



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103936860 A

(43) 申请公布日 2014.07.23

(21) 申请号 201410195766.X

代理人 吴小明 王旭

(22) 申请日 2009.10.07

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C07K 16/46 (2006.01)

08017607.6 2008.10.08 EP

A61K 39/395 (2006.01)

08021834.0 2008.12.16 EP

A61P 35/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 9/00 (2006.01)

200980140164.1 2009.10.07

C12N 15/13 (2006.01)

(71) 申请人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

C12N 15/85 (2006.01)

地址 瑞士巴塞尔

C12N 5/10 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

(72) 发明人 莫妮卡·贝纳 乌尔里希·布林克曼

盖伊·乔治

雷姆科·阿尔伯特·格里普

萨拜因·伊姆霍夫·容

阿妮塔·卡夫利 休伯特·藤贝尔格

克里斯蒂安·克莱因

约尔格·托马斯·雷古拉

沃尔夫冈·谢弗

于尔根·迈克尔·尚策

维尔纳·朔伊尔 斯特凡·泽贝尔

马库斯·托马斯

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

权利要求书1页 说明书72页

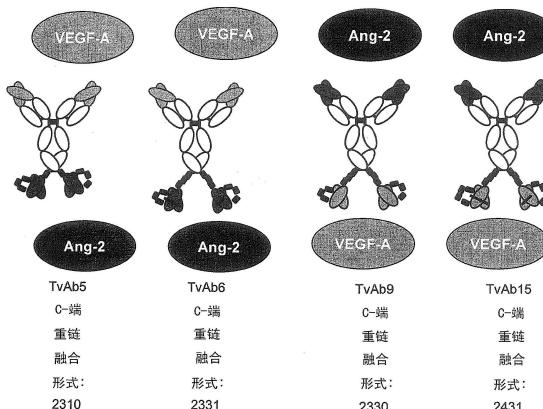
序列表94页 附图28页

(54) 发明名称

双特异性抗-VEGF/抗-ANG-2抗体

(57) 摘要

本发明涉及针对人VEGF和针对人ANG-2的双特异性抗体，制备它们的方法，包含所述抗体的药物组合物及其应用。



1. 特异性结合人血管内皮生长因子 (VEGF) 和人血管生成素 -2 (ANG-2) 的双特异性抗体, 其包含特异性结合人 VEGF 的第一抗原结合位点和特异性结合人 ANG-2 的第二抗原结合位点,

其中

i) 所述抗原结合位点每个是一对抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域;

ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:9 的 CDR3 区, SEQ ID NO:10 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:11 的 CDR1 区, 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:12 的 CDR3 区, SEQ ID NO:13 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:14 的 CDR1 区;

和

iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:78 的 CDR3 区, SEQ ID NO:79 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:80 的 CDR1 区, 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:81 的 CDR3 区, SEQ ID NO:82 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:83 的 CDR1 区。

2. 根据权利要求 1 所述的双特异性抗体, 其中

对 VEGF 特异性的抗原结合位点的结合亲和力 KD/ 对 ANG-2 特异性的抗原结合位点的结合亲和力 KD 的比值是 1.0-10.0。

3. 根据权利要求 1 至 2 中任意一项所述的双特异性抗体, 其中该特异性结合人 ANG-2 的第二抗原结合位点不特异性结合人血管生成素 1 (ANG-1)。

4. 药物组合物, 其包含根据权利要求 1-3 中任意一项所述的抗体。

5. 根据权利要求 4 所述的药物组合物, 用于治疗癌症。

6. 根据权利要求 4 所述的药物组合物, 用于治疗血管疾病。

7. 根据权利要求 1 至 3 中任意一项所述的双特异性抗体, 用于治疗癌症。

8. 根据权利要求 1 至 3 中任意一项所述的双特异性抗体, 用于治疗血管疾病。

9. 编码根据权利要求 1 至 4 任意一项所述的双特异性抗体的核酸。

10. 含有根据权利要求 9 所述核酸的表达载体, 其能够在原核或真核宿主细胞中表达所述核酸。

11. 包含根据权利要求 10 所述的载体的原核或真核宿主细胞。

12. 产生根据权利要求 1 至 3 任意一项所述的双特异性抗体的方法, 其特征在于在原核或真核宿主细胞中表达根据权利要求 9 所述的核酸并从所述细胞或该细胞培养物上清液回收所述双特异性抗体。

13. 通过权利要求 12 的重组方法获得的抗体。

## 双特异性抗 -VEGF / 抗 -ANG-2 抗体

[0001] 本发明涉及针对人血管内皮生长因子 (VEGF/VEGF-A) 和针对人血管生成素 -2(angiopoietin-2, ANG-2) 的双特异性抗体, 制备它们的方法, 包含所述抗体的药物组合物, 及其应用。

[0002] 发明背景

[0003] 血管发生参与各种病症的发病机理, 所述疾病包括实体瘤、眼内新血管综合征如增殖性视网膜病或年龄相关的黄斑变性 (AMD)、类风湿性关节炎和银屑病 (Folkman, J., 等, *J. Biol. Chem.* (生物的化学杂志) 267(1992) 10931–10934 ;Klagsbrun, M., 等, *Annu. Rev. Physiol.* (物理学年度综述) 53(1991) 217–239 ;和 Garner, A., *Vascular diseases* (血管疾病), 在 :*Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach* (眼科疾病, 即动力学途径的病理学), Garner, A., 和 Klintworth, G. K, (编辑) 第二版 Marcel Dekker, 纽约, (1994), 第 1625–1710 页)。在实体瘤的情形中, 与正常细胞相比较, 新血管生成允许所述肿瘤细胞获得生长优势和增殖自主性。因此, 在乳腺癌以及在一些其它肿瘤中, 已经观察到在肿瘤切片中的微脉管密度与患者存活之间的相关性 (Weidner, N., 等, *N. Engl. J. Med.* (新英格兰医学杂志) 324(1991) 1–8 ;Horak, E. R., 等, *Lancet* 340(1992) 1120–1124 ; 和 Macchiarini, P., 等, *Lancet* 340(1992) 145–146)。

[0004] VEGF 和抗 VEGF 抗体

[0005] 人血管内皮生长因子 (VEGF/VEGF-A) (SEQ ID No:105) 在例如 Leung, D. W., 等, *Science* (科学) 246(1989) 1306–9 ;Keck, P. J., 等, *Science* (科学) 246(1989) 1309–12 和 Connolly, D. T., 等, *J. Biol. Chem.* (生物的化学杂志) 264(1989) 20017–24 中描述。VEGF 参与与肿瘤和眼内病症相关的正常和异常的血管发生与新血管生成的调控 (Ferrara, N., 等, *Endocr. Rev.* (内分泌综述) 18(1997) 4–25 ;Berkman, R. A., 等, *J. Clin. Invest.* (临床研究杂志) 91(1993) 153–159 ;Brown, L. F., 等, *Human Pathol.* (人类病理学) 26(1995) 86–91 ;Brown, L. F., 等, *Cancer Res.* (癌症研究) 53(1993) 4727–4735 ;Mattern, J., 等, *Brit. J. Cancer* (英国癌症学杂志) 73(1996) 931–934 ; 和 Dvorak, H., 等, *Am. J. Pathol.* (美国病理学杂志) 146(1995) 1029–1039)。VEGF 是同二聚体糖蛋白, 已经从数种来源分离。VEGF 对内皮细胞显示高度特异性的促有丝分裂活性。VEGF 在胚胎血管发生和成人生命周期血管发生的新血管形成中具有重要调节功能 (Carmeliet, P., 等, *Nature* (自然), 380(1996) 435–439 ;Ferrara, N., 等, *Nature* (自然), 380(1996) 439–442 ;Ferrara 和 Davis-Smyth 在 *Endocrine Rev.*, 18(1997) 4–25 中综述。VEGF 发挥作用的重要性在以下研究中证实, 这些研究显示单个 VEGF 等位基因的失活由于脉管系统不能发育而导致胚胎致死 (Carmeliet, P., 等, *Nature* (自然), 380(1996) 435–439 ;Ferrara, N., 等, *Nature* (自然), 380(1996) 439–442)。此外, VEGF 对于单核细胞具有强烈的化学引诱物活性, 能够诱导内皮细胞中纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂, 并也能够诱导微血管通透性。由于后一种活性, 其有时被称为血管通透性因子 (VPF)。VEGF 的分离和性质已有综述; 见 Ferrara, N., 等, *J. Cellular Biochem.* (细胞生物化学杂志), 47(1991) 211–218 和 Connolly, *J. Cellular Biochem.* (细胞生物化学杂

