[0389] 其中在所述Fab片段中进行下述修饰:

[0390] i) 在a)的两个Fab片段中,或在b)的两个Fab片段中,可变结构域VL和VH彼此替换,和/或恒定结构域CL和CH1彼此替换,

[0391] 或

[0392] ii) 在a)的两个Fab片段中,可变结构域VL和VH彼此替换,并且恒定结构域CL和CH1彼此替换,

[0393] 并且

[0394] 在b)的两个Fab片段中,可变结构域VL和VH彼此替换,或

[0395] 者恒定结构域CL和CH1彼此替换,

[0396] 或

[0397] iii) 在a)的两个Fab片段中,可变结构域VL和VH彼此替换,或恒定结构域CL和CH1彼此替换,

[0398] 并且

[0399] 在b)的两个Fab片段中,可变结构域VL和VH彼此替换,并且恒定结构域CL和CH1彼此替换,

[0400] 或

[0401] iv) 在a)的两个Fab片段中,可变结构域VL和VH彼此替换,并且在b)的两个Fab片段中,恒定结构域CL和CH1彼此替换,

[0402] 或

[0403] v) 在a)的两个Fab片段中,恒定结构域CL和CH1彼此替换,并且在b)的两个Fab片段中,可变结构域VL和VH彼此替换,

[0404] 其中第一和第二抗原是选自以下组成的组的不同抗原:(人)ANG2,(人)VEGF,(人)IL-1 β 和(人)PDGF-B。

[0405] 在一个实施方案中,所述另外的Fab片段均经由肽接头融合在a)的重链的C-端或融合在a)的重链的N-端。

[0406] 在一个实施方案中,所述另外的Fab片段均经由肽接头融合在a)的重链的C-端。

[0407] 在一个实施方案中,所述另外的Fab片段均经由肽连接体融合在a)的重链的N-端。

[0408] 在一个实施方案中,在所述Fab片段中进行下述修饰:

[0409] i) 在a)的两个Fab片段中,或在b)的两个Fab片段中,可变结构域VL和VH彼此替换,

- [0410] 和/或
- [0411] 恒定结构域CL和CH1彼此替换。
- [0412] 在一个实施方案中,在所述Fab片段中进行下述修饰:
- [0413] i) 在a)的两个Fab片段中,可变结构域VL和VH彼此替换,
- [0414] 和/或
- [0415] 恒定结构域CL和CH1彼此替换。
- [0416] 在一个实施方案中,在所述Fab片段中进行下述修饰:
- [0417] i) 在a)的两个Fab片段中,恒定结构域CL和CH1彼此替换。
- [0418] 在一个实施方案中,在所述Fab片段中进行下述修饰:
- [0419] i) 在b)的两个Fab片段中,可变结构域VL和VH彼此替换,
- [0420] 和/或
- [0421] 恒定结构域CL和CH1彼此替换。
- [0422] 在一个实施方案中,在所述Fab片段中进行下述修饰:
- [0423] i) 在b)的两个Fab片段中,恒定结构域CL和CH1彼此替换。
- [0424] 本文报道的一方面是双特异性的四价抗体,其包含:
- [0425] a) 第一抗体的(修饰的)重链,所述第一抗体特异性结合第一抗原并且包含第一VH-CH1结构域对,其中所述第一抗体的第二VH-CH1结构域对的N-端经由肽接头融合在所述重链的C-端,
- [0426] b) a)所述的第一抗体的两条轻链,
- [0427] c) 第二抗体的(修饰的)重链,所述第二抗体特异性结合第二抗原并且包含第一VH-CL结构域对,其中所述第二抗体的第二VH-CL结构域对的N-端经由肽接头融合在所述重链的C-端,并且
- [0428] d) c)所述的第二抗体的两条(修饰的)轻链,它们分别包含CL-CH1结构域对,
- [0429] 其中第一和第二抗原是选自由以下组成的组的不同抗原:(人)ANG2,(人)VEGF,(人)IL-1 β 和(人)PDGF-B。
- [0430] 本文报道的一方面是包含以下的双特异性抗体:
- [0431] a) 特异性结合第一抗原的第一全长抗体的重链和轻链,和
- [0432] b) 特异性结合第二抗原的第二全长抗体的重链和轻链,其中所述重
- [0433] 链的N-端经由肽接头连接在所述轻链的C-端,
- [0434] 其中第一和第二抗原是选自由以下组成的组的不同抗原:(人)ANG2,(人)VEGF,(人)IL-1 β 和(人)PDGF-B。
- [0435] a) 中的抗体不包含b)中报道的修饰,并且所述重链和轻链是分离的链。
- [0436] 本文报道的一方面是包含以下的双特异性抗体:
- [0437] a) 全长抗体,其特异性结合第一抗原并且由两条抗体重链和两条抗体轻链组成,和
- [0438] b) Fv片段,其特异性结合第二抗原并包含VH²结构域和VL²结构域,其中两个结构域通过二硫键桥彼此连接,
- [0439] 其中仅有VH²结构域和VL²结构域中的一个经由肽接头融合到特异性结合第一抗原的全长抗体的重链或轻链,

[0440] 其中第一和第二抗原是选自由以下组成的组的不同抗原：(人) ANG2, (人) VEGF, (人) IL-1 β 和(人) PDGF-B。

[0441] 在所述双特异性中,a) 中的重链和轻链是分离的链。

[0442] 在一个实施方案中,VH²结构域和VL²结构域中的另一个没有经由肽接头融合到特异性结合第一抗原的全长抗体的重链或轻链。

[0443] 在本文报道的所有方面中,第一轻链包含VL结构域和CL结构域,第一重链包含VH结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域。

[0444] 在所有方面的一个实施方案中,本文报道的抗体是多特异性抗体,其需要至少两个重链多肽的异二聚化,并且其中所述抗体特异性结合人IL-1 β 和第二非-人IL-1 β 抗原。

[0445] 已经记载了一些用于CH3-修饰的方法,以支持异二聚化,例如,记载在WO 96/27011,WO 98/050431,EP 1870459,WO 2007/110205,WO 2007/147901,WO 2009/089004,WO 2010/129304,WO 2011/90754,WO 2011/143545,WO 2012/058768,WO 2013/157954,WO 2013/096291中,它们通过引用包括在本文中。典型地,在本领域已知的方法中,第一重链的CH3结构域和第二重链的CH3结构域都是以互补方式改造的,使得包含一个改造的CH3结构域的重链不再与相同结构的另一条重链同型二聚化(例如,CH3-改造的第一重链可能不再与另一条CH3-改造的第一重链同型二聚化;并且CH3-改造的第二重链可能不再与另一条CH3-改造的第二重链同型二聚化)。由此,包含一个改造的CH3结构域的重链被迫使与另一条包含以互补方式改造的CH3结构域的重链异二聚化。对于本发明的这个实施方案,第一重链的CH3结构域与第二重链的CH3结构域通过氨基酸置换以互补方式改造,从而迫使第一重链和第二重链异二聚化,而第一重链和第二重链不再能够同型二聚化(例如,由于空间原因)。

[0446] 考虑将上文引用并包括的本领域已知的支持重链异二聚化的不同的方法作为用于本发明的多特异性抗体的不同的备选方案,所述多特异性抗体包含来源于特异性结合第一抗原的第一抗体的“非交叉的Fab区”和来源于特异性结合第二抗原的第二抗体的“交叉的Fab区”连同上文描述的用于本发明的特定的氨基酸置换。

[0447] 本文报道的多特异性抗体的CH3结构域可以通过“凸起-进入-孔洞”技术改变,该技术以一些实例详细记载在,例如WO 96/027011,Ridgway,J.B.,等人,Protein Eng.9 (1996) 617-621;和Merchant,A.M.,等人,Nat.Biotechnol.16 (1998) 677-681中。在这种方法中,两个CH3结构域的相互作用表面被改变,以增加包含这两个CH3结构域的两个重链的异二聚化。(这两个重链的)这两个CH3结构域中的每一个都可以是“凸起”,而另一个是“孔洞”。引入二硫键桥进一步稳定该异二聚体(Merchant,A.M.,等人,Nature Biotech.16 (1998) 677-681;Atwell,S.,等人,J.Mol.Biol.270 (1997) 26-35)并且增加收率。

[0448] 在一个优选的实施方案中,本文报道的多特异性抗体包含在“凸起链”的CH3结构域中的T366W突变和在“孔洞链”的CH3结构域中的T366S、L368A、Y407V突变(按照Kabat EU索引编号)。也可以使用CH3结构域之间的另外的链间二硫键桥(Merchant,A.M.,等人,Nature Biotech.16 (1998) 677-681),例如,通过向“凸起链”的CH3结构域中引入Y349C突变,和向“孔洞链”的CH3结构域中引入E356C突变或S354C突变。由此,在另一个优选的实施方案中,本文报道的多特异性抗体在两个CH3结构域中的一个中包含Y349C和T366W突变并且在两个CH3结构域的另一一个中包含E356C、T366S、L368A和Y407V突变,或本文报道的多特

异性抗体在两个CH3结构域中的一个中包含Y349C和T366W突变并且在两个CH3结构域的另一个中包含S354C、T366S、L368A和Y407V突变(一个CH3结构域中的额外的Y349C突变和另一个CH3结构域中的额外的E356C或S354C突变形成链间二硫键桥)(根据Kabat EU索引编号)。

[0449] 但是,还可以备选地或另外应用EP 1 870 459A1所述的其他凸起-入-孔洞技术。在一个实施方案中,本文报道的多特异性抗体包含在“凸起链”的CH3结构域中的R409D和K370E突变,和在“孔洞链”的CH3结构域中的D399K和E357K突变(按照Kabat EU索引编号)。

[0450] 在一个实施方案中,本文报道的多特异性抗体包含在“凸起链”的CH3结构域中的T366W突变,和在“孔洞链”的CH3结构域中的T366S、L368A和Y407V突变,和另外的在“凸起链”的CH3结构域中的R409D和K370E突变以及在“孔洞链”的CH3结构域中的D399K和E357K突变(按照Kabat EU索引编号)。

[0451] 在一个实施方案中,本文报道的多特异性抗体在两个CH3结构域中的一个中包含Y349C和T366W突变并且在两个CH3结构域的另一个中包含S354C、T366S、L368A和Y407V突变,或本文报道的多特异性抗体在两个CH3结构域中的一个中包含Y349C和T366W突变并且在两个CH3结构域的另一个中包含S354C、T366S、L368A和Y407V突变,以及另外包含在“凸起链”的CH3结构域中的R409D和K370E突变和在“孔洞链”的CH3结构域中的D399K和E357K突变(按照Kabat EU索引编号)。

[0452] 除了“凸起-进入-孔洞技术”之外,其他用于修饰多特异性抗体的重链的CH3结构域从而迫使异二聚化的技术在本领域中是已知的。在本文中考虑将这些技术,尤其是记载在WO 96/27011,WO 98/050431,EP 1870459,WO 2007/110205,WO 2007/147901,WO 2009/089004,WO 2010/129304,WO 2011/90754,WO 2011/143545,WO 2012/058768,WO 2013/157954和WO 2013/096291中的那些,作为“凸起-进入-孔洞技术”的备选方案与本文报道的多特异性抗体联用。

[0453] 在本文报道的多特异性抗体的一个实施方案中,使用EP 1870459中记载的方法来支持所述多特异性抗体的第一重链和第二重链的异二聚化。这一方法是基于在两条重链,即,第一和第二重链之间的CH3/CH3-结构域-界面中的特定氨基酸位置引入带相反电荷的带电荷氨基酸。

[0454] 因此,该实施方案涉及本文报道的多特异性抗体,其中在所述抗体的三级结构中,第一重链的CH3结构域与第二重链的CH3结构域形成位于各自抗体CH3结构域之间的界面,其中第一重链的CH3结构域和第二重链的CH3结构域各自的氨基酸序列分别包含位于抗体三级结构中的所述界面内的一组氨基酸,其中来自位于一条重链的CH3结构域中的界面内的该组氨基酸中的第一氨基酸被置换为带正电荷的氨基酸,并且来自位于另一条重链的CH3结构域中的界面内的该组氨基酸中的第二氨基酸被置换为带负电荷的氨基酸。该实施方案所述的多特异性抗体在本文中还称为“CH3 (+/-)-改造的多特异性抗体”(其中缩写“+/-”表示被引入到各自的CH3结构域中的带相反电荷的氨基酸)。

[0455] 在本文报道的所述CH3 (+/-)-改造的多特异性抗体的一个实施方案中,所述带正电荷的氨基酸选自K、R和H,并且所述带负电荷的氨基酸选自E或D。

[0456] 在本文报道的所述CH3 (+/-)-改造的多特异性抗体的一个实施方案中,所述带正电荷的氨基酸选自K和R,并且所述带负电荷的氨基酸选自E或D。

[0457] 在本文报道的所述CH3 (+/-)-改造的多特异性抗体的一个实施方案中,所述带正

电荷的氨基酸是K,并且所述带负电荷的氨基酸是E。

[0458] 在本文报道的所述CH3 (+/-) -改造的多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链的CH3结构域中,位置409的氨基酸R被置换为D,并且位置的氨基酸K被置换为E,并且在另一条重链的CH3结构域中,位置399的氨基酸D被置换为K,并且位置357的氨基酸E被置换为K (按照Kabat EU索引编号)。

[0459] 在本文报道的多特异性抗体的一个实施方案中,使用W02013/157953中记载的方法支持多特异性抗体的第一重链与第二重链的异二聚化。在本文报道的所述多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链的CH3结构域中,位置366的氨基酸T被置换为K,并且在另一条重链的CH3结构域中,位置351的氨基酸L被置换为D (按照Kabat EU索引编号)。在本文报道的所述多特异性抗体的另一个实施方案中,在一条重链的CH3结构域中,位置366的氨基酸T被置换为K,位置351的氨基酸L被置换为K,并且在另一条重链的CH3结构域中,位置351的氨基酸L被置换为D (按照Kabat EU索引编号)。

[0460] 在本文报道的所述多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链的CH3结构域中,位置366的氨基酸T被置换为K,位置351的氨基酸L被置换为K,并且在另一条重链的CH3结构域中,位置351的氨基酸L被置换为D (按照Kabat EU索引编号)。另外,在另一条重链的CH3结构域中包含下述置换中的至少一个:位置349的氨基酸Y被置换为E,位置349的氨基酸Y被置换为D并且位置368的氨基酸L被置换为E (按照Kabat EU索引编号)。在一个实施方案中,位置368的氨基酸L被置换为E (按照Kabat EU索引编号)。

[0461] 在本文报道的多特异性抗体的一个实施方案中,使用W02012/058768中记载的方法来支持所述多特异性抗体的第一重链与第二重链的异二聚化。在本文报道的所述多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链的CH3结构域中,位置351的氨基酸L被置换为Y并且位置407的氨基酸Y被置换为A,并且在另一条重链的CH3结构域中,位置366的氨基酸T被置换为A,并且位置409的氨基酸K被置换为F (按照Kabat EU索引编号)。在另一个实施方案中,除了前述置换之外,在另一条重链的CH3结构域中,在下述位置的氨基酸中的至少一个被置换:位置411 (初始是T), 399 (初始是D), 400 (初始是S), 405 (初始是F), 390 (初始是N) 和392 (初始是K) (按照Kabat EU索引编号)。优选的置换为:

[0462] -位置411的氨基酸T被选自N,R,Q,K,D,E和W的氨基酸置换 (按照Kabat EU索引编号),

[0463] -位置399的氨基酸D被选自R,W,Y和K的氨基酸置换 (按照Kabat EU索引编号),

[0464] -位置400的氨基酸S被选自E,D,R和K的氨基酸置换 (按照Kabat EU索引编号),

[0465] -位置405的氨基酸F被选自I,M,T,S,V和W的氨基酸置换 (按照Kabat EU索引编号);

[0466] -位置390的氨基酸N被选自R,K和D的氨基酸置换 (按照Kabat EU索引编号);和

[0467] -位置392的氨基酸K被选自V,M,R,L,F和E的氨基酸置换 (按照Kabat EU索引编号)。

[0468] 在本文报道的所述多特异性抗体的另一个实施方案中 (按照W02012/058768所述改造),在一条重链的CH3结构域中,位置351的氨基酸L被置换为Y并且位置407的氨基酸Y被置换为A,并且在另一条重链的CH3结构域中,位置366的氨基酸T被置换为V并且位置409的氨基酸K被置换为F (按照Kabat EU索引编号)。在本文报道的所述多特异性抗体的另一个实

实施方案中,在一条重链的CH3结构域中,位置407的氨基酸Y被替换为A,并且在另一条重链的CH3结构域中,位置366的氨基酸T被替换为A并且位置409的氨基酸K被替换为F(按照Kabat EU索引编号)。在所述最后一个前述的实施方案中,在所述另一条重链的CH3结构域中,位置392的氨基酸K被替换为E,位置411的氨基酸T被替换为E,位置399的氨基酸D被替换为R并且位置400的氨基酸S被替换为R(按照Kabat EU索引编号)。

[0469] 在本文报道的多特异性抗体的一个实施方案中,使用WO 2011/143545中记载的方法来支持所述多特异性抗体的第一重链与第二重链的异二聚化。在本文报道的所述多特异性抗体的一个实施方案中,在两条重链的CH3结构域中在位置368和/或409引入氨基酸修饰(按照Kabat EU索引编号)。

[0470] 在本文报道的多特异性抗体的一个实施方案中,使用WO 2011/090762中记载的方法来支持所述多特异性抗体的第一重链与第二重链的异二聚化。WO 2011/090762涉及按照“凸起-进入-孔洞”技术进行的氨基酸修饰。在本文报道的所述CH3 (KiH) -改造的多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链的CH3结构域中,位置366的氨基酸T被替换为W,并且在另一条重链的CH3结构域中,位置407的氨基酸Y被替换为A(按照Kabat EU索引编号)。在本文报道的所述CH3 (KiH) -改造的多特异性抗体的另一个实施方案中,在一条重链的CH3结构域中,位置366的氨基酸T被替换为Y,并且在另一条重链的CH3结构域中,位置407的氨基酸Y被替换为T(按照Kabat EU索引编号)。

[0471] 在本文报道的多特异性抗体的一个实施方案中,其是IgG2同种型的,使用WO 2011/090762中记载的方法来支持所述多特异性抗体的第一重链与第二重链的异二聚化。

[0472] 在本文报道的多特异性抗体的一个实施方案中,使用WO 2009/089004中记载的方法来支持所述多特异性抗体的第一重链与第二重链的异二聚化。在本文报道的所述多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链的CH3结构域中,位置392的氨基酸K或N被替换为带负电荷的氨基酸(在一个优选的实施方案中,被替换为E或D,在一个优选的实施方案中,被替换为D),并且在另一条重链的CH3结构域中,位置399的氨基酸D、位置356的氨基酸E或D或位置357的氨基酸E被替换为带正电荷的氨基酸(在一个优选的实施方案中,被替换为K或R,在一个优选的实施方案中,被替换为K,在一个优选的实施方案中,位置399或356的氨基酸被替换为K)(按照Kabat EU索引编号)。在另一个实施方案中,除了前述置换之外,在一条重链的CH3结构域中,位置409的氨基酸K或R被替换为带负电荷的氨基酸(在一个优选的实施方案中,被替换为E或D,在一个优选的实施方案中,被替换为D)(按照Kabat EU索引编号)。在甚至另一个实施方案中,除了或备选地前述置换之外,在一条重链的CH3结构域,位置439的氨基酸K和/或位置370的氨基酸K彼此独立地被替换为带负电荷的氨基酸(在一个优选的实施方案中,被替换为E或D,在一个优选的实施方案中,置换为D)(按照Kabat EU索引编号)。

[0473] 在本文报道的多特异性抗体的一个实施方案中,使用WO 2007/147901中所述的方法来支持所述多特异性抗体的第一重链与第二重链的异二聚化。在本文报道的所述多特异性抗体的一个实施方案中,在一条重链的CH3结构域中,位置253的氨基酸K被替换为E,位置282的氨基酸D被替换为K,并且位置322的氨基酸K被替换为D,并且在另一条重链的CH3结构域中,位置239的氨基酸D被替换为K,位置240的氨基酸E被替换为K,并且位置292的氨基酸K被替换为D(按照Kabat EU索引编号)。

[0474] 在本文报道的多特异性抗体的一个实施方案中,使用WO 2007/110205中记载的方法来支持所述多特异性抗体的第一重链与第二重链的异二聚化。

[0475] 在本文报道的所有方面和实施方案的一个实施方案中,所述多特异性抗体是双特异性抗体或三特异性抗体。在本发明的一个优选的实施方案中,所述多特异性抗体是双特异性抗体。

[0476] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,所述抗体是二价或三价抗体。在一个实施方案中,所述抗体是二价抗体。

[0477] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,所述多特异性抗体具有IgG型抗体的恒定结构域结构。在本文报道的所有方面的另一个实施方案中,所述多特异性抗体特征在于,所述多特异性抗体是人IgG1亚类的或是具有突变L234A和L235A的人IgG1亚类的。在本文报道的所有方面的另一个实施方案中,所述多特异性抗体特征在于,所述多特异性抗体是人IgG2亚类的。在本文报道的所有方面的另一个实施方案中,所述多特异性抗体特征在于所述多特异性抗体是人IgG3亚类的。在本文报道的所有方面的另一个实施方案中,所述多特异性抗体特征在于,所述多特异性抗体是人IgG4亚类的,或是具有另外的突变S228P的人IgG4亚类的。在本文报道的所有方面的另一个实施方案中,所述多特异性抗体特征在于,所述多特异性抗体是人IgG1亚类的或人IgG4亚类的。在本文报道的所有方面的另一个实施方案中,所述多特异性抗体特征在于,所述多特异性抗体是具有突变L234A和L235A的人IgG1亚类的(按照Kabat EU索引编号)。在本文报道的所有方面的另一个实施方案中,所述多特异性抗体特征在于,所述多特异性抗体是具有突变L234A、L235A和P329G的人IgG1亚类的(按照Kabat EU索引编号)。在本文报道的所有方面的另一个实施方案中,所述多特异性抗体特征在于,所述多特异性抗体是具有突变S228P和L235E的人IgG4亚类的(按照Kabat EU索引编号)。在本文报道的所有方面的另一个实施方案中,所述多特异性抗体特征在于,所述多特异性抗体是具有突变S228P、L235E和P329G的人IgG4亚类的(按照Kabat EU索引编号)。

[0478] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,包含含有本文指定的CH3结构域的重链的抗体包含另外的C-端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447,按照Kabat EU索引编号)。在本文报道的所有方面的一个实施方案中,包含含有本文指定的CH3结构域的重链的抗体包含另外的C-端甘氨酸残基(G446,按照Kabat EU索引编号)。

[0479] 在一个实施方案中,所述抗体包含第一Fc-区多肽和第二Fc-区多肽,并且

[0480] 其中

[0481] i) 第一Fc-区多肽是人IgG1 Fc-区多肽并且第二Fc-区多肽是人IgG1 Fc-区多肽,或

[0482] ii) 第一Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A的人IgG1 Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A的人IgG1 Fc-区多肽,或

[0483] iii) 第一Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,P329G的人IgG1 Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,P329G的人IgG1 Fc-区多肽,或

[0484] iv) 第一Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,S354C,T366W的人IgG1 Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,Y349C,T366S,L368A,Y407V的人IgG1 Fc-区多肽,或

[0485] v) 第一Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,P329G,S354C,T366W的人IgG1 Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,P329G,Y349C,T366S,L368A,Y407V的人IgG1 Fc-区多肽,或

[0486] vi) 第一Fc-区多肽是人IgG4 Fc-区多肽并且第二Fc-区多肽是人IgG4 Fc-区多肽,或

[0487] vii) 第一Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E的人IgG4 Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E的人IgG4 Fc-区多肽,或

[0488] viii) 第一Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,P329G的人IgG4 Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,P329G的人IgG4 Fc-区多肽,或

[0489] ix) 第一Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,S354C,T366W的人IgG4 Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,Y349C,T366S,L368A,Y407V的人IgG4 Fc-区多肽,或

[0490] x) 第一Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,P329G,S354C,T366W的人IgG4 Fc-区多肽,并且第二Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,P329G,Y349C,T366S,L368A,Y407V的人IgG4 Fc-区多肽。

[0491] 在一个实施方案中,所述抗体包含第一Fc-区多肽和第二Fc-区多肽,并且

[0492] 其中所述抗体在第一Fc-区多肽中和在第二Fc-区多肽中包含下述突变组合:

[0493] i) I253A,H310A,和H435A,或

[0494] ii) H310A,H433A,和Y436A,或

[0495] iii) L251D,L314D,和L432D,或

[0496] iv) i)-iii)的组合。

[0497] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,本文报道的抗体是效应子沉默的抗体。在本文报道的所有方面的一个实施方案中,所述抗体是效应子沉默的抗体并且不结合人FcRn。在本文报道的所有方面的一个优选的实施方案中是人IgG1亚类的抗体并且在两条重链中具有突变L234A、L235A、P329G、I253A、H310A和H434A(按照Kabat索引编号)。

[0498] 在另一方面中,按照上述实施方案中任一个所述的抗-IL-1 β 抗体可以结合单独的或组合的如在下文1-4节中所述的任意特征。

[0499] 1. 抗体亲和性

[0500] 用于确定KD值的方法在下文的实施例中描述。

[0501] 当使用BIACORE[®]表面等离子体共振测定时,备选地,KD值可以按下文所述进行测量:使用BIACORE[®]-2000或BIACORE[®]-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)的测定在25℃以~10个响应单位(RU)的固定的抗原CM5芯片进行。在一个实施方案中,按照供应商的使用说明,用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIAcore, Inc.)。将抗原用10mM乙酸钠(pH 4.8)稀释为5 μ g/mL(~0.2 μ M),之后以5 μ L/分钟的流速注入,获得大约10个响应单位(RU)的偶联的蛋白。注入抗原之后,注入1M乙醇胺以封闭未反应的基团。为了动力学测量,在25℃,以大约25 μ L/min的流速注入在具有0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN-20[™])表面活性剂的PBS(PBST)中的Fab的两倍连续稀释液(0.78nM至500nM)。使用简单的一对一朗缪尔

(Langmuir) 结合模型 (BIACORE[®] 评价软件版本 3.2), 通过同时匹配结合和解离传感图, 计算结合速率 (k_a) 和解离速率 (k_d)。平衡解离常数 (KD) 计算为比例 k_d/k_a (参见, 例如, Chen, Y. 等人., J.Mol.Biol. 293 (1999) 865-881)。通过上述表面等离子共振测定, 如果结合速率 (on-rate) 超过 $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 那么解离速率可以通过使用荧光淬灭技术确定, 所述荧光淬灭技术在以光谱仪, 如装有停流 (stop-flow) 的分光光度计 (Aviv Instruments) 或具有搅拌的比色皿的 8000-系列 SLM-AMINCO[™] 分光光度计 (ThermoSpectronic) 测量的增加的抗原浓度的存在下, 在 25°C 测量在 PBS (pH 7.2) 中 20nM 抗-抗原抗体 (Fab 形式) 的荧光发射强度的增加或减少 (激发 = 295nm; 发射 = 340nm, 16nm 带通)。

[0502] 2. 嵌合抗体和人源化抗体

[0503] 在某些实施方案中, 本文提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述在, 例如, US 4,816,567; 和 Morrison, S.L. 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81 (1984) 6851-6855) 中。在一个实施例中, 嵌合抗体包含非人可变区 (例如, 来源于小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物诸如猴的可变区) 和人恒定区。在另一个实施例中, 嵌合抗体是“类别转换的”抗体, 其中所述类或亚类已经从亲本抗体的类或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0504] 在某些实施方案中, 嵌合抗体是人源化抗体。通常, 将非人抗体人源化以减少对于人类的免疫原性, 同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常, 人源化抗体包含这样的—个或多个可变结构域: 其中 HVR 例如 CDR (或其部分) 源自非人抗体, 并且 FR (或其部分) 源自人抗体序列。人源化抗体任选地也包含人恒定区的至少一部分。在一些实施方案中, 将人源化抗体中的一些 FR 残基置换为来自非人抗体 (例如, HVR 残基所来源的抗体) 的相应残基, 例如, 以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0505] 人源化抗体及其制备方法综述在, 例如, Almagro, J.C. 和 Fransson, J., Front.Biosci. 13 (2008) 1619-1633 中, 且进一步描述在, 例如, Riechmann, I. 等人, Nature 332 (1988) 323-329; Queen, C. 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86 (1989) 10029-10033; US 5,821,337, US 7,527,791, US 6,982,321, 和 US 7,087,409; Kashmiri, S.V. 等人, Methods 36 (2005) 25-34 (描述了特异性决定区 (SDR) 移植); Padlan, E.A., Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498 (描述了“表面再建”); Dall’Acqua, W.F. 等人, Methods 36 (2005) 43-60 (描述了“FR 改组”); 和 Osbourn, J. 等人, Methods 36 (2005) 61-68 以及 Klimka, A. 等人, Br.J.Cancer 83 (2000) 252-260 (描述了用于 FR 改组的“指导选择”方案) 中。

[0506] 可以用于人源化的人框架区包括, 但不限于: 使用“最佳拟合”方法选择的框架区 (参见, 例如, Sims, M.J. 等人, J.Immunol. 151 (1993) 2296-2308); 来源于轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列的框架区 (参见, 例如, Carter, P. 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89 (1992) 4285-4289; 和 Presta, L.G. 等人, J.Immunol. 151 (1993) 2623-2632); 人成熟的 (体细胞突变的) 框架区或人种系框架区 (参见, 例如, Almagro, J.C. 和 Fransson, J., Front.Biosci. 13 (2008) 1619-1633); 和从筛选 FR 文库来源的框架区 (参见, 例如, Baca, M. 等人, J.Biol.Chem. 272 (1997) 10678-10684 和 Rosok, M.J. 等人, J.Biol.Chem. 271 (1996) 22611-22618)。

[0507] 3. 多特异性抗体

[0508] 本文提供的抗体是多特异性抗体, 例如, 双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两种不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中, 所述结合特异性之一是针

对IL-1 β ,且另一种是针对任意其他抗原。在某些实施方案中,双特异性抗体可以结合IL-1 β 的两个不同表位。双特异性抗体也可以用于将细胞毒性剂定位至表达IL-1 β 的细胞。可以将双特异性抗体制备为全长抗体或抗体片段。

[0509] 用于制备多特异性抗体的技术包括,但不限于,重组共表达具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对(参见Milstein,C.和Cuello,A.C.,Nature 305 (1983) 537-540, WO 93/08829,以及Traunecker,A.等人,EMBO J.10 (1991) 3655-3659),和“凸起-入-孔洞”工程改造(参见,例如,US 5,731,168)。也可以通过以下方式制备多特异性抗体:改造静电转向效应(engineering electrostatic steering effects)用于制备抗体Fc-异二聚体分子(WO 2009/089004);交联两个或更多个抗体或片段(参见,例如,US 4,676,980,和Brennan,M.等人,Science 229 (1985) 81-83);使用亮氨酸拉链生产双特异性抗体(参见,例如,Kostelny,S.A.等人,J.Immunol.148 (1992) 1547-1553);使用“双抗体”技术以制备双特异性抗体片段(参见,例如,Holliger,P.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 (1993) 6444-6448);和使用单链Fv (sFv) 二聚体(参见,例如Gruber,M等人,J.Immunol.152 (1994) 5368-5374);以及制备三特异性抗体,如在例如Tutt,A.等人,J.Immunol.147 (1991) 60-69中所述。

[0510] 本文中还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的经工程改造的抗体,包括“章鱼抗体(Octopus antibodies)”(参见,例如,US 2006/0025576)。

[0511] 本文中的抗体或片段也包括“双重作用Fab”或“DAF”,其包含结合IL-1 β 以及另一种不同抗原的抗原结合位点(参见,例如US 2008/0069820)。

[0512] 本文的抗体或片段还包括在WO 2009/080251,WO 2009/080252,WO 2009/080253,WO 2009/080254,WO 2010/112193,WO 2010/115589,WO 2010/136172,WO 2010/145792,和WO 2010/145793中所述的多特异性抗体。

[0513] 4. 抗体变体

[0514] 在某些实施方案中,考虑本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能合乎需要的是,改善抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。通过向编码抗体的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成,可以制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括,例如,从抗体的氨基酸序列删除残基和/或插入残基和/或置换残基。可以制备缺失、插入和置换的任意组合以获得最终构建体,条件是,所述最终构建体具有期望的特征,例如,抗原结合。

[0515] a) 置换、插入和缺失变体

[0516] 在某些实施方案中,提供了具有一个或多个氨基酸置换的抗体变体。用于置换诱变的目标位点包括HVR和FR。在下表中在“优选的置换”的标题下显示了保守置换。在表1中在“示例性置换”的标题下提供了更实质性的变化,并且参考氨基酸侧链类别在下面进一步描述。可以将氨基酸置换引入目标抗体中并且针对期望的活性(例如,保留的/改善的抗原结合、降低的免疫原性、或改善的ADCC或CDC)来筛选产物。

[0517] 表

[0518]

原始残基	示例性置换	优选的置换
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0519] 氨基酸可以根据共同的侧链特性分组：

[0520] (1) 疏水的：正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile；

[0521] (2) 中性亲水的：Cys, Ser, Thr, Asn, Gln；

[0522] (3) 酸性的：Asp, Glu；

[0523] (4) 碱性的：His, Lys, Arg；

[0524] (5) 影响链取向的残基：Gly, Pro；

[0525] (6) 芳族的：Trp, Tyr, Phe。

[0526] 非保守置换需要将这些分类之一的成员交换为另一个分类的成员。

[0527] 一类置换变体涉及置换亲本抗体 (例如, 人源化抗体或人抗体) 的一个或多个高变区残基。通常, 选择用于进一步研究的所得变体相对于亲本抗体在某些生物学特性上具有改进 (例如, 改善) (例如, 增加的亲和力、降低的免疫原性), 和/或具有亲本抗体的基本上保留的某些生物学特性。一种示例性的置换变体是亲和力成熟的抗体, 所述抗体可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术 (诸如本文描述的那些) 方便地产生。简而言之, 将一

个或多个HVR残基突变并且将变体抗体在噬菌体上展示并针对特定生物学活性(例如结合亲和力)进行筛选。

[0528] 可以在HVR中做出改变(例如,置换),例如,以改善抗体亲和力。这类改变可以在HVR“热点”(即,在体细胞成熟过程中以高频率经历突变的密码子所编码的残基(参见,例如,Chowdhury,P.S.,Methods Mol.Biol.207 (2008) 179-196),和/或接触抗原的残基中做出,并对得到的变体VH或VL试验结合亲和力。通过构建次级文库并从中重新选择而实现的亲和力成熟已经描述在,例如,Hoogenboom,H.R.等人,在Methods in Molecular Biology (分子生物学方法) 178 (2002) 1-37中。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如,易出错PCR、链改组或寡核苷酸-定向的诱变)的任一种,将多样性引入所选择用于成熟的可变基因中。随后建立次级文库。随后筛选该文库以鉴定具有期望的亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法涉及HVR-定向的方案,其中将几个HVR残基(例如,一次4-6个残基)随机化。可以特别地鉴定参与抗原结合的HVR残基,例如,使用丙氨酸扫描诱变或建模。特别地经常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0529] 在某些实施方案中,置换、插入或缺失可以出现在一个或多个HVR内部,只要这类改变不实质上降低抗体的结合抗原的能力。例如,可以在HVR中做出不实质上降低结合亲和力的保守改变(例如,如本文中提供的保守置换)。这类改变可以例如在HVR的抗原接触残基的外部。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR未改变或含有不超过一个、两个或三个氨基酸置换。

[0530] 一种用于鉴定可以被靶向以便诱变的抗体残基或区域的有用方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham,B.C.和Wells,J.A.,Science 244 (1989) 1081-1085所述。在这种方法中,鉴定一个残基或靶残基组(例如,带电荷残基,诸如arg、asp、his、lys和glu),并且用中性的或带负电荷的氨基酸(例如,丙氨酸或聚丙氨酸)替换以确定该抗体与抗原的相互作用是否受影响。可以在对初始置换显示出功能敏感性的氨基酸位置处引入其他置换。备选地或额外地,可以使用抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体和抗原之间的接触点。可以靶向或消除这类接触残基和邻近残基作为置换的候选物。可以筛选变体以确定它们是否含有期望的特性。

[0531] 氨基酸序列插入包括长度在从一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的范围内的氨基端和/或羧基端融合体,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N-端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N-或C-端与酶(例如针对ADEPT的酶)或增加所述抗体的血清半衰期的多肽的融合体。

[0532] b) 糖基化变体

[0533] 在某些实施方案中,改变本文提供的抗体以增加或减少抗体被糖基化的程度。通过改变氨基酸序列从而建立或移除一个或多个糖基化位点,可以方便地实现对抗体添加或删除糖基化位点。

[0534] 在抗体包含Fc区的情况下,可以改变与之连接的碳水化合物。哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分枝的双天线寡糖,所述寡糖通常借助N-键连接至Fc区的CH2结构域的Asn297(参见,例如,Wright,A.和Morrison,S.L.,TIBTECH 15 (1997) 26-32)。寡糖可以包括各种碳水化合物,例如,甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及与双天线寡糖结构的“茎部”中的GlcNAc连接的岩藻糖。在一些实施方案中,可以修饰本发明的抗

体中的寡糖以便产生具有某些改善的特性的抗体变体。

[0535] 在一个实施方案中,提供具有碳水化合物结构的抗体变体,所述碳水化合物结构缺少与Fc区(直接地或间接地)连接的岩藻糖。例如,这类抗体中岩藻糖的量可以是1%至80%、1%至65%、5%至65%、或20%至40%。通过以下方式确定岩藻糖的量:相对于如通过MALDI-TOF质谱法(例如,如WO 2008/077546中所述)所测量的与Asn 297连接的全部糖结构(例如复杂结构、杂合结构和高甘露糖结构)的总和,计算糖链内在Asn297处的岩藻糖的平均量。Asn297表示位于Fc区中约位置297处的天冬酰胺残基(Fc区残基的EU编号);但是,由于抗体中的微小序列变异,Asn297也可以位于位置297的上游或下游±3个氨基酸处,即,在位置294和300之间。这样的岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。参见,例如,US 2003/0157108;US 2004/0093621。与“去岩藻糖基化的”或“岩藻糖-缺陷型”抗体变体相关的出版物的例子包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO 2005/053742;WO 2002/031140;Okazaki, A. 等人, *J. Mol. Biol.* 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N. 等人, *Biotech. Bioeng.* 87 (2004) 614-622。能够生产去岩藻糖基化抗体的细胞系的例子包括在蛋白岩藻糖基化方面有缺陷的Lec13CHO细胞(Ripka, J. 等人, *Arch. Biochem. Biophys.* 249 (1986) 533-545;US 2003/0157108;和WO 2004/056312, 特别是实施例11), 和敲除的细胞系, 诸如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除的CHO细胞(参见,例如, Yamane-Ohnuki, N. 等人, *Biotech. Bioeng.* 87 (2004) 614-622; Kanda, Y. 等人, *Biotechnol. Bioeng.* 94 (2006) 680-688;和WO 2003/085107)。

[0536] 还可以为抗体变体提供双分的寡糖,例如,其中与抗体的Fc区连接的双天线寡糖由GlcNAc对分。这样的抗体变体可以具有减少的岩藻糖化和/或改善的ADCC功能。这样的抗体变体的例子例如描述在WO 2003/011878;US 6,602,684;和US 2005/0123546中。还提供了在与Fc区连接的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。这样的抗体变体可以具有改善的CDC功能。这样的抗体变体例如描述在WO 1997/30087;WO 1998/58964;和WO 1999/22764中。

[0537] c) Fc-区变体

[0538] 在某些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入本文中提供的抗体的Fc区中,由此产生Fc区变体。该Fc区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置处含有氨基酸修饰(例如,置换)的人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区)。

[0539] 在某些实施方案中,本发明预见到具有一些但并非全部效应子功能的抗体变体,这使所述抗体变体成为下述应用的合乎需要的候选物:其中抗体的体内半衰期是重要的,而某些效应子功能(诸如补体和ADCC)是不必要的或有害的。可以实施体外和/或体内细胞毒性测定以证实CDC和/或ADCC活性的降低/耗尽。

[0540] 例如,可以实施Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺少Fc γ R结合(因此可能缺少ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。用于介导ADCC的原代细胞(即NK细胞)仅表达Fc(RIII, 而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。Ravetch, J. V. 和 Kinet, J. P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492的第464页上的表3中总结了造血细胞上的FcR表达。评估目标分子的ADCC活性的体外测定的非限制性例子描述在US 5,500,362(参见,例如,

Hellstrom, I. 等人., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063; 和 Hellstrom, I. 等人., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502; US 5,821,337 (参见 Bruggemann, M. 等人., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361) 中。备选地, 可以采用非放射性测定方法 (参见, 例如, 用于流式细胞术的 ACTITM 非放射性的细胞毒性测定 (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA; 和 CytoTox96® 非放射性的细胞毒性测定 (Promega, Madison, WI))。用于这样的测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。备选地或额外地, 可以在体内评估目标分子的 ADCC 活性, 例如, 在动物模型中, 诸如在 Clynes, R. 等人., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656 公开的动物模型中。也可以实施 C1q 结合测定以证实抗体不能结合 C1q 且因此缺少 CDC 活性 (参见, 例如, WO 2006/029879 和 WO 2005/100402 中的 C1q 和 C3c 结合 ELISA)。为了评估补体激活, 可以进行 CDC 测定 (参见, 例如, Gazzano-Santoro, H. 等人., J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171; Cragg, M. S. 等人., Blood 101 (2003) 1045-1052; 以及 Cragg, M. S. 和 M. J. Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743)。也可以使用本领域已知的方法进行 FcRn 结合和体内清除率/半衰期确定 (参见, 例如, Petkova, S. B. 等人., Int. Immunol. 18 (2006:1759-1769))。

[0541] 具有减少的效应子功能的抗体包括具有 Fc 区残基 238、265、269、270、297、327 和 329 中的一个或多个的置换的那些 (US 6,737,056)。这样的 Fc 突变体包括具有在氨基酸位置 265、269、270、297 和 327 中的两个或更多个位置处的置换的 Fc 突变体, 包括将残基 265 和 297 置换成丙氨酸的所谓的“DANA”Fc 突变体 (US 7,332,581)。

[0542] 描述了具有改善的或减少的与 FcR 的结合的某些抗体变体 (参见, 例如, US 6,737,056; WO 2004/056312, 和 Shields, R. L. 等人, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604)。

[0543] 在某些实施方案中, 抗体变体包含具有改善 ADCC 的一个或多个氨基酸置换 (例如, 在 Fc 区的位置 298、333 和/或 334 (残基的 EU 编号) 处的置换) 的 Fc 区。

[0544] 在一些实施方案中, 在 Fc 区中做出导致改变的 (即, 改善的或减少的) C1q 结合和/或补体依赖性的细胞毒性 (CDC) 的改变, 例如, 如在 US 6,194,551, WO 99/51642, 和 Idusogie, E. E. 等人, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184 中所述。

[0545] 在 US 2005/0014934 中描述了具有增加的半衰期和改善的与新生儿 Fc 受体 (FcRn) 的结合的抗体, 所述新生儿 Fc 受体负责母体 IgG 向胎儿的转移 (Guyer, R. L. 等人, J. Immunol. 117 (1976) 587-593, 和 Kim, J. K. 等人, J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434)。那些抗体包含其中具有一个或多个改善 Fc 区与 FcRn 的结合的置换的 Fc 区。这样的 Fc 变体包括在下述 Fc 区残基中一个或多个处具有置换的那些: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 或 434, 例如, Fc 区残基 434 的置换 (US 7,371,826)。

[0546] 关于 Fc 区变体的其他例子, 也参见 Duncan, A. R. 和 Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; US 5,648,260; US 5,624,821; 和 WO 94/29351。

[0547] d) 半胱氨酸改造的抗体变体

[0548] 在某些实施方案中, 可能合乎需要的是, 建立半胱氨酸改造的抗体, 例如, “硫代 MAb”, 其中抗体的一个或多个残基用半胱氨酸残基置换。在特定实施方案中, 置换的残基出现在抗体的可到达位点处。通过用半胱氨酸置换那些残基, 由此使反应性巯基位于抗体的可到达位点处并且可以用于将抗体缀合至其他结构部分 (诸如药物结构部分或接头-药物

结构部分)以产生免疫缀合物,如本文中进一步所述。在某些实施方案中,可以用半胱氨酸置换以下残基中的任何一个或多个:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。可以如例如US 7,521,541中所述产生半胱氨酸改造的抗体。

[0549] e) 抗体衍生物

[0550] 在某些实施方案中,可以进一步修饰本文中提供的抗体以含有本领域已知的且容易得到的额外非蛋白性结构部分。适合用于抗体衍生的结构部分包括,但不限于,水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括,但不限于,聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧杂环戊烷、聚-1,3,6-三氧杂环己烷、亚乙基/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(同聚物或无规共聚物)和葡聚糖或聚(n-乙基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇同聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如,丙三醇)、聚乙烯醇和它们的混合物。由于它在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛可以具有制造方面的优点。所述聚合物可以具有任何分子量,并可以是分支或不分支的。与抗体连接的聚合物的数目可以变动,并且如果连接超过一个聚合物,它们可以是相同或不同的分子。一般而言,用于衍生的聚合物的数目和/或类型可以基于以下考虑事项确定:包括、但不限于,待改善的抗体的特定特性或功能,抗体衍生物是否将用在确定条件下的疗法中等。

[0551] 在另一个实施方案中,提供了抗体和非蛋白性结构部分的缀合物,所述非蛋白性结构部分可以通过暴露于辐射而选择性地加热。在一个实施方案中,非蛋白性结构部分是碳纳米管(Kam,N.W.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102(2005)11600-11605)。辐射可以具有任何波长,并包括,但不限于这样的波长:其不伤害普通细胞,但是其将非蛋白性结构部分加热至杀伤在抗体-非蛋白性结构部分附近的细胞的温度。

[0552] B. 重组方法和组合物

[0553] 使用重组方法和组合物(例如,如在US 4,816,567中所述)可以生产抗体。在一个实施方案中,提供了分离的核酸,其编码本文描述的抗体。所述核酸可以编码包含所述抗体的VL的氨基酸序列和/或包含所述抗体的VH的氨基酸序列(例如,所述抗体的轻链和/或重链)。在另一个实施方案中,提供了一种或多种包含所述核酸的载体(例如,表达载体)。在另一个实施方案中,提供了包含所述核酸的宿主细胞。在一个这样的实施方案中,宿主细胞包含以下载体(例如,已经用以下载体转化):(1)包含编码包含所述抗体的VL的氨基酸序列和包含所述抗体的VH的氨基酸序列的核酸的载体,或(2)第一载体和第二载体,所述第一载体包含编码包含所述抗体的VL的氨基酸序列的核酸,所述第二载体包含编码包含所述抗体的VH的氨基酸序列的核酸。在一个实施方案中,所述宿主细胞是真核细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如,Y0、NS0、Sp20细胞)。在一个实施方案中,提供了制备本文报道的抗体的方法,其中所述方法包括在适合表达所述抗体的条件下培养上述提供的包含编码所述抗体的核酸的宿主细胞,和任选地,从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体。

[0554] 为了重组生产抗体,将编码抗体的核酸(例如,如上所述)分离,并将其插入到一种或多种载体中用以在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规方法容易地对这样的核酸进行分离和测序(例如,通过使用能够特异性结合编码抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。

[0555] 适用于克隆或表达编码抗体的载体的宿主细胞包括本文中所述的原核或真核细

胞。例如,抗体可以在细菌中制备,尤其是在不需要糖基化和Fc效应子功能时。关于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见,例如,US 5,648,237,US 5,789,199,和US 5,840,523。(也参见Charlton,K.A.,在:Methods in Molecular Biology,Vol.248,Lo,B.K.C.(编),Humana Press,Totowa,NJ(2003),第245-254页中,其描述了抗体片段在大肠杆菌(E.coli.)中的表达)。在表达后,抗体可以分离自可溶级分中的细菌细胞糊,并且可以被进一步纯化。

[0556] 除了原核生物以外,真核微生物诸如丝状真菌或酵母是编码抗体的载体的合适的克隆或表达宿主,包括其糖基化途径已经被“人源化”的真菌和酵母菌株,从而导致具有部分地或完全地人糖基化模式的抗体的生产。参见Gerngross,T.U.,Nat.Biotech.22(2004)1409-1414;和Li,H.等人.,Nat.Biotech.24(2006)210-215。

[0557] 适合用于表达糖基化抗体的宿主细胞也来源于多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴别出众多可以与昆虫细胞结合使用的杆状病毒毒株,特别用于转染草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞。

[0558] 植物细胞培养物也可以用作宿主(参见,例如,US 5,959,177,US 6,040,498,US 6,420,548,US 7,125,978,和US 6,417,429(描述了用于在转基因植物中生产抗体的PLANTIBODIES™技术))。

[0559] 脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如,适合悬浮生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他例子是用SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(293或293细胞,其描述在例如Graham,F.L.等人.,J.Gen Virol.36(1977)59-74中);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠塞尔托利细胞(TM4细胞,其描述在例如Mather,J.P.,Biol.Reprod.23(1980)243-252中);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);buffalo大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,其描述在例如Mather,J.P.等人.,Annals N.Y.Acad.Sci.383(1982)44-68中;MRC 5细胞;和FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR⁻CHO细胞(Urlaub,G.等人.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77(1980)4216-4220);和骨髓瘤细胞系,诸如Y0、NS0和Sp2/0。关于适合用于抗体生产的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见,例如,Yazaki,P.和Wu,A.M.,Methods in Molecular Biology,Vol.248,Lo,B.K.C.(编),Humana Press,Totowa,NJ(2004),第255-268页。

[0560] C. 测定

[0561] 通过本领域已知的各种测定,可以针对它们的物理/化学性能和/或生物学活性鉴别、筛选或表征本文中提供的抗体。示例性的测定在实施例中报道。

[0562] D. 免疫缀合物

[0563] 本发明还提供了免疫缀合物,其包含与一个或多个细胞毒性剂诸如化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如,蛋白毒素,细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素缀合的本文报道的抗体。

[0564] 在一个实施方案中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中将抗体与一个或多个药物缀合,所述药物包括,但不限于,美登素类(maytansinoid)(参见US 5,208,020,US 5,416,064和EP 0 425 235B1);澳瑞他汀(auristatin)诸如单甲基澳瑞他汀药物结构部分DE和DF(MMAE与MMAF)(参见US 5,635,483,US 5,780,588,和US 7,498,298);多拉司他汀

(dolastatin);卡奇霉素(calicheamicin)或其衍生物(参见US 5,712,374,US 5,714,586,US 5,739,116,US 5,767,285,US 5,770,701,US 5,770,710,US 5,773,001,和US 5,877,296;Hinman,L.M.等人,Cancer Res.53(1993)3336-3342;以及Lode,H.N.等人,Cancer Res.58(1998)2925-2928);蒽环类抗生素(anthracycline)诸如道诺霉素(daunomycin)或多柔比星(doxorubicin)(参见Kratz,F.等人,Curr.Med.Chem.13(2006)477-523;Jeffrey,S.C.,等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.16(2006)358-362;Torgov,M.Y.,等人,Bioconj.Chem.16(2005)717-721;Nagy,A.,等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97(2000)829-834;Dubowchik,G.M.,等人,Bioorg.&Med.Chem.Letters 12(2002)1529-1532;King,H.D.,等人,J.Med.Chem.45(2002)4336-4343;和US 6,630,579);甲氨蝶呤(methotrexate);长春地辛(vindesine);紫杉烷(taxane)诸如多西他赛(docetaxel)、紫杉醇(paclitaxel)、拉罗他赛(larotaxel)、替司他赛(tesetaxel)和奥他赛(ortataxel);单端孢霉烯(a trichothecene);和CC1065。

[0565] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含与酶活性毒素或其片段缀合的如本文中所所述的抗体,所述酶活性毒素或其片段包括、但不限于,白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单孢菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒蛋白A链、 α -帚曲毒蛋白(alpha-sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(croton)、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、白树毒素(gelonin)、丝裂蛋白(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢菌毒素(tricothecenes)。

[0566] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含与放射性原子缀合的如本文中所所述的抗体,从而形成放射性缀合物。多种放射性同位素可用于生产放射性缀合物。例子包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 和Lu的放射性同位素。当将放射性缀合物用于检测时,它可以包括用于闪烁法研究的放射性原子,例如 Tc^{99m} 或 I^{123} ,或用于核磁共振(NMR)成像(也被称作磁共振成像,MRI)的自旋标记,诸如碘-123(再次出现)、碘-131、镅-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0567] 可以用多种双官能蛋白质偶联剂来制备抗体和细胞毒性剂的缀合物,如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亚氨基硫烷(IT)、亚胺酯的双官能衍生物(诸如盐酸二亚胺代己二酸二甲酯(dimethyl adipimidate HCl))、活性酯(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(诸如戊二醛)、二-叠氮基化合物(诸如二(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺)、二-重氮基衍生物(诸如二(对-重氮基苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以按照Vitetta,E.S.等人,Science 238(1987)1098-1104中所述制备蓖麻蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酰基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸酯(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂。参见WO 94/11026。接头可以是促进细胞毒性药物在细胞中释放的“可切割接头”。例如,可以使用酸敏感接头、肽酶敏感接头、光敏感接头、二甲基接头或含有二硫化物的接头(Chari,R.V.等人,Cancer Res.52(1992)127-131;US 5,208,020)。

[0568] 本文的免疫缀合物或ADC明确考虑但不限于用包括、但不限于如下的市售交联剂(例如来自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)制备的这类缀合物: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 磺基-EMCS, 磺基-GMBS, 磺基-KMUS, 磺基-MBS, 磺基-SIAB, 磺基-SMCC, 和磺基-SMPB, 以及SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基苄)苯甲酸酯)。

[0569] E. 药物制剂

[0570] 通过将具有期望纯度的这类抗体与一种或多种任选的药理学上可接受的载体(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A. (编) (1980))混合, 可以以冻干制剂或水溶液的形式制备如本文中所述的多特异性抗体的药物制剂。药理学上可接受的载体在采用的剂量和浓度对接受者而言通常是无毒的, 且包括, 但不限于: 缓冲剂诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵; 氯化六甲双铵; 苯扎氯铵; 苄索氯铵; 苯酚、丁醇或苯甲醇; 对羟基苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯; 儿茶酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 和间甲酚); 低分子量(小于约10个残基)多肽; 蛋白, 诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水聚合物, 诸如聚(乙烯吡咯烷酮); 氨基酸, 诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖类、二糖类和其他碳水化合物类, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂诸如EDTA; 糖类, 诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇; 形成盐的抗衡离子, 诸如钠; 金属络合物(例如, Zn-蛋白复合物); 和/或非离子型表面活性剂, 诸如聚乙二醇(PEG)。示例性的药理学上可接受的载体在本文中还包括间质(interstitial)药物分散剂, 诸如可溶性的中性活性的透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP), 例如, 人可溶性的PH-20透明质酸酶糖蛋白, 诸如rhuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)。包括rhuPH20在内的某些示例性sHASEGP和使用方法描述在US 2005/0260186和US 2006/0104968中。在一方面中, 将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶(诸如软骨素酶)组合。

[0571] 在US 6,267,958中描述了示例性的冻干的抗体制剂。水性抗体制剂包括在US 6,171,586和WO 2006/044908中描述的那些, 后者制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0572] 本文中的制剂还可以含有超过一种正在治疗的特定适应证所需的活性成分, 优选地具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些。例如, 可能合乎需要的是, 进一步提供抗-ANG2抗体或抗-VEGF抗体。这样的活性成分适当地以对于预期目的而言有效的量联合存在。

[0573] 活性成分可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(分别例如, 羟基甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、胶态药物递送系统(例如, 脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)或大乳剂中。这样的技术公开在Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A. (编) (1980)中。

[0574] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的合适的例子包括含有所述抗体的固体疏水聚合物的半透性基质, 所述基质呈成形制品(例如薄膜或微胶囊)的形式。

[0575] 要用于体内施用的制剂通常是无菌的。可以容易地实现无菌度, 例如, 通过穿过无菌过滤膜过滤。

[0576] F. 治疗方法和组合物

[0577] 本文提供的任何多特异性抗体可以用在治疗方法中。

[0578] 在一方面中, 提供了用作药物的多特异性抗体。在其他方面, 提供了用于治疗眼血

管疾病、优选是黄斑变性的多特异性抗体。在某些实施方案中,提供用于治疗方法的多特异性抗体。在某些实施方案中,本发明提供用在治疗患有眼血管疾病、优选黄斑变性的个体的方法中的多特异性抗体,所述方法包括向所述个体施用有效量的多特异性抗体。在一个这样的实施方案中,所述方法进一步包括向所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如下文所述。在其他实施方案中,本发明提供用于抑制血管发生的多特异性抗体。在某些实施方案中,本发明提供用于抑制个体的血管发生的方法中的多特异性抗体,所述方法包括向所述个体施用有效量的多特异性抗体,从而抑制血管发生。按照上述任意实施方案所述的“个体”优选是人。

[0579] 在另一方面中,本发明提供多特异性抗体在药物的生产或制备中的应用。在一个实施方案中,所述药物用于治疗眼血管疾病,优选是黄斑变性。在另一个实施方案中,药物用在治疗眼血管疾病、优选黄斑变性的方法中,所述方法包括向患有眼血管疾病、优选黄斑变性的个体施用有效量的所述药物。在一个这样的实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如下文所述。在另一个实施方案中,所述药物用于抑制血管发生。在另一个实施方案中,所述药物用在抑制个体血管发生的方法中,所述方法包括向所述个体施用有效量的所述药物,从而抑制血管发生。按照上述任意实施方案所述的“个体”可以是人。

[0580] 在另一方面中,本发明提供用于治疗眼血管疾病、优选黄斑变性的方法。在一个实施方案中,所述方法包括向患有这样的眼血管疾病、优选黄斑变性的个体施用有效量的多特异性抗体。在一个这样的实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,如下文所述。按照上述任意实施方案所述的“个体”可以是人。

[0581] 在另一方面中,本发明提供用于抑制个体中血管发生的方法。在一个实施方案中,所述方法包括向所述个体施用有效量的多特异性抗体,从而抑制血管发生。在一个实施方案中,“个体”是人。

[0582] 在另一方面中,本发明提供包含本文提供的任一种多特异性抗体的药物制剂,例如,用在上述任一种治疗方法中。在一个实施方案中,药物制剂包含本文提供的任一种多特异性抗体和药学上可接受的载体。在另一个实施方案中,药物制剂包含本文提供的任一种多特异性抗体和至少一种另外的治疗剂,例如,如下文所述。

[0583] 本发明的抗体可以单独地或与其他药剂联合地用在治疗中。例如,本发明的抗体可以与至少一种另外的治疗剂一起共同施用。在某些实施方案中,另外的治疗剂是抗-VEGF抗体或抗-ANG2抗体。

[0584] 上面指出的这样的联合治疗包括组合施用(其中将两种或更多种治疗剂包括在同一制剂或分开的制剂中)和分开施用,在后一种情况下,本发明的抗体的施用可以发生在一种或多种另外的治疗剂的施用之前、同时和/或之后。在一个实施方案中,多特异性抗体的施用和另外的治疗剂的施用发生在彼此的约一个月内,或在约一、二或三周内,或在约一天、两天、三天、四天、五天或六天内。

[0585] 本发明的抗体(和任何另外的治疗剂)可以通过任意合适的方式施用,包括胃肠外、肺内和鼻内施用,并且,如果需要,用于局部治疗,病灶内施用。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。定量给药可以通过任意适当的途径,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射进行,部分地取决于施用是短暂的还是长期的。各种定量给药时间

方案包括但不限于在不同时间点单次或多次施用,推注施用,并且在本文中考虑脉冲输注。

[0586] 以与良好医学实践一致的方式,配制、定量给药和施用本发明的抗体。在该背景下考虑的因素包括正在治疗的特定病症、正在治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床状况、病症的起因、药剂的递送位点、施用方法、施用的时间方案和医学从业人员已知的其他因素。抗体不需要、但任选地与一种或多种当前用于预防或治疗讨论的病症的药剂一起配制。这样的其他药剂的有效量取决于存在于所述制剂中的抗体的量,病症或治疗的类型,和上文讨论的其他因素。这些通常以相同剂量并且以本文所述的施用途径使用,或以本文所述的剂量的约1至99%、或以经验上/临床上确定为合适的任意剂量和任意途径使用。

[0587] 为了预防或治疗疾病,本发明的抗体(当单独地或与一种或多种其他另外的治疗剂联合使用时)的适当剂量将取决于要治疗的疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重程度和进程、施用抗体是为了预防还是治疗目的、以前的治疗、患者的临床史和对抗体的应答、以及主治医师的判断。适当地一次性地或在一系列治疗中将抗体施用给患者。取决于疾病的类型和严重程度,约1 μ g/kg至15mg/kg(例如,0.5mg/kg–10mg/kg)的抗体可以是用于施用给患者的最初候选剂量,例如,不论通过一次或多次分开施用,还是通过连续输注。一个典型的日剂量可能是在约1 μ g/kg至100mg/kg或更多的范围内,取决于上面提及的因素。对于在几天或更长时间内的重复施用,取决于病症,所述治疗通常持续至发生期望的疾病症状抑制作用。抗体的一种示例性剂量是在约0.05mg/kg至约10mg/kg的范围内。因而,可以将一剂或多剂约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg(或它们的任意组合)的剂量施用给患者。可以间歇地(例如,每周或每三周)施用这样的剂量(例如,使得患者接受约两剂至约二十剂、或例如约六剂抗体)。可以施用最初的较高负荷剂量(loading dose),继之以一个或多个较低剂量。但是,其他剂量方案可能是有用的。通过常规技术和测定容易地监测该治疗的进展。

[0588] 应当理解,使用本发明的免疫缀合物替代多特异性抗体或者在多特异性抗体之外还使用本发明的免疫缀合物,可以实现以上制剂或治疗方法中的任一种。

[0589] III. 制品

[0590] 在发明的另一方面,提供了制品,其含有用于治疗、预防和/或诊断上文所述的病症的材料。所述制品包含容器和贴在容器上或与容器结合的标签或包装说明书。适当的容器包括,例如,瓶子、小瓶、注射器、静脉内(IV)溶液袋等。容器可以由多种材料制成,如玻璃或塑料。所述容器容纳单独的组合物或与另一种有效地治疗、预防和/或诊断病症的组合物组合的组合物,且可以具有无菌入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的小瓶)。组合物内的至少一种活性剂是本发明的抗体。所述标签或包装说明书指示,所述组合物用于治疗选择的病症。此外,制品可以包含:(a)其中包含组合物的第一容器,其中所述组合物包含本发明的抗体;和(b)其中包含组合物的第二容器,其中所述组合物包含另一种细胞毒性治疗剂或其他的治疗剂。本发明的该实施方案中的制品还可以包含包装说明书,所述包装说明书指示所述组合物可以用于治疗特定病症。备选地,或另外,制品可以进一步包含第二(或第三)容器,所述容器包含药学上可接受的缓冲液,诸如抑制细菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。其可以进一步包含从商业和使用者观点看合乎需要的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0591] 应当理解,以上制品中的任一种可以包括本发明的免疫缀合物以替代抗-IL-1 β 抗体或者与抗-IL-1 β 抗体组合。

[0592] IV.具体的实施方案

[0593] 1.一种双特异性抗体,其特异性结合选自由以下组成的组的两种不同的抗原:人ANG2,人VEGF,人IL-1 β 和人PDGF-B。

[0594] 2.一种双特异性抗体,其特异性结合i) 人ANG2,和ii) 人IL-1 β 或人PDGF-B。

[0595] 3.一种双特异性抗体,其特异性结合两种:i) 人VEGF,和ii) 人IL-1 β 或人PDGF-B。

[0596] 4.一种双特异性抗体,其特异性结合人IL-1 β 和人PDGF-B。

[0597] 5.根据实施方案1-4中任一项所述的抗体,其中所述抗体特异性结合人IL-1 β ,并且包含:

[0598] a) 包含以下的重链可变结构域:

[0599] (a) 包含SEQ ID NO:02的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的HVR-H2,和 (c) 包含SEQ ID NO:05的氨基酸序列的HVR-H3,或

[0600] (a) 包含SEQ ID NO:07的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:08的氨基酸序列的HVR-H2,和 (c) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3,或

[0601] (a) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-H2,和 (c) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H3,

[0602] 和

[0603] 包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L2;和 (c) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L3,或

[0604] a) 包含以下的重链可变结构域:包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2,和 (c) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H3,和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-L2;和 (c) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L3。

[0605] 6.根据实施方案1-5中任一项所述的抗体,其中所述抗体特异性结合人IL-1 β ,并且包含:

[0606] a) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:07的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:08的氨基酸序列的HVR-H2,和 (c) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3,和

[0607] 包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L2;和 (c) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L3。

[0608] 7.根据实施方案1-6中任一项所述的抗体,其中所述抗体特异性结合人PDGF-B,并且包含:

[0609] a) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-H2,和 (c) 包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HVR-H3,和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HVR-L2;和 (c) 包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-

L3,

[0610] 或

[0611] b) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的HVR-L3,

[0612] 或

[0613] c) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的HVR-L3。

[0614] 8. 根据实施方案1-7中任一项所述的抗体, 其中所述抗体特异性结合人PDGF-B, 并且包含: 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-L3。

[0615] 9. 根据实施方案1-7中任一项所述的抗体, 其中所述抗体特异性结合人PDGF-B, 并且包含: 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的HVR-L3。

[0616] 10. 根据实施方案1-7中任一项所述的抗体, 其中所述抗体特异性结合人PDGF-B, 并且包含: 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的HVR-L3。

[0617] 11. 根据实施方案1、2和5-10中任一项所述的抗体, 其中所述抗体特异性结合人ANG2, 并且包含:

[0618] a) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (c) 包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的HVR-L3,

[0619] 或

[0620] b) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的HVR-L1; (b)

包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的HVR-L3,

[0621] 或

[0622] c) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的HVR-L2; 和(c) 包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的HVR-L3,

[0623] 或

[0624] d) 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的HVR-L2; 和(c) 包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的HVR-L3。

[0625] 12. 根据实施方案1、2和5-11中任一项所述的抗体, 其中所述抗体特异性结合人ANG2, 并且包含: 包含以下的重链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的HVR-H2, 和(c) 包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的HVR-H3, 和包含以下的轻链可变结构域: (a) 包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的HVR-L1; (b) 包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的HVR-L2; 和(c) 包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的HVR-L3。

[0626] 13. 根据实施方案1、3和5-12中任一项所述的抗体, 其中所述抗体特异性结合人VEGF, 并且包含:

[0627] a) 包含在SEQ ID NO:107的重链可变结构域中的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3和包含在SEQ ID NO:108的重链可变结构域中的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,

[0628] 或

[0629] b) 包含在SEQ ID NO:109的重链可变结构域中的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3和包含在SEQ ID NO:110的重链可变结构域中的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3。

[0630] 14. 根据实施方案1、3和5-13中任一项所述的抗体, 其中所述抗体特异性结合人VEGF, 并且包含分别在SEQ ID NO:107和SEQ ID NO:108中的HC和LC序列, 包括这些序列的翻译后修饰。

[0631] 15. 根据实施方案1、3和5-13中任一项所述的抗体, 其中所述抗体特异性结合人VEGF, 并且包含分别在SEQ ID NO:109和SEQ ID NO:110中的HC和LC序列, 包括这些序列的翻译后修饰。

[0632] 16. 根据实施方案1-15中任一项所述的抗体, 其中所述抗体是人IgG1亚类或人IgG4亚类的。

[0633] 17. 根据实施方案1-16中任一项所述的抗体, 其中所述抗体是具有κ轻链的人IgG1亚类的。

[0634] 18. 根据实施方案1-17中任一项所述的抗体, 其中所述抗体是单克隆抗体。

[0635] 19. 根据实施方案1-18中任一项所述的抗体, 其中所述抗体是双特异性抗体。

[0636] 20. 根据实施方案1-19中任一项所述的抗体, 其中所述抗体是包含以下的二价双特异性抗体:

[0637] a) 特异性结合第一抗原的抗体的第一轻链和第一重链, 和

[0638] b) 特异性结合第二抗原的抗体的第二轻链和第二重链, 其中第二

[0639] 轻链和第二重链的可变结构域VL和VH彼此替换。

[0640] 21. 根据实施方案20所述的抗体, 其中所述抗体包含:

[0641] i) 在a) 中第一轻链的恒定结构域CL中, 位置124的氨基酸独立地被置换为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H) (按照Kabat编号) (在一个优选的实施方案中, 独立地被置换为赖氨酸(K)或精氨酸(R)), 并且, 其中在a) 中第一重链的恒定结构域CH1中, 位置147的氨基酸或位置213的氨基酸独立地被置换为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D) (按照Kabat EU索引编号),

[0642] 或

[0643] ii) 在b) 中第二轻链的恒定结构域CL中, 位置124的氨基酸独立地被置换为赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H) (按照Kabat编号) (在一个优选的实施方案中, 独立地被置换为赖氨酸(K)或精氨酸(R)), 并且, 其中在b) 中第二重链的恒定结构域CH1中, 位置147的氨基酸或位置213的氨基酸独立地被置换为谷氨酸(E)或天冬氨酸(D) (按照Kabat EU索引编号)。

[0644] 22. 根据实施方案20-21中任一项所述的抗体, 其中所述抗体在第二重链的恒定结构域CL中包含置换为K的位置124和123的氨基酸 (按照Kabat EU索引编号)。

[0645] 23. 根据实施方案20-22中任一项所述的抗体, 其中所述抗体在第二轻链的恒定结构域CH1中包含置换为E的位置147和213的氨基酸 (按照Kabat的EU索引编号)。

[0646] 24. 根据实施方案20-23中任一项所述的抗体, 其中所述抗体在第一轻链的恒定结构域CL中包含置换为K的位置124和123的氨基酸, 并且在第一重链的恒定结构域CH1中包含置换为E的位置147和213的氨基酸 (按照Kabat EU索引编号)。

[0647] 25. 根据实施方案20-24中任一项所述的抗体, 其中所述抗体在第二重链的恒定结构域CL中包含置换为K的位置124和123的氨基酸, 并且, 其中在第二轻链的恒定结构域CH1中, 位置147和213的氨基酸被置换为E, 并且, 在第一轻链的可变结构域VL中, 位置38的氨基酸被置换为K, 在第一重链的可变结构域VH中, 位置39的氨基酸被置换为E, 在第二重链的可变结构域VL中, 位置38的氨基酸被置换为K, 并且在第二轻链的可变结构域VH中, 位置39的氨基酸被置换为E (按照Kabat EU索引编号)。

[0648] 26. 根据实施方案1-19中任一项所述的抗体, 其中所述抗体是包含以下的二价双特异性抗体:

[0649] a) 特异性结合第一抗原的抗体的第一轻链和第一重链, 和

[0650] b) 特异性结合第二抗原的抗体的第二轻链和第二重链, 其中第二轻链和第二重链的可变结构域VL和VH彼此替换, 并且, 其中第二轻链和第二重链的恒定结构域CL和CH1彼此替换。

[0651] 27. 根据实施方案1-19中任一项所述的抗体, 其中所述抗体是包含以下的二价双特异性抗体:

[0652] a) 特异性结合第一抗原的抗体的第一轻链和第一重链, 和

[0653] b) 特异性结合第二抗原的抗体的第二轻链和第二重链,其中第二轻链和第二重链的恒定结构域CL和CH1彼此替换。

[0654] 28. 根据实施方案1-19中任一项所述的抗体,其中所述抗体是包含以下的多特异性抗体:

[0655] a) 全长抗体,其特异性结合第一抗原并且由两条抗体重链和两条抗体轻链组成,和

[0656] b) 一个、两个、三个或四个单链Fab片段,其特异性结合一至四种其他抗原(即,第二和/或第三和/或第四和/或第五抗原,优选地,特异性结合一种其他抗原,即第二抗原),

[0657] 其中b)中所述的单链Fab片段通过在所述全长抗体的重链或轻链的C-或N-端的肽接头融合到a)中所述的全长抗体上。

[0658] 29. 根据实施方案1-19中任一项所述的抗体,其中所述抗体是包含以下的三价双特异性抗体:

[0659] a) 全长抗体,其特异性结合第一抗原并且由两条抗体重链和两条抗体轻链组成,

[0660] b) 第一多肽,其由以下组成:

[0661] ba) 抗体重链可变结构域(VH),

[0662] 或

[0663] bb) 抗体重链可变结构域(VH)和抗体恒定结构域1(CH1),

[0664] 其中所述第一多肽通过肽接头以其VH结构域的N-端融合到所述

[0665] 全长抗体的两条重链中的一条的C-端,

[0666] c) 第二多肽,其由以下组成:

[0667] ca) 抗体轻链可变结构域(VL),

[0668] 或

[0669] cb) 抗体轻链可变结构域(VL)和抗体轻链恒定结构域(CL),

[0670] 其中所述第二多肽通过肽接头以VL结构域的N-端融合到所述全长抗体的两条重链中的另一条的C-端,

[0671] 并且

[0672] 其中第一多肽的抗体重链可变结构域(VH)和第二多肽的抗体轻链

[0673] 可变结构域(VL)一起形成特异性结合第二抗原的抗原-结合位点。

[0674] 30. 根据实施方案29所述的抗体,其中b)中多肽的抗体重链可变结构域(VH)与c)中多肽的抗体轻链可变结构域(VL)通过在下述位置之间引入二硫键而经由链间二硫键桥连接起来并稳定:

[0675] i) 重链可变结构域位置44与轻链可变结构域位置100,或

[0676] ii) 重链可变结构域位置105与轻链可变结构域位置43,或

[0677] iii) 重链可变结构域位置101与轻链可变结构域位置100(总是按照Kabat EU索引编号)。

[0678] 31. 根据实施方案1-19中任一项所述的抗体,其中所述抗体是包含以下的三特异性或四特异性的抗体:

[0679] a) 特异性结合第一抗原的全长抗体的第一轻链和第一重链,和

[0680] b) 特异性结合第二抗原的全长抗体的第二(修饰的)轻链和第二(修饰的)重链,其

中可变结构域VL和VH彼此替换,和/或其中恒定结构域CL和CH1彼此替换,和

[0681] c) 其中特异性结合一种或两种其他抗原(即,第三和/或第四抗原)的一至四种抗原结合肽经由肽接头融合到a)和/或b)的轻链或重链的C-或N-端。

[0682] 32. 根据实施方案1-19中任一项所述的抗体,其中所述抗体是包含以下的双特异性的四价抗体:

[0683] a) 抗体的两条轻链和两条重链,其特异性结合第一抗原(并且包含两个Fab片段),

[0684] b) 抗体的两个另外的Fab片段,其特异性结合第二抗原,其中所述另外的Fab片段均经由肽接头分别融合到a)的重链的C-或N-端,

[0685] 并且

[0686] 其中在所述Fab片段中进行下述修饰:

[0687] i) 在a)的两个Fab片段中,或在b)的两个Fab片段中,可变结构域VL和VH彼此替换,和/或恒定结构域CL和CH1彼此替换,

[0688] 或

[0689] ii) 在a)的两个Fab片段中,可变结构域VL和VH彼此替换,并且恒定结构域CL和CH1彼此替换,

[0690] 并且

[0691] 在b)的两个Fab片段中,可变结构域VL和VH彼此替换,或恒定结构域CL和CH1彼此替换,

[0692] 或

[0693] iii) 在a)的两个Fab片段中,可变结构域VL和VH彼此替换,或恒定结构域CL和CH1彼此替换,

[0694] 并且

[0695] 在b)的两个Fab片段中,可变结构域VL和VH彼此替换,并且恒定结构域CL和CH1彼此替换,

[0696] 或

[0697] iv) 在a)的两个Fab片段中,可变结构域VL和VH彼此替换,并且在b)的两个Fab片段中,恒定结构域CL和CH1彼此替换,

[0698] 或

[0699] v) 在a)的两个Fab片段中,恒定结构域CL和CH1彼此替换,并且在b)的两个Fab片段中,可变结构域VL和VH彼此替换。

[0700] 33. 根据实施方案1-19中任一项所述的抗体,其中所述抗体是包含以下的双特异性的四价抗体:

[0701] a) 第一抗体的(修饰的)重链,所述第一抗体特异性结合第一抗原并且包含第一VH-CH1结构域对,其中所述第一抗体的第二VH-CH1结构域对的N-端经由肽接头融合在所述重链的C-端,

[0702] b) a)所述的第一抗体的两条轻链,

[0703] c) 第二抗体的(修饰的)重链,所述第二抗体特异性结合第二抗原并且包含第一VH-CL结构域对,其中所述第二抗体的第二VH-CL结构域对的N-端经由肽接头融合在所述重链的C-端,和

[0704] d) c) 所述的第二抗体的两条 (修饰的) 轻链, 它们分别包含CL-CH1 结构域对。

[0705] 34. 根据实施方案1-19中任一项所述的抗体, 其中所述抗体是包含以下的双特异性抗体:

[0706] a) 特异性结合第一抗原的第一全长抗体的重链和轻链, 和

[0707] b) 特异性结合第二抗原的第二全长抗体的重链和轻链, 其中所述重链的N-端经由肽接头连接在所述轻链的C-端。

[0708] 35. 根据实施方案1-19中任一项所述的抗体, 其中所述抗体是包含以下的双特异性抗体:

[0709] a) 全长抗体, 其特异性结合第一抗原并且由两条抗体重链和两条抗体轻链组成, 和

[0710] b) Fv片段, 其特异性结合第二抗原并包含VH²结构域和VL²结构域, 其中两个结构域通过二硫键桥彼此连接,

[0711] 其中仅有VH²结构域和VL²结构域中的一个经由肽接头融合到特异性结合第一抗原的全长抗体的重链或轻链。

[0712] 36. 根据实施方案1-35中任一项所述的抗体, 其中所述抗体包含第一Fc-区多肽和第二Fc-区多肽, 并且

[0713] 其中

[0714] i) 第一Fc-区多肽选自包括下述的组:

[0715] -人IgG1 Fc-区多肽,

[0716] -人IgG2 Fc-区多肽,

[0717] -人IgG3 Fc-区多肽,

[0718] -人IgG4 Fc-区多肽,

[0719] -具有突变L234A, L235A的人IgG1 Fc-区多肽,

[0720] -具有突变Y349C, T366S, L368A, Y407V的人IgG1 Fc-区多肽,

[0721] -具有突变S354C, T366S, L368A, Y407V的人IgG1 Fc-区多肽,

[0722] -具有突变L234A, L235A, Y349C, T366S, L368A, Y407V的人IgG1 Fc-区多肽,

[0723] -具有突变L234A, L235A, S354C, T366S, L368A, Y407V的人IgG1 Fc-区多肽,

[0724] -具有突变P329G的人IgG1 Fc-区多肽,

[0725] -具有突变L234A, L235A, P329G的人IgG1 Fc-区多肽,

[0726] -具有突变P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V的人IgG1 Fc-区多肽,

[0727] -具有突变P329G, S354C, T366S, L368A, Y407V的人IgG1 Fc-区多肽,

[0728] -具有突变L234A, L235A, P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V的人IgG1 Fc-区多肽,

[0729] -具有突变L234A, L235A, P329G, S354C, T366S, L368A, Y407V的人IgG1 Fc-区多肽,

[0730] -具有突变S228P, L235E的人IgG4 Fc-区多肽,

[0731] -具有突变S228P, L235E, P329G的人IgG4 Fc-区多肽,

[0732] -具有突变Y349C, T366S, L368A, Y407V的人IgG4 Fc-区多肽,

[0733] -具有突变S354C, T366S, L368A, Y407V的人IgG4 Fc-区多肽,

[0734] -具有突变S228P, L235E, Y349C, T366S, L368A, Y407V的人IgG4 Fc-区多肽,

[0735] -具有突变S228P, L235E, S354C, T366S, L368A, Y407V的人IgG4 Fc-区多肽,

- [0736] -具有突变P329G的人IgG4 Fc-区多肽,
- [0737] -具有突变P329G,Y349C,T366S,L368A,Y407V的人IgG4 Fc-区多肽,
- [0738] -具有突变P329G,S354C,T366S,L368A,Y407V的人IgG4 Fc-区多肽,
- [0739] -具有突变S228P,L235E,P329G,Y349C,T366S,L368A,Y407V的人IgG4 Fc-区多肽,
- [0740] -具有突变S228P,L235E,P329G,S354C,T366S,L368A,Y407V的人IgG4 Fc-区多肽,
- [0741] -具有突变K392D的人IgG1,IgG2或IgG4,和
- [0742] -具有N392D的人IgG3,
- [0743] 并且
- [0744] ii) 第二Fc-区多肽选自包括下述的组:
- [0745] -人IgG1 Fc-区多肽,
- [0746] -人IgG2 Fc-区多肽,
- [0747] -人IgG3 Fc-区多肽,
- [0748] -人IgG4 Fc-区多肽,
- [0749] -具有突变L234A,L235A的人IgG1 Fc-区多肽,
- [0750] -具有突变S354C,T366W的人IgG1 Fc-区多肽,
- [0751] -具有突变Y349C,T366W的人IgG1 Fc-区多肽,
- [0752] -具有突变L234A,L235A,S354C,T366W的人IgG1 Fc-区多肽,
- [0753] -具有突变L234A,L235A,Y349C,T366W的人IgG1 Fc-区多肽,
- [0754] -具有突变P329G的人IgG1 Fc-区多肽,
- [0755] -具有突变L234A,L235A,P329G的人IgG1 Fc-区多肽,
- [0756] -具有突变P329G,S354C,T366W的人IgG1 Fc-区多肽,
- [0757] -具有突变P329G,Y349C,T366W的人IgG1 Fc-区多肽,
- [0758] -具有突变L234A,L235A,P329G,S354C,T366W的人IgG1 Fc-区多肽,
- [0759] -具有突变L234A,L235A,P329G,Y349C,T366W的人IgG1 Fc-区多肽,
- [0760] -具有突变S228P,L235E的人IgG4 Fc-区多肽,
- [0761] -具有突变S228P,L235E,P329G的人IgG4 Fc-区多肽,
- [0762] -具有突变S354C,T366W的人IgG4 Fc-区多肽,
- [0763] -具有突变Y349C,T366W的人IgG4 Fc-区多肽,
- [0764] -具有突变S228P,L235E,S354C,T366W的人IgG4 Fc-区多肽,
- [0765] -具有突变S228P,L235E,Y349C,T366W的人IgG4 Fc-区多肽,
- [0766] -具有突变P329G的人IgG4 Fc-区多肽,
- [0767] -具有突变P329G,S354C,T366W的人IgG4 Fc-区多肽,
- [0768] -具有突变P329G,Y349C,T366W的人IgG4 Fc-区多肽,
- [0769] -具有突变S228P,L235E,P329G,S354C,T366W的人IgG4 Fc-区多肽,
- [0770] -具有突变S228P,L235E,P329G,Y349C,T366W的人IgG4 Fc-区多肽,
- [0771] -具有突变D399K,D356K,和/或E357K的人IgG1,和
- [0772] -具有突变D399K,E356K,和/或E357K的人IgG2,IgG3或IgG4。
- [0773] 37. 根据实施方案1-35中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含第一Fc-区多肽和第二Fc-区多肽,并且

[0774] 其中

[0775] i) 第一Fc-区多肽是人IgG1 Fc-区多肽并且第二Fc-区多肽是人IgG1 Fc-区多肽, 或

[0776] ii) 第一Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A的人IgG1 Fc-区多肽, 并且第二Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A的人IgG1 Fc-区多肽, 或

[0777] iii) 第一Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,P329G的人IgG1 Fc-区多肽, 并且第二Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,P329G的人IgG1 Fc-区多肽, 或

[0778] iv) 第一Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,S354C,T366W的人IgG1 Fc-区多肽, 并且第二Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,Y349C,T366S,L368A,Y407V的人IgG1 Fc-区多肽, 或

[0779] v) 第一Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,P329G,S354C,T366W的人IgG1 Fc-区多肽, 并且第二Fc-区多肽是具有突变L234A,L235A,P329G,Y349C,T366S,L368A,Y407V的人IgG1 Fc-区多肽, 或

[0780] vi) 第一Fc-区多肽是人IgG4 Fc-区多肽并且第二Fc-区多肽是人IgG4 Fc-区多肽, 或

[0781] vii) 第一Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E的人IgG4 Fc-区多肽, 并且第二Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E的人IgG4 Fc-区多肽, 或

[0782] viii) 第一Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,P329G的人IgG4 Fc-区多肽, 并且第二Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,P329G的人IgG4 Fc-区多肽, 或

[0783] ix) 第一Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,S354C,T366W的人IgG4 Fc-区多肽, 并且第二Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,Y349C,T366S,L368A,Y407V的人IgG4 Fc-区多肽, 或

[0784] x) 第一Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,P329G,S354C,T366W的人IgG4 Fc-区多肽, 并且第二Fc-区多肽是具有突变S228P,L235E,P329G,Y349C,T366S,L368A,Y407V的人IgG4 Fc-区多肽。

[0785] 38. 根据实施方案1-37中任一项所述的抗体, 其中所述抗体包含第一Fc-区多肽和第二Fc-区多肽, 并且

[0786] 其中所述抗体在第一Fc-区多肽中和在第二Fc-区多肽中包含下述突

[0787] 变组合:

[0788] i) I253A,H310A,和H435A, 或

[0789] ii) H310A,H433A,和Y436A, 或

[0790] iii) L251D,L314D,和L432D, 或

[0791] iv) i) 至iii) 的组合。

[0792] 39. 根据实施方案1-37中任一项所述的抗体, 其中所述抗体包含第一Fc-区多肽和第二Fc-区多肽, 并且其中

[0793] a) 第一和第二Fc-区多肽均为IgG1或IgG4亚类的(来源于人起源的), 并且在第一Fc-区多肽中包含选自下述突变中的一个或两个: i) I253A,H310A和H435A的组, 或ii) H310A,H433A和Y436A的组, 或iii) L251D,L314D和L432D的组(按照Kabat EU索引编号系统编号) 以及在第二Fc-区多肽中包含选自包括突变L251D、I253A、H310A、L314D、L432D、

H433A、H435A和Y436A的组(按照Kabat EU索引编号系统编号)中的一个或两个突变,从而使得第一和第二Fc-区多肽中的所有突变在一起发生时导致在变体(人)IgG种类Fc-区中包含下述突变:i) I253A,H310A和H435A,或ii) H310A,H433A和Y436A,或iii) L251D,L314D和L432D,

[0794] 或

[0795] b) 第一和第二Fc-区多肽均为人IgG1或人IgG4亚类的(即来源于人起源的),并且都在所述Fc-区中包含突变I253A/H310A/H435A或H310A/H433A/Y436A或L251D/L314D/L432D或它们的组合(按照Kabat EU索引编号系统编号),由此在第一或第二Fc-区多肽中存在所有突变,或在第一Fc-区多肽中存在一个或两个突变并且在第二Fc-区多肽中存在一个或两个突变,从而使得当第一和第二Fc-区多肽中的所有突变在同时发生时导致在所述Fc-区中包含下述突变:i) I253A,H310A和H435A,或ii) H310A,H433A和Y436A,或iii) L251D,L314D和L432D,

[0796] 或

[0797] c) 第一和第二Fc-区多肽均为人IgG1或人IgG4亚类的(即来源于人起源的),并且在第一以及第二Fc-区多肽中包含突变I253A/H310A/H435A或H310A/H433A/Y436A或L251D/L314D/L432D(按照Kabat EU索引编号系统编号),或在第一Fc-区多肽中包含突变组合I253A/H310A/H435A并且在第二Fc-区多肽中包含突变组合H310A/H433A/Y436A(按照Kabat EU索引编号系统编号)。

[0798] 40. 根据实施方案1-37中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含第一Fc-区多肽和第二Fc-区多肽,并且其中

[0799] a) 第一变体Fc-区多肽衍生自第一亲本IgG种类Fc-区多肽,并且第二变体Fc-区多肽衍生自第二亲本IgG种类Fc-区多肽,其中第一亲本IgG种类Fc-区多肽与第二亲本IgG种类Fc-区多肽相同或不同,并且

[0800] b) 除了第一亲本IgG种类Fc-区多肽与第二亲本IgG种类Fc-区多肽不同的那些氨基酸残基之外,第一变体Fc-区多肽与第二变体Fc-区多肽还在一个或多个氨基酸残基处不同,并且

[0801] c) 包含第一变体Fc-区多肽和第二变体Fc-区多肽的IgG种类Fc-区具有的针对人Fc-受体的亲和力不同于包含a)中第一亲本IgG种类Fc-区多肽和a)中第二亲本IgG种类Fc-区多肽的IgG种类Fc-区的亲和力,

[0802] 其中第一Fc-区多肽或第二Fc-区多肽或这两个Fc-区多肽彼此独立

[0803] 地包含下述突变或突变组合中的一个:

[0804] -T307H,或

[0805] -Q311H,或

[0806] -E430H,或

[0807] -N434H,或

[0808] -T307H和Q311H,或

[0809] -T307H和E430H,或

[0810] -T307H和N434A,或

[0811] -T307H和N434H,或

- [0812] -T307Q和Q311H,或
- [0813] -T307Q和E430H,或
- [0814] -T307Q和N434H,或
- [0815] -T307H和Q311H和E430H和N434A,或
- [0816] -T307H和Q311H和E430H和N434H,或
- [0817] -T307H和Q311H和E430H和N434Y,或
- [0818] -T307Q和Q311H和E430H和N434A,或
- [0819] -T307Q和Q311H和E430H和N434H,或
- [0820] -T307Q和Q311H和E430H和N434Y,或
- [0821] -T307Q和V308P和N434Y和Y436H,或
- [0822] -T307H和M252Y和S254T和T256E,或
- [0823] -T307Q和M252Y和S254T和T256E,或
- [0824] -Q311H和M252Y和S254T和T256E,或
- [0825] -E430H和M252Y和S254T和T256E,或
- [0826] -N434H和M252Y和S254T和T256E,或
- [0827] -T307H和Q311H和M252Y和S254T和T256E,或
- [0828] -T307H和E430H和M252Y和S254T和T256E,或
- [0829] -T307H和N434A和M252Y和S254T和T256E,或
- [0830] -T307H和N434H和M252Y和S254T和T256E,或
- [0831] -T307Q和Q311H和M252Y和S254T和T256E,或
- [0832] -T307Q和E430H和M252Y和S254T和T256E,或
- [0833] -T307Q和N434H和M252Y和S254T和T256E,或
- [0834] -T307H和Q311H和E430H和N434A和M252Y和S254T和T256E,或
- [0835] -T307H和Q311H和E430H和N434H和M252Y和S254T和T256E,或
- [0836] -T307H和Q311H和E430H和N434Y和M252Y和S254T和T256E,或
- [0837] -T307Q和Q311H和E430H和N434A和M252Y和S254T和T256E,或
- [0838] -T307Q和Q311H和E430H和N434H和M252Y和S254T和T256E,或
- [0839] -T307Q和Q311H和E430H和N434Y和M252Y和S254T和T256E,或
- [0840] -T307Q和V308P和N434Y和Y436H和M252Y和S254T和T256E。
- [0841] 41. 根据实施方案1-37中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含第一Fc-区多肽和第二Fc-区多肽,
- [0842] 并且其中第一Fc-区多肽包含突变Y349C、T366S、L368A和Y407V(孔洞-链),并且第二Fc-区多肽包含突变S354C和T366W(凸起-链),并且其中第一Fc-区多肽(孔洞-链)包含下述突变:
- [0843] i) I253A或I253G,和
- [0844] ii) L314A或L314G或L314D,
- [0845] 并且其中第一Fc-区多肽与第二Fc-区多肽通过一个或多个二硫键桥连接,
- [0846] 并且其中第一多肽的CH3-结构域与第二多肽的CH3-结构域都结合蛋白质A或不都结合蛋白质A(按照Kabat EU索引编号)。

- [0847] 42. 根据实施方案41所述的抗体,其中所述抗体包含下述突变:
- [0848] i) I253A或I253G,和
- [0849] ii) L314A或L314G或L314D,和
- [0850] iii) T250Q,和/或
- [0851] iv) T256E或T256A。
- [0852] 43. 根据实施方案41-42中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含下述突变:
- [0853] i) I253A或I253G,和
- [0854] ii) L314A或L314G或L314D,和
- [0855] iii) 任选地, a) T250Q, 和/或T256E或T256A, 和
- [0856] iv) a) L251A或L251G或L251D, 和/或b) H310A或H310G。
- [0857] 44. 根据实施方案41-43中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含下述突变:
- [0858] i) I253A或I253G,和
- [0859] ii) L314A或L314G或L314D,和
- [0860] iii) a) T250Q, 和/或T256E或T256A, 和
- [0861] iv) a) L251A或L251G或L251D, 和/或b) H310A或H310G,
- [0862] v) 任选地, a) T307A或T307H或T307Q或T307P, 和/或b) Q311H, 和/或c) M252Y, 和/或d) S254T。
- [0863] 45. 根据实施方案41-44中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含下述突变:
- [0864] i) T250Q, 和/或
- [0865] ii) M252Y, 和/或
- [0866] iii) S254T, 和/或
- [0867] iv) T256E或T256A, 和/或
- [0868] v) T307A或T307H或T307Q或T307P, 和/或
- [0869] vi) Q311H。
- [0870] 46. 根据实施方案1-45中任一项所述的抗体,其用作药物。
- [0871] 47. 根据实施方案1-45中任一项所述的抗体,其用于治疗眼血管疾病。
- [0872] 48. 实施方案1-45中任一项所述的抗体用于治疗眼部疾病、尤其是眼血管疾病的应用。
- [0873] 49. 实施方案1-45中任一项所述的抗体,其用于治疗眼部疾病。
- [0874] 50. 根据实施方案1-45中任一项所述的抗体,其用于治疗眼部疾病、尤其是眼血管疾病。
- [0875] 51. 一种治疗患有眼血管疾病的个体的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的实施方案1-45中任一项所述的抗体。
- [0876] 52. 一种药物制剂,其包含实施方案1-45中任一项所述的抗体。
- [0877] 53. 一种用于治疗眼血管疾病的药物制剂,其包含实施方案1-45中任一项所述的抗体。
- [0878] 54. 实施方案1-45中任一项所述的抗体在制备用于治疗眼血管疾病的药物中的应用。
- [0879] 55. 一种治疗患有眼血管疾病的患者的方法,所述方法通过向需要所述治疗的患

者施用实施方案1-45中任一项所述的抗体进行。

[0880] 56. 根据实施方案52-53中任一项所述的药物制剂, 其中所述抗体通过玻璃体内应用进行施用。

[0881] 57. 根据实施方案55-56中任一项所述的施用, 其中所述施用是玻璃体内应用。

[0882] 58. 编码实施方案1-45中任一项所述的抗体的核酸。

[0883] 59. 包含一种或多种编码实施方案1-45中任一项所述的抗体的核酸的细胞。

[0884] 60. 用于制备实施方案1-45中任一项所述的抗体的方法, 其中所述方法包括下述步骤:

[0885] a) 任选地用一种或多种编码实施方案1-45中任一项所述的抗体的核酸转染哺乳动物细胞,

[0886] b) 培养所述细胞, 从而表达所述抗体, 和

[0887] c) 从所述细胞或培养基回收所述抗体, 由此制备所述抗体。

[0888] V. 实施例

[0889] 以下是本发明的方法和组合物的实施例。要理解, 考虑到有上文提供的一般描述, 可以实行各种其他实施方案。

[0890] 实施例1

[0891] 鼠抗-IL-1 β 抗体H34的最初的产生和表征

[0892] 材料--BALB/c雌性小鼠获自Banting&Kingman (Freemont, CA)。完全和不完全弗氏佐剂(CFA和IFA)来自Difco (Detroit, MI)。HB101来自Hana Biologics, Inc. (Berkeley, CA)。不含钙和镁的Dulbecco's磷酸盐缓冲的盐水(PBS)和谷氨酰胺来自GIBCO Labs (Grand Island, NY)。胎牛血清来自Hyclone Labs (Logan, UT), 并且次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷(HAT)和次黄嘌呤-胸苷(HT)补充剂, 和50%聚乙二醇(PEG) 1450来自Bethesda Research Labs (Gaithersburg, MD)。兔抗-小鼠IgG+A+M过氧化物酶缀合物、链霉抗生物素蛋白过氧化物酶、小鼠Ig同种型鉴定试剂盒和原次苯基二胺(orthophenylene diamine, OPD)来自Zymed Labs (South San Francisco, CA)。琼脂糖蛋白质-A和Sephadex G-25来自Pharmacia (Piscataway, NJ)。降植烷(2,6,10,14-四甲基十五烷)来自Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, WI)。¹²⁵I Bolton-Hunter试剂来自New England Nuclear (Boston, MA)。所有其他的化学剂是来自Sigma的分析级试剂。

[0893] 杂交瘤制备--使用Kohler和Milstein的方法(出处同上)制备针对IL-1 β 的杂交瘤, 如Lerner (1981) Yale J. Biol. Med., 54:347所述。将十二周龄的雌性BALB/c小鼠腹膜内注射和在后足垫注射在CFA中的5 μ g纯化的MW 17,500形式的IL-1 β 。以3-4周的时间间隔给予五次在不完全弗氏佐剂(IFA)中的加强注射。通过ELISA定期地确定血清抗体效价, 并且在5次注射后, 效价是可检测到的。选择用于融合的动物接受在无菌PBS中的10 μ g IL-1 β 的静脉内(IV)加强。4天后, 摘下单, 并且使用50%PEG1450将脾细胞与P3X63-Ag8.653骨髓瘤细胞融合。将细胞在96孔平板(1*10⁶个细胞/孔)中的HAT培养基中培养。通过固相抗原ELISA、使用¹²⁵I IL-1 β 的固相抗体RIA和IL-1 β 诱导的胸腺细胞增殖抑制, 测定杂交瘤上清的抗-IL-1 β 活性(参见下文)。通过在具有胸腺细胞(5*10⁵/孔)的HAT培养基中有限稀释至少3次而克隆杂交瘤。

[0894] 抗体制备和纯化--通过向降植烷处理的小鼠腹膜内注射2*10⁶个杂交瘤细胞而在

腹水中产生单克隆抗体 (Kohler等人, 出处同上)。收集腹水液并且通过琼脂糖-蛋白质A层析纯化抗体 (Goding, J. Immunol. Methods, 20 (1978) 241)。

[0895] 如上文所述, 由相应的细胞系制备单克隆抗体 ILB1-H34。

[0896] IL-1 β 抗体的ELISA--将乙烯基测定平板 (Costar) 用50 μ L/孔的5 μ g/mL稀释在PBS中的抗原溶液包被, 并且在4 (度) C温育过夜。将孔用5%脱脂干奶粉/0.05%乙基汞硫代水杨酸钠/PBS在室温下复包被一小时。将孔用0.1%牛血清白蛋白 (BSA) /0.05%乙基汞硫代水杨酸钠/PBS清洗, 并且将50 μ L/孔的抗-IL-1 β 抗体在室温温育2小时。使用兔抗-小鼠IgG+A+M过氧化物酶缀合物和OPD底物溶液通过间接ELISA检测抗体。备选地, 将纯化的单克隆抗体生物素酰化 (Geusdon等人, J. Histochem. Cytochem. 27 (1979) 1131) 并使用链霉抗生物素蛋白过氧化物酶和OPD底物溶液检测。使用小鼠Ig同种型鉴定试剂盒, 通过间接ELISA鉴定单克隆抗体的同种型。

[0897] 胸腺细胞增殖测定--向在MEM/5%胎牛血清 (FBS) /100 μ g/ml庆大霉素、2-巯基乙醇 (2×10^{-5} M)、25mM Hepes培养基中的C3H/HeJ小鼠胸腺细胞 (1×10^6 /孔) 中添加IL-1 β 和PHA (10 μ g/ml)。在37°C 48小时后, 加入0.5 μ Ci/孔的 3 H胸苷, 并且将培养物培养过夜。使用细胞收集器将细胞收集在玻璃纤维滤器上并且处理用于闪烁计数。

[0898] 受体结合测定--将17,500形式的IL-1 β 用二碘代 125 I Bolton-Hunter试剂按照制造商的使用说明进行标记。在10 μ L PBS中的1 μ g IL-1 β 与1mCi试剂在4°C反应4小时; 加入500 μ L PBS/0.2%明胶, 并且通过在20*1cm的Sephadex G-25柱上以PBS/0.2%明胶的层析, 将标记的IL-1 β 与游离的Bolton-Hunter试剂分离。向24孔培养平板中在DMEM/1%BSA/0.1%叠氮化钠/0.01%Triton X-100中的BALB/c 3T3成纤维细胞汇合的单层中添加 125 IIL-1 β 。在37°C 1小时后, 将单层在不含标记的IL-1 β 的培养基中彻底清洗。将所述单层用0.1N NaOH取下用于 γ 计数。通过在存在200倍摩尔过量的未标记的IL-1 β 的条件下温育测量 125 IIL-1 β 的非特异性结合。

[0899] 抗体亲和力的确定--从使用免疫沉淀放射性免疫测定获得的数据确定单克隆抗体亲和力。简言之, 将5000cpm/管的 125 IIL-1 β 与在0.3ml 1%脱脂干奶粉/0.5%乙基汞硫代水杨酸钠/PBS中的纯化的单克隆抗体的稀释液在4°C温育过夜。通过分别加入100 μ L/管的10%正常小鼠血清/PBS和在PBS中的4mg/ml山羊抗小鼠IgG血清, 沉淀抗原-抗体复合物。在4°C 4小时后, 添加1ml/管冰冷的2%聚乙二醇-6000并将管在4°C以3000*g离心20分钟。吸出上清, 并将沉淀物在 γ 计数器中计数。由在不同抗体浓度的结合的/游离的比例计算亲和力常数 (Berson等人, Clin. Chim. Acta. 22 (1969) 51-69)。

[0900] 如上文所述, 使用从不同抗体浓度的 125 IIL-1 β 结合的免疫沉淀放射性免疫测定 (RIA) 获得的数据计算亲和力常数。抗-IL-1 β 抗体H34具有 64×10^9 L/mol的针对IL-1 β 的亲和力。

[0901] 实施例2

[0902] 小鼠免疫

[0903] 对于NMRI小鼠的免疫, 使用RIMMS (“快速免疫, 多个位点” (“Rapid Immunization, Multiple Sites”)) 时间方案。

[0904] 实施例3

[0905] 确定抗-IL-1 β 抗体的血清效价

[0906] 将人重组IL-1 β 以在PBS中2.5 μ g/ml固定在96-孔NUNC Maxisorb平板上(100 μ l/孔),然后:用200 μ l/孔在PBS中的2%CroteinC封闭所述平板;以100 μ l/孔一式两份应用在含0.5%CroteinC的PBS中的抗血清的系列稀释液;用在含0.5%CroteinC的PBS中1:16,000稀释的HRP-缀合的山羊抗-小鼠IgG抗体(Jackson ImmunoResearch)检测(100 μ l/孔)。对于所有步骤,将平板在37 $^{\circ}$ C温育1小时。在所有步骤之间,将平板用含0.05%吐温20的PBS清洗3次。通过加入100 μ l/孔可溶性BM Blue POD底物(Roche Diagnostics GmbH,Mannheim,德国)显色信号;并且通过加入100 μ l/孔1M HCl终止。以690nm作为参比,在450nm读取吸光度。效价定义为导致半最大信号的抗血清稀释液。

[0907] 实施例4

[0908] 人IL-1 β 结合ELISA

[0909] 变体1

[0910] 使用基于酶联免疫吸附测定(ELISA)的技术进行结合分析。将抗原人IL-1 β (Peprotech Cat.No 200-01B)以500ng/mL的浓度(25 μ L,在PBS中)固定在384孔微量滴定平板(Thermo Scientific,Cat.No.464718)上。下述每个步骤之后是3次常规清洗(90 μ L PBS,进行分配和抽吸):1)封闭步骤:使未结合的表面饱和(1小时,2%BSA);2)增加浓度的抗-IL-1 β 抗体,持续1小时;3)检测抗体,稀释度=1:2000(驴F(ab)₂抗-兔IgG POD,Amersham,NA9340V或绵羊IgG抗-小鼠IgG POD,Amersham RPN4201)。加入底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,Roche Diagnostics GmbH,Mannheim,德国,Cat.No 11835033001)后20-30分钟,在370nm确定光密度。使用GraphPad Prism 6.0软件利用四参数逻辑模型计算EC₅₀。

[0911] 变体2

[0912] 使用基于酶联免疫吸附测定(ELISA)的技术进行结合分析。将抗原His-标记的人IL-1 β (Sino Biologics,Cat.No.10139-H07E)以0.25 μ g/mL的浓度(25 μ L,在PBS中)固定在384孔微量滴定平板(Thermo Scientific,Cat.No.464718)上。下述每个步骤之后是3次常规清洗(90 μ L PBS,0.5%BSA,0.05%吐温,进行分配和抽吸):1)封闭步骤:使未结合的表面饱和(1小时,2%BSA);2)增加浓度的抗-IL-1 β 抗体,持续1小时;3)检测抗体,稀释度=1:2000(驴F(ab)₂抗-兔IgG POD,Amersham,NA9340V或绵羊IgG抗-小鼠IgG POD,Amersham RPN4201)。加入底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,Roche Diagnostics GmbH,Mannheim,德国,Cat.No11835033001)后20-30分钟,在370nm确定光密度。使用GraphPad Prism6.0软件利用四参数逻辑模型计算EC₅₀。

[0913] 实施例5

[0914] 食蟹猴IL-1 β 结合ELISA

[0915] 使用基于酶联免疫吸附测定(ELISA)的技术进行结合分析。将抗原人IL-1 β (Sino Biologics,Cat.No.90010CNAE)以0.5 μ g/mL的浓度(25 μ L,在PBS中)固定在384孔微量滴定平板(Thermo Scientific,Cat.No.464718)上。下述每个步骤之后是3次常规清洗(90 μ L PBS,0.5%BSA,0.05%吐温,进行分配和抽吸):1)封闭步骤:使未结合的表面饱和(1小时,2%BSA);2)增加浓度的抗-IL-1 β 抗体,持续1小时;3)检测抗体,稀释度=1:2000(驴F(ab)₂抗-兔IgG POD,Amersham,NA9340V或绵羊IgG抗-小鼠IgG POD,Amersham RPN4201)。加入底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,Roche Diagnostics GmbH,Mannheim,德国,Cat.No 11835033001)后20-30分钟,在370nm确定光密度。使用GraphPad Prism 6.0软件利用四参

数逻辑模型计算EC₅₀。

[0916] 实施例6

[0917] 鼠IL-1 β 结合ELISA

[0918] 使用基于酶联免疫吸附测定 (ELISA) 的技术进行结合分析。将抗原鼠IL-1 β (Sino Biologicals, Cat.No.50101-MNAE) 以0.5 μ g/mL的浓度 (25 μ L, 在PBS中) 固定在384孔微量滴定平板 (Thermo Scientific, Cat.No.464718) 上。下述每个步骤之后是3次常规清洗 (90 μ L PBS, 0.5% BSA, 0.05% 吐温, 进行分配和抽吸): 1) 封闭步骤: 使未结合的表面饱和 (1小时, 2% BSA); 2) 增加浓度的抗-IL-1 β 抗体, 持续1小时; 3) 检测抗体, 稀释度=1:2000 (驴F(ab)₂ 抗-兔IgG POD, Amersham, NA9340V或绵羊IgG抗-小鼠IgG POD, Amersham RPN4201)。加入底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国, Cat.No.11835033001) 后20-30分钟, 在370nm确定光密度。使用GraphPad Prism 6.0软件利用四参数逻辑模型计算EC₅₀。

[0919] 实施例7

[0920] 蛋白-蛋白相互作用抑制测定: 人IL-1 β :1型人IL-1受体

[0921] 使用基于酶联免疫吸附测定 (ELISA) 的技术进行人IL-1 β 与I型人IL-1受体的蛋白-蛋白相互作用抑制分析。将人His-标记的IL-1 β 蛋白 (Sino Biologicals, Cat.No.10139-H07E) 以1 μ g/mL的浓度 (25 μ L, 在PBS, 0.5% BSA和0.05% 吐温中) 固定在384孔微量滴定平板 (Thermo Scientific Cat.No.464718) 上。下述每个步骤之后是3次常规清洗 (90 μ L PBS, 进行分配和抽吸): 1) 使未结合的表面饱和的封闭步骤 (1小时, 2% BSA); 2) 将12.5 μ L增加浓度的抗-IL-1 β 抗体与12.5 μ L 300ng/mL的Fc-标记的人IL-1 β 受体 (Sino Biologicals, Ca.No10126-H02H) 在250 μ L的体积中温育1小时; 3) 使用过氧化物酶-标记的抗huFc抗体 (山羊F(ab)₂ 抗-人FC POD, Jackson, Cat.No.109-036-098) 实现检测。加入底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB, Roche Diagnostics GmbH, Cat.No.11835033001) 后10-30分钟, 在370nm确定光密度。使用GraphPad Prism 6.0软件利用四参数逻辑模型计算IC₅₀。

[0922] 实施例8

[0923] 蛋白-蛋白相互作用抑制测定: 人IL-1 β :2型人IL-1受体

[0924] 使用基于酶联免疫吸附测定 (ELISA) 的技术进行人IL-1 β 与II型人IL-1受体的蛋白-蛋白相互作用抑制分析。将人His-标记的IL-1 β 蛋白 (Sino Biologicals, Cat.No.10139-H07E) 以1 μ g/mL的浓度 (25 μ L, 在PBS, 0.5% BSA和0.05% 吐温中) 固定在384孔微量滴定平板 (Thermo Scientific Cat.No.464718) 上。下述每个步骤之后是3次常规清洗 (90 μ L PBS, 进行分配和抽吸): 1) 封闭步骤: 使未结合的表面饱和 (1小时, 2% BSA); 2) 将12.5 μ L增加浓度的抗-IL-1 β 抗体与12.5 μ L 30ng/mL的Fc-标记的人IL-1 β 受体 (RnD, Ca.No.663-2R-50) 在250 μ L的体积中温育1小时; 3) 使用过氧化物酶-标记的抗-huFc抗体 (山羊F(ab)₂ 抗-人FC POD, Jackson, Cat.No.109-036-098) 实现检测。加入底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国, Cat.No.11835033001) 后10-30分钟, 在370nm确定光密度。使用GraphPad Prism 6.0软件利用四参数逻辑模型计算IC₅₀。

[0925] 实施例9

[0926] 由产生鼠抗-IL-1 β 抗体的杂交瘤表达小鼠杂交瘤H34

[0927] 培养基包含下述试剂: RPMI (PAN), 20% 胎牛血清, 2mM 谷氨酰胺 (PAN), 1x 丙酮酸钠

(PAN), 1x NEAS (PAN)

[0928] 通过将试管在37℃水浴中放置60秒而将冷冻的包含细胞的小瓶预先解冻。用2ml预热的(37℃)培养基将细胞快速悬浮,并且从小瓶中转移到10ml烧瓶(CellStar)(已经含有8ml培养基)中。将烧瓶以1000rpm(25℃)离心5分钟。然后弃掉上清,并通过在10ml预热的(37℃)培养基中上下吹吸而轻轻悬浮细胞沉淀物。将全部溶液填装到T25-烧瓶中,并将烧瓶在培养箱(37℃, 7%CO₂, 85%湿度)中放置2天。

[0929] 接下来的5天,通过以1-2x 10⁵个细胞/ml的密度在新培养基中稀释,每2-3天分传(split)细胞。然后在接下来的日子里开始减少一部分胎牛血清,即从第一步中的20%减为10%。在10%胎牛血清中分传两次后,1:1混合培养基(RPMI (PAN), 10%胎牛血清, 2mM谷氨酰胺(PAN), 1x丙酮酸钠(PAN), 1x NEAS (PAN))与Hyclone-ADCF-MAb-培养基(Thermo-Scientific),并且使用该培养基进行另外两次分传。然后,将Hyclone:RPMI(具有10%胎牛血清)的比例提高至3:1,并且以2-3x 10⁵个细胞/ml的更高的密度接种细胞。至少在添加了Nutridoma CS(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国)的100%Hyclone-培养基中分传细胞。

[0930] 然后,将细胞-溶液体积扩大到20ml(T75烧瓶)用于5次分传。对于抗体产生,在Celline CL1000反应器中装入15ml密度为2.0x 10⁶个细胞/ml的细胞,并且温育8-9天(37℃, 7%CO₂, 85%湿度)。对于收集,将上清装入50ml falcon中,并且以4000rpm离心4次(每次循环后,将上清转入新的50ml falcon中)。最后将不含细胞的上清在-20℃冷冻。

[0931] 实施例10

[0932] 从鼠杂交瘤进行抗体纯化

[0933] 将包含抗体的H34杂交瘤上清过滤,并通过两个层析步骤纯化。使用用PBS(1mM KH₂PO₄, 10mM Na₂HPO₄, 137mM NaCl, 2.7mM KCl)(pH 7.4)平衡的HiTrap蛋白质G(GE Healthcare),通过亲和层析捕获抗体。通过用平衡缓冲液清洗去除未结合的蛋白,并且用25mM柠檬酸缓冲液(pH 3.0)回收抗体,并在洗脱后立即用1M Tris-碱(pH 9.0)中和至pH 6.0。使用在Superdex 200™(GE Healthcare)上的大小排阻层析作为第二纯化步骤。所述大小排阻层析在20mM组氨酸缓冲液, 0.14M NaCl, pH 6.0中进行。将包含抗体的溶液用配备Biomax-SK膜(Millipore, Billerica, MA)的Ultrafree-CL离心过滤器部件浓缩并保存在-80℃。

[0934] 将包含抗体的杂交瘤上清过滤,并通过两个层析步骤纯化。将上清与50%v/v 2M甘氨酸, pH 8.6, 600mM NaCl混合,并且使用用1M甘氨酸, pH 8.6, 300mM NaCl平衡的HiTrap MabSelectSuRe(GE Healthcare)通过亲和层析捕获。通过用平衡缓冲液清洗去除未结合的蛋白,并且用100mM柠檬酸缓冲液(pH 2.8)回收抗体,并在洗脱后立即用1M Tris-碱(pH 8.5)中和至pH 6.0。使用在Superdex 200™(GE Healthcare)上的大小排阻层析作为第二纯化步骤。所述大小排阻层析在20mM组氨酸缓冲液, 0.14M NaCl, pH 6.0中进行。将包含抗体的溶液用配备Biomax-SK膜(Millipore, Billerica, MA)的Ultrafree-CL离心过滤器部件浓缩并保存在-80℃。

[0935] 实施例11

[0936] 在HEK细胞中,人源化抗体的转染和瞬时表达

[0937] 使用转染剂293-free(Transfection Reagent 293-free, Novagen),在混悬适应

的HEK293F (FreeStyle 293-F细胞;Invitrogen) 细胞中进行抗体的瞬时表达。

[0938] 在125ml摇瓶(在37℃,7%CO₂,85%湿度,135rpm温育/摇动)中解冻后,细胞已经通过稀释传代至少四次(体积为30ml)。

[0939] 将细胞在250ml体积中增殖至3×10⁵个细胞/ml。三天后,将细胞分传,并且以7×10⁵个细胞/ml的密度新接种到1升摇瓶中的250ml体积中。转染将在细胞密度约为1.4-2.0×10⁶个细胞/ml后24小时进行。

[0940] 在转染之前,用预热的(水浴;37℃)Opti-MEM(Gibco)将250μg质粒-DNA(122μg轻链和128μg重链)稀释在10ml的终体积中。轻轻混合溶液并且在室温温育不超过5分钟。然后,向DNA-OptiMEM-溶液中加入333.3μl 293-free转染剂。轻轻混合并且在室温温育15-20分钟。将全部体积的混合物加入到具有250ml HEK-细胞-培养体积的1L摇瓶中。

[0941] 在37℃,7%CO₂,85%湿度,135rpm温育/摇动6或7天。

[0942] 通过以2,000rpm,4℃,10分钟的第一离心步骤收集上清。然后将上清转移到新的离心瓶中,以4,000rpm,4℃第二次离心20分钟。然后,将不含细胞的上清通过0.22μm瓶顶过滤器(bottle-top-filter)过滤并保存在冰箱中(-20℃)。

[0943] 实施例12

[0944] 从HEK上清纯化抗体

[0945] 将包含抗体的培养物上清过滤,并通过两个层析步骤纯化。使用用PBS(1mM KH₂PO₄,10mM Na₂HPO₄,137mM NaCl,2.7mM KCl)(pH 7.4)平衡的HiTrap MabSelectSuRe(GE Healthcare),通过亲和层析捕获抗体。通过用平衡缓冲液清洗去除未结合的蛋白,并且用50mM柠檬酸缓冲液(pH 2.8)回收抗体,并在洗脱后立即用1M Tris-碱(pH 9.0)中和至pH 6.0。使用在Superdex 200™(GE Healthcare)上的大小排阻层析作为第二纯化步骤。所述大小排阻层析在20mM组氨酸缓冲液,0.14M NaCl,pH 6.0中进行。将包含抗体的溶液用配备Biomax-SK膜(Millipore,Billerica,MA)的Ultrafree-CL离心过滤器部件浓缩并保存在-80℃。

[0946] 实施例13

[0947] 抗体制剂的分析

[0948] 使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过测量280nm的光密度(OD),而确定抗体制剂的蛋白浓度。

[0949] 使用具有蛋白表达芯片(Protein Express Chip)和HT蛋白表达试剂盒(HT Protein Express Reagents Kit)的LabChip GX II(PerkinElmer),通过CE-SDS分析抗体的纯度和完整性。

[0950] 通过使用TSK-GEL QC-PAK GFC 300用2x PBS,pH 7.4作为运行缓冲液的高效SEC,或通过使用BioSuite高分辨率SEC,250 Å,5μm分析级大小排阻柱(Waters GmbH)用200mM K₂HPO₄/KH₂PO₄,250mM KCl,pH 7.0作为运行缓冲液的高效SEC,来确定抗体制剂的聚集物含量。

[0951] 实施例14

[0952] 从抗体制备Fab片段并分析:

[0953] 将12mg抗体(1mg/ml,在20mM组氨酸,140mM NaCl,pH 6.0中)与240μl L-半胱氨酸溶液(Merck Millipore;250mM,在20mM组氨酸,140mM NaCl,pH 6.0中)和327μl木瓜蛋白酶

(Roche Life Science; 0.001U/mg 抗体) 在 37℃ 温育 120 分钟。切割后, 使用用 PBS (1mM KH_2PO_4 , 10mM Na_2HPO_4 , 137mM NaCl , 2.7mM KCl) (pH 7.4) 平衡的 HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) 的亲层析去除完整的 IgG 和 Fc 片段。随后, 使用在 Superdex 200™ (GE Healthcare) 上的大小排阻层析作为第二纯化步骤, 进一步纯化 MabSelectSuRe 层析的流过液。所述大小排阻层析在 20mM 组氨酸缓冲液, 0.14M NaCl , pH 6.0 中进行。将包含 Fab 片段的溶液用装配 Biomax-SK 膜 (Millipore, Billerica, MA) 的 Ultrafree-CL 离心过滤器部件浓缩并保存在 -80℃。

[0954] 使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数, 通过测量 280nm 的光密度 (OD), 确定 Fab-片段的蛋白浓度。

[0955] 在存在和不存在还原剂 (5mM 1,4-二硫苏糖醇) 的条件下, 通过 SDS-PAGE (NuPAGE 4-12%Bis-Tris 凝胶, Invitrogen) 并用 Simply Blue Safe Stain (Invitrogen) 染色, 分析 Fab-片段的纯度和完整性。

[0956] 使用 BioSuite 高分辨率 SEC, 250 Å, 5μm 分析级大小排阻柱 (Waters GmbH), 使用 200mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 250mM KCl , pH 7.0 作为运行缓冲液, 通过高效 SEC 确定 Fab 制剂的聚集物含量。

[0957] 实施例 15

[0958] 在用 IL-1β 刺激 A549 细胞后的 ICAM-1 表达

[0959] 将 A549 细胞 (10,000/孔) 在补充了 10% FCS 的 RPMI 1640 中生长过夜。然后, 将培养基更换为补充了 0.5% 血清的饥饿培养基 (Hunger medium)。

[0960] 将抗-IL-1β 抗体与 250pg/ml 的 IL-1β 以及不同浓度的抗体 (1000, 100, 10, 1, 0.1, 0ng/ml) 温育 2 小时。然后, 一式四份, 将 A549 细胞用 IL-1β/抗体混合物温育过夜。

[0961] 将细胞用冰冷的 PBS 洗涤四次, 然后用 PFA 固定 20 分钟。然后, 将细胞用 GSDB 封闭, 未进行透化处理。在用抗-ICAM-1 抗体 (R&D Systems, 5μg/ml) 温育 2 小时后, 将样品用 PBS 清洗四次。对于染色, 将样品用 1:1000 稀释的抗-小鼠抗体-HRP 缀合物 (Amersham) 温育 1 小时。然后, 将样品用 PBS 清洗四次, 并且用 ABTS 温育 2 小时。以 495nm 为参比, 测量 405nm 处的吸光度。

[0962] 实施例 16

[0963] 在用 IL-1β 刺激 A549 细胞后的 IL-6 确定 (Quantikine ELISA, R&D Systems)

[0964] 将 A549 细胞 (10,000/孔) 在补充了 10% FCS 的 RPMI 1640 中生长过夜。然后, 将培养基更换为补充了 0.5% 血清的饥饿培养基并继续培养 96 小时。

[0965] 将抗-IL-1β 抗体 (1μg/ml) 与 250pg/ml 的 IL-1β 温育 2 小时。然后, 将 A549 细胞用 IL-1β/抗体混合物培养过夜, 一式两份。

[0966] 取出 100μl 的培养上清样品用于进一步的分析。

[0967] 将用单克隆抗-人 IL-6 抗体包被的 96 孔平板用测定稀释剂 RD1W 封闭 15 分钟。然后, 加入上清样品并在室温 (RT) 温育 2 小时。将孔分别用 200μl 洗涤缓冲液清洗四次。然后, 将孔用与 HRP 缀合的多克隆抗-人 IL-6 抗体在室温 (RT) 温育两个小时。将孔分别用 200μl 洗涤缓冲液清洗四次。之后, 将孔用四甲基联苯胺和 H_2O_2 温育 20 分钟。20 分钟后通过加入 2N 硫酸终止反应。以 570nm 作为参比波长, 确定 450nm 处的吸光度。

[0968] 实施例 17

[0969] 生物活性测定

[0970] 由于D10细胞在不存在IL-1或饲养细胞的条件下针对con A仅最低限度地增殖,因此,鼠辅助T淋巴细胞(Th-2)D10.G4.1系已经广泛用作IL-1(白介素-1)生物活性的可靠且灵敏的测定(参见Symons,J.A.,等人,在Lymphokines and Interferons,a Practical Approach(淋巴因子和干扰素,实践方法)中.Clemens,M.J.等人(编):IRL Press.272(1987))。这一效应的ED₅₀典型地<12pg/mL。

[0971] 将35,000个D10.G4.1T-细胞/孔(刚解冻的)在含有IL-1 β (1ng/ml)的培养基(RPMI/2.5 μ g/ml ConA/10%FCS)中刺激72小时。

[0972] 按照供应商的使用说明,通过CellTiterGlo®发光细胞生存力测定(CellTiterGlo®Luminescent Cell Viability Assay)确定读数。

[0973] 实施例18

[0974] IL-1 β 诱导的HUVEC细胞上的ICAM-1上调

[0975] 将在相应的培养基EBM/EGM(Cat#CC-4176)中的HUVEC细胞(Lonza,Cat#00191027)以40,000个细胞/孔接种在96孔培养平板(Costar,Cat#3596)中的EBM+2%BSA(200 μ l/孔)中。将细胞在5%-CO₂培养箱中在37℃培养复苏24小时。进行按最后的需要40倍浓缩液的两连续稀释:一次用抗-IL-1 β 抗体huH34-2,另一次用重组人IL-1 β (R&D Systems,Cat#201-LB),均在EBM+2%BSA中。将两次连续稀释液彼此1:1混合,并在室温(RT)温育一小时。向细胞中加入10 μ l的这种IL-1 β /抗-IL-1 β 抗体混合物并轻轻混合。在5%-CO₂培养箱中在37℃进行培养20小时。然后,从细胞去除所有的培养基,并将细胞用PBS清洗两次。在用非酶促细胞解离液(Cell Dissociation Solution Non-enzymatic)1x(Sigma,Cat#C5914)清洗一次后,用100 μ l细胞解离液在37℃进行温育。每5分钟通过显微镜观察检查解离。当80%的细胞变为球状时,将细胞转移到FACS-平板中(96孔,340 μ l储量,PP,V-底平板(Falcon Cat#353263))。使用100 μ l PBS+1%BSA,通过吹吸4次,将其余的细胞从培养平板上解离下来,并且也加入到FACS-平板中。5分钟后,以300xg离心,弃掉上清。将沉淀物重悬在100 μ l PBS+1%BSA+10 μ g/ml人IgG(Sigma;Cat#I2511)中,并在室温(RT)温育15分钟。添加10 μ l抗-人ICAM-1荧光素缀合物(CD54)(R&D Systems,Cat#BBA20),然后在4℃温育30-45分钟。5分钟后,以300xg离心,弃掉上清。将沉淀物重悬在110 μ l PBS+1%BSA中并在LSRII上测量。

[0976] 实施例19

[0977] 在THP1细胞中MSU诱导TNF α 产生

[0978] 将THP1细胞(Invitrogen,Cat.No.thp-null)在作为生长培养基的补充了10%FBS(热灭活)的RPMI 1640(Gibco,Cat#A10491)中生长至1x10⁶个细胞/ml的密度,并且转移到Falcon管中。添加PMA(佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯(phorbol myristate acetate),Invitrogen,Cat#tlrl-pma)至300ng/ml的终浓度,并且在5%-CO₂培养箱中在37℃温育3小时。将细胞用PBS清洗一次(以300xg离心5分钟,弃掉上清),并且以1.33x10⁶个细胞/ml的密度重悬在补充了2mM L-谷氨酰胺和10%FBS(热灭活的)的Hunger RPMI(Gibco,Cat#31870-025)中。将150 μ l/孔的细胞混悬液以2x10⁵个细胞/孔接种在96孔培养平板(Costar,Cat#3596)中。在5%-CO₂培养箱中在37℃进行过夜培养。添加50 μ l 4倍浓缩的MSU混悬液(尿酸单钠晶体,Invitrogen,Cat#tlrl-msu)(在饥饿培养基中终浓度为250 μ g/ml),并且在5%-CO₂培养箱中在37℃温育6小时。在生长培养基中进行抗-IL-1 β 抗体的连续稀释。弃掉THP1

细胞的上清,并且将孔用PBS清洗一次。然后,向孔中添加制备好的抗-IL-1b抗体连续稀释液。在5%-CO₂培养箱中在37℃进行过夜培养。收集上清并且通过TNFαsingleplex进行分析。

[0979] 实施例20

[0980] 化学降解试验

[0981] 将样品分成三份等分试样,并且分别重新缓冲在20mM His/His*HCl,140mM NaCl,pH 6.0中或在PBS中,保存在40℃ (His/NaCl) 或37℃ (PBS)。对照样品保存在-80℃。