志), 47(1991) 219–223。单个 VEGF 基因的替代 mRNA 剪切产生五种同种型的 VEGF。

[0006] 抗 VEGF 中和抗体抑制各种人肿瘤细胞系在小鼠中的生长 (Kim, I., 等, Nature (自然) 362(1993) 841–844; Warren, S. R., 等, J. Clin. Invest. (临床研究杂志) 95(1995) 1789–1797; Borgstrom, P., 等, Cancer Res. (癌症研究) 56(1996) 4032–4039; 和 Melnyk, O., 等, Cancer Res. (癌症研究) 56(1996) 921–924)。W094/10202, W098/453 32, W02005/00900 和 W000/35956 提及针对 VEGF 的抗体。人源化的单克隆抗体贝伐单抗 (bevacizumab, 以商标名阿瓦斯丁(Avastin)®出售) 是一种用于肿瘤治疗的抗 VEGF 抗体 W098/45331)。

[0007] 雷珠单抗 (Ranibizumab, 商标名 Lucentis®) 是源自与贝伐单抗 (阿瓦斯丁) 相同母体鼠抗体的单克隆抗体片段。其比母体分子小得多, 并且经亲和力成熟以提供对 VEGF-A 更强的结合 (W098/45331)。其是抗 - 血管生成的, 已经被批准用于治疗“湿”型年龄相关的黄斑变性 (ARMD), 这是年龄相关的视觉丧失的一种常见形式。另一种抗 -VEGF 抗体是例如 HuMab G6-31, 其在例如 US2007/0141065 中描述。

[0008] ANG-2 和抗 -ANG-2 抗体

[0009] 人血管生成素 -2(ANG-2) (替代地缩写为 ANGPT2 或 ANG2) (SEQ ID No:106) 在 Maisonpierre, P. C., 等, Science (科学) 277(1997) 55–60 和 Cheung, A. H., 等, Genomics 48(1998) 389–91 中描述。发现血管生成素 -1 和 -2(ANG-1 (SEQ ID No:107) 和 ANG-2 (SEQ ID No:106)) 是 Ties 的配体, Ties 是选择性在血管内皮内表达的酪氨酸激酶家族。Yancopoulos, G. D., 等, Nature (自然) 407(2000) 242–48。现在有四种明确的血管生成素家族的成员。血管生成素 -3 和 -4(Ang-3 和 Ang-4) 可代表小鼠和人中相同基因位点的非常不同的对应物。Kim, I., 等, FEBS Lett, 443(1999) 353–56; Kim, I., 等, J Biol Chem 274(1999) 26523–28。ANG-1 和 ANG-2 最初在组织培养实验中分别作为激动剂和拮抗剂而鉴定 (对于 ANG-1, 见 :Davis, S., 等, Cell 187(1996) 1161–69; 对于 ANG-2, 见 :Maisonpierre, P. C., 等, Science (科学) 277(1997) 55–60)。所有已知血管生成素基本上都结合 Tie2, 且 Ang-1 和 -2 均以 3nM(Kd) 的亲和力结合 Tie2。Maisonpierre, P. C., 等, Science (科学) 277(1997) 55–60。显示 Ang-1 支持 EC 存活并促进内皮完整性, Davis, S., 等, Cell 187(1996) 1161–69; Kwak, H. J., 等, FEBS Lett 448(1999) 249–53; Suri, C., 等, Science (科学) 282(1998) 468–71; Thurston, G., 等, Science (科学) 286(1999) 2511–14; Thurston, G., 等, Nat. Med. 6(2000) 460–63, 而 ANG-2 具有相反效应, 在存活因子 VEGF 或碱性成纤维细胞生长因子不存在时促进血管去稳定和退化。Maisonpierre, P. C., 等, Science (科学) 277(1997) 55–60。然而, ANG-2 功能的许多研究已经表明更复杂的情况。ANG-2 可能是血管重塑的复杂调节因子, 在血管萌芽和血管退化中均发挥作用。支持 ANG-2 的这种作用, 表达分析揭示在成人血管生成萌芽环境中 ANG-2 和 VEGF 一起迅速诱导, 而在血管退化环境中在不存在 VEGF 时 ANG-2 被诱导。Holash, J., 等, Science (科学) 284(1999) 1994–98; Holash, J., 等, Oncogene 18(1999) 5356–62。与背景 - 依赖性作用相一致, ANG-2 特异性结合相同的内皮 - 特异性受体 Tie-2, Tie-2 被 Ang-1 激活, 但一旦激活具有背景 - 依赖性效应。Maisonpierre, P. C., 等, Science (科学) 277(1997) 55–60。

[0010] 角膜血管生成测定已显示 ANG-1 和 ANG-2 均具有相似效应,与 VEGF 协同作用促进新血管的生长。Asahara, T., 等, Circ. Res. 83(1998)233-40。体外高浓度 ANG-2 也可促进血管生成,这种观察提出了这样的可能性,即存在剂量 - 依赖性内皮反应。Kim, I., 等, Oncogene 19(2000)4549-52。高浓度 ANG-2 作为内皮细胞在血清饥饿凋亡中的凋亡存活因子起作用,这种凋亡经 PI-3 激酶和 Akt 途径激活 Tie2。Kim, I., 等, Oncogene 19(2000)4549-52。

[0011] 其它体外实验表明在持续暴露过程中, ANG-2 的效应可从 Tie2 的拮抗剂进行性转变为激活剂,且在更晚时间点, ANG-2 可直接促进脉管的管形成和新血管稳定。Teichert-Kuliszewska, K., 等, Cardiovasc. Res. 49(2001)659-70。另外,如果 EC 在纤维蛋白胶上培养,也观察到 ANG-2 激活 Tie2,可能暗示 ANG-2 的作用依赖于 EC 分化状态。Teichert-Kuliszewska, K., 等, Cardiovasc. Res. 49(2001)659-70。在三维胶原蛋白胶中培养的微血管 EC 中,ANG-2 也能诱导 Tie2 激活并促进毛细血管样结构的形成。Mochizuki, Y., 等, J. Cell. Sci. 115(2002)175-83。使用 3-D 球状共培养作为血管成熟的体外模型证明 EC 和间充质细胞的直接接触消除了对 VEGF 的反应性,而 VEGF 和 ANG-2 的存在诱导萌芽。Korff, T., 等, Faseb J. 15(2001)447-57。Etoh, T. H. 等证明组成型表达 Tie2 的 EC 中,在 VEGF 存在下 ANG-2 强烈地上调 MMP-1, -9 和 u-PA 的表达。Etoh, T., 等, Cancer Res. (癌症研究) 61(2001)2145-53。通过体内瞳孔膜模型,Lobov, I. B. 等显示存在内源 VEGF 时 ANG-2 促进毛细管直径的迅速增加、促进基底层重塑、内皮细胞的增殖和迁移,并刺激新血管的萌芽。Lobov, I. B., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美国国家科学院院报) 99(2002)11205-10。相反,没有内源 VEGF 时 ANG-2 促进内皮细胞死亡和血管退化。Lobov, I. B., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美国国家科学院院报) 99(2002)11205-10。相似地,通过体内肿瘤模型,Vajkoczy, P., 等证明多细胞凝集物通过血管原性萌芽起始脉管生长,该萌芽经过宿主和肿瘤内皮同时表达 VEGFR-2 和 ANG-2 发生。Vajkoczy, P., 等, J. Clin. Invest. (临床研究杂志) 109(2002)777-85。这种模型说明生长中的肿瘤的建立的微血管具有连续重塑的特征,这推测由 VEGF 和 ANG-2 的表达介导。Vajkoczy, P., 等, J. Clin. Invest. (临床研究杂志) 09(2002)777-85。