[0982] 在温育结束后,分析样品的相对活性浓度(BIAcore),聚集(SEC)和断裂(毛细管电泳或SDS-PAGE)并与未处理的对照进行比较。

[0983] 实施例21

[0984] 热稳定性

[0985] 在20mM组氨酸/盐酸组氨酸,140mM NaCl,pH 6.0中制备浓度为1mg/mL的样品,经由0.4μm滤板离心转移到光学384孔平板中,并且用石蜡油覆盖。在DynaPro平板读取仪(Wyatt)上通过动态光散射重复测量水力半径,同时以0.05℃/min的速率将样品从25℃加热至80℃。

[0986] 备选地,将样品转移到10μL微量比色皿阵列中,并且用Optim1000仪器(Avacta Inc.)记录静态光散射数据以及用266nm激光激发时的荧光数据,同时以0.1℃/min的速率将它们从25℃加热至90℃。

[0987] 聚集开始温度定义为水力半径(DLS)或散射的光强度(Optim1000)开始增加时的温度。

[0988] 解链温度定义为荧光强度相对于波长的图中的拐点。

[0989] 实施例22

[0990] 免疫

[0991] 对于小鼠(NMRI小鼠)和兔(人Ig基因座转基因兔)的免疫,使用基于RIMMS(“快速免疫,多个位点”(“Rapid Immunization, Multiple Sites”))的时间方案。抗原是人PDGF-BB(Cell Signaling Tech.)。

[0992] 实施例23

[0993] 确定抗-PDGF-B抗体的血清效价

[0994] 将人重组PDGF-B以在PBS中2.5μg/ml(小鼠)或1.0μg/ml(兔)固定在96-孔NUNC Maxisorb平板上(100μl/孔),然后:用200μl/孔在PBS中的2% CroteinC封闭所述平板;以100μl/孔一式两份应用在含0.5% CroteinC的PBS中的抗血清的系列稀释液;用在含0.5% CroteinC的PBS中1:16,000稀释的HRP-缀合的山羊抗-小鼠IgG抗体(Jackson ImmunoResearch)检测小鼠血清,或用在含0.5% CroteinC的PBS中1:5,000稀释的生物素酰化的山羊抗-人κ抗体(Southern Biotech)和1:8,000稀释的HRP-缀合的链霉抗生物素蛋白检测兔血清,100μl/孔。对于所有步骤,将平板在37℃温育1小时。在所有步骤之间,将平板用含0.05%吐温20的PBS清洗3次。通过加入100μl/孔可溶性BM Blue POD底物(Roche Diagnostics GmbH,Mannheim,德国)显色信号;并且通过加入100μl/孔1M HCl终止。以690nm作为参比,在450nm读取吸光度。效价定义为导致半最大信号的抗血清稀释液。

[0995] 实施例24

[0996] 来自兔的B细胞克隆

[0997] 分离兔外周血单核细胞 (PBMC)

[0998] 从三只经免疫的兔采集血液样品。将包含EDTA的全血用1x PBS (PAA, Pasching, 奥地利) 稀释两倍, 然后使用哺乳动物淋巴细胞 (lympholyte mammal) (Cedarlane Laboratories, Burlington, Ontario, 加拿大) 按照制造商的使用说明进行密度离心。将PBMC用1x PBS洗涤两次。

[0999] EL-4B5培养基

[1000] 使用补充了10% FCS (Hyclone, Logan, UT, USA), 2mM谷氨酰胺, 1%青霉素/链霉素溶液 (PAA, Pasching, 奥地利), 2mM丙酮酸钠, 10mM HEPES (PAN Biotech, Aidenbach, 德国) 和0.05mMβ-巯基乙醇 (Gibco, Paisley, 苏格兰) 的RPMI 1640 (Pan Biotech, Aidenbach, 德国)。

[1001] 平板包被

[1002] 将无菌细胞培养6孔平板用在碳酸盐缓冲液 (0.1M碳酸氢钠, 34mM碳酸氢二钠 (disodium hydrogen carbonate), pH 9.55) 中的PBGF-BB (2μg/ml) 或PDGF-AA与PDGF-CC蛋白混合物 (1μg/ml PDGF-AA和PDGF-CC) 在4℃包被过夜。在使用之前, 将平板用无菌PBS清洗三次。

[1003] 去除巨噬细胞/单核细胞

[1004] 将一半血液样品的PBMC接种在无菌6孔平板 (细胞培养级别) 上, 以通过非特异性粘附去除巨噬细胞和单核细胞。

[1005] 将剩余的50%的PBMC接种在预先用PDGF-AA与PDGF-CC蛋白的混合物包被的平板中, 从而一步去除与这些蛋白结合的B细胞并去除巨噬细胞和单核细胞。

[1006] 每个孔最多装满4ml培养基和多至 6×10^6 个来自经免疫的兔的PBMC, 并且允许在培养箱中在37℃结合1小时。

[1007] 将上清中的细胞 (外周血淋巴细胞 (PBL)) 用于抗原淘选步骤。

[1008] 在PDGF BB蛋白上富集B细胞

[1009] 将用PDGF-BB蛋白包被的6孔组织培养平板接种多至 6×10^6 个PBL/4ml培养基, 并且允许在培养箱中在37℃结合1小时。通过用1x PBS小心清洗孔1-2次地去除不贴壁的细胞。通过在培养箱中在37℃用胰蛋白酶处理10分钟, 使其余的贴壁细胞脱落。用EL-4B5培养基终止胰蛋白酶解。在进行免疫荧光染色之前, 将细胞保持在冰上。

[1010] 免疫荧光染色和流式细胞术

[1011] 使用抗-IgG FITC (AbD Serotec, Düsseldorf, 德国) 进行单细胞分选。对于表面染色, 将来自去除和富集步骤的细胞用在PBS中的与FITC缀合的抗-IgG抗体温育, 并且在暗处在4℃温育45分钟。染色后, 将PBMC用冰冷的PBS清洗两次。最后, 将PBMC重悬在冰冷的PBS中, 并立即进行FACS分析。在FACS分析之前, 加入浓度为5μg/ml的碘化丙啶 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), 从而区分死细胞和活细胞。

[1012] 使用配有计算机和FACSDiva软件 (BD Biosciences, USA) 的Becton Dickinson FACSAria进行单细胞分选。

[1013] B-细胞培养

[1014] 简言之, 将单个分选的兔B-细胞在96孔平板中用200μl/孔包含Pansorbin细胞 (1:

100,000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt, 德国)、5%兔胸腺细胞上清 (MicroCoat, Bernried, 德国) 和 γ -辐射的鼠EL-4B5胸腺瘤细胞 (2.5×10^4 个细胞/孔) 的EL-4B5培养基在培养箱中在37℃培养7天。取出B-细胞培养物的上清用于筛选, 并且立即收集剩余的细胞并在100 μ l RLT缓冲液 (Qiagen, Hilden, 德国) 中在-80℃冷冻。

[1015] 实施例25

[1016] 杂交瘤产生

[1017] 细胞培养

[1018] 使用小鼠骨髓瘤细胞系P3x63-Ag8.653作为融合配偶体以产生小鼠-小鼠杂交瘤。在融合前约14天将细胞解冻, 并且在8-氮鸟嘌呤的存在下培养。每3-4天, 将细胞分传并且调整至1-2x 10⁵ 个细胞/ml的浓度。

[1019] 细胞融合

[1020] 材料:

[1021] 小鼠杂交瘤培养基 (RPMI 1640 (PAN), FBS超低-IgG, 2mM L-谷氨酰胺, 1mM丙酮酸钠, NEAA, 具有muIL-6的Nutridoma-CS, HAZ (SIGMA, #A9666)), 调整至室温 (RT)

[1022] RPMI 1640培养基 (37℃)

[1023] RPMI 1640培养基 (4℃)

[1024] PEG (37℃)

[1025] 在融合之前, 大致将骨髓瘤细胞离心 (250rpm, 7min.)。将细胞团块重悬在培养基中。对于一个脾, 需要大约1-5*10⁷ 个细胞。

[1026] 对于细胞融合, 应该使用约5:1的淋巴细胞:骨髓瘤细胞比例。将P3x63-Ag8.653-细胞重悬在50ml RPMI 1640培养基中, 并离心 (250rpm, 7min.)。去除上清。然后将细胞添加到脾细胞中。

[1027] 在融合过程中, 在水浴中将温度调节至37℃。

[1028] 向所述细胞中逐滴加入PEG溶液 (37℃)。

[1029] 将融合混合物在培养箱中在37℃温育15-120分钟。然后, 将融合混合物离心 (250rpm, 7min.) 并且重悬在1200 μ l重悬培养基中。将100 μ l细胞混悬液添加到50ml半固体杂交瘤培养基中, 匀化, 并且在6孔平板的每个孔中分别加入4ml。培养9-13天后, 挑取单个克隆。

[1030] 实施例26

[1031] 杂交瘤培养

[1032] 将约5x10⁶ 个细胞悬浮在50ml Hyclone培养基中。将培养混合物温育96小时。然后, 加入75ml Hyclone培养基。继续培养7天。如果生存力降至低于40%, 将细胞混悬液通过0.22 μ 滤器过滤, 并且使用滤过液进行纯化。

[1033] 实施例27

[1034] B-细胞克隆

[1035] V-结构域的PCR扩增

[1036] 使用NucleoSpin 8/96RNA试剂盒 (Macherey&Nagel; 740709.4, 740698), 按照制造商的流程从B-细胞裂解物 (重悬在RLT缓冲液中-Qiagen-Cat. N°79216) 制备总RNA。将RNA用60 μ l无RNA酶的水洗脱。按照制造商的使用说明, 用Superscript III第一链合成超级混合

物(Invitrogen 18080-400)和寡dT-引物,通过反转录酶反应,使用6 μ l RNA产生cDNA。所有的步骤在Hamilton ML Star系统上进行。使用4 μ l cDNA与AccuPrime超级混合物(Invitrogen 12344-040)以50 μ l的终体积来扩增免疫球蛋白重链和轻链可变区(VH和VL),对于野生型兔B-细胞的重链使用引物rbHC.up和rbHC.do,对于轻链使用rbLC.up和rbLC.do,并且对于转基因兔B-细胞的轻链使用BcPCR_FHLC_leader.fw和BcPCR_huCkappa.rev。所有的正向引物都特异性针对(VH和VL各自的)信号肽,而反向引物特异性针对(VH和VL各自的)恒定区。用于RbVH+RbVL的PCR条件如下:94 $^{\circ}$ C热启动5分钟;35个循环:94 $^{\circ}$ C 20s, 70 $^{\circ}$ C 20s, 68 $^{\circ}$ C 45s,并且在68 $^{\circ}$ C最后延伸7分钟。用于HuVL的PCR条件如下:94 $^{\circ}$ C热启动5分钟;40个循环:94 $^{\circ}$ C 20s, 52 $^{\circ}$ C 20s, 68 $^{\circ}$ C 45s,并且在68 $^{\circ}$ C最后延伸7分钟。

[1037]

rbHC.up AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGC
TGGCTTC

SEO ID NO: 111

rbHCf.do CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG

SEO ID NO: 112

rbLC.up AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGGCCCCC
GEO ID: NC_112 ACTC

SEQ ID NO: 113

rbLC.do CAGAGTCTGCTGAGGTTGTAGGTAC

SEQ ID NO: 114

BcPCR_FHLC_leader.fw ATGGACATGAGGGTCCCCGC

SEO ID NO: 115

BcPCR_huCkappa.rev GATTTCAACTGCTCATCAGATGGC

SEO ID NO: 116

[1038] 将50μl PCR溶液中的8μl上样到48E-凝胶2% (Invitrogen G8008-02) 上。按照制造商的流程使用NucleoSpin Extract II试剂盒 (Macherey&Nagel; 740609250) 纯化阳性PCR反应物, 并且以50μl洗脱缓冲液洗脱。所有的纯化步骤均在Hamilton ML Starlet系统上进行。

[1039] 实施例28

[1040] 兔单克隆二价抗体的重组表达

[1041] 对于兔单克隆二价抗体的重组表达,通过突出物克隆法(overhang cloning method)将编码VH或VL的PCR产物以cDNA克隆到表达载体中(RS Haun等人.,BioTechniques 13(1992)515-518;MZ Li等人.,Nature Methods 4(2007)251-256)。表达载体包含由以下组成的表达盒:包含内含子A的5'CMV启动子,和3'BGH多聚腺苷酸化序列。除了表达盒,质粒

还包含用于在大肠杆菌中的质粒扩增的pUC-来源的复制起点和赋予氨苄青霉素抗性的 β -内酰胺酶基因。使用基本质粒的三种变体：一种质粒包含设计为接纳VH区的兔IgG恒定区；两种质粒包含接纳VL区的兔或人 κ LC恒定区。

[1042] 使用重叠的引物,通过PCR扩增编码 κ 或 γ 恒定区和VL/VH插入物的线性的表达质粒。

[1043] 将纯化的PCR产物与T4DNA-聚合酶一起温育,这产生单链突出物。反应通过加入dCTP而终止。

[1044] 在下一步,将质粒和插入物组合并与recA一起温育,这诱导位点特异性的重组。将重组的质粒转化到大肠杆菌中。次日,挑取生长的菌落,并通过质粒制备、限制性分析和DNA-测序来检测正确的重组质粒。

[1045] 对于抗体表达,将分离的HC和LC质粒瞬时共转染到HEK293细胞中,并且在1周后收集上清。

[1046] 实施例29

[1047] 兔单克隆单价抗体的重组表达

[1048] 为了将所选的候选物重组表达为单克隆单价抗体,将所有VH链的兔恒定区转化为在CH3片段中包绕凸起-突变的人恒定区。对于来源于兔野生型B-细胞的VL链,将兔C κ 恒定区转化为人的。使用4 μ l所选候选物的cDNA与AccuPrime超级混合物(Invitrogen 12344-040)以50 μ l的终体积来扩增免疫球蛋白重链和轻链可变区,其中正向引物特异性针对信号肽,反向引物特异性针对具有与(VH和VL各自的)人恒定区同源的重合序列(20bp)(在3'端)的CDR3-J区。用于VH和VL链扩增的PCR条件如下:94 $^{\circ}$ C热启动5分钟;35个循环:94 $^{\circ}$ C 20s, 68 $^{\circ}$ C 20s, 68 $^{\circ}$ C 45s,在68 $^{\circ}$ C最后延伸7分钟。

[1049] 通过突出物克隆方法,将编码VH或VL的PCR-产物作为cDNA克隆到表达载体中(RS Haun等人.,BioTechniques 13(1992) 515-518;MZ Li等人.,Nature Methods 4(2007) 251-256)。表达载体包含由以下组成的表达盒:包含内含子A的5'CMV启动子和3'BGH多聚腺苷酸化序列。除了表达盒,质粒还包含用于在大肠杆菌中的质粒扩增的pUC-来源的复制起点和赋予氨苄青霉素抗性的 β -内酰胺酶基因。使用基本质粒的两种变体:一种质粒包含设计为接纳新扩增的VH链的人IgG恒定区,第二种质粒包含接纳VL链的人 κ LC恒定区。

[1050] 使用重叠的引物,通过PCR扩增编码 κ 或 γ 恒定区和VL/VH插入物的线性的表达质粒。

[1051] 将纯化的PCR产物与T4DNA-聚合酶一起温育,这产生单链突出物。反应通过加入dCTP而终止。

[1052] 在下一步,将质粒和插入物组合并与recA一起温育,这诱导位点特异性的重组。将重组的质粒转化到大肠杆菌中。次日,挑取生长的菌落,并通过质粒制备、限制性分析和DNA-测序来检测正确的重组质粒。

[1053] 实施例30

[1054] 人PDGF-BB结合ELISA

[1055] 使用基于酶联免疫吸附测定(ELISA)的技术进行结合分析。将抗原人PDGF-BB(Cell Signaling,Cat.No 8921BF)以125ng/mL的浓度(25 μ L,在PBS,0.5%BSA和0.05%吐温中)固定在384孔微量滴定平板(Thermo Scientific,Cat.No.464718)上。下述每个步骤

之后是3次常规清洗(90 μ L PBS,进行分配和抽吸):1) 封闭步骤:使未结合的表面饱和(1小时,2%BSA);2) 增加浓度的抗-PDGF-BB抗体,持续1小时;3) 检测抗体,稀释度=1:3000 (ECL抗-兔IgG-POD,NA9340V+ECL抗-人IgG-POD,NA933V或对于鼠抗体备选地是ECL抗-小鼠IgG-POD;NA 9310V)。加入底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,Piercenet,Cat.No.34021)后20-30分钟,在370nm确定光密度。使用GraphPad Prism 6.0软件利用四参数逻辑模型计算EC₅₀。

[1056] 实施例31

[1057] 食蟹猴PDGF-BB结合ELISA

[1058] 使用基于酶联免疫吸附测定(ELISA)的技术进行结合分析。将抗原人PDGF-BB以125ng/mL的浓度(25 μ L,在PBS,0.5%BSA和0.05%吐温中)固定在384孔微量滴定平板(Thermo Scientific,Cat.No.464718)上。下述每个步骤之后是3次常规清洗(90 μ L PBS,0.5%BSA,0.05%吐温,进行分配和抽吸):1) 封闭步骤:使未结合的表面饱和(1小时,2%BSA);2) 增加浓度的抗-PDGF-BB抗体,持续1小时;3) 检测抗体,稀释度=1:3000 (ECL抗-兔IgG-POD,NA9340V+ECL抗-人IgG-POD,NA933V或对于鼠抗体备选地是ECL抗-小鼠IgG-POD;NA 9310V)。加入底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,Piercenet,34021)后20-30分钟,在370nm确定光密度。使用GraphPad Prism 6.0软件利用四参数逻辑模型计算EC₅₀。

[1059] 实施例32

[1060] 鼠PDGF-BB结合ELISA

[1061] 使用基于酶联免疫吸附测定(ELISA)的技术进行结合分析。将抗原鼠PDGF-BB(Peprotech 315-18)以125ng/mL的浓度(25 μ L,在PBS,0.5%BSA和0.05%吐温中)固定在384孔微量滴定平板(Thermo Scientific,Cat.No.464718)上。下述每个步骤之后是3次常规清洗(90 μ L PBS,0.5%BSA,0.05%吐温,进行分配和抽吸):1) 封闭步骤:使未结合的表面饱和(1小时,2%BSA);2) 增加浓度的抗-PDGF-BB抗体,持续1小时;3) 检测抗体,稀释度=1:3000 (ECL抗-兔IgG-POD,NA9340V+ECL抗-人IgG-POD,NA933V或对于鼠抗体备选地是ECL抗-小鼠IgG-POD;NA9310V)。加入底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,Piercenet,34021)后20-30分钟,在370nm确定光密度。使用GraphPad Prism 6.0软件利用四参数逻辑模型计算EC₅₀。

[1062] 实施例33

[1063] 大鼠PDGF-BB结合ELISA

[1064] 使用基于酶联免疫吸附测定(ELISA)的技术进行结合分析。将抗原大鼠PDGF-BB(R&D,520-BB)以125ng/mL的浓度(25 μ L,在PBS,0.5%BSA和0.05%吐温中)固定在384孔微量滴定平板(Thermo Scientific,Cat.No.464718)上。下述每个步骤之后是3次常规清洗(90 μ L PBS,0.5%BSA,0.05%吐温,进行分配和抽吸):1) 封闭步骤:使未结合的表面饱和(1小时,2%BSA);2) 增加浓度的抗-PDGF-BB抗体,持续1小时;3) 检测抗体,稀释度=1:3000 (ECL抗-兔IgG-POD,NA9340V+ECL抗-人IgG-POD,NA933V或对于鼠抗体备选地是ECL抗-小鼠IgG-POD;NA9310V)。加入底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,Piercenet,34021)后20-30分钟,在370nm确定光密度。使用GraphPad Prism 6.0软件利用四参数逻辑模型计算EC₅₀。

[1065] 实施例34

[1066] 人PDGF-AA结合ELISA

[1067] 使用基于酶联免疫吸附测定(ELISA)的技术进行结合分析。将抗原人PDGF-AA(Peprotech,Cat.No.AF-100-13A)以125ng/mL的浓度(25 μ L,在PBS,0.5%BSA和0.05%吐温

中)固定在384孔微量滴定平板(Thermo Scientific,Cat.No.464718)上。下述每个步骤之后是3次常规清洗(90 μ L PBS,0.5%BSA,0.05%吐温,进行分配和抽吸):1)封闭步骤:使未结合的表面饱和(1小时,2%BSA);2)增加浓度的抗-PDGF-BB抗体,持续1小时;3)检测抗体,稀释度=1:3000(ECL抗-兔IgG-POD,NA9340V+ECL抗-人IgG-POD,NA933V或对于鼠抗体备选地是ECL抗-小鼠IgG-POD;NA9310V)。加入底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,Piercenet,34021)后20-30分钟,在370nm确定光密度。使用GraphPad Prism 6.0软件利用四参数逻辑模型计算EC₅₀。

[1068] 实施例35

[1069] 人PDGF-CC结合ELISA

[1070] 使用基于酶联免疫吸附测定(ELISA)的技术进行结合分析。将抗原人PDGF-CC(Peprotech AF-100-00C)以125ng/mL的浓度(25 μ L,在PBS,0.5%BSA和0.05%吐温中)固定在384孔微量滴定平板(Thermo Scientific,Cat.No.464718)上。下述每个步骤之后是3次常规清洗(90 μ L PBS,0.5%BSA,0.05%吐温,进行分配和抽吸):1)封闭步骤:使未结合的表面饱和(1小时,2%BSA);2)增加浓度的抗-PDGF-BB抗体,持续1小时;3)检测抗体,稀释度=1:3000(ECL抗-兔IgG-POD,NA9340V+ECL抗-人IgG-POD,NA933V或对于鼠抗体备选地是ECL抗-小鼠IgG-POD;NA9310V)。加入底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,Piercenet,34021)后20-30分钟,在370nm确定光密度。使用GraphPad Prism 6.0软件利用四参数逻辑模型计算EC₅₀。

[1071] 实施例36

[1072] 蛋白-蛋白相互作用抑制测定:人PDGF-B:人PDGF-BB受体

[1073] 使用基于酶联免疫吸附测定(ELISA)的技术进行人PDGF-BB与人PDGF-BB受体的蛋白-蛋白相互作用抑制分析。将人Fc-标记的PDGF-BB受体蛋白(RnD,Cat.No.385-PR-100)以750 μ g/mL的浓度(25 μ L,在PBS,0.5%BSA和0.05%吐温中)固定在384孔微量滴定平板(Thermo Scientific Cat.No.464718)上。下述每个步骤之后是3次常规清洗(90 μ L PBS,进行分配和抽吸):1)使未结合的表面饱和的封闭步骤(1小时,2%BSA);2)将15 μ L增加浓度的抗-PDGF-BB抗体与15 μ L 75nM的生物素酰化的人PDGF-BB(Cell Signaling,8921BF)在30 μ L的体积中温育1小时;3)使用过氧化物酶-标记的链霉抗生物素蛋白(Roche Diagnostics GmbH,Mannheim,德国,11089153001)实现检测。加入底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,Piercenet,34021)后20-30分钟,在370nm确定光密度。使用GraphPad Prism 6.0软件利用四参数逻辑模型计算IC₅₀。

[1074] 实施例37

[1075] 从鼠杂交瘤进行抗体纯化

[1076] 将包含抗体的杂交瘤上清过滤,并通过两个层析步骤纯化。使用用PBS(1mM KH₂PO₄,10mM Na₂HPO₄,137mM NaCl,2.7mM KCl)(pH 7.4)平衡的HiTrap Protein G(GE Healthcare),通过亲和层析捕获抗体。通过用平衡缓冲液清洗去除未结合的蛋白,并且用25mM柠檬酸缓冲液(pH 3.0)回收抗体,并在洗脱后立即用1M Tris-碱(pH 9.0)中和至pH6.0。使用在Superdex 200TM(GE Healthcare)上的大小排阻层析作为第二纯化步骤。所述大小排阻层析在20mM组氨酸缓冲液,0.14M NaCl,pH 6.0中进行。将包含抗体的溶液用配备Biomax-SK膜(Millipore,Billerica,MA)的Ultrafree-CL离心过滤器部件浓缩并保存在-

80℃。

[1077] 将包含抗体的杂交瘤上清过滤,并通过两个层析步骤纯化。将上清与50% v/v 2M 甘氨酸, pH 8.6, 600mM NaCl混合,并且使用用1M甘氨酸, pH 8.6, 300mM NaCl平衡的HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare)通过亲和层析捕获。通过用平衡缓冲液清洗去除未结合的蛋白,并且用100mM柠檬酸缓冲液 (pH 2.8)回收抗体,并在洗脱后立即用1M Tris-碱 (pH 8.5)中和至pH 6.0。使用在Superdex 200™ (GE Healthcare)上的大小排阻层析作为第二纯化步骤。所述大小排阻层析在20mM组氨酸缓冲液, 0.14M NaCl, pH 6.0中进行。将包含抗体的溶液用配备Biomax-SK膜 (Millipore, Billerica, MA)的Ultrafree-CL离心过滤器部件浓缩并保存在-80℃。

[1078] 实施例38

[1079] 人PDGF-BB结合表面等离子体共振谱测定

[1080] 使用BIAcore B4000系统 (GE Healthcare),用基于表面等离子体共振谱的技术进行结合分析。利用胺偶联化学,将抗原人PDGF-BB (Cell Signaling, 8921BF)以1μg/mL的浓度(在PBS, 0.1% BSA, 0.05%吐温中)固定在C1传感器芯片 (GE Healthcare, BR-1005-35)上。应用在10mM HEPES pH 7.2, 150mM NaCl中的增加浓度的抗-PDGF-BB抗体。使用180秒缔合期和600秒解离期的读取时间,计算表观 k_a 和表观 k_d 。使用BIAcore T200v2.0拟合软件计算表观 K_D (抗体亲抗原性)。

[1081] 实施例39

[1082] 食蟹猴PDGF-BB结合表面等离子体共振谱测定

[1083] 使用BIAcore B4000系统 (GE Healthcare),用基于表面等离子体共振谱的技术进行结合分析。利用胺偶联化学,将抗原食蟹猴PDGF-BB以1μg/mL的浓度(在PBS, 0.1% BSA, 0.05%吐温中)固定在C1传感器芯片 (GE Healthcare, BR-1005-35)上。应用在10mM HEPES pH 7.2, 150mM NaCl中的增加浓度的抗-PDGF-BB抗体。使用180秒缔合期和600秒解离期的读取时间,计算表观 k_a 和表观 k_d 。使用BIAcore T200 v2.0拟合软件计算表观 K_D (抗体亲抗原性)。

[1084] 实施例40

[1085] 在HEK细胞中,人源化抗体的转染和瞬时表达

[1086] 使用转染剂293-free (Novagen),在混悬适应的HEK293F (FreeStyle 293-F细胞; Invitrogen)细胞中进行抗体的瞬时表达。

[1087] 在125ml摇瓶(在37℃, 7% CO₂, 85%湿度, 135rpm温育/摇动)中解冻后,细胞已经通过稀释传代至少四次(体积为30ml)。

[1088] 将细胞在250ml体积中增殖至 3×10^5 个细胞/ml。三天后,将细胞分传,并且以 7×10^5 个细胞/ml的密度新接种到1升摇瓶中的250ml体积中。转染将在细胞密度约为 $1.4-2.0 \times 10^6$ 个细胞/ml后24小时进行。

[1089] 在转染之前,用预热的(水浴; 37℃) Opti-MEM (Gibco)将250μg质粒-DNA (122μg轻链和128μg重链)稀释在10ml的终体积中。轻轻混合溶液并且在室温温育不超过5分钟。然后,向DNA-OptiMEM-溶液中加入333.3μl的293-free转染剂。轻轻混合并且在室温温育15-20分钟。将全部体积的混合物加入到具有250ml HEK-细胞-培养体积的1L摇瓶中。

[1090] 在37℃, 7% CO₂, 85%湿度, 135rpm温育/摇动6或7天。

[1091] 通过以2,000rpm,4℃,10分钟的第一离心步骤收集上清。然后将上清转移到新的离心瓶中,以4,000rpm,4℃第二次离心20分钟。然后,将不含细胞的上清通过0.22μm瓶顶滤器(bottle-top-filter)过滤并保存在冰箱中(-20℃)。

[1092] 实施例41

[1093] 从抗体制备Fab片段并分析:

[1094] 将5mg抗体(在20mM组氨酸,140mM NaCl,pH 6.0中约1mg/ml)与90μl L-半胱氨酸溶液(Merck Millipore;在20mM组氨酸,140mM NaCl,pH 6.0中250mM)和12μl木瓜蛋白酶(Roche Life Science;3.2U/mg抗体)在37℃温育120分钟。切割后,使用用PBS(1mM KH₂PO₄,10mM Na₂HPO₄,137mM NaCl,2.7mM KCl)(pH 7.4)平衡的HiTrap MabSelectSuRe(GE Healthcare)的亲和层析去除完整的IgG和Fc片段。随后,使用在Superdex 200™(GE Healthcare)上的大小排阻层析作为第二纯化步骤,进一步纯化MabSelectSuRe层析的流过液。所述大小排阻层析在20mM组氨酸缓冲液,0.14M NaCl,pH 6.0中进行。将包含Fab片段的溶液用装配Biomax-SK膜(Millipore,Billerica,MA)的Ultrafree-CL离心过滤器部件浓缩并保存在-80℃。

[1095] 使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过测量280nm的光密度(OD),确定Fab-片段的蛋白浓度。

[1096] 在存在和不存在还原剂(5mM 1,4-二硫苏糖醇)的条件下,通过SDS-PAGE(NuPAGE 4-12%Bis-Tris凝胶,Invitrogen)并用Simply Blue Safe Stain(Invitrogen)染色,分析Fab-片段的纯度和完整性。

[1097] 使用Superdex 200 10/300GL分析级大小排阻柱(GE Healthcare),使用2x PBS,pH 7.4作为运行缓冲液,通过高效SEC确定Fab制剂的聚集物含量。

[1098] 实施例42

[1099] 3T3细胞增殖ELISA

[1100] 为了确定增殖抑制作用,按照制造商的手册使用BrdU比色测定(Roche Diagnostics GmbH,Mannheim,德国,#11 647 229 001)。在该测定中,使用5ng/ml人PDGF-BB和抗体。

[1101] 实施例43

[1102] 磷酸-PDGF-Rβ(Tyr751)夹心ELISA

[1103] 将10,000个3T3-细胞/孔在补充了10%新生牛血清的DMEM-培养基中培养24小时。然后,将细胞在饥饿培养基(具有0.5%新生牛血清的DMEM-培养基)中培养24小时。

[1104] 在加入之前,将抗体(1μg/ml)在包含5ng/ml PDGF-BB的培养基中预先温育2小时。将3T3细胞在具有5ng/ml人PDGF-BB和抗体的饥饿培养基中培养10分钟。

[1105] 在裂解之前,将细胞用PBS清洗4次。细胞裂解在100μl裂解缓冲液中进行。

[1106] 将裂解溶液在用兔抗-PDGF-Rβ抗体包被的96孔平板的孔中在4℃温育过夜。然后,将孔用PBS清洗4次。在用小鼠抗-磷酸-PDGF受体β抗体温育1小时后,将孔用清洗缓冲液洗涤4次。对于检测,将孔用100μl TMB底物溶液温育30分钟。通过加入100μl终止溶液终止反应。在450nm确定吸光度。

[1107] 实施例44

[1108] 细胞迁移测定

[1109] 使用CIM-平板16 (ACEABiosciences Inc., n°05665817001, 孔尺寸膜8μm)。

[1110] 流程

[1111] 在使用 (50-70%汇合) 前将原代人视网膜周细胞 ((ACBRI 183CellSystems), 用hTERT无限增殖化) 饥饿过夜 (在不含生长因子 (b°SF-4ZR-500-S) 的CellSystems CSC无血清培养基中)。

[1112] 平板准备

[1113] 上部室: (50μl培养基+100μl细胞混悬液)

[1114] 用在PBS中的20μg/ml的纤连蛋白 (Sigma n°F0895-2mg) 包被两侧:

[1115] 在每个孔的传感器侧 (底侧) 上加入40μl纤连蛋白溶液, 将上部室在通风橱中温育30分钟。从传感器侧小心吸走纤连蛋白溶液, 避免触及电极。将UC翻转, 使得孔侧向上而传感器侧向下。在孔中加入50μl纤连蛋白溶液, 并且在通风橱中在室温 (RT) 温育30分钟。从孔内侧小心吸走溶液。在孔中加入50μl不含生长因子的CSC无血清培养基。