[0012] Tie-2 和血管生成素 -1 敲除小鼠的研究显示显示相似的表型并表明血管生成素 -1 刺激的 Tie-2 磷酸化介导了发育中血管的重塑和稳定,促进血管在血管生成过程中的成熟并维持内皮细胞 - 支持细胞粘附(Dumont, J., 等, Genes&Development(基因和发育), 8(1994)1897-1909; Sato, T. N., Nature(自然), 376(1995)70-74; (Thurston, G., 等, Nature Medicine(自然医学):6(2000)460-463)。认为血管生成素 -1 的作用在成人中是保守的,在成人中其广泛且组成型表达(Hanahan, D., Science, 277(1997)48-50; Zagzag, D., 等, Exp Neurology, 159:391-400(1999))。相比之下,血管生成素 -2 的表达主要局限于血管重塑位点,人们认为在那里血管生成素 -2 阻断血管生成素 -1 的组成型稳定或成熟功能,允许血管恢复且保持在可塑状态,该状态对萌芽信号更有反应性(Hanahan, D., 1997; Holash, J., 等, Orzcoze 18(1999)5356-62; Maisonpierre, P. C., 1997)。在病理性血管生成中血管生成素 -2 表达的研究已经发现许多肿瘤类型显示血管中血管生成素 -2 的表达(Maisonpierre, P. C., 等, Science(科学) 277(1997)55-60)。功能研究表明血管生成素 -2 参与肿瘤血管生成并且血管生成素 -2 过表达与小

鼠异种移植模型中增加的肿瘤生长相关 (Ahmad, S. A., 等, Cancer Res. (癌症研究), 61(2001) 1255–1259)。其它研究已经将血管生成素 -2 过表达与肿瘤血管过度形成相关联 (Etoh, T., 等, Cancer Res. (癌症研究) 61(2001) 2145–53; Tanaka, F., 等, Cancer Res. (癌症研究) 62(2002) 124–29)。

[0013] 近年来已经提出将血管生成素 -1, 血管生成素 -2 和 / 或 Tie-2 作为可能的抗 - 癌治疗靶标。例如 US6, 166, 185, US5, 650, 490 和 US5, 814, 464 中每个公开了抗 - Tie-2 配体和受体抗体。据报道使用可溶性 Tie-2 的研究降低了啮齿动物中肿瘤的数目和大小 (Lin, 1997; Lin 1998)。Siemester, G., 等 Siemeister, G., 等, Cancer Res. (癌症研究) 59(1999) 3185–91 产生了表达 Tie-2 胞外域的人黑色素瘤细胞系, 将其注射到裸鼠中并报道了可溶性 Tie-2 导致肿瘤生长和肿瘤血管生成的显著抑制。考虑到血管生成素 -1 和血管生成素 -2 均结合 Tie-2, 从这些研究中尚不清楚血管生成素 -1、血管生成素 -2 或 Tie-2 是否将是抗 - 癌治疗的有吸引力的靶标。然而, 认为有效抗 - 血管生成素 -2 治疗在治疗疾病 (如癌症) 中有益, 这些疾病中进展依赖于异常血管生成, 其中阻断该过程可预防疾病的进展 (Follunan, J., Nature Medicine (自然医学) 1(1995) 27–31)。

[0014] 此外, 一些研究组已经报道结合血管生成素 -2 的抗体和肽的应用。见例如 US6166, 185 和 US2003/10124129, W003/030833, W02006/068953, W003/057134 或 US2006/0122370。

[0015] 血管生成素 -2 病灶性 (focal) 表达效应的研究已经显示拮抗血管生成素 -1/Tie-2 信号使紧密的脉管结构松弛由此将 EC 暴露于来自血管生成诱导剂 (如 VEGF) 的激活信号 (Hanahan, D., Science, 277(1997) 48–50)。这种血管生成素 -1 的抑制导致的促 - 血管生成效应表明抗 - 血管生成素 -1 治疗将不是有效的抗 - 癌治疗。

[0016] 发育过程中 ANG-2 在发生血管重塑的位点表达。Maisonpierre, P. C., 等, Science (科学) 277(1997) 55–60。在成人个体中, ANG-2 表达限制在血管重塑位点以及高度血管化的肿瘤中, 包括神经胶质瘤, Osada, H., 等, Int. J. Oncol. 18(2001) 305–09; Koga, K., 等, Cancer Res. (癌症研究) 61(2001) 6248–54, 肝细胞癌, Tanaka, S., 等, J. Clin. Invest. (临床研究杂志) 103(1999) 341–45, 胃癌, Etoh, T., 等, Cancer Res. (癌症研究) 61(2001) 2145–53; Lee, J. H., 等, Int. J. Oncol. 18(2001) 355–61, 甲状腺癌, Bunone, G., 等, Am J Pathol 155(1999) 1967–76, 非 - 小细胞肺癌, Wong, M. P., 等, Lung Cancer 29(2000) 11–22 和结肠癌, Ahmad, S. A., 等, Cancer 92(2001) 1138–43, 和前列腺癌 Wurmbach, J. H., 等, AntiCancer Res. 20(2000) 5217–20。发现一些肿瘤细胞表达 ANG-2。例如, Tanaka, S., 等, J. Clin. Invest. (临床研究杂志) 103(1999) 341–45 在人肝细胞癌 (HCC) 的 12 个样品的 10 个中检测到 ANG-2 mRNA。Ellis 研究组报道 ANG-2 在肿瘤上皮中广泛表达。Ahmad, S. A., 等, Cancer 92(2001) 1138–43。其他研究者报道了相似的发现。Chen, L., 等, J. Tongji Med. Univ. 21(2001) 228–35。通过在存档的人乳腺癌样品中检测 ANG-2 mRNA 水平, Sfiligoi, C., 等, Int. J. Cancer (国际癌症杂志) 103(2003) 466–74 报道 ANG-2 mRNA 与辅助淋巴结侵袭、短的无疾病时间和差的总体生存显著相关。Tanaka, F., 等, Cancer Res. (癌症研究) 62(2002) 7124–29 综述了分别具有病理 I- 期至 IIIA 期非小细胞肺癌 (NSCLC) 的总共 236 个患者。使用免疫组织化学, 他们发现 16.9% 的 NSCLC 患者是 ANG-2 阳性的。ANG-2 阳性肿瘤的微血管密度比 ANG-2 阴性的微血管密度显著更高。ANG-2

的这种血管生成效应仅在 VEGF 表达高的时候可见。此外, ANG-2 的阳性表达是预测较差手术后生存的显著因子。Tanaka, F., 等, Cancer Res. (癌症研究) 62(2002) 7124-29。然而, 他们没有发现 Ang-1 表达和微血管密度之间有显著相关性。Tanaka, F., 等, Cancer Res. (癌症研究) 62(2002) 7124-29。这些结果表明 ANG-2 是数种类型癌症预后不良患者的指示剂。

[0017] 最近, 使用 ANG-2 敲除小鼠模型, Yancopoulos 研究组报道出生后血管生成中需要 ANG-2。Gale, N. W., 等, Dev. Cell 13(2002) 411-23。他们显示眼中玻璃样脉管系统的发育编程性退化在 ANG-2 敲除小鼠中没有发生, 并且它们的视网膜血管没有从视网膜中央动脉萌发出来。Gale, N. W., 等, Dev. Cell 13(2002) 411-23。他们还发现 ANG-2 缺失导致淋巴脉管系统的模式形成和功能的严重缺陷。Gale, N. W., 等, Dev. Cell 13(2002) 411-23。通过 Ang-1 的遗传拯救纠正了淋巴缺陷, 但没有纠正血管生成缺陷。Gale, N. W., 等, Dev. Cell 13(2002) 411-23。

[0018] Peters 及其同事报道了可溶性 Tie2 当作为重组蛋白或在病毒表达载体中递送时, 抑制小鼠模型中鼠乳腺癌 (mammary carcinoma) 和黑素瘤的体内生长。Lin, P., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院院报) 95(1998) 8829-34; Lin, P., 等, J. Clin. Invest. (临床研究杂志) 100(1997) 2072-78。如此处理的肿瘤组织中血管密度大大降低。此外, 可溶性 Tie2 阻断肿瘤细胞条件培养基刺激的大鼠角膜中的血管生成。Lin, P., 等, J. Clin. Invest. (临床研究杂志) 100(1997) 2072-78。另外, Isner 及其小组证明向 VEGF 添加 ANG-2 比单独的 VEGF 显著促进更长且更多周围新血管生成。Asahara, T., 等, Circ. Res. 83(1998) 233-40。过量可溶性 Tie2 受体妨碍 VEGF- 诱导的新血管生成经 ANG-2 的调节。Asahara, T., 等, Circ. Res. 83(1998) 233-40。Siemeister, G., 等, Cancer Res. (癌症研究) 59(1999) 3185-91 通过裸鼠异种移植显示在异种移植植物中过表达 Flt-1 或 Tie2 的胞外配体-结合结构域导致途径的显著抑制不能被另一种补偿, 表明应当认为 VEGF 受体途径和 Tie2 途径是两种独立的体内血管生成过程中必需的介质。Siemeister, G., 等, Cancer Res. (癌症研究) 59:3(1999) 3185-91。这一点被 White, R., R., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院院报) 100(2003) 5028-33 更近的公开所证明。在他们的研究中, 证明了特异性结合且抑制 ANG-2 的核酸酶 - 抗性 RNA 适体 (aptamer) 显著抑制大鼠角膜微袋 (micropocket) 血管生成模型中 bFGF 诱导的新血管形成。

#### [0019] 双特异性抗体

[0020] 最近已经开发了广泛多样的重组抗体形式, 例如通过融合例如 IgG 抗体形式和单链结构域的四价双特异性抗体 (见例如 Coloma, M. J., 等, 自然生物技术 (Nature Biotech.) 15(1997) 159-163; WO2001/077342 和 Morrison, S. L. 等, 自然生物技术 (Nature Biotech.) 25(2007) 1233-1234)。

[0021] 此外, 开发了能够结合两种以上抗原的若干其他新型形式, 其中抗体核心结构 (IgA, IgD, IgE, IgG 或 IgM) 不再保持诸如双抗体 (diabodies)、三链抗体或四链抗体 (tetrabodies), 微型抗体 (minibodies), 若干单链形式 (scFv, 双-scFv) (Holliger P, 等, Nature Biotech (自然生物技术) 23(2005) 1126-1136; Fischer N., 和 Léger, O., 病理学 (Pathobiology) 74(2007) 3-14; Shen J, 等, 免疫学方法杂志 (Journal of Immunological Methods) 318(2007) 65-74; Wu, C. 等, 自然生物技术 (Nature

Biotech) 25 (2007) 1290–1297)。

[0022] 所有这样的形式使用接头将抗体核心 (IgA, IgD, IgE, IgG 或 IgM) 与其他结合蛋白 (例如 scFv) 融合或融合例如两个 Fab 片段或 scFv(Fischer N., Léger O., 病理学 (Pathobiology) 74 (2007) 3–14)。人们可能一直希望保持效应子功能, 诸如例如补体依赖性细胞毒性 (CDC) 或抗体依赖性细胞毒性 (ADCC), 它们通过保持与天然存在的抗体的高度相似性而通过 Fc 受体结合来介导。

[0023] 在 WO2007/024715 中, 报道了双重可变的结构域免疫球蛋白作为改造的多价和多特异性结合蛋白。在 US6, 897, 044 中报道了具有生物活性的抗体二聚体的制备方法。在 US7, 129, 330 中报道了具有至少四个彼此通过肽接头连接的可变结构域的多价 FV 抗体构建体。在 US2005/0079170 中报道了二聚体和多聚体抗原结合结构。在 US6, 511, 663 中报道了三价或四价单特异性抗原结合蛋白, 其包含通过连接结构彼此共价结合的三个或四个 Fab 片段, 所述蛋白不是天然免疫球蛋白。在 WO2006/020258 中报道了这样的四价双特异性抗体, 其可以在原核细胞和真核细胞中有效表达, 并且用于治疗和诊断方法中。在 US2005/0163782 中报道了在包含两种类型的多肽二聚体的混合物中将通过至少一个链间二硫键连接的二聚体与不通过至少一个链间二硫键连接的二聚体分离或优先合成通过至少一个链间二硫键连接的二聚体的方法。在 US5, 959, 083 中报道了双特异性四价受体。在 WO2001/077342 中报道了具有三个或多个功能性抗原结合位点的改造的抗体。

[0024] 在 WO1997/001580 中报道了多特异性和多价抗原结合多肽。WO1992/004053 报道了共轭对缀合物 (homoconjugate), 其典型地由结合相同抗原决定簇的 IgG 类的单克隆抗体制备, 通过合成交联共价连接。在 WO1991/06305 中报道了对于抗原具有高亲和力的低聚单克隆抗体, 其中分泌典型地是 IgG 类的低聚物, 其具有两种以上的免疫球蛋白单体, 所述免疫球蛋白单体缔合在一起形成四价或六价 IgG 分子。在 US6, 350, 860 中报道了绵羊来源的抗体和改造的抗体构建体, 其可以用于治疗其中干扰素 γ 活性是致病性的疾病。在 US2005/0100543 中, 报道了可靶向的构建体, 所述构建体是双特异性抗体的多价载体, 即可靶向的构建体的每个分子可以作为两种以上双特异性抗体的载体。在 WO1995/009917 中报道遗传改造的双特异性四价抗体。在 WO2007/109254 中, 报道了由稳定的 scFv 组成或包含稳定的 scFv 的稳定的结合分子。

[0025] VEGF 和 ANG-2 抑制剂的组合

[0026] WO2007/068895 涉及 ANG-2 拮抗剂和 VEGF, KDR 和 / 或 FLTL 拮抗剂的组合。 WO2007/089445 涉及 ANG-2 和 VEGF 抑制剂的组合。

[0027] WO2003/106501 涉及结合血管生成素并含有多聚化结构域的融合蛋白。 WO2008/132568 涉及结合血管生成素和 VEGF 的融合蛋白。

[0028] 发明概述

[0029] 本发明第一方面是特异性结合人血管内皮生长因子 (VEGF) 和人血管生成素 -2 (ANG-2) 的双特异性抗体, 其包含特异性结合人 VEGF 的第一抗原结合位点和特异性结合人 ANG-2 的第二抗原结合位点。

[0030] 在本发明的一个实施方案中, 根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于:

[0031] i) 所述抗原结合位点每个是一对抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域;

[0032] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID

NO:1, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:17, 或 SEQ ID NO:94 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:18, 或 SEQ ID NO:95 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:19, 或 SEQ ID NO:96 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:20, 或 SEQ ID NO:97 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:21, 或 SEQ ID NO:98 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:22, 或 SEQ ID NO:99 的 CDR1 区 ;