[1116] 下部室: 160μl/孔你的待检测的样品 (1X浓缩的)

[1117] 所有的稀释液都在不含生长因子的CellSystems CSC无血清培养基 (n°SF-4ZR-500-S) 中; 将样品/抗体混合物在通风橱中温育2小时; 添加160μl/孔的样品; 使用CIM-平板16组装工具组装UC和LC; 将CIM-平板16在培养箱中在37°C放置1小时以平衡; 将CIM-平板16放置在RTCA DP分析仪上; 在RTCA软件中通过开始步骤1起始背景测量。

[1118] 细胞制剂

[1119] 将细胞用细胞解离缓冲液剥离, 并以 1.5×10^5 个细胞/ml重悬细胞在不含生长因子的CellSystems CSC无血清培养基 (n°SF-4ZR-500-S) 中; 将CIM-平板16从RTCA分析仪上取下, 并在UC中加入在基础培养基 (不含生长因子的Cell Systems CSC无血清培养基n°SF-4ZR-500-S) 中的15,000个原代人视网膜周细胞 ((ACBRI 183CellSystems), 用hTERT无限增殖化) /孔/100μl; 将平板放回RTCA分析仪并且立即开始10-20小时的测量。

[1120] 实施例45

[1121] 细胞增殖测定

[1122] CellTiter 96Aqueous One溶液细胞增殖测定 (Promega, G3580)。

[1123] 原代人视网膜周细胞 ((ACBRI 183CellSystems), 用hTERT无限增殖化), 2500个细胞/孔/100μl

[1124] 培养基

[1125] 生长培养基=CSC完全培养基, 培养增强物 (culture boost) (ACBRI n°4Z=-500)

[1126] 测定培养基=不含生长因子的CSC无血清培养基 (ACBRI n°SF-4ZR-500-S)

[1127] Balbc3T3, 5000个细胞/孔/100μl

[1128] 培养基

[1129] 生长培养基=DMEM (Gibco n°41966), 10%NBCS

[1130] 测定培养基=DMEM (Gibco n°41966), 0.4%NBCS

[1131] 增殖测定

[1132] 在测定前24-48小时将细胞接种在生长培养基中。当细胞至80-90%汇合时, 用胰蛋白酶溶液收集细胞。将细胞以 0.25×10^5 个细胞/ml (或 0.5×10^5 个细胞/ml) 重悬在生长培养基中。向96孔平板的每个孔中加入100μl细胞混悬液。在37温育24小时。去除生长培养基,

向每个孔中加入100 μ l测定培养基。温育24小时。向每个孔中加入100 μ l标准物或样品(2X浓缩的,稀释在测定培养基中)。在37以5%CO₂温育72小时。向细胞加入40 μ l染料溶液并在37℃温育。在不同时间(1h至8h)在490nm读取。

[1133] 实施例46

[1134] 抗-PDGF-BB抗体动力学筛选

[1135] 使用BIAcore T200仪器(GE Healthcare),通过表面等离子体共振研究抗-PDGF-BB抗体与人PDGF-BB的结合。使用GE Healthcare供应的胺偶联试剂盒,在pH 4.0将大约20个共振单位(RU)的重组人PDGF-BB(5 μ g/ml;订购号220-BB;R&D Systems)偶联到S系列C1芯片(GE Healthcare BR-1005-35)上。用于固定的运行缓冲液是HBS-N pH 7.4(10mM HEPES, 150mM NaCl, pH 7.4, GE Healthcare)。对于下述动力学表征,运行和稀释缓冲液为HBS-P pH 7.4(10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.05%表面活性剂P20, pH 7.4, GE Healthcare)。流动池设置为25℃-并且样品区组设置为12℃-并用运行缓冲液致敏两次。

[1136] 通过以100 μ l/min的流速注入在溶液中浓度为30nM和3nM的抗-PDGF-BB抗体30秒而测量缔合。监测解离期直至600秒,并且解离期通过由样品溶液转换为运行缓冲液而引发。通过以5 μ l/min的流速连续两次注入0.85% H₃PO₄(磷酸)溶液60秒进行清洗,而使表面再生。通过减去由空白表面得到的反应而校正本体折射率(bulk refractive index)差异。还减去空白注射液(=双重参比)。为了计算K_D和其他动力学参数,使用朗缪尔1:1模型。

[1137] 实施例47

[1138] 抗-PDGF-BB Fab动力学表征

[1139] 使用BIAcore T200仪器(GE Healthcare),通过表面等离子体共振研究抗-PDGF-BB Fab样品与人PDGF-BB的结合。使用GE Healthcare供应的胺偶联试剂盒,在pH 4.0将大约50个共振单位(RU)的重组人PDGF-BB(0.5 μ g/ml;订购号220-BB;R&D Systems)偶联到S系列CM3芯片(GE Healthcare BR-1005-36)上。用于固定的运行缓冲液是HBS-N pH 7.4(10mM HEPES, 150mM NaCl, pH 7.4, GE Healthcare)。对于下述动力学表征,运行和稀释缓冲液为HBS-P pH 7.4(10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.05%表面活性剂P20, pH 7.4, GE Healthcare)。流动池设置为25℃-并且样品区组设置为12℃-并用运行缓冲液致敏两次。

[1140] 通过以30 μ l/min的流速注入在溶液中的不同浓度(以300nM起始,连续1:3稀释)的抗-PDGF-BB Fab 180秒而测量缔合。监测解离期直至900秒,并且解离期通过由样品溶液转换为运行缓冲液而引发。通过以5 μ l/min的流速用0.85% H₃PO₄(磷酸)溶液清洗60秒,而使表面再生。通过减去由空白表面得到的反应而校正本体折射率差异。还减去空白注射液(=双重参比)。为了计算K_D和其他动力学参数,使用朗缪尔1:1模型。

[1141] 实施例48

[1142] 从抗体制备Fab片段并分析:

[1143] 将12mg抗体(1mg/ml,在20mM组氨酸,140mM NaCl, pH 6.0中)与240 μ l L-半胱氨酸溶液(Merck Millipore; 250mM,在20mM组氨酸,140mM NaCl, pH 6.0中)和327 μ l木瓜蛋白酶(Roche Life Science; 0.001U/mg抗体)在37℃温育120分钟。切割后,使用用PBS(1mM KH₂PO₄, 10mM Na₂HPO₄, 137mM NaCl, 2.7mM KCl)(pH 7.4)平衡的HiTrap MabSelectSuRe(GE Healthcare)的亲层析去除完整的IgG和Fc片段。随后,使用在Superdex 200™(GE Healthcare)上的大小排阻层析作为第二纯化步骤,进一步纯化MabSelectSuRe层析的流过

液。所述大小排阻层析在20mM组氨酸缓冲液,0.14M NaCl,pH 6.0中进行。将包含Fab片段的溶液用装配Biomax-SK膜(Millipore,Billerica,MA)的Ultrafree-CL离心过滤器部件浓缩并保存在-80℃。

[1144] 使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过测量280nm的光密度(OD),确定Fab-片段的蛋白浓度。

[1145] 在存在和不存在还原剂(5mM 1,4-二硫苏糖醇)的条件下,通过SDS-PAGE(NuPAGE 4-12%Bis-Tris凝胶,Invitrogen)并用Simply Blue Safe Stain(Invitrogen)染色分析Fab-片段的纯度和完整性。

[1146] 使用BioSuite高分辨率SEC,250 Å,5μm分析级大小排阻柱(Waters GmbH),使用200mM K₂HPO₄/KH₂PO₄,250mM KCl,pH 7.0作为运行缓冲液,通过高效SEC确定Fab制剂的聚集物含量。

[1147] 实施例49

[1148] ANG2结合动力学和成熟的XFab的交叉反应性

[1149] 使用BIAcore T200仪器(GE Healthcare)通过表面等离子体共振研究成熟的XFab与人ANG2-RBD-Fc-区融合体的结合。使用由GE Healthcare供应的胺偶联试剂盒,在pH 5.0将大约4000RU的抗-人抗体(10μg/ml抗-人IgG(Fc)抗体;订购号BR-1008-39;GE Healthcare)偶联在S系列CM5芯片(GE Healthcare BR-1005-30)上。在固定步骤过程中,使用HBS-N(10mM HEPES,150mM NaCl pH 7.4,GE Healthcare)作为运行缓冲液。对于下述动力学表征,样品和运行缓冲液是HBS-P(10mM HEPES,150mM NaCl pH 7.4,0.05%表面活性剂P20;GE Healthcare)。流动池设置为25℃-并且样品区组设置为12℃-并在动力学表征之前用运行缓冲液致敏两次。

[1150] 通过以5μl/min的流速注入1μg/ml溶液30秒而捕获人或食蟹猴ANG2-RBD-Fc-区融合物。通过以90μl/min的流速注入在溶液中的不同浓度(以300nM起始,连续1:3稀释)的XFab 90秒而测量缔合。监测解离期直至600秒,并且解离期通过由样品溶液转换为运行缓冲液而引发。通过以5μl/min的流速用3M MgCl₂溶液清洗60秒,而使表面再生。通过减去由抗-人IgG抗体(Fc)表面得到的反应而校正本体折射率差异。还减去空白注射液(=双重参比)。为了计算KD和其他动力学参数,使用朗缪尔1:1模型。

[1151] 实施例50

[1152] 生物学活性

[1153] 该方法确定抗体抑制ANG2与其受体Tie2结合的能力。对于Tie2受体酪氨酸激酶在细胞表面上的表达,将HEK293细胞系(一种人胚肾细胞系)稳定转染人Tie2的表达载体,产生细胞系HEK293_Tie2。

[1154] 将细胞用于Tie2受体结合并诱导受体的自磷酸化的ANG2刺激。可以通过加入本文报道的抗-ANG2抗体而抑制与Tie2的结合。通过ELISA分析磷酸化的等级。OD值与磷酸化的Tie2的量相关,并且针对抗体浓度绘图。确定EC₅₀值并且相对于在同一平板上的参比标准物以相对生物学活性(RBA)报道。

[1155] 将多孔平板用针对人Tie2受体的抗体包被(100μl,10μg/ml;R&D Systems,Cat# MAB3132;96孔Maxisorb免疫平板,在室温温育过夜;将包被的平板清洗三次,体积为250μl;然后在室温用200μl封闭液温育1-2小时)。

[1156] 分开地,将HEK293_Tie2细胞(40 μ l;5x 10⁶个细胞/ml;DMEM/F12)加入到讨论抗体的连续稀释液与ANG2(R&D Systems,Cat#623-CF)的预先温育的混合物(80 μ l)中。10分钟后,将细胞裂解(加入60 μ l裂解缓冲液;温育15分钟),并且将细胞裂解物转移到包被的平板中进行ELISA。

[1157] 所述裂解物的Tie2受体结合捕获物抗-Tie2抗体(100 μ l裂解物;在室温(RT)温育90分钟)。通过与生物素缀合的抗-磷酸酪氨酸抗体(100 μ l;0.3 μ g/ml抗-磷酸酪氨酸抗体,克隆4G10®,生物素缀合物,Upstate,Cat#16-103;在室温(RT)温育60分钟)检测Tie2受体上磷酸化的酪氨酸。生物素残基被链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶缀合物(100 μ l;100mU/ml;Roche Diagnostics GmbH,Mannheim,德国,Cat#11089153001;在室温(RT)温育30分钟)结合。加入过氧化物酶底物TMB(100 μ l;Roche Diagnostics GmbH,Mannheim,德国,Cat#11835033001),并在5-10分钟后在450nm测量光密度。

[1158] 实施例51

[1159] 双特异性抗体的制备和纯化

[1160] 在用转染试剂293-free(Novagen)转染DNA后,在混悬适应的HEK293F(FreeStyle 293-F细胞;Invitrogen)细胞中进行双特异性抗体的瞬时表达。

[1161] 在125ml摇瓶中解冻(在37 $^{\circ}$ C,7%CO₂,85%湿度,135rpm温育/摇动)后,每逢第三天或第四天通过稀释将细胞传代至少四次(体积为30ml)。通过将细胞以3x10⁵个细胞/ml的细胞密度接种在250ml培养基中而扩增细胞。三天后,将细胞分传,并且以2x10⁵个细胞/ml的密度新接种在500ml培养基中。四天后,将细胞分传,并且以7x10⁵个细胞/ml的密度新接种在1升培养基中(在37 $^{\circ}$ C,7%CO₂,85%湿度,110rpm温育/摇动)。在24小时后,在大约1.4-2.0x10⁶个细胞/ml的细胞密度进行转染。

[1162] 在转染之前,将1000 μ g质粒-DNA(2x 250 μ g轻链编码质粒DNA和2x 250 μ g重链编码质粒DNA)稀释在终体积为40ml的预热的(水浴;37 $^{\circ}$ C)Opti-MEM(Gibco)中。将溶液轻轻混合,并且在室温温育不超过5分钟。然后,向DNA-Opti-MEM-溶液中加入1333 μ l 293-free转染剂。将混合物轻轻混合,并且在室温温育15-20分钟。小心地将全部体积的混合物添加到1升HEK-细胞培养物中。将细胞在37 $^{\circ}$ C,7%CO₂,85%湿度下以110rpm摇动进一步培养7天。

[1163] 7天后,通过以2000rpm,4 $^{\circ}$ C离心10分钟的第一离心步骤收集上清。然后,将上清转移到新的离心瓶中用于以4000rpm,4 $^{\circ}$ C离心20分钟的第二离心步骤。将不含细胞的上清通过0.22 μ m滤器(Millipore)过滤并且在开始纯化步骤之前保存在冰箱中(-20 $^{\circ}$ C)。

[1164] 将含有抗体的培养上清过滤并通过至少两个层析步骤纯化。使用用PBS(1mM KH₂PO₄,10mM Na₂HPO₄,137mM NaCl,2.7mM KCl)(pH 7.4)平衡的CaptureSelect预装柱IgG-CH1(life technologies,#494320005),通过亲和层析捕获抗体。通过用平衡缓冲液清洗去除未结合的蛋白,并且用25mM柠檬酸缓冲液(pH 3.0)回收抗体,并在洗脱后立即用1M Tris-碱(pH 9.0)中和至pH 6.0。

[1165] 使用在Superdex 200™(GE Healthcare)上的大小排阻层析作为第二纯化步骤。所述大小排阻层析在20mM组氨酸缓冲液,0.14M NaCl,pH 6.0中进行。将含有抗体的溶液用装配Biomax-SK膜(Millipore,Billerica,MA)的Ultrafree-CL离心过滤器部件浓缩并保存在-80 $^{\circ}$ C。

[1166] 使用疏水相互作用层析(HIC)进一步纯化抗-PDGF-B/ANG2抗体(克隆0144-0004)。

向含有抗体的溶液中加入硫酸铵至终浓度为1M。将溶液施加到用1M硫酸铵,35mM乙酸盐,pH 5.6中平衡的丁基琼脂糖4 Fast Flow (GE Healthcare) 柱上。将抗体用35mM乙酸盐 (pH 5.6) 以线性梯度 (0-100%) 洗脱。将含有抗体的级分汇集并且应用到大小排阻层析上。

[1167] 使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过测量280nm的光密度 (OD) 确定抗体制剂的蛋白浓度。

[1168] 使用具有蛋白表达芯片和HT蛋白表达试剂盒的LabChip GX II (PerkinElmer), 通过CE-SDS分析抗体的纯度和完整性。

[1169] 使用BioSuite高分辨率SEC, 250 Å, 5µm分析级大小排阻柱 (Waters GmbH), 使用 200mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 250mM KCl, pH 7.0作为运行缓冲液,通过高效SEC确定抗体制剂的聚集物含量。

[1170]

	抗体	规模 [l]	收率 [mg]	收率 [mg/l 上清]	单体 (SE-HPLC) [%]	单体 (CE-SDS) [%]	柱
抗 -PDGF-B/ ANG2 抗体	0144	1.5	37.7	25.1	>98	>95	CH1 选 择, HIC, SEC
抗 -PDGF-B/ VEGF 抗体	0117	1	46.3	46.3	>98	>95	CH1 选 择, SEC
抗 -PDGF-B/ ANG2 抗体	0145	1	21.5	21.5	>98	>95	CH1 选 择/SEC
抗 -PDGF-B/ ANG2 抗体	0146	0.5	14.6	29.2	>98	>95	CH1 选 择/SEC
抗 -IL-1β/AN G2 抗体	0031	1	29.2	29.2	>98	>95	CH1 选 择, SEC
抗 -IL-1β/VE GF 抗体	0032	1.5	23.6	15.7	>98	>95	CH1 选 择, IEX, SEC

[1171] 抗体0144是包含SEQ ID NO:117 (VH) 与SEQ ID NO:118 (VL) 的ANG2结合位点和SEQ ID NO:92 (VH) 与SEQ ID NO:97 (VL) 的PDGF-B结合位点的CrossMab抗体。

[1172] 抗体0117是包含SEQ ID NO:119 (VH) 与SEQ ID NO:120 (VL) 的VEGF结合位点和SEQ ID NO:92 (VH) 与SEQ ID NO:97 (VL) 的PDGF-B结合位点的CrossMab抗体。

[1173] 抗体0145是包含SEQ ID NO:119 (VH) 与SEQ ID NO:120 (VL) 的ANG2结合位点和SEQ ID NO:101 (VH) 与SEQ ID NO:106 (VL) 的PDGF-B结合位点的CrossMab抗体。

[1174] 抗体0146是包含SEQ ID NO:117 (VH) 与SEQ ID NO:118 (VL) 的ANG2结合位点和SEQ ID NO:121 (VH) 与SEQ ID NO:122 (VL) 的PDGF-B结合位点的CrossMab抗体。

[1175] 抗体0031是包含SEQ ID NO:06 (VH) 与SEQ ID NO:16 (VL) 的IL-1β结合位点和SEQ ID NO:140 (VH) 与SEQ ID NO:141 (VL) 的ANG2结合位点的CrossMab抗体。

[1176] 抗体0032是包含SEQ ID NO:142 (VH) 与SEQ ID NO:143 (VL) 的VEGF结合位点和SEQ ID NO:06 (VH) 与SEQ ID NO:16 (VL) 的IL-1 β 结合位点的CrossMab抗体。

[1177] 实施例52

[1178] 双特异性抗体动力学表征

[1179] PDGF-BB

[1180] 使用BIAcore T200仪器 (GE Healthcare), 通过表面等离子体共振研究双特异性抗-PDGF-BB/ANG2抗体与人PDGF-BB的结合。使用GE Healthcare供应的胺偶联试剂盒, 在pH 4.0将大约50个共振单位 (RU) 的重组人PDGF-BB (0.5 μ g/ml; 订购号220-BB; R&D Systems) 偶联到S系列CM3芯片 (GE Healthcare BR-1005-36) 上。用于固定的运行缓冲液是HBS-N pH 7.4 (10mM HEPES, 150mM NaCl, pH 7.4, GE Healthcare)。对于下述动力学表征, 运行和稀释缓冲液为HBS-P pH 7.4 (10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.05% 表面活性剂P20, pH 7.4, GE Healthcare)。流动池设置为25 $^{\circ}$ C-并且样品区组设置为12 $^{\circ}$ C-并用运行缓冲液致敏两次。

[1181] 通过以30 μ l/min的流速注入在溶液中的不同浓度 (以300nM起始, 连续1:3稀释) 的双特异性抗体180秒而测量缔合。监测解离期直至900秒, 并且解离期通过由样品溶液转换为运行缓冲液而引发。通过以5 μ l/min的流速用0.85% H₃PO₄ (磷酸) 溶液清洗60秒, 而使表面再生。通过减去由空白表面得到的反应而校正本体折射率差异。还减去空白注射液 (= 双重参比)。为了计算KD和其他动力学参数, 使用朗缪尔1:1模型。

[1182] ANG2:

[1183] 使用BIAcore T200仪器 (GE Healthcare), 通过表面等离子体共振研究双特异性抗体与人ANG2-RBD-小鼠Fc-区融合体的结合。使用GE Healthcare供应的胺偶联试剂盒, 在pH 5.0将大约4000RU的抗-小鼠Fc-区抗体 (10 μ g/ml 抗-小鼠 (Fc) 抗体) 偶联到S系列CM5芯片 (GE Healthcare BR-1005-30) 上。在固定步骤过程中使用HBS-N (10mM HEPES, 150mM NaCl pH 7.4, GE Healthcare) 作为运行缓冲液。对于下述动力学表征, 样品和运行缓冲液为HBS-P (10mM HEPES, 150mM NaCl pH 7.4, 0.05% 表面活性剂P20; GE Healthcare)。流动池设置为25 $^{\circ}$ C-并且样品区组设置为12 $^{\circ}$ C-并在动力学表征之前用运行缓冲液致敏两次。

[1184] 通过以5 μ l/min的流动注入1 μ g/ml溶液30秒而捕获人ANG2-RBD-鼠Fc-区融合体。通过以90 μ l/min的流速注入在溶液中的不同浓度 (以300nM起始, 连续1:3稀释) 的双特异性抗体90秒而测量缔合。监测解离期直至600秒, 并且解离期通过由样品溶液转换为运行缓冲液而引发。通过以5 μ l/min的流速用3M MgCl₂溶液清洗60秒而使所有表面再生。通过减去由抗-小鼠IgG抗体 (Fc) 表面得到的反应而校正本体折射率差异。还减去空白注射液 (= 双重参比)。为了计算KD和其他动力学参数, 使用朗缪尔1:1模型。

[1185] VEGF:

[1186] 使用BIAcore T200仪器 (GE Healthcare), 通过表面等离子体共振研究双特异性抗体与人VEGF同种型121的结合。使用GE Healthcare供应的胺偶联试剂盒, 按照制造商的使用说明, 将抗-六-组氨酸抗体偶联到CM5芯片 (GE Healthcare BR-1005-30) 上。在固定步骤过程中使用HBS-N (10mM HEPES, 150mM NaCl pH 7.4, GE Healthcare) 作为运行缓冲液。对于下述动力学表征, 样品和运行缓冲液为HBS-P (10mM HEPES, 150mM NaCl pH 7.4, 0.05% 表面活性剂P20; GE Healthcare)。流动池设置为25 $^{\circ}$ C-并且样品区组设置为12 $^{\circ}$ C-并在动力学表征之前用运行缓冲液致敏两次。

[1187] 通过以5 μ l/min的流速注入溶液30秒捕获包含组氨酸标记的人VEGF同种型121。通过以90 μ l/min的流速注入在溶液中的不同浓度(以300nM起始,连续1:3稀释)的双特异性抗体90秒而测量缔合。监测解离期直至600秒,并且解离期通过由样品溶液转换为运行缓冲液而引发。通过以5 μ l/min的流速用3M MgCl₂溶液清洗60秒而使所有表面再生。通过减去由抗-六-组氨酸抗体表面得到的反应而校正本体折射率差异。还减去空白注射液(=双重参比)。为了计算KD和其他动力学参数,使用朗缪尔1:1模型。

[1188] IL-1 β :

[1189] 使用BIAcore T200仪器(GE Healthcare),通过表面等离子体共振研究抗-IL-1 β 抗体与人IL-1 β 的结合动力学。所有的实验使用HBS-P(10mM His,140mM NaCl,0.05%吐温20pH 7.4)作为运行和稀释缓冲液在25 $^{\circ}$ C进行。使用标准的胺偶联化学,将抗-人Fc抗体固定在S系列CM5传感器芯片(GE Healthcare)上。双特异性抗体被捕获在表面上,导致100-200RU的捕获响应。向表面上注入人IL-1 β 90秒,浓度从0.74至60nM(1:3连续稀释)(缔合期)。通过用运行缓冲液清洗,监测解离期600秒。通过以5 μ l/min的流速注入3M MgCl₂(用于抗-人Fc抗体)或10mM甘氨酸pH1.5(用于抗-小鼠Fc抗体)60秒使表面再生。通过减去由模拟表面得到的反应而校正本体折射率差异。还减去空白注射液(双重参比)。使用BIAevaluation软件将衍生的曲线针对1:1朗缪尔结合模型拟合。

[1190] 实施例53

[1191] X-射线结构确定

[1192] Apo Fab片段H34

[1193] 在32mg/ml的浓度进行Fab片段H34的结晶筛选。在蒸汽扩散坐滴实验(vapor diffusion sitting drop experiments)中,通过混合0.1 μ l蛋白溶液和0.1 μ l储备溶液,将结晶微滴设置为21 $^{\circ}$ C。在包含PEG作为沉淀剂的不同条件下,晶体析出。用于确定H34的结构的晶体在2天内从0.1M HEPES pH 7.0,20%PEG 4000中析出和从0.1M二甲基胍酸钠,15%PEG4000中析出。

[1194] 用无水石蜡油(作为冷冻保护剂)收集晶体,然后在液氮(liquid N₂)中快速冷却。以Swiss光源的光束线X10SA在100K的温度用Pilatus 6M检测器采集衍射图像,并且用XDS包处理(Kabsch,W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants(来自初始未知对称性和晶胞常数的晶体的旋转衍射的自动处理).J.Appl.Cryst.26(1993)795-800)。将来自两种晶体的数据合并,产生1.64 Å分辨率的数据组(在空间群P1中,且两个Fab/晶体学不对称单位)(见下表)。

[1195] 使用来自Roche-内部PDB-ID 1htfr的Fab 577作为检索模型,通过分子替换确定结构。Fab分成恒定和可变结构域,并且都用于在CCP4程序PHASER CCP4(CCP4(Collaborative Computational Project(合作计算项目),N.The CCP4suite:programs for protein crystallography(CCP4套件:用于蛋白晶体学的程序).Acta Crystallogr.D,(1994)760-763)中分开的检索,以解释弯角(elbow angle)中可能的变化。该模型在COOT(Emsley,P.,Lohkamp,B.,Scott,WG.&Cowtan,K.Features and development of COOT(COOT的特征和发展).Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.60(2010)486-501)中重建并且用CCP4程序精修。

[1196] 表:关于H34 Fab apo-晶体的数据采集和结构精修统计

[1197]

数据采集

波长(Å)	1.0
分辨率 ¹ (Å)	48.27 - 1.64 (1.699 - 1.64)
空间群	P1
晶胞(Å, °)	50.03 69.72 80.58 93.389 95.059
	110.195
全反射	424699 (40316)

[1198]

特有反射	123149 (12254)
多重性	3.4 (3.3)
完全性(%)	0.99 (0.99)
平均 I/σ(I)	5.95 (0.59)
Wilson B-因子	28.27
R-合并 ²	0.1151 (1.612)
R-meas	0.1352 (1.908)
CC1/2	0.991 (0.332)
CC*	0.998 (0.706)

精修

用于精修的反射	123149 (12068)
用于 R-无的反射	6101 (592)
R-工作 ³	0.2005 (0.3964)
R-无 ⁴	0.2350 (0.4117)
CC(工作)	0.959 (0.593)
CC(无)	0.943 (0.586)
非氢原子数目	7574
大分子	6622
蛋白残基	859
RMS 键(Å)	0.007
RMS 角(°)	1.09
支持的 Ramachandran (%)	97
允许的 Ramachandran (%)	2.7
Ramachandran 异常值 (%)	0.23
旋转异构体异常值(%)	1.1
Clashscore	1.30
平均 B-因子(Å ²)	32.58
大分子	31.78
溶剂	38.12

[1199] 所有数据用Phenix计算。

[1200] ¹括号中的值表示最高分辨率库 (highest resolution bins)。

[1201] ² $R_{\text{合并}} = \Sigma |I - \langle I \rangle| / \Sigma I$, 其中I是强度。

[1202] ³ $R_{\text{工作}} = \Sigma |F_o - \langle F_c \rangle| / \Sigma F_o$, 其中F_o是观察到的且F_c是计算的结构因子幅度。

[1203] ⁴R_无是基于在精修过程中忽略的5%的总数据计算的。

[1204] 具有人IL-1β的复合Fab片段H34

[1205] 在结晶筛选前,将Fab片段H34与IL-1β (Peprotech) 以1.2:1的摩尔比混合。将蛋白混合物在21℃温育2小时。用于结晶实验的蛋白浓度为32mg/ml。在蒸汽扩散坐滴实验中,通过混合0.1μl蛋白和0.1μl储备溶液,将结晶微滴设置为21℃。在2天内晶体从0.1M Tris pH 8.0, 20%PEG4000中析出,并在4天内生长至0.15mm x 0.06mm x 0.01mm的最终尺寸。

[1206] 不添加冷冻保护剂,收集晶体,然后在液氮 (liquid N₂) 中快速冷冻。以Swiss光源的光束线X10SA在100K的温度用Pilatus 6M检测器采集衍射图像,并且用XDS包处理 (Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants (来自初始未知对称性和晶胞常数的晶体的旋转衍射的自动处理). J. Appl. Cryst. 26 (1993) 795-800 (1993))。数据采集和处理按照与用于H34apo晶体相同的途径 (见上文) 进行。统计数据收集在上表中。将来自两种晶体的数据合并以得到更完整的数据组。使用H34 Fab结构和白介素-1β (PDB-ID 112h) 作为检索模型,分子替换是成功的。模型构建和精修如上文所述进行。

[1207] 表: H34 Fab IL-1β复合物晶体的数据采集和结构精修统计

[1208]

数据采集

波长	1
分辨率范围 ¹	48.22 - 1.36 (1.409 - 1.36)
空间群	P 1
晶胞	41.1 48.92 70.36 96.162 101.938 96.035
全反射	564817 (55575)
特有反射	113220 (11310)
多重性	5.0 (4.9)
完全性(%)	0.99 (1.00)
平均 I/σ(I)	9.82 (0.78)
Wilson B-因子	17.64
R-合并 ²	0.09016 (2.448)
R-meas	0.1007 (2.744)

[1209]

CC1/2	0.999 (0.277)
CC*	1 (0.659)

精修

用于精修的反射	113220 (10997)
用于 R-无的反射	5663 (564)
R-工作	0.1559 (0.3786)
R-无	0.2063 (0.4137)
CC(工作)	0.979 (0.659)
CC(无)	0.971 (0.626)
非氢原子数目	5318
大分子	4570
蛋白残基	576
RMS(键)	0.005
RMS(角)	1.09
支持的 Ramachandran (%)	98
允许的 Ramachandran (%)	1.9
Ramachandran 异常值(%)	0
旋转异构体异常值(%)	1.3
Clashscore	1.86
平均 B-因子	28.68
大分子	26.52
溶剂	41.85

[1210] 所有数据用Phenix计算。

[1211] ¹括号中的值表示最高分辨率库 (highest resolution bins)。[1212] ² $R_{\text{合并}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, 其中I是强度。[1213] ³ $R_{\text{工作}} = \sum |F_o - \langle F_c \rangle| / \sum F_o$, 其中F_o是观察到的且F_c是计算的结构因子幅度。[1214] ⁴R_无是基于在精修过程中忽略的5%的总数据计算的。[1215] 实施例54

[1216] 抗-IL-1β抗体的结合动力学和交叉反应性

[1217] 使用BIAcore T200仪器 (GE Healthcare), 通过表面等离子体共振研究抗-IL-1β抗体与人、食蟹猴、大鼠和小鼠IL-1β的动力学结合以及与人IL-1β和人IL-1α的交叉反应性。所有的实验使用HBS-P (10mM His, 140mM NaCl, 0.05%吐温20pH 7.4) 作为运行和稀释缓冲液在25℃进行。使用标准的胺偶联化学, 将抗-人或抗-小鼠Fc抗体固定在S系列CM5传感器芯片 (GE Healthcare) 上。抗-IL-1β抗体被捕获在表面上, 导致100-200RU的捕获响应。向表面上注入IL-1β分子90秒, 浓度从0.74至60nM (1:3连续稀释) (缔合期)。通过用运行缓冲液清洗, 监测解离期600秒。按照上述条件, 通过单次注入100nM抗原, 确定针对人IL-1β和人IL-1α的交叉反应性。通过以5μl/min的流速注入3M MgCl₂ (用于抗-人Fc抗体) 或10mM甘氨酸pH 1.5 (用于抗-小鼠Fc抗体) 60秒使表面再生。通过减去由模拟表面 (mock surface)