[0033] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78, 或 SEQ ID NO:86 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:79, 或 SEQ ID NO:87 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:80, 或 SEQ ID NO:88 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:28, 具有突变 T92L, H93Q 和 W94T 的 SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:81, 或 SEQ ID NO:89 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:82 或 SEQ ID NO:90 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:83, 或 SEQ ID NO:91 的 CDR1 区。

[0034] 在本发明的一个实施方案中, 根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0035] i) 所述抗原结合位点每个是一对抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域;

[0036] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:1 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:2 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:3 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:4 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:5 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:6 的 CDR1 区 ;

[0037] 或所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:9 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:10 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:11 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:12 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:13 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:14 的 CDR1 区 ;

[0038] 或所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:17 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:18 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:19 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:20 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:21 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:22 的 CDR1 区 ; 和

[0039] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:25 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:26 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:27 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:28 或具有突变 T92L, H93Q 和 W94T 的 SEQ ID NO:28 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:29 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:30 的 CDR1 区。

[0040] 在本发明的一个实施方案中, 根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0041] i) 所述抗原结合位点每个是一对抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域;

[0042] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点包含 SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, 或 SEQ ID NO:100 作为重链可变结构域 , 和 SEQ ID NO:8, SEQ ID

NO:16, SEQ ID NO:24, 或 SEQ ID NO:101 作为轻链可变结构域, 和

[0043] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点包含 SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:84 或 SEQ ID NO:92 作为重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:32, 具有突变 T92L, H93Q 和 W94T 的 SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:85 或 SEQ ID NO:93 作为轻链可变结构域。

[0044] 在本发明的一个实施方案中, 根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0045] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:1, 或 SEQ ID NO:94 的 CDR3 区, SEQ ID NO:2, 或 SEQ ID NO:95 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:3, 或 SEQ ID NO:96 的 CDR1 区, 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:4, 或 SEQ ID NO:97 的 CDR3 区, SEQ ID NO:5, 或 SEQ ID NO:98 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:6, 或 SEQ ID NO:99 的 CDR1 区;

[0046] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78, 或 SEQ ID NO:86 的 CDR3 区, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:79, 或 SEQ ID NO:87 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:80, 或 SEQ ID NO:88 的 CDR1 区, 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:81, 或 SEQ ID NO:89 的 CDR3 区, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:82 或 SEQ ID NO:90 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:83, 或 SEQ ID NO:91 的 CDR1 区。

[0047] 在本发明的一个实施方案中, 根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0048] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点包含 SEQ ID NO:7, 或 SEQ ID NO:100 作为重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:101 作为轻链可变结构域, 和

[0049] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点包含 SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:84 或 SEQ ID NO:92 作为重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:85 或 SEQ ID NO:93 作为轻链可变结构域。

[0050] 在本发明的一个实施方案中, 根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0051] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78, 或 SEQ ID NO:86 的 CDR3 区, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:79, 或 SEQ ID NO:87 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:80, 或 SEQ ID NO:88 的 CDR1 区, 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:81, 或 SEQ ID NO:89 的 CDR3 区, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:82 或 SEQ ID NO:90 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:83, 或

SEQ ID NO:91 的 CDR1 区。

[0052] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0053] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点包含 SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:84 或 SEQ ID NO:92 作为重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:85 或 SEQ ID NO:93 作为轻链可变结构域。

[0054] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0055] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:1 的 CDR3 区, SEQ ID NO:2 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:3 的 CDR1 区, 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:4 的 CDR3 区, SEQ ID NO:5 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:6 的 CDR1 区; 和

[0056] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:46 的 CDR3 区, SEQ ID NO:47 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:48 的 CDR1 区, 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:49 的 CDR3 区, SEQ ID NO:50 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:51 的 CDR1 区。

[0057] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0058] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点包含 SEQ ID NO:7 作为重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:8 作为轻链可变结构域, 和

[0059] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点包含 SEQ ID NO:52 作为重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:53 作为轻链可变结构域。

[0060] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0061] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:1, 或 SEQ ID NO:94 的 CDR3 区, SEQ ID NO:2, 或 SEQ ID NO:95 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:3, 或 SEQ ID NO:96 的 CDR1 区, 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:4, 或 SEQ ID NO:97 的 CDR3 区, SEQ ID NO:5, 或 SEQ ID NO:98 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:6, 或 SEQ ID NO:99 的 CDR1 区;

[0062] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:62, 或 SEQ ID NO:86 的 CDR3 区, SEQ ID NO:63, 或 SEQ ID NO:87 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:64, 或 SEQ ID NO:88 的 CDR1 区, 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:65, 或 SEQ ID NO:89 的 CDR3 区, SEQ ID NO:66, 或 SEQ ID NO:90 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:67, 或 SEQ ID NO:91 的 CDR1 区。

[0063] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0064] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点包含 SEQ ID NO:7, 或 SEQ ID NO:100 作为重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:101 作为轻链可变结构域, 和

[0065] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点包含 SEQ ID NO:68, 或 SEQ ID NO:92 作为重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:69, 或 SEQ ID NO:93 作为轻链可变结构域。

[0066] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0067] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:1 的 CDR3 区, SEQ ID NO:2 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:3 的 CDR1 区, 并且在轻链可变

结构域中包含 SEQ ID NO:4 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:5 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:6 的 CDR1 区 ;

[0068] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:62 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:63 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:64 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:65 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:66 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:67 的 CDR1 区。

[0069] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0070] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点包含 SEQ ID NO:7 作为重链可变结构域 , 和 SEQ ID NO:8 作为轻链可变结构域 ; 和

[0071] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点包含 SEQ ID NO:68 作为重链可变结构域 , 和 SEQ ID NO:69 作为轻链可变结构域。

[0072] 所述双特异性抗体至少是二价的,并且可以是三价、四价或多价的。

[0073] 优选地,根据本发明的双特异性抗体是二价、三价或四价的。

[0074] 本发明的另一方面是编码所述双特异性抗体的链的核酸分子。

[0075] 本发明还提供含有根据本发明所述核酸的表达载体,其能够在原核或真核宿主细胞表达所述核酸,和用于重组产生根据本发明所述抗体的含有这种载体的宿主细胞。

[0076] 本发明还包括原核或者真核宿主细胞,其包含根据本发明的载体。

[0077] 本发明还包括产生根据本发明所述的双特异性抗体的方法,其特征在于在原核或真核宿主细胞中表达根据本发明所述的核酸并从所述细胞或该细胞培养物上清液回收所述双特异性抗体。本发明还包括通过这种重组方法获得的抗体。

[0078] 本发明的另一方面是包含所述双特异性抗体的药物组合物,所述组合物用于治疗癌症,所述双特异性抗体用于制备治疗癌症的药物的应用,通过向需要所述治疗的患者施用所述双特异性抗体来治疗患有癌症的患者的方法。

[0079] 根据本发明所述的双特异性抗体对于需要 VEGF 和 ANG-2 靶向疗法的人患者显示益处。根据本发明所述的抗体具有新的和有创造性的性质,从而导致对于患有所述疾病的患者,尤其是患有癌症的患者的益处。令人惊讶地发现根据本发明所述的双特异性抗体与各自单特异性母体抗体的组合相比在肿瘤生长和 / 或抑制肿瘤血管生成中更有效。

#### [0080] 发明详述

[0081] 本发明一个实施方案是特异性结合人 VEGF 和人 ANG-2 的双特异性抗体,其包含特异性结合人 VEGF 的第一抗原结合位点和特异性结合人 ANG-2 的第二抗原结合位点,其特征在于 :

[0082] i) 所述抗原结合位点每个是一对抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域 ;

[0083] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:17, 或 SEQ ID NO:94 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:18, 或 SEQ ID NO:95 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:19, 或 SEQ ID NO:96 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:20, 或 SEQ ID NO:97 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:21, 或 SEQ ID NO:98 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:22, 或 SEQ ID NO:99 的 CDR1 区 ;

[0084] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78, 或 SEQ ID NO:86 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:79, 或 SEQ ID NO:87 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:80, 或 SEQ ID NO:88 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:28, 具有突变 T92L, H93Q 和 W94T 的 SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:81, 或 SEQ ID NO:89 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:82 或 SEQ ID NO:90 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:83, 或 SEQ ID NO:91 的 CDR1 区。

[0085] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0086] i) 所述抗原结合位点每个是一对抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域 ;

[0087] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:1 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:2 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:3 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:4 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:5 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:6 的 CDR1 区 ;

[0088] 或所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:9 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:10 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:11 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:12 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:13 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:14 的 CDR1 区 ;

[0089] 或所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:17 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:18 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:19 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:20 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:21 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:22 的 CDR1 区 ; 和

[0090] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:25 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:26 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:27 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:28 或具有突变 T92L, H93Q 和 W94T 的 SEQ ID NO:28 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:29 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:30 的 CDR1 区。

[0091] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0092] i) 所述抗原结合位点每个是一对抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域 ;

[0093] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点包含 SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, 或 SEQ ID NO:100 作为重链可变结构域 , 和 SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:24, 或 SEQ ID NO:101 作为轻链可变结构域 , 和

[0094] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点包含 SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:84 或 SEQ ID NO:92 作为重链可变结构域 , 和 SEQ ID NO:32, 具有突变 T92L, H93Q 和 W94T 的 SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:85 或 SEQ ID NO:93 作为轻链可变结构域。

[0095] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0096] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:1, 或 SEQ ID NO:94 的 CDR3 区, SEQ ID NO:2, 或 SEQ ID NO:95 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:3, 或 SEQ ID NO:96 的 CDR1 区, 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:4, 或 SEQ ID NO:97 的 CDR3 区, SEQ ID NO:5, 或 SEQ ID NO:98 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:6, 或 SEQ ID NO:99 的 CDR1 区;

[0097] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78, 或 SEQ ID NO:86 的 CDR3 区, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:79, 或 SEQ ID NO:87 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:80, 或 SEQ ID NO:88 的 CDR1 区, 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:81, 或 SEQ ID NO:89 的 CDR3 区, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:82 或 SEQ ID NO:90 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:83, 或 SEQ ID NO:91 的 CDR1 区。

[0098] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0099] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点包含 SEQ ID NO:7, 或 SEQ ID NO:100 作为重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:101 作为轻链可变结构域, 和

[0100] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点包含 SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:84 或 SEQ ID NO:92 作为重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:85 或 SEQ ID NO:93 作为轻链可变结构域。

[0101] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0102] ii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78, 或 SEQ ID NO:86 的 CDR3 区, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:79, 或 SEQ ID NO:87 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:80, 或 SEQ ID NO:88 的 CDR1 区, 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:81, 或 SEQ ID NO:89 的 CDR3 区, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:82 或 SEQ ID NO:90 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:83, 或 SEQ ID NO:91 的 CDR1 区。

[0103] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0104] ii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点包含 SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:84 或 SEQ ID NO:92 作为重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:85 或 SEQ ID NO:93 作为轻链可变结构域。

[0105] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0106] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:1 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:2 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:3 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:4 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:5 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:6 的 CDR1 区 ;和

[0107] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:46 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:47 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:48 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:49 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:50 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:51 的 CDR1 区。

[0108] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0109] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点包含 SEQ ID NO:7 作为重链可变结构域 , 和 SEQ ID NO:8 作为轻链可变结构域 , 和

[0110] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点包含 SEQ ID NO:52 作为重链可变结构域 , 和 SEQ ID NO:53 作为轻链可变结构域。

[0111] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0112] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:1, 或 SEQ ID NO:94 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:2, 或 SEQ ID NO:95 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:3, 或 SEQ ID NO:96 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:4, 或 SEQ ID NO:97 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:5, 或 SEQ ID NO:98 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:6, 或 SEQ ID NO:99 的 CDR1 区 ;

[0113] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:62, 或 SEQ ID NO:86 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:63, 或 SEQ ID NO:87 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:64, 或 SEQ ID NO:88 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:65, 或 SEQ ID NO:89 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:66, 或 SEQ ID NO:90 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:67, 或 SEQ ID NO:91 的 CDR1 区。

[0114] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0115] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点包含 SEQ ID NO:7, 或 SEQ ID NO:100 作为重链可变结构域 , 和 SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:101 作为轻链可变结构域 , 和

[0116] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点包含 SEQ ID NO:68, 或 SEQ ID NO:92 作为重链可变结构域 , 和 SEQ ID NO:69, 或 SEQ ID NO:93 作为轻链可变结构域。

[0117] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0118] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:1 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:2 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:3 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:4 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:5 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:6 的 CDR1 区 ;

[0119] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:62 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:63 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:64 的 CDR1 区 , 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:65 的 CDR3 区 , SEQ ID NO:66 的 CDR2 区 , 和 SEQ ID NO:67 的 CDR1 区。

[0120] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0121] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点包含 SEQ ID NO:7 作为重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:8 作为轻链可变结构域;和

[0122] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点包含 SEQ ID NO:68 作为重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:69 作为轻链可变结构域。

[0123] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0124] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:1 的 CDR3 区, SEQ ID NO:2 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:3 的 CDR1 区, 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:4 的 CDR3 区, SEQ ID NO:5 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:6 的 CDR1 区;和

[0125] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点在重链可变结构域中包含 SEQ ID NO:78 的 CDR3 区, SEQ ID NO:79 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:80 的 CDR1 区, 并且在轻链可变结构域中包含 SEQ ID NO:81 的 CDR3 区, SEQ ID NO:82 的 CDR2 区, 和 SEQ ID NO:83 的 CDR1 区。

[0126] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明所述的双特异性抗体的特征在于

[0127] ii) 所述特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点包含 SEQ ID NO:7 作为重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:8 作为轻链可变结构域, 和

[0128] iii) 所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点包含 SEQ ID NO:84 作为重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:85 作为轻链可变结构域。

[0129] 本发明另一个实施方案是特异性结合人血管内皮生长因子 (VEGF) 和人血管生成素 -2(ANG-2) 的双特异性抗体, 其特征在于母体抗 -ANG-2 抗体不特异性结合人血管生成素 1(ANG-1)。典型的特异性结合人 ANG-2 但不结合人 ANG-1 的母体抗体是例如 Ang2s\_R3\_LC03, Ang2s\_LC09, Ang2i\_LC06, Ang2i\_LC07, 并且优选地是 Ang2i\_LC10 或与 Ang2s\_R3\_LC03, Ang2s\_LC09, Ang2i\_LC06, Ang2i\_LC07, Ang2i\_LC10 结合相同表位的抗体, 优选地抗体结合与 Ang2i\_LC06, 或 Ang2i\_LC10 相同的表位。因此在本发明的一个实施方案中, 特异性结合人血管内皮生长因子 (VEGF) 和人血管生成素 -2(ANG-2) 但不结合人 ANG-1( 或其中母体抗 -ANG-2 抗体不特异性结合人血管生成素 1(ANG-1)) 的双特异性抗体结合与 Ang2s\_R3\_LC03, Ang2s\_LC09, Ang2i\_LC06, Ang2i\_LC07, Ang2i\_LC10 相同的表位, 优选地结合与 Ang2i\_LC06 或 Ang2i\_LC10 相同的表位。与特异性结合人血管内皮生长因子 (VEGF) 和人血管生成素 -2(ANG-2) 以及结合人 ANG-1 的双特异性抗体相比较, 这种特异性结合人血管内皮生长因子 (VEGF) 和人血管生成素 -2(ANG-2) 但不结合人 ANG-1( 或其中母体抗 -ANG-2 抗体不特异性结合人血管生成素 1(ANG-1)) 的双特异性抗体可具有改善的性质, 如例如生物学或药理学活性, 更低的毒性或药物代谢动力学谱。