得到的反应而校正本体折射率差异。减去空白注射液(双重参比)。使用BIAevaluation软件将衍生的曲线针对1:1朗缪尔结合模型拟合。

[1218] 实施例55

[1219] 抗-IL-1 β IgG与抗-IL-1 β Fab相比较的结合动力学

[1220] 使用BIAcore T200仪器(GE Healthcare),通过表面等离子体共振研究抗-IL-1 β IgG和Fab与人IL-1 β 的结合。所有的实验使用HBS-P(10mM His,140mM NaCl,0.05%吐温20pH 7.4)作为运行和稀释缓冲液在25℃进行。使用标准的胺偶联化学,将抗-人Fc或抗-人Fab抗体固定在S系列CM5传感器芯片(GE Healthcare)上。抗-IL-1 β IgG和Fab被捕获在表面上,分别导致大约100和50RU的捕获响应。向表面上以30 μ l/min的流速注入人IL-1 β 90秒,浓度从0.74至60nM(1:3连续稀释)(缔合期)。通过用运行缓冲液清洗,监测解离期600秒。通过以5 μ l/min的流速注入3M MgCl₂(用于抗-人Fc抗体)或10mM甘氨酸pH 1.5(用于抗-小鼠Fc抗体)60秒使表面再生。通过减去由模拟表面得到的反应而校正本体折射率差异。减去空白注射液(双重参比)。使用BIAevaluation软件将衍生的曲线针对1:1朗缪尔结合模型拟合。

[1221] 实施例56

[1222] 抗-IL-1 β 抗体的作用模式分析

[1223] 使用BIAcore T200仪器(GE Healthcare),通过表面等离子体共振研究抗-IL-1 β 与人IL-1RI的结合抑制。所有的实验使用HBS-P(10mM His,140mM NaCl,0.05%吐温20pH 7.4)作为运行和稀释缓冲液在25℃进行。使用标准的胺偶联化学,将人IL-1RI固定在S系列CM5传感器芯片(GE Healthcare)上。将10nM人IL-1 β 与浓度从100nM降至0.098nM(1:2连续稀释)的抗-IL-1 β 抗体预先温育。将IL-1 β /抗-IL-1 β 抗体混合物以5 μ l/min注入流动池,60秒后的结合反应(RU)用于监测抑制。通过以5 μ l/min的流速注入10mM NaOH 60秒使表面再生。通过减去由模拟表面得到的反应而校正本体折射率差异。

[1224] 尽管出于清楚理解的目的,通过举例说明和实施例详细地描述了前述的发明,但是所述说明和实施例不应该解释为限制本发明的范围。本文引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用明确地整体结合在本文中。

序列表

<110> 豪夫迈·罗氏有限公司

<120> 双特异性抗体和用于眼科学的方法

<130> P32416-W0

<150> EP14192517.2

<151> 2014-11-10

<160> 189

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huH34-1 VH

<400> 1

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	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	Tyr	Ile	Ser	Ser	Tyr	Ser	Gly	Phe	Thr	Thr	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	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Ser	Leu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
				100				105						110	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huH34-1-HVR-H1

<400> 2

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

1 5

<210> 3

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huH34-1-HVR-H2s

<400> 3

Tyr Ser Gly

1

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huH34-1-HVR-H2

<400> 4

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Phe Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 5

Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu

1 5

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huH34-2 VH

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Ser Ser Tyr Asn Ala Phe Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Arg Gly Arg Ala Thr Phe Thr Val 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
 Val Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

1 5

<210> 8

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 8

Tyr Asn Ala

1

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huH34-2-HVR-H2

<400> 9

Tyr Ile Ser Ser Tyr Asn Ala Phe Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 10

Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu

1 5

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huH34-3 VH

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Ala Phe Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Arg Gly Arg Ala Thr Phe Thr Val 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

Val Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 12

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

1 5

<210> 13

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huH34-3-HVR-H2s

<400> 13

Tyr Ser Ala

1

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huH34-3-HVR-H2

<400> 14

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Ala Phe Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Arg

1

5

10

15

Gly

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 15

Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu

1

5

<210> 16

<211> 105

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huH34 VK

<400> 16

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20

25

30

His Trp Ser Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

35

40

45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50

55

60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65

70

75

80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Asn Tyr Tyr Thr Phe

	85	90	95
Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	
<210> 17			
<211> 6			
<212> PRT			
<213> 小家鼠			
<400> 17			
Ser Ser Ser Val Ser Tyr			
1	5		
<210> 18			
<211> 3			
<212> PRT			
<213> 小家鼠			
<400> 18			
Ser Thr Ser			
1			
<210> 19			
<211> 5			
<212> PRT			
<213> 小家鼠			
<400> 19			
Trp Ser Asn Tyr Tyr			
1	5		
<210> 20			
<211> 121			
<212> PRT			
<213> 小家鼠			
<400> 20			
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr			
	20	25	30
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe			
	50	55	60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80

Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Ser Pro Thr Arg Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 21

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

1 5

<210> 22

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 22

Tyr Tyr Gly

1

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 23

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 24

Gly Ser Pro Thr Arg Tyr Tyr Val Met Asp

1 5 10

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 25

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

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 26

Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 1 5

<210> 27

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 27

Ala Ala Thr
 1

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 28

Phe Tyr Asn Thr Pro Trp
 1 5

<210> 29

<211> 116

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 29

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Val Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Gln Thr Thr Gln Asp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 30

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 31

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 31

Gly Ser Gly
 1

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 32

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Val

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 33

Thr Gln Asp Phe Asp

1 5

<210> 34

<211> 111

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 34

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr

20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 35

Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr Gly Tyr Ser Phe

1 5 10

<210> 36

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 36

Arg Ala Ser

1

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 37

Ser Asn Glu Asp Pro Arg

1

5

<210> 38

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGFB-0085 VH

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu 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

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

35

40

45

Ser Thr Ile Ser Asp Gly Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Glu Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Trp Leu Phe Gly Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGFB-0085 HVR-H1

<400> 39

Ser Tyr Trp Met Ser

1 5

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGFB-0085 HVR-H2s

<400> 40

Ser Asp Gly Gly Gly Leu

1 5

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGFB-0085 HVR-H2

<400> 41

Thr Ile Ser Asp Gly Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGFB-0085 HVR-H3

<400> 42

Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Trp Leu Phe Gly Tyr

1 5 10

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGFB-0085 VL kappa

<400> 43

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ala Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGFB-0085 HVR-L1

<400> 44

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

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGFB-0085 HVR-L2

<400> 45

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGFB-0085 HVR-L3

<400> 46

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 47

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGFB-0086 VH

<400> 47

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	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		
Trp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35				40					45			
Ser	Thr	Ile	Ser	Asp	Gly	Gly	Gly	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
			50				55					60			
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	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	Glu	Ser	Gly	Gly	Tyr	Thr	Asp	Trp	Leu	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115				120								

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGFB-0086 HVR-H1

<400> 48

Ser	Tyr	Trp	Met	Ser
1				5

<210> 49

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGFB-0086 HVR-H2s

<400> 49

Ser Asp Gly Gly Gly Leu

1 5

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGFB-0086 HVR-H2

<400> 50

Thr Ile Ser Asp Gly Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGFB-0086 HVR-H3

<400> 51

Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Trp Leu Phe Gly Tyr

1 5 10

<210> 52

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGFB-0086 VL kappa

<400> 52

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu

	85		90		95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys					
	100		105		
<210> 53					
<211> 11					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> PDGFB-0086 HVR-L1					
<400> 53					
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn					
1	5		10		
<210> 54					
<211> 7					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> PDGFB-0086 HVR-L2					
<400> 54					
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser					
1	5				
<210> 55					
<211> 9					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> PDGFB-0086 HVR-L3					
<400> 55					
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr					
1	5				
<210> 56					
<211> 129					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> Ang2 LC10 VH					
<400> 56					
Gln Val Gln Leu Val Gln 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> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 HVR-H1

<400> 57

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

1

5

<210> 58

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 HVR-H2s

<400> 58

Asn Ser Gly

1

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 HVR-H2

<400> 59

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

Gly

<210> 60

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 HVR-H3

<400> 60

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

Phe Asp

<210> 61

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 VL

<400> 61

Ser Tyr Val 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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser
100 105 110

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 HVR-L1

<400> 62

Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser

1 5

<210> 63

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 HVR-L2

<400> 63

Asp Asp Ser

1

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 HVR-L3

<400> 64

Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp

1 5

<210> 65

<211> 129

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) VH

<400> 65

Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Asn Phe Ala 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 Pro Gly Tyr Tyr	Tyr
	100	105	110
Pro Ala Ala Phe Asp	Ile Trp Gly Gln Gly	Thr Met Val Thr	Val Ser
	115	120	125

Ser

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) HVR-H1

<400> 66

Gly Tyr Asn Phe Ala Gly Tyr

1 5

<210> 67

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) HVR-H2s

<400> 67

Asn Ser Gly

1

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) HVR-H2

<400> 68

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

1 5 10 15

Gly

<210> 69

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) HVR-H3

<400> 69

Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr Pro Ala Ala

1 5 10 15

Phe Asp

<210> 70

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) VL

<400> 70

Ser Tyr Val 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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser

100 105 110

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) HVR-L1

<400> 71

Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser

1 5

<210> 72

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) HVR-L2

<400> 72

Asp Asp Ser

1

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) HVR-L3

<400> 73

Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp

1

5

<210> 74

<211> 129

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) VH

<400> 74

Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Asn Phe Ala 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 Pro Gly Tyr Tyr Tyr

100

105

110

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

115

120

125

Ser

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) HVR-H1

<400> 75

Gly Tyr Asn Phe Ala Gly Tyr

1 5

<210> 76

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) HVR-H2s

<400> 76

Asn Ser Gly

1

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) HVR-H2

<400> 77

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

1 5 10 15

Gly

<210> 78

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) HVR-H3

<400> 78

Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr Pro Ala Ala

1 5 10 15

Phe Asp

<210> 79

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) VL

<400> 79

Ser Tyr Val 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 Thr 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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser

100 105 110

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) HVR-L1

<400> 80

Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser

1 5

<210> 81

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) HVR-L2

<400> 81

Asp Thr Ser

1

<210> 82

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) HVR-L3

<400> 82

Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp

1 5

<210> 83

<211> 129

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (在 LC中) VH

<400> 83

Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Asn Phe Ala 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 Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr

100 105 110

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

115 120 125

Ser

<210> 84

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (在
LC中) HVR-H1

<400> 84

Gly Tyr Asn Phe Ala Gly Tyr

1 5

<210> 85

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (在
LC中) HVR-H2s

<400> 85

Asn Ser Gly

1

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (在
LC中) HVR-H2

<400> 86

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

1 5 10 15

Gly

<210> 87

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (在
LC中) HVR-H3

<400> 87

Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr Pro Ala Ala

1 5 10 15

Phe Asp

<210> 88

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (在 LC中) VL

<400> 88

```

Ser Tyr Val 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 Thr 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
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser
          100          105          110

```

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (在 LC中) HVR-L1

<400> 89

```

Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser
1           5

```

<210> 90

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (在 LC中) HVR-L2

<400> 90

```

Asp Thr Ser

```

1
 <210> 91
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (在
 LC中) HVR-L3
 <400> 91
 Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp
 1 5
 <210> 92
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 92
 Met Ala Glu Val Pro Glu Leu Ala Ser Glu Met Met Ala Tyr Tyr Ser
 1 5 10 15
 Gly Asn Glu Asp Asp Leu Phe Phe Glu Ala Asp Gly Pro Lys Gln Met
 20 25 30
 Lys Cys Ser Phe Gln Asp Leu Asp Leu Cys Pro Leu Asp Gly Gly Ile
 35 40 45
 Gln Leu Arg Ile Ser Asp His His Tyr Ser Lys Gly Phe Arg Gln Ala
 50 55 60
 Ala Ser Val Val Val Ala Met Asp Lys Leu Arg Lys Met Leu Val Pro
 65 70 75 80
 Cys Pro Gln Thr Phe Gln Glu Asn Asp Leu Ser Thr Phe Phe Pro Phe
 85 90 95
 Ile Phe Glu Glu Glu Pro Ile Phe Phe Asp Thr Trp Asp Asn Glu Ala
 100 105 110
 Tyr Val His Asp Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp
 115 120 125
 Ser Gln Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala
 130 135 140
 Leu His Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met
 145 150 155 160
 Ser Phe Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu
 165 170 175
 Gly Leu Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp

180	185	190
Lys Pro Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys		
195	200	205
Lys Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn		
210	215	220
Lys Leu Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr		
225	230	235
Ser Gln Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly		
245	250	255
Gln Asp Ile Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser		
260	265	
<210> 93		
<211> 231		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 93		
Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg		
1	5	10
Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met		
20	25	30
Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala		
35	40	45
Glu Leu Asp Leu Asn Met Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu		
50	55	60
Ser Leu Ala Arg Gly Arg Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu		
65	70	75
Pro Ala Met Ile Ala Glu Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile		
85	90	95
Ser Arg Arg Leu Ile Asp Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro		
100	105	110
Pro Cys Val Glu Val Gln Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn		
115	120	125
Val Gln Cys Arg Pro Thr Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg		
130	135	140
Lys Ile Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val		
145	150	155
Thr Leu Glu Asp His Leu Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala		
165	170	175
Arg Pro Val Thr Arg Ser Pro Gly Gly Ser Gln Glu Gln Arg Ala Lys		

	180					185					190				
Thr	Pro	Gln	Thr	Arg	Val	Thr	Ile	Arg	Thr	Val	Arg	Val	Arg	Arg	Pro
	195					200					205				
Pro	Lys	Gly	Lys	His	Arg	Lys	Phe	Lys	His	Thr	His	Asp	Lys	Thr	Ala
	210					215					220				
Leu	Lys	Glu	Thr	Leu	Gly	Ala									
225						230									
<210>	94														
<211>	191														
<212>	PRT														
<213>	智人														
<400>	94														
Met	Asn	Phe	Leu	Leu	Ser	Trp	Val	His	Trp	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	
Tyr	Leu	His	His	Ala	Lys	Trp	Ser	Gln	Ala	Ala	Pro	Met	Ala	Glu	Gly
	20					25					30				
Gly	Gly	Gln	Asn	His	His	Glu	Val	Val	Lys	Phe	Met	Asp	Val	Tyr	Gln
	35					40					45				
Arg	Ser	Tyr	Cys	His	Pro	Ile	Glu	Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Glu
	50					55					60				
Tyr	Pro	Asp	Glu	Ile	Glu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Pro	Ser	Cys	Val	Pro	Leu
65					70				75					80	
Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Asn	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	Val	Pro
	85					90					95				
Thr	Glu	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr	Met	Gln	Ile	Met	Arg	Ile	Lys	Pro	His
	100					105					110				
Gln	Gly	Gln	His	Ile	Gly	Glu	Met	Ser	Phe	Leu	Gln	His	Asn	Lys	Cys
	115					120					125				
Glu	Cys	Arg	Pro	Lys	Lys	Asp	Arg	Ala	Arg	Gln	Glu	Asn	Pro	Cys	Gly
	130					135					140				
Pro	Cys	Ser	Glu	Arg	Arg	Lys	His	Leu	Phe	Val	Gln	Asp	Pro	Gln	Thr
145					150				155					160	
Cys	Lys	Cys	Ser	Cys	Lys	Asn	Thr	Asp	Ser	Arg	Cys	Lys	Ala	Arg	Gln
	165					170					175				
Leu	Glu	Leu	Asn	Glu	Arg	Thr	Cys	Arg	Cys	Asp	Lys	Pro	Arg	Arg	
	180					185					190				
<210>	95														
<211>	496														
<212>	PRT														

<213> 智人

<400> 95

```

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
          165          170          175
Gln Thr Ser Glu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Lys Asn Ser Phe Leu Glu
          180          185          190
Lys Lys Val Leu Ala Met Glu Asp Lys His Ile Ile Gln Leu Gln Ser
          195          200          205
Ile Lys Glu Glu Lys Asp Gln Leu Gln Val Leu Val Ser Lys Gln Asn
          210          215          220
Ser Ile Ile Glu Glu Leu Glu Lys Lys Ile Val Thr Ala Thr Val Asn
225          230          235          240
Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln His Asp Leu Met Glu Thr Val Asn
          245          250          255
Asn Leu Leu Thr Met Met Ser Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asp Pro Thr
          260          265          270
Val Ala Lys Glu Glu Gln Ile Ser Phe Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe
          275          280          285
Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn

```

290	295	300
Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly Gly		
305	310	315
Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln		320
	325	330
Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu		335
	340	345
Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg		350
	355	360
Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr		365
	370	380
Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg		
385	390	395
Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile		400
	405	410
Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys		415
	420	430
Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp		
	435	440
Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln		445
	450	460
Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser		
465	470	475
Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala Asp Phe		480
	485	490
		495

<210> 96

<211> 225

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG1 LALAPGAAA

<400> 96

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly		
1	5	10
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		15
	20	25
Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		30
	35	40
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		45

50	55	60
His Asn Ala Lys Thr	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	
65	70	75
Arg Val Val Ser Val	Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly	80
	85	90
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile	95
	100	105
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		110
	115	120
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Thr		125
	130	135
Leu Ala Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		140
145	150	155
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		160
	165	170
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		175
	180	185
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		190
	195	200
His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		205
	210	215
Pro		220
225		
<210> 97		
<211> 229		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> IgG4 SPLEPGAAA		
<400> 97		
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe		
1	5	10
Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		15
	20	25
Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		30
	35	40
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		45
	50	55
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser		60

65	70	75	80
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu			
	85	90	95
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Gly Ser			
	100	105	110
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro			
	115	120	125
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln			
	130	135	140
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala			
145	150	155	160
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr			
	165	170	175
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu			
	180	185	190
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser			
	195	200	205
Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser			
	210	215	220
Leu Ser Leu Gly Lys			
225			
<210> 98			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 98			
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			

<210> 100
<211> 438
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Ang2_wt VHL交叉HC IgG1 LALAPGAAA凸起
<400> 100
Ser Tyr Val 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

Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser
			100					105						110	
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr
		115						120					125		
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
		130						135					140		
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val
145						150					155				160
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165						170				175	
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile
			180						185					190	
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val
		195						200					205		
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
		210						215					220		
Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
225						230				235					240
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ala	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
				245						250				255	
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
			260							265				270	
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
		275						280					285		
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Gln
		290						295					300		
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
305						310				315					320
Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
				325						330				335	
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr
			340							345				350	
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
		355						360					365		
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
		370						375					380		
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr
385						390				395					400
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe

405	410	415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys		
420	425	430
Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435		
<210> 101		
<211> 236		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Ang2_wt VHVL交叉LC kappa		
<400> 101		
Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
130 135 140		
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
145 150 155 160		
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
165 170 175		
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
180 185 190		
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
195 200 205		
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		

210	215	220
Ser Pro Val Thr Lys	Ser Phe Asn Arg Gly	Glu Cys
225	230	235
<210> 102		
<211> 446		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> huH34-2 HC IgG1不交叉的LALAPGAAA孔洞		
<400> 102		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
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 Ile		
35	40	45
Gly Tyr Ile Ser Ser Tyr Asn Ala Phe Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe		
50	55	60
Arg Gly Arg Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Val Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser		

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

<210> 103

<211> 211

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huH34-2 LC kappa不交叉的

<400> 103

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met			
	20	25	30
His Trp Ser Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr			

35					40					45						
Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
50					55					60						
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	
65					70					75					80	
Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Trp	Ser	Asn	Tyr	Tyr	Thr	Phe	
85					90					95						
Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	
100					105					110						
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Arg	Lys	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	
115					120					125						
Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	
130					135					140						
Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	
145					150					155					160	
Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	
165					170					175						
Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	
180					185					190						
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	
195					200					205						
Gly Glu Cys																
210																
<210> 104																
<211> 440																
<212> PRT																
<213> 人工序列																
<220>																
<223> Ang2 wt mut4 + D50T VHVL交叉HC IgG1 LALAPGAAA凸起																
<400> 104																
Ser	Tyr	Val	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	Thr	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
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser			
	100	105	110
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr			
	115	120	125
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro			
	130	135	140
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val			
145	150	155	160
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser			
	165	170	175
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile			
	180	185	190
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val			
	195	200	205
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
	210	215	220
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
225	230	235	240
Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
	245	250	255
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
	260	265	270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
	275	280	285
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln			
	290	295	300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
305	310	315	320
Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
	325	330	335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr			
	340	345	350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
	355	360	365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
370	375	380	

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 385 390 395 400
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 405 410 415
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 105
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Ang2-wt 4 mut+ D50T VHVL交叉kappa LC
 <400> 105
 Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Asn Phe Ala 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 Pro Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Pro Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235
 <210> 106
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Ang2-wt mut4 + D50T + D106S VHVL交叉kappa LC
 <400> 106
 Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Asn Phe Ala 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 Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Pro Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235
 <210> 107
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VEGF_B20.4.1 VHVL交叉HC IgG1 LALAPGAAA凸起
 <400> 107
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Arg Arg Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Ser Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 180 185 190
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 195 200 205
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 210 215 220

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

<210> 108

<211> 228

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VEGF_B20.4.1 VHVL交叉LC kappa

<400> 108

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Ile Asn Gly Ser
 20 25 30

Trp Ile Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Ala Ile Trp Pro Phe Gly Gly Tyr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Arg Trp Gly His Ser Thr Ser Pro Trp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 145 150 155 160
 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
 165 170 175
 Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
 180 185 190
 Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
 195 200 205
 Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 210 215 220
 Arg Gly Glu Cys
 225
 <210> 109
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VEGF_VHVL交叉IgG HC LALAPGAAA凸起
 <400> 109
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr			
	100	105	110
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser			
	115	120	125
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu			
	130	135	140
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His			
145	150	155	160
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser			
	165	170	175
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys			
	180	185	190
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu			
	195	200	205
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
	210	215	220
Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
225	230	235	240
Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
	245	250	255
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
	260	265	270
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr			
	275	280	285
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp			
	290	295	300
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu			
305	310	315	320
Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
	325	330	335
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys			
	340	345	350
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			

355	360	365
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
370	375	380
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
385	390	395
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		400
405	410	415
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser		
420	425	430
Leu Ser Leu Ser Pro		
435		
<210> 110		
<211> 230		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> VEGF_LC VHVL交叉LC kappa		
<400> 110		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr		15
20	25	30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe		
50	55	60
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val		
100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala		
115	120	125
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
130	135	140
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
145	150	155
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		160

	165		170		175
Glu Ser Val Thr	Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser				
	180		185		190
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr					
	195		200		205
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser					
	210		215		220
Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
225			230		
<210> 111					
<211> 461					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> Ang2_wt CHCk交叉IgG1 HC LALAPGAAA凸起					
<400> 111					
Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp					
	130		135		140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn					
145		150		155	160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu					
	165		170		175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp					

180	185	190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
195	200	205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
210	215	220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His		
225	230	235
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val		
245	250	255
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr		
260	265	270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
275	280	285
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
290	295	300
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
305	310	315
Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
325	330	335
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
340	345	350
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
355	360	365
Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu		
370	375	380
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
385	390	395
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
405	410	415
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
420	425	430
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
435	440	445
His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
450	455	460

<210> 112

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2_wt CHCK交叉LC kappa

<400> 112

Ser Tyr Val 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
 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser
 100 105 110
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 115 120 125
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 130 135 140
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 145 150 155 160
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 180 185 190
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 195 200 205
 Glu Pro Lys Ser Cys
 210

<210> 113

<211> 461

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2-wt mut4 + D50T CHCK交叉HC IgG1 LALAPGAAA凸起

<400> 113

Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Asn Phe Ala 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 Pro Gly Tyr Tyr Tyr			
100	105	110	
Pro Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser			
115	120	125	
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp			
130	135	140	
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
145	150	155	160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
165	170	175	
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
180	185	190	
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			
195	200	205	
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser			
210	215	220	
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His			
225	230	235	240
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val			
245	250	255	
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr			
260	265	270	
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
275	280	285	
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
290	295	300	
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
305	310	315	320

Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
				325			330				335					
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
				340			345				350					
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	
				355			360				365					
Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	
				370			375				380					
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
385				390			395				400					
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
				405			410				415					
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
				420			425				430					
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
				435			440				445					
His	Asn	Ala	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro				
450				455			460									
<210> 114																
<211> 213																
<212> PRT																
<213> 人工序列																
<220>																
<223> Ang2-wt mut4 + D50T CHCk交叉LC																
<400> 114																
Ser	Tyr	Val	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	Thr	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	Ser	Asp	His
				85			90				95					
Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	
				100			105				110					

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 115 120 125
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 130 135 140
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 145 150 155 160
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 180 185 190
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 195 200 205
 Glu Pro Lys Ser Cys
 210
 <210> 115
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Xang2-0098 Ang2 LC 10 VH wt IgG1
 <400> 115
 Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn
145					150					155				160	
Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp
			180					185					190		
Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr
	195						200					205			
Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser
	210					215					220				
Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	Thr	His
225				230					235					240	
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
				245					250					255	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
	275						280					285			
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
	290					295					300				
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
305				310					315					320	
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
				325					330				335		
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
			340					345					350		
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
	355					360						365			
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
	370					375					380				
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
385				390					395					400	
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				405					410				415		
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
			420					425				430			
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
	435					440					445				
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro			

				245				250				255			
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				260				265				270			
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
				275				280				285			
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
				290				295				300			
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
305				310				315				320			
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
				325				330				335			
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				340				345				350			
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
				355				360				365			
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
				370				375				380			
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
385				390				395				400			
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				405				410				415			
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				420				425				430			
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
				435				440				445			
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro			
450				455				460							
<210> 117															
<211> 461															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> Xang2-0103															
<400> 117															
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	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	Asn	Phe	Ala	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
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 Ser Ser Pro Gly	Tyr Tyr Tyr
100	105	110
Pro Ala Ala Phe Asp Ile Trp	Gly Gln Gly Thr Met Val	Thr Val Ser
115	120	125
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro	Ser Val Phe Ile Phe Pro	Pro Ser Asp
130	135	140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr	Ala Ser Val Val Cys Leu	Leu Asn Asn
145	150	155
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys	Val Gln Trp Lys Val Asp	Asn Ala Leu
165	170	175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu	Ser Val Thr Glu Gln Asp	Ser Lys Asp
180	185	190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser	Thr Leu Thr Leu Ser Lys	Ala Asp Tyr
195	200	205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala	Cys Glu Val Thr His Gln	Gly Leu Ser
210	215	220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe	Asn Arg Gly Glu Cys Asp	Lys Thr His
225	230	235
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	Pro Glu Leu Leu Gly Gly	Pro Ser Val
245	250	255
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	Lys Asp Thr Leu Met Ile	Ser Arg Thr
260	265	270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val	Val Asp Val Ser His Glu	Asp Pro Glu
275	280	285
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	Asp Gly Val Glu Val His	Asn Ala Lys
290	295	300
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg	Val Val Ser
305	310	315
Val Leu Thr Val Leu His Gln	Asp Trp Leu Asn Gly Lys	Glu Tyr Lys
325	330	335
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	Leu Pro Ala Pro Ile Glu	Lys Thr Ile
340	345	350

Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
355							360					365			
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
370							375				380				
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
385					390				395						400
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				405					410					415	
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
			420					425					430		
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
			435					440					445		
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro			
450						455					460				
<210> 118															
<211> 461															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> Xang2-0101															
<400> 118															
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	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	Asn	Phe	Ala	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	Glu	Ser	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Tyr
			100						105				110		
Pro	Ala	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser
			115						120				125		
Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp
130						135						140			

Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn
145					150					155				160	
Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp
			180					185					190		
Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr
		195					200					205			
Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser
	210					215					220				
Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	Thr	His
225				230					235					240	
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
				245					250					255	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
	275						280					285			
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
	290					295					300				
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
305				310					315					320	
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
				325					330				335		
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
			340					345				350			
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
	355					360					365				
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
	370					375					380				
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
385				390					395					400	
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				405					410				415		
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
			420					425				430			
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
	435					440					445				
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro			

			245					250					255				
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr		
			260					265					270				
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu		
			275					280					285				
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys		
			290					295					300				
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser		
305			310					315					320				
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys		
			325					330					335				
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile		
			340					345					350				
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro		
			355					360					365				
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu		
370			375					380									
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn		
385			390					395					400				
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser		
			405					410					415				
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg		
			420					425					430				
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu		
			435					440					445				
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro					
450			455					460									
<210> 120																	
<211> 461																	
<212> PRT																	
<213> 人工序列																	
<220>																	
<223> Xang2-0112 Ang2 wt LC10 VH 孔洞																	
<400> 120																	
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	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
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 Ala Ser Val Ala Ala Pro	Ser Val Phe Ile Phe Pro	Pro Ser Asp
130	135	140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr	Ala Ser Val Val Cys Leu	Leu Asn Asn
145	150	155
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys	Val Gln Trp Lys Val Asp	Asn Ala Leu
165	170	175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu	Ser Val Thr Glu Gln Asp	Ser Lys Asp
180	185	190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser	Thr Leu Thr Leu Ser Lys	Ala Asp Tyr
195	200	205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala	Cys Glu Val Thr His Gln	Gly Leu Ser
210	215	220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe	Asn Arg Gly Glu Cys Asp	Lys Thr His
225	230	235
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	Pro Glu Leu Leu Gly Gly	Pro Ser Val
245	250	255
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	Lys Asp Thr Leu Met Ile	Ser Arg Thr
260	265	270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val	Val Asp Val Ser His Glu	Asp Pro Glu
275	280	285
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	Asp Gly Val Glu Val His	Asn Ala Lys
290	295	300
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg	Val Val Ser
305	310	315
Val Leu Thr Val Leu His Gln	Asp Trp Leu Asn Gly Lys	Glu Tyr Lys
325	330	335
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	Leu Pro Ala Pro Ile Glu	Lys Thr Ile
340	345	350

Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	
		355					360					365				
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	
		370				375					380					
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
385					390					395					400	
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
				405				410						415		
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
			420					425					430			
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
		435					440					445				
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro				
	450					455					460					
<210> 121																
<211> 214																
<212> PRT																
<213> 人工序列																
<220>																
<223> VL-DIG																
<400> 121																
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
1				5					10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Lys	Asn	Tyr	
			20					25					30			
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	
		35					40					45				
Tyr	Tyr	Ser	Ser	Thr	Leu	Leu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
	50					55					60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
65					70					75					80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Ile	Thr	Leu	Pro	Pro	
				85					90					95		
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
			100					105					110			
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
		115					120					125				
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	
	130					135					140					

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser		
180	185	190
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys		
195	200	205
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu		
210	215	220
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
225	230	235
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
245	250	255
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
260	265	270
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
275	280	285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
290	295	300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
305	310	315
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
325	330	335
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
340	345	350
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys		
355	360	365
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
370	375	380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
385	390	395
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
405	410	415
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
420	425	430
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
435	440	445
Leu Ser Leu Ser Pro		
450		
<210> 123		
<211> 461		
<212> PRT		

<213> 人工序列

<220>

<223> Xang2-0113 Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) 孔洞

<400> 123

Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Asn Phe Ala 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 Pro Gly Tyr Tyr Tyr			
100	105	110	
Pro Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser			
115	120	125	
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp			
130	135	140	
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
145	150	155	160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
165	170	175	
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
180	185	190	
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			
195	200	205	
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser			
210	215	220	
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His			
225	230	235	240
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val			
245	250	255	
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
260	265	270	
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			