[0130] 因此一个优选的实施方案是特异性结合人 VEGF 和人 ANG-2 的双特异性抗体, 其包含特异性结合人 VEGF 的第一抗原结合位点和特异性结合人 ANG-2 的第二抗原结合位点, 其特征在于: 该第二抗原结合位点不特异性结合人血管生成素 1(ANG-1)。

[0131] 本发明的一个实施方案是特异性结合人血管内皮生长因子 (VEGF) 和人血管生成素 -2(ANG-2) 的双特异性抗体, 其包含特异性结合人 VEGF 的第一抗原结合位点和特异性结合人 ANG-2 的第二抗原结合位点, 其特征在于: 结合亲和力 KD( 对 VEGF 特异性的抗原结合

位点)/KD(对 ANG-2 特异性的抗原结合位点)的比值是 1.0-10.0, 优选是 1.5-8.0(在一个实施方案是 5.0-8.0)且优选地绝对 KD 值在  $10^{-8}$ - $10^{-13}$ mol/l 的范围内。KD 值通过在 ANG-2/VEGF 结合 BIACORE 中确定(见实施例 2 和图 15A)。因为人 VEGF 和人 ANG-2 两种蛋白在人血清中均以大约相同的浓度以可溶性受体配体存在, 通过双特异性抗体阻断所述两种受体配体在用这种双特异性抗体治疗癌症或血管疾病的过程中可产生在抗血管生成效应、肿瘤生长抑制或抵抗机制方面改善的性质, 所述双特异性抗体的特征在于结合亲和力 KD(对 VEGF 特异性的抗原结合位点)/KD(对 ANG-2 特异性的抗原结合位点)的比值是 1.0-10.0, 优选是 1.5-8.0, 并且在一个实施方案是 5.0-8.0。优选地所述双特异性抗体的特征在于结合亲和力 KD(对 VEGF 特异性的抗原结合位点)/KD(对 ANG-2 特异性的抗原结合位点)的比值是 1.0-10.0, 优选是 1.5-8.0(在一个实施方案是 5.0-8.0), 并且所述双特异性抗体包含 SEQ ID NO:7 的重链可变结构域和 SEQ ID NO:8 的轻链可变域作为特异性结合 VEGF 的第一抗原结合位点, 和 a) SEQ ID NO:52 的重链可变结构域和 SEQ ID NO:53 的轻链可变结构域作为所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点, 或者 b) SEQ ID NO:84 的重链可变结构域和 SEQ ID NO:85 的轻链可变结构域作为所述特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点。

[0132] 用于本文时, “抗体”指包含抗原结合位点的结合蛋白。术语“结合位点”或“抗原结合位点”用于本文时, 指配体实际上结合的抗体分子的区域。术语“抗原结合位点”包含抗体重链可变结构域 (VH) 和 / 或抗体轻链可变结构域 (VL) 或 VH/VL 的对, 并可源自完整抗体或抗体片段如单链 Fv、VH 结构域和 / 或 VL 结构域、Fab 或 (Fab)2。在本发明的一个实施方案中, 每个抗原结合位点包含抗体重链可变结构域 (VH) 和 / 或抗体轻链可变结构域 (VL), 和优选地由抗体轻链可变结构域 (VL) 和抗体重链可变结构域 (VH) 组成的对形成。

[0133] 特异性结合人血管内皮生长因子 (VEGF) 的抗原结合位点, 并且特别是重链可变结构域 (VH) 和 / 或抗体轻链可变结构域 (VL) 可如下获得, a) 来自已知抗 -VEGF 抗体, 如 Kim 等, Nature (自然) 362(1993) 841-844; Warren, R. S., 等, J. Clin. Invest. (临床研究杂志) 95(1995) 1789-1797; Borgstrom, P., 等, Cancer Res. (癌症研究) 56(1996) 4032-4039; Melnyk, O., 等, Cancer Res. (癌症研究) 56(1996) 921-924. WO94/10202, WO98/45332, WO 005/00900, WO00/35956 和 US2007/0141065 或 b) 来自通过其中使用人 VEGF 蛋白或核酸或其片段或通过噬菌体展示的从头 (de novo) 免疫法获得的新抗 -VEGF 抗体。

[0134] 特异性结合人血管生成素 -2(ANG-2) 的抗原结合位点, 特别是重链可变结构域 (VH) 和 / 或抗体轻链可变结构域 (VL) 可如下获得, a) 来自已知抗 -ANG-2 抗体, 如 WO03/030833, WO2006/068953, WO2006/045049 或 US6, 166, 185; 或 b) 来自通过其中使用人 ANG-2 蛋白或核酸或其片段或通过噬菌体展示的从头免疫法获得的新抗 -ANG-2 抗体。

[0135] 抗体特异性指抗体对于抗原的特定表位的选择性识别。天然抗体, 例如是单特异性的。

[0136] 根据本发明所述的“双特异性抗体”是具有两种不同的抗原结合特异性的抗体。如果抗体具有超过一种特异性, 识别的表位可以与单抗原或一种以上的抗原相关。本发明的抗体特异于两种不同的抗原, 即作为第一抗原的 VEGF 和作为第二抗原的 ANG-2。

[0137] 术语“单特异性”抗体, 用于本文时指具有一个或多个分别结合于相同抗原的相同表位的结合位点的抗体。

[0138] 术语“价”在本申请中使用时指结合位点在抗体分子上存在的具体数量。象这样,

术语“二价”，“四价”，和“六价”指在抗体分子上分别存在两个结合位点，四个结合位点，和六个结合位点。根据本发明的双特异性抗体是至少“二价的”，并且可以是“三价”或“多价”的（例如（“四价”或六价）的）。优选地，根据本发明的双特异性抗体是二价，三价或四价的。在一个实施方案中，所述双特异性抗体是二价的。在一个实施方案中，所述双特异性抗体是三价的。在一个实施方案中，所述双特异性抗体是四价的。

[0139] 本发明的抗体具有两个以上的结合位点，并且是双特异性的。即，即使是在存在两个以上结合位点（即，抗体是三价或多价的）的情形中，所述抗体可以是双特异性的。本发明的双特异性抗体包括，例如多价单链抗体、双抗体和三链抗体，以及具有全长抗体的恒定结构域结构的抗体，另外的抗原结合位点（例如单链Fv、VH结构域和/或VL结构域，Fab，或(Fab)2)通过一个或多个肽接头连接所述全长抗体的恒定结构域结构。所述抗体可以是来自单一物种的全长抗体，或可以是嵌合化或人源化的。对于具有超过两个抗原结合位点的抗体，一些结合位点可以是相同的，只要所述蛋白具有对于两个不同抗原的结合位点。即，当第一结合位点特异于 VEGF 时，第二结合位点特异于 ANG-2，反之亦然。

[0140] 人血管内皮生长因子(VEGF/VEGF-A)(SEQ ID No:105)在例如 Leung, D. W., 等, Science(科学)246(1989)1306-9;Keck, P. J., 等, Science(科学)246(1989)1309-12 和 Connolly, D. T., 等, J. Biol. Chem. (生物的化学杂志)264(1989)20017-24 中描述。VEGF 参与与肿瘤和眼内病症相关的正常和异常的血管发生与新血管生成的调控(Ferrara, N., 等, Endocr. Rev. (内分泌综述)18(1997)4-25;Berkman, R. A., 等, J. Clin. Invest. (临床研究杂志)91(1993)153-159;Brown, L. F., 等, Human Pathol. (人类病理学)26(1995)86-91;Brown, L. F., 等, Cancer Res. (癌症研究)53(1993)4727-4735;Mattern, J., 等, Brit. J. Cancer(英国癌症学杂志)73(1996)931-934;和 Dvorak, H., 等, Am. J. Pathol. (美国病理学杂志)146(1995)1029-1039)。VEGF 是同二聚体糖蛋白，已经从数种来源分离。VEGF 对内皮细胞显示高度特异性的促有丝分裂活性。