275	280	285
Val Lys Phe Asn Trp Tyr	Val Asp Gly Val Glu Val	His Asn Ala Lys
290	295	300
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
305	310	315
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
325	330	335
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
340	345	350
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro		
355	360	365
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala		
370	375	380
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
385	390	395
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
405	410	415
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
420	425	430
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
435	440	445
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
450	455	460
<210> 124		
<211> 461		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Xang2-0114 VH 孔洞		
<400> 124		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Ala 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 Ser Ser	Pro Gly Tyr Tyr Tyr	
	100	105	110
Pro Ala Ala Phe Asp	Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met	Val Thr Val Ser	
	115	120	125
Ser Ala Ser Val Ala	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe	Pro Pro Ser Asp	
	130	135	140
Glu Gln Leu Lys Ser	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys	Leu Leu Asn Asn	
	145	150	155
160	165	170	175
Phe Tyr Pro Arg Glu	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val	Asp Asn Ala Leu	
	180	185	190
Gln Ser Gly Asn Ser	Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln	Asp Ser Lys Asp	
	195	200	205
Ser Thr Tyr Ser Leu	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser	Lys Ala Asp Tyr	
	210	215	220
Glu Lys His Lys Val	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His	Gln Gly Leu Ser	
	225	230	235
Ser Pro Val Thr Lys	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	Asp Lys Thr His	
	240	245	250
Thr Cys Pro Pro Cys	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	Gly Pro Ser Val	
	255	260	265
Phe Leu Phe Pro Pro	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	Ile Ser Arg Thr	
	270	275	280
Pro Glu Val Thr Cys	Val Val Val Asp Val Ser His	Glu Asp Pro Glu	
	285	290	295
Val Lys Phe Asn Trp	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	His Asn Ala Lys	
	300	305	310
Thr Lys Pro Arg Glu	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	Arg Val Val Ser	
	315	320	325
Val Leu Thr Val Leu	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly	Lys Glu Tyr Lys	
	330	335	340
Cys Lys Val Ser Asn	Lys Ala Leu Pro Ala Pro	Ile Glu Lys Thr Ile	
	345	350	355
Ser Lys Ala Lys Gly	Gln Pro Arg Glu Pro Gln	Val Cys Thr Leu Pro	
	360	365	370
Pro Ser Arg Asp Glu	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser	Leu Ser Cys Ala	
	375	380	

Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
385						390				395					400
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				405					410						415
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
			420						425					430	
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
			435						440					445	
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro			
			450					455				460			
<210> 125															
<211> 442															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> Ang2_WT + PDGFB_0044															
<400> 125															
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Met	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	His	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35				40						45		
Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
			50				55					60			
Lys	Val	Lys	Ala	Thr	Phe	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Cys	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Gln	Thr	Thr	Gln	Asp	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu
			100						105					110	
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
			115					120					125		
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
			130				135					140			
Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
145					150					155					160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				165					170					175	

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
180	185	190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
195	200	205
Lys Val Asp Glu Lys Val Ser Pro Asn Leu Val Thr Lys Leu Thr His		
210	215	220
Ala His Arg Ala Gln Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Ala Lys Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
340	345	350
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly		
355	360	365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
370	375	380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
385	390	395
Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln		
405	410	415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala		
420	425	430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435	440	
<210> 126		
<211> 217		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		

<223> Ang2_wt + PDGFB_0044

<400> 126

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5				10					15		
Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Ile	Tyr
			20					25					30		
Gly	Tyr	Ser	Phe	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
		35					40					45			
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala
		50				55					60				
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn
65					70				75					80	
Pro	Val	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn
				85				90						95	
Glu	Asp	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Thr
			100					105						110	
Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Arg	Lys	Leu
			115				120						125		
Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro
		130				135					140				
Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly
145					150				155					160	
Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr
				165				170						175	
Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His
			180				185						190		
Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
		195					200					205			
Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							
		210				215									

<210> 127

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2_wt + PDGFB_0058 VH-VL交叉

<400> 127

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 128

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2_wt + PDGFB_0058 VH-VL交叉

<400> 128

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ala Gly Gly Gly Ile Thr His Tyr Pro Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Asp Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
65	70	75 80
Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Cys Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Glu Ser Gly Gly Asp Ile Tyr Ser Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Ser Pro Asn Leu Val Thr		
210	215	220
Lys Leu Thr His Ala His Arg Ala Gln Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro		
225	230	235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser		
245	250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys		

355	360	365
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		400
405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435	440	445
<210> 129		
<211> 446		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Ang2_wt + PDGFB_0085交叉		
<400> 129		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		15
20	25	30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Thr Ile Ser Asp Gly Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Cys Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
85	90	95
Ala Glu Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Trp Leu Phe Gly Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		160

					165			170					175				
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro		
					180			185					190				
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys		
					195			200					205				
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Ser	Pro	Asn	Leu	Val	Thr		
					210			215					220				
Lys	Leu	Thr	His	Ala	His	Arg	Ala	Gln	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro		
225					230			235					240				
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ala	Ser		
					245			250					255				
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp		
					260			265					270				
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn		
					275			280					285				
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val		
					290			295					300				
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu		
305					310			315					320				
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys		
					325			330					335				
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu		
					340			345					350				
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys		
					355			360					365				
Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser		
					370			375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp		
385					390			395					400				
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser		
					405			410					415				
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala		
					420			425					430				
Leu	His	Asn	Ala	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro				
					435			440					445				

<210> 130

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2_wt + PDGFB_0085 VH-VL交叉

<400> 130

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Ala Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
           20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
           85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Val Ala Ala Pro
           100          105          110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr
           115          120          125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
           130          135          140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145          150          155          160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
           165          170          175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
           180          185          190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
           195          200          205
Asn Arg Gly Glu Cys
           210

```

<210> 131

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2_wt + PDGFB_0086 VH-VL交叉

<400> 131

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

```

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr	Ile Thr Cys Arg	Ala Ser Gln Ser	Ile Ser Ser Tyr
20	25	30	
Leu Asn Trp Tyr	Gln Gln Lys Pro	Gly Lys Ala Pro	Lys Leu Leu Ile
35	40	45	
Tyr Ala Ala Ser	Ser Leu Gln Ser	Gly Val Pro Ser	Arg Phe Ser Gly
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly	Thr Asp Phe Thr	Leu Thr Ile Ser	Ser Ser Leu Gln Pro
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala	Thr Tyr Tyr Cys	Gln Gln Ser Tyr	Ser Thr Pro Leu
85	90	95	
Thr Phe Gly Gly	Gly Thr Lys Val	Glu Ile Lys Thr	Val Ala Ala Pro
100	105	110	
Ser Val Phe Ile	Phe Pro Pro Ser	Asp Arg Lys Leu	Lys Ser Gly Thr
115	120	125	
Ala Ser Val Val	Cys Leu Leu Asn	Asn Phe Tyr Pro	Arg Glu Ala Lys
130	135	140	
Val Gln Trp Lys	Val Asp Asn Ala	Leu Gln Ser Gly	Asn Ser Gln Glu
145	150	155	160
Ser Val Thr Glu	Gln Asp Ser Lys	Asp Ser Thr Tyr	Ser Leu Ser Ser
165	170	175	
Thr Leu Thr Leu	Ser Lys Ala Asp	Tyr Glu Lys His	Lys Val Tyr Ala
180	185	190	
Cys Glu Val Thr	His Gln Gly Leu	Ser Ser Pro Val	Thr Lys Ser Phe
195	200	205	
Asn Arg Gly Glu	Cys		
210			
<210> 132			
<211> 37			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> rbHC.up			
<400> 132			
aagcttgcca ccatggagac	tggtctgcgc tggettc	37	
<210> 133			
<211> 21			
<212> DNA			
<213> 人工序列			

<220>
<223> rbHCf.do
<400> 133
ccattggtga ggggtgcccga g 21
<210> 134
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> rbLC.up
<400> 134
aagcttgcca ccatggacay gagggccccc actc 34
<210> 135
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> rbLC.do
<400> 135
cagagtrctg ctgaggttgt aggtac 26
<210> 136
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> BcPCR_FHLC_leader.fw
<400> 136
atggacatga ggggtccccgc 20
<210> 137
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> BcPCR_huCkappa.rev
<400> 137
gatttcaact gctcatcaga tggc 24
<210> 138
<211> 446
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 不交叉CH1Ck的huH34-2 HC

<400> 138

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	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	Ile
			35				40						45		
Gly	Tyr	Ile	Ser	Ser	Tyr	Asn	Ala	Phe	Thr	Thr	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
		50				55					60				
Arg	Gly	Arg	Ala	Thr	Phe	Thr	Val	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
Val	Arg	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Ser	Leu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100						105					110	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
			115						120					125	
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
			130						135					140	
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145					150					155					160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				165						170				175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
			180						185					190	
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
			195				200						205		
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
			210				215					220			
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ala	Ser	Arg
				245						250				255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
				260					265				270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala

275					280					285						
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
290					295					300						
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
305					310					315					320	
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
325					330					335						
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	
340					345					350						
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	
355					360					365						
Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
370					375					380						
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
385					390					395					400	
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
405					410					415						
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	
420					425					430						
Leu	His	Asn	Ala	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro			
435					440					445						

<210> 139

 $\langle 211 \rangle \quad 211$

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 不交叉CH1Ck的huH34-2 LC

<400> 139

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

				85					90					95			
Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val		
				100					105					110			
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser		
				115					120					125			
Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln		
				130					135					140			
Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val		
145					150					155					160		
Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu		
				165					170					175			
Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu		
				180					185					190			
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg		
				195					200					205			
Gly	Glu	Cys															
210																	
<210>	140																
<211>	129																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<220>																	
<223>	Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) VH																
<400>	140																
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	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	Asn	Phe	Ala	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	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Tyr		
				100					105					110			
Pro	Ala	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser		

115	120	125
Ser		
<210> 141		
<211> 110		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) VL		
<400> 141		
Ser Tyr Val 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 Thr 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		
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser		
100 105 110		
<210> 142		
<211> 123		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> VEGF_LC VHVL交叉LC kappa		
<400> 142		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1 5 10 15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr		
20 25 30		
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35 40 45		
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe		
50 55 60		
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala 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 Tyr Pro Tyr Tyr Tyr	Gly Thr Ser His Trp Tyr	Phe Asp Val	
100	105	110	
Trp Gly Gln Gly Thr	Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120		
<210> 143			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> VEGF_LC10 VHVL交叉IgG HC LALAPGAAA凸起			
<400> 143			
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr			
20	25	30	
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105		
<210> 144			
<211> 116			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> PDGFang2-0044 VH			
<400> 144			
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr			
20	25	30	

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Val Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Gln Thr Thr Gln Asp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 145

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGFang2-0044 VL

<400> 145

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

<210> 146

<211> 440

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CrossMab Ang2 wt-PDGF-0044 HC1

<400> 146

Ser	Tyr	Val	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		
Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser
		100						105					110		
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr
		115						120					125		
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
		130					135					140			
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val
145				150					155					160	
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
			165					170					175		
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile
		180						185					190		
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val
	195						200					205			
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
	210						215				220				
Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
225				230					235					240	
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ala	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
			245					250					255		
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
		260						265					270		
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
	275						280					285			
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Gln
	290						295					300			

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 305 310 315 320
 Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 325 330 335
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
 340 345 350
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 355 360 365
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 370 375 380
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 385 390 395 400
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 405 410 415
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 147

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CrossMab Ang2 wt-PDGF-0044 HC2

<400> 147

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		
115	120	125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu		
130	135	140
Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
145	150	155
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
	165	170
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
	180	185
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
	195	200
Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
	210	215
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe		
225	230	235
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro		
	245	250
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
	260	265
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
	275	280
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
	290	295
Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
305	310	315
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
	325	330
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro		
	340	345
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val		
	355	360
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
	370	375
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395
Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
	405	410
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		

420	425	430
Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
435	440	445
<210> 148		
<211> 236		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CrossMab Ang2 wt-PDGF-0044 LC1		
<400> 148		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
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
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 Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
130	135	140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
145	150	155
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
165	170	175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
180	185	190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
195	200	205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
210	215	220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		

225	230	235
<210> 149		
<211> 218		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CrossMab Ang2 wt-PDGF-0044 LC2		
<400> 149		
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
1	5	10
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr		
	20	25
Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
	35	40
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala		
	50	55
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn		
65	70	75
Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn		
	85	90
Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
	100	105
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys		
	115	120
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
	130	135
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
145	150	155
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
	165	170
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
	180	185
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
	195	200
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210	215
<210> 150		
<211> 440		
<212> PRT		

<213> 人工序列

<220>

<223> CrossMab Ang2 wt-PDGF-0085 HC1

<400> 150

Ser	Tyr	Val	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	
Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser
			100					105						110	
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr
			115					120						125	
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
			130				135					140			
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val
145				150					155					160	
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
			165						170					175	
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile
			180					185						190	
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val
		195					200					205			
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
	210					215				220					
Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
225				230					235					240	
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ala	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
			245						250					255	
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
			260					265					270		
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln

275	280	285
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val	Val Ser Val Leu Thr Val	Leu Ala Gln
290	295	300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
305	310	315
Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
325	330	335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr		
340	345	350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
355	360	365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
370	375	380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
385	390	395
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
405	410	415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys		
420	425	430
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	
<210> 151		
<211> 450		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CrossMab Ang2 wt-PDGF-0085 HC2		
<400> 151		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
20	25	30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Thr Ile Ser Asp Gly Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		

				85					90					95			
Ala	Glu	Ser	Gly	Gly	Tyr	Thr	Asp	Trp	Leu	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln		
				100					105					110			
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val		
				115					120					125			
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala		
				130					135					140			
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser		
145						150				155					160		
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val		
				165					170					175			
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro		
				180					185					190			
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys		
				195					200					205			
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp		
				210					215					220			
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly		
225						230				235					240		
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ala		
				245						250					255		
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu		
				260					265					270			
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His		
				275					280					285			
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg		
				290					295					300			
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys		
305						310				315					320		
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu		
				325					330					335			
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys		
				340					345					350			
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu		
				355					360					365			
Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp		
				370					375					380			
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val		
385						390				395					400		

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 152
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CrossMab Ang2 wt-PDGF-0085 LC1
 <400> 152
 Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235
 <210> 153
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CrossMab Ang2 wt-PDGF-0085 LC2
 <400> 153
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ala Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 154

<211> 440

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CrossMab Ang2 wt-PDGF-0086 HC1

<400> 154

Ser Tyr Val 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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser

100 105 110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr

115 120 125

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro

130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

180 185 190

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val

195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

210 215 220

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
245	250	255	
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
260	265	270	
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
275	280	285	
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln			
290	295	300	
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
305	310	315	320
Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
325	330	335	
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr			
340	345	350	
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
355	360	365	
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
370	375	380	
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr			
385	390	395	400
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe			
405	410	415	
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys			
420	425	430	
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
435	440		
<210> 155			
<211> 450			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> CrossMab Ang2 wt-PDGF-0086 HC2			
<400> 155			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu 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	
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	

Ser Thr Ile Ser Asp Gly Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Glu Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Trp Leu Phe Gly Tyr Trp Gly Gln		
	100	105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
	115	120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
	130	135 140
Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
	165	170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
	180	185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
	195	200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
	210	215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly		
225	230	235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala		
	245	250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
	260	265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
	275	280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
	290	295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu		
	325	330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys		
	340	345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		

355	360	365
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
385	390	395
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp		400
405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
420	425	430
Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435	440	445
Gly Lys		
450		
<210> 156		
<211> 236		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CrossMab Ang2 wt-PDGF-0086 LC1		
<400> 156		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr		15
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
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
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 Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
130	135	140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		

145	150	155	160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
	165	170	175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
	180	185	190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			
	195	200	205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser			
	210	215	220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
225	230	235	
<210> 157			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> CrossMab Ang2 wt-PDGF-0086 LC2			
<400> 157			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr			
	20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
	100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly			
	115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
	130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			

	165		170		175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr					
	180		185		190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser					
	195		200		205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
210					
<210> 158					
<211> 440					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> Clone 146 HC1					
<400> 158					
Ser Tyr Val 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 Thr 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
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser					
	100		105		110
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr					
	115		120		125
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro					
	130		135		140
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val					
145		150		155	160
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser					
	165		170		175
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile					
	180		185		190
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val					

195	200	205
Glu Pro Lys Ser Cys Asp	Lys Thr His Thr Cys Pro	Pro Cys Pro Ala
210	215	220
Pro Glu Ala Ala Gly Gly	Pro Ser Val Phe Leu Phe	Pro Pro Lys Pro
225	230	235
Lys Asp Thr Leu Met Ala	Ser Arg Thr Pro Glu Val	Thr Cys Val Val
245	250	255
Val Asp Val Ser His Glu	Asp Pro Glu Val Lys Phe	Asn Trp Tyr Val
260	265	270
Asp Gly Val Glu Val His	Asn Ala Lys Thr Lys Pro	Arg Glu Glu Gln
275	280	285
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg	Val Val Ser Val Leu Thr	Val Leu Ala Gln
290	295	300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys	Glu Tyr Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys Ala
305	310	315
Leu Gly Ala Pro Ile Glu	Lys Thr Ile Ser Lys Ala	Lys Gly Gln Pro
325	330	335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr	Thr Leu Pro Pro Cys Arg	Asp Glu Leu Thr
340	345	350
Lys Asn Gln Val Ser Leu	Trp Cys Leu Val Lys Gly	Phe Tyr Pro Ser
355	360	365
Asp Ile Ala Val Glu Trp	Glu Ser Asn Gly Gln Pro	Glu Asn Asn Tyr
370	375	380
Lys Thr Thr Pro Pro Val	Leu Asp Ser Asp Gly Ser	Phe Phe Leu Tyr
385	390	395
Ser Lys Leu Thr Val Asp	Lys Ser Arg Trp Gln Gln	Gly Asn Val Phe
405	410	415
Ser Cys Ser Val Met His	Glu Ala Leu His Asn Ala	Tyr Thr Gln Lys
420	425	430
Ser Leu Ser Leu Ser Pro	Gly Lys	
435	440	
<210> 159		
<211> 446		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Clone 146 HC2		
<400> 159		
Gln Val Gln Leu Gln Gln	Ser Gly Ala Glu Leu	Met Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr			
20	25	30	
Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe			
50	55	60	
Lys Val Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Gln Thr Thr Gln Asp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu			
100	105	110	
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala			
115	120	125	
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu			
130	135	140	
Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly			
145	150	155	160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
165	170	175	
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
180	185	190	
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr			
195	200	205	
Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr			
210	215	220	
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe			
225	230	235	240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro			
245	250	255	
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val			
260	265	270	
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr			
275	280	285	
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val			
290	295	300	
Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys			
305	310	315	320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser			
325	330	335	
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro			
340	345	350	
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val			
355	360	365	
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly			
370	375	380	
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp			
385	390	395	400
Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp			
405	410	415	
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His			
420	425	430	
Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
435	440	445	
<210> 160			
<211> 236			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> Clone 146 LC1			
<400> 160			
Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Asn Phe Ala 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 Pro Gly Tyr Tyr Tyr			
100	105	110	
Pro Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser			
115	120	125	

Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235
 <210> 161
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Clone 146 LC2
 <400> 161
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr
 20 25 30
 Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 162

<211> 440

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Clone 144 HCl

<400> 162

Ser Tyr Val 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 Thr 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
 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser
 100 105 110
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 115 120 125
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 130 135 140
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 145 150 155 160
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
180	185	190
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
195	200	205
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
210	215	220
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
225	230	235
Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
245	250	255
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
260	265	270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
275	280	285
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln		
290	295	300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
305	310	315
Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
325	330	335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr		
340	345	350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
355	360	365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
370	375	380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
385	390	395
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
405	410	415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys		
420	425	430
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	
<210> 163		
<211> 450		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		

<223> Clone 144 HC2

<400> 163

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu 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
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Asp Gly Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Glu Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Trp Leu Phe Gly Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr	Val Leu Ala Gln Asp Trp	Leu Asn Gly Lys
305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys Ala Leu Gly	Ala Pro Ile Glu
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala	Lys Gly Gln Pro Arg Glu	Pro Gln Val Cys
340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg	Asp Glu Leu Thr Lys Asn	Gln Val Ser Leu
355	360	365
Ser Cys Ala Val Lys Gly	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile	Ala Val Glu Trp
370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr	Thr Pro Pro Val
385	390	395
Leu Asp Ser Asp Gly Ser	Phe Phe Leu Val Ser Lys	Leu Thr Val Asp
405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln	Gly Asn Val Phe Ser Cys	Ser Val Met His
420	425	430
Glu Ala Leu His Asn Ala	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro
435	440	445
Gly Lys		
450		
<210> 164		
<211> 236		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Clone 144 LC1		
<400> 164		
Gln Val Gln Leu Val Gln	Ser Gly Ala Glu Val Lys	Lys Pro Gly Ala
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys	Lys Ala Ser Gly Tyr Asn	Phe Ala 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
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	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Tyr																
100								105								110															
Pro	Ala	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser																
115								120								125															
Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp																
130								135								140															
Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn																
145								150								155															
Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu																
165								170								175															
Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp																
180								185								190															
Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr																
195								200								205															
Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser																
210								215								220															
Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys																				
225								230								235															
<210> 165																															
<211> 214																															
<212> PRT																															
<213> 人工序列																															
<220>																															
<223> Clone 144 LC2																															
<400> 165																															
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly																
1				5				10				15																			
Asp	Arg	Val	Ala	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Asn	Tyr																
20								25								30															
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile																
35								40								45															
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly																
50								55								60															
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro																
65								70								75															
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Leu																
85								90								95															
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala																

100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 166		
<211> 440		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Clone 145 HCl		
<400> 166		
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln		
1	5	10
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 Thr 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
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His		
85	90	95
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser		
100	105	110
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
115	120	125
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		

130	135	140
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
145	150	155
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
	165	170
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
	180	185
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
	195	200
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
210	215	220
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
225	230	235
Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
	245	250
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
	260	265
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
275	280	285
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln		
290	295	300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
305	310	315
Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
	325	330
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr		
	340	345
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
	355	360
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
370	375	380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
385	390	395
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
	405	410
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys		
	420	425
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	

<210> 167

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Clone 145 HC2

<400> 167

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	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	
Trp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45		
Ser	Thr	Ile	Ser	Asp	Gly	Gly	Gly	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
			50				55					60			
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	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	Glu	Ser	Gly	Gly	Tyr	Thr	Asp	Trp	Leu	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100						105					110	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
			115					120						125	
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
			130					135						140	
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
145						150					155				160
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
						165					170				175
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
						180					185			190	
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
						195								200	205
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
						210								215	220
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly
225							230					235			240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ala
							245							250	255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
260	265	270	
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
275	280	285	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
290	295	300	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu			
325	330	335	
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys			
340	345	350	
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
355	360	365	
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
370	375	380	
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
385	390	395	400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp			
405	410	415	
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
420	425	430	
Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
435	440	445	
Gly Lys			
450			
<210> 168			
<211> 236			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> Clone 145 LC1			
<400> 168			
Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Asn Phe Ala 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
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 Pro Gly Tyr Tyr Tyr		
100	105	110
Pro Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser		
115	120	125
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
130	135	140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
145	150	155
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
165	170	175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
180	185	190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
195	200	205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
210	215	220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	235
<210> 169		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Clone 145 LC2		
<400> 169		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr		
20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60

Ser	Tyr	Val	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	Thr	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	

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser															
100								105						110	
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr															
115								120						125	
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro															
130								135						140	
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val															
145								150						155	160
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser															
								165						170	175
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile															
								180						185	190
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val															
								195						200	205
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala															
								210						215	220
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro															
225								230						235	240
Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val															
								245						250	255
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val															
								260						265	270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln															
								275						280	285
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln															
								290						295	300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala															
305								310						315	320
Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro															
								325						330	335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr															
								340						345	350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser															
								355						360	365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr															
								370						375	380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr															
385								390						395	400
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe															

	405		410		415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys					
	420		425		430
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
	435		440		
<210> 171					
<211> 446					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> CrossMab Ang2 mut-PDGF-0044 HC2					
<400> 171					
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala					
1	5		10		15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr					
	20		25		30
Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile					
	35		40		45
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe					
	50		55		60
Lys Val Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr					
65	70		75		80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85		90		95
Ala Gln Thr Thr Gln Asp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu					
	100		105		110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala					
	115		120		125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu					
	130		135		140
Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly					
145	150		155		160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser					
	165		170		175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu					
	180		185		190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr					
	195		200		205
Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr					

210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe		
225	230	235
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro		240
	245	250
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		255
	260	265
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		270
	275	280
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		285
290	295	300
Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
305	310	315
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
	325	330
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro		335
	340	345
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val		350
	355	360
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		365
370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395
Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		400
	405	410
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		415
	420	425
Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		430
	435	440
		445
<210> 172		
<211> 236		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CrossMab Ang2 mut-PDGF-0044 LC1		
<400> 172		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Ala Gly Tyr		15

				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	Ser	Ser	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Tyr		
		100						105				110					
Pro	Ala	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser		
	115						120					125					
Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp		
	130					135				140							
Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn		
145					150					155					160		
Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu		
				165					170					175			
Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp		
		180						185				190					
Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr		
	195						200					205					
Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser		
	210					215					220						
Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
225					230					235							
<210>	173																
<211>	218																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<220>																	
<223>	CrossMab	Ang2	mut-PDGF-0044	LC2													
<400>	173																
Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly		
1			5					10						15			
Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Ile	Tyr		
		20						25					30				
Gly	Tyr	Ser	Phe	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro		

35	40	45
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala		
50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn		
65	70	75
Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn		
85	90	95
Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
100	105	110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys		
115	120	125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
130	135	140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
145	150	155
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
165	170	175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
180	185	190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
195	200	205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	

<210> 174

<211> 440

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CrossMab Ang2 mut5-PDGF-0085 HC1

<400> 174

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln		
1	5	10
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 Thr 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
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser			
	100	105	110
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr			
	115	120	125
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro			
	130	135	140
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val			
145	150	155	160
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser			
	165	170	175
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile			
	180	185	190
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val			
	195	200	205
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
	210	215	220
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
225	230	235	240
Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
	245	250	255
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
	260	265	270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
	275	280	285
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln			
	290	295	300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
305	310	315	320
Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
	325	330	335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr			
	340	345	350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
	355	360	365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
370	375	380	

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 385 390 395 400
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 405 410 415
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 175
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CrossMab Ang2 mut5-PDGF-0085 HC2
 <400> 175
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu 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
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Asp Gly Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Glu Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Trp Leu Phe Gly Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly		
225	230	235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu		
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys		
340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
355	360	365
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
385	390	395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp		
405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
420	425	430
Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435	440	445
Gly Lys		
450		
<210> 176		
<211> 236		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		

<223> CrossMab Ang2 mut5-PDGF-0085 LC1

<400> 176

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

<210> 177

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CrossMab Ang2 mut5-PDGF-0085 LC2

<400> 177

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Ala	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Asn	Tyr
		20						25						30	
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40						45		
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55						60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Leu
				85					90						95
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
				100					105					110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Arg	Lys	Leu	Lys	Ser	Gly
		115						120					125		
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
		130						135					140		
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145					150					155					160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165					170					175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
		180						185						190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
		195					200						205		
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
		210													

<210> 178

<211> 440

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CrossMab Ang2 mut5-PDGF-0086 HC1

<400> 178

Ser	Tyr	Val	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 Thr 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
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His		
85	90	95
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser		
100	105	110
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
115	120	125
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
130	135	140
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
145	150	155
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
180	185	190
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
195	200	205
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
210	215	220
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
225	230	235
Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
245	250	255
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
260	265	270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
275	280	285
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln		
290	295	300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
305	310	315
Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
325	330	335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr		

340	345	350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
355	360	365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
370	375	380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
385	390	395
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		400
405	410	415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys		
420	425	430
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	
<210> 179		
<211> 450		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CrossMab Ang2 mut5-PDGF-0086 HC2		
<400> 179		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
20	25	30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Thr Ile Ser Asp Gly Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Glu Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Trp Leu Phe Gly Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		

145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
	165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
	180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
	195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
	210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala			
	245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
	260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
	275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
	290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu			
	325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys			
	340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
	355	360	365
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
	370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
385	390	395	400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp			
	405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
	420	425	430
Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
	435	440	445
Gly Lys			
450			

<210> 180

<211> 236

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CrossMab Ang2 mut5-PDGF-0086 LC1

<400> 180

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

<210> 181

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CrossMab Ang2 mut5-PDGF-0086 LC2

<400> 181

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
           20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
           85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
           100          105          110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly
           115          120          125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
           130          135          140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
           165          170          175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
           180          185          190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
           195          200          205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
           210

```

<210> 182

<211> 440

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CrossMab Ang2mut4 + huH34-2 HCl

<400> 182

Ser	Tyr	Val	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	Thr	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
Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser
			100					105						110	
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr
			115					120						125	
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
			130					135						140	
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val
145							150							155	160
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
							165							170	175
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile
			180					185						190	
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val
			195					200						205	
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
			210					215						220	
Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
225								230						235	240
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ala	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
							245							250	255
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
			260					265						270	
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
			275					280						285	
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Gln
			290					295						300	

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 305 310 315 320
 Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 325 330 335
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
 340 345 350
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 355 360 365
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 370 375 380
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 385 390 395 400
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 405 410 415
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 183

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CrossMab Ang2mut4 + huH34-2 HC2

<400> 183

Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Ser Ser Tyr Asn Ala Phe Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Arg Gly Arg Ala Thr Phe Thr Val 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
 Val Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser		
225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys		
355	360	365
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		

420	425	430
Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445
<210> 184		
<211> 236		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CrossMab Ang2mut4 + huH34-2 LC1		
<400> 184		
Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Asn Phe Ala 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 Pro Gly Tyr Tyr Tyr		
100 105 110		
Pro Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser		
115 120 125		
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
130 135 140		
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
145 150 155 160		
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
165 170 175		
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
180 185 190		
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
195 200 205		
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
210 215 220		
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		

225	230	235
<210> 185		
<211> 212		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CrossMab Ang2mut4 + huH34-2 LC2		
<400> 185		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1 5 10 15		
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met		
20 25 30		
His Trp Ser Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr		
35 40 45		
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser		
50 55 60		
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu		
65 70 75 80		
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Asn Tyr Tyr Thr Phe		
85 90 95		
Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser		
100 105 110		
Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala		
115 120 125		
Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val		
130 135 140		
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser		
145 150 155 160		
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr		
165 170 175		
Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys		
180 185 190		
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn		
195 200 205		
Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 186		
<211> 440		
<212> PRT		

<213> 人工序列

<220>

<223> CrossMab Ang2mut5 + huH34-2 HCl

<400> 186

Ser	Tyr	Val	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	Thr	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	
Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser
			100					105						110	
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr
			115					120						125	
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
			130				135					140			
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val
145					150				155						160
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165					170					175	
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile
			180					185						190	
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val
		195					200					205			
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
		210				215				220					
Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
225					230				235						240
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ala	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
				245					250					255	
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
			260					265					270		
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln

275	280	285
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val	Val Ser Val Leu Thr Val	Leu Ala Gln
290	295	300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
305	310	315
Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
325	330	335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr		
340	345	350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
355	360	365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
370	375	380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
385	390	395
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
405	410	415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys		
420	425	430
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	
<210> 187		
<211> 448		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CrossMab Ang2mut5 + huH34-2 HC2		
<400> 187		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
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 Ile		
35	40	45
Gly Tyr Ile Ser Ser Tyr Asn Ala Phe Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe		
50	55	60
Arg Gly Arg Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		

				85					90					95			
Val	Arg	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Ser	Leu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr		
				100					105					110			
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro		
				115					120					125			
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly		
				130					135					140			
Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn		
145					150					155					160		
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln		
				165					170					175			
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser		
				180					185					190			
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser		
				195					200					205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr		
				210					215					220			
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser		
225					230					235					240		
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ala	Ser	Arg		
				245					250					255			
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro		
				260					265					270			
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala		
				275					280					285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val		
				290					295					300			
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr		
305					310					315					320		
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr		
				325					330					335			
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu		
				340					345					350			
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys		
				355					360					365			
Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser		
				370					375					380			
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp		
385					390					395					400		

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 188
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CrossMab Ang2mut5 + huH34-2 LC1
 <400> 188
 Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Asn Phe Ala 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 Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Pro Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235
 <210> 189
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CrossMab Ang2mut5 + huH34-2 LC2
 <400> 189
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Ser Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Asn Tyr Tyr Thr Phe
 85 90 95
 Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
 100 105 110
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 115 120 125
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 130 135 140
 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
 145 150 155 160
 Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
 165 170 175
 Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
 180 185 190
 Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 195 200 205
 Arg Gly Glu Cys
 210