[0141] 人血管生成素-2(ANG-2)(替代地缩写为 ANGPT2 或 ANG2)(SEQ ID No:106)在 Maisonpierre, P. C., 等, Science(科学)277(1997)55-60 和 Cheung, A. H., 等, Genomics48(1998)389-91 中描述。发现血管生成素-1 和 -2(ANG-1(SEQ ID No:107)和 ANG-2(SEQ ID No:106))是 Ties 的配体, Ties 是选择性在血管内皮内表达的酪氨酸激酶家族。Yancopoulos, G. D., 等, Nature(自然)407(2000)242-48。现在有四种明确的血管生成素家族的成员。血管生成素-3 和 -4(Ang-3 和 Ang-4)可代表小鼠和人中相同基因位点的非常不同的对应物。Kim, I., 等, FEBS Let, 443(1999)353-56;Kim, I., 等, J Biol Chem274(1999)26523-28。ANG-1 和 ANG-2 最初在组织培养实验中分别作为激动剂和拮抗剂而鉴定(对于 ANG-1, 见:Davis, S., 等, Cell(细胞)87(1996)1161-69;对于 ANG-2, 见:Maisonpierre, P. C., 等, Science(科学)277(1997)55-60)。所有已知血管生成素基本上都结合 Tie2, 且 Ang-1 和 -2 均以 3nM(Kd) 的亲和力结合 Tie2。Maisonpierre, P. C., 等, Science(科学)277(1997)55-60。

[0142] 本发明的抗体的抗原结合位点可包含六个互补性决定区(CDRs)，其在不同程度上有助于结合位点对于抗原的亲和力。存在三个重链可变结构域CDRs(CDRH1, CDRH2 和 CDRH3)和三个轻链可变结构域CDRs(CDRL1, CDRL2 和 CDRL3)。CDR 和构架区(FRs)的程度通过与氨基酸序列的汇编数据库进行比较来确定，所述氨基酸序列中那些区域根据序列之

间的可变性来确定。此外,还包括在本发明范围内的是包含更少 CDRs 的功能性抗原结合位点(即,在结合特异性由三个、四个或五个 CDRs 决定的情形中)。例如,少于 6 个 CDRs 的完整组对于结合可能是足够的。在一些情形中,VH 或 VL 结构域是足够的。

[0143] 在某些实施方案中,本发明的抗体还包含一个或多个免疫球蛋白种类的免疫球蛋白恒定区。免疫球蛋白种类包括 IgG, IgM, IgA, IgD, 和 IgE 同种型,并且在 IgG 和 IgA 的情形中,包括它们的亚型。在优选的实施方案中,本发明的抗体具有 IgG 型抗体的恒定结构域结构,但是具有四个抗原结合位点。这是通过例如将两个特异性结合 VEGF 的完整抗原结合位点(例如,单链 Fv)与特异性结合 ANG-2 的完整抗体的 N 端或 C 端重链或轻链进行连接来实现。备选地这是通过将两个特异性结合 ANG-2 的完整结合肽与特异性结合 VEGF 的全长抗体的 C 端重链融合实现。这四个抗原结合位点优选地对于两种不同结合特异性的每种包含两个抗原结合位点。

[0144] 术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”用于本文中时,指单一氨基酸组成的抗体分子制剂。

[0145] 术语“嵌合抗体”指一种抗体,其包括来自一种来源或物种的可变区,即结合区,以及源自不同来源或物种的恒定区的至少一部分,其通常通过重组 DNA 技术进行制备。优选包括鼠可变区和人恒定区的嵌合抗体。本发明涵盖的“嵌合抗体”的其它优选形式是这样的那些,其中恒定区已经被从初始抗体的恒定区开始进行修饰或改变以产生按照本发明的特性,特别是关于 C1q 结合和 / 或 Fc 受体 (FcR) 结合。也将这种“嵌合”抗体称作“类别转换抗体”。嵌合抗体是被表达的免疫球蛋白基因的产物,该基因包括编码免疫球蛋白可变区的 DNA 区段和编码免疫球蛋白恒定区的 DNA 区段。制备嵌合抗体的方法包括目前在本领域众所周知的常规重组 DNA 和基因转染技术。见,例如,Morrison, S. L., 等,美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 81 (1984) 6851–6855;US5, 202, 238 和 5, 204, 244。

[0146] 术语“人源化抗体”指这样的抗体,其中的构架或“互补性决定区”(CDR) 已经被修饰为包括与母体免疫球蛋白相比特异性不同的免疫球蛋白的 CDR。在一个优选实施方案中,将鼠 CDR 移植到人抗体的构架区以制备“人源化抗体”。见例如,Riechmann, L. ,等,自然 (Nature) 332 (1988) 323–327;和 Neuberger, M. S. ,等,自然 (Nature) 314 (1985) 268–270。特别优选的 CDRs 对应于识别以上指出的关于嵌合抗体的抗原的那些代表性序列。本发明涵盖的“人源化抗体”的其它形式是这样的那些,其中恒定区已经另外被从初始抗体的恒定区开始进行修饰或改变以产生按照本发明的特性,特别是关于 C1q 结合和 / 或 Fc 受体 (FcR) 结合。

[0147] 用于本文时,术语“人抗体”意欲包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。人抗体是现有技术中公知的 (van Dijk, M. A. , 和 van de Winkel, J. G. , 当前化学生物学观点 (Curr. Opin. Chem. Biol.) 5 (2001) 368–374)。人抗体还可以在转基因动物(例如小鼠)中产生,所述转基因动物在免疫时能够在缺乏内源免疫球蛋白生成的条件下产生人抗体的全部所有组成成分或选择部分 (selection)。在所述种系突变小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致在抗原攻击时产生人抗体(见例如 Jakobovits, A. , 等 ., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美 国 国 家 科 学 院 学 报) 90 (1993) 2551–2555; Jakobovits, A. , 等 ., Nature(自 然) 362 (1993) 255–258;Bruggemann, M. , 等 ., Year Immunol. (免 疫 学 年 度) 7 (1993) 33–40)。人抗体还可以在噬菌体展示文库中产生

(Hoogenboom, H. R., 和 Winter, G., J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 227 (1992) 381–388; Marks, J. D., 等., J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 222 (1991) 581–597)。Cole, A. 等和 Boerner, P., 等的技术也可以用于制备人单克隆抗体 (Cole, A., 等., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (单克隆抗体和癌症治疗), Liss A. L., p. 77 (1985); 和 Boerner, P., 等., J. Immunol. (免疫学杂志) 147 (1991) 86–95)。如已经对按照本发明的嵌合和人源化抗体所提及地, 术语“人抗体”用于本文中时还包括这样的抗体, 其在恒定区内进行修饰以产生按照本发明的特性, 特别是关于 C1q 结合和 / 或 FcR 结合, 例如通过“类别转换”即改变或突变 Fc 部分 (例如由 IgG1 到 IgG4 和 / 或 IgG1/IgG4 突变。)

[0148] 用于本文时, 术语“重组人抗体”意欲包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有人抗体, 诸如分离自宿主细胞, 诸如 NS0 或 CHO 细胞的抗体或分离自人免疫球蛋白基因的转基因动物 (例如小鼠) 的抗体, 或利用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体。这种重组人抗体具有处于重排形式的可变区和恒定区。按照本发明的重组人抗体已经经历了体内体细胞高变。因此, 重组抗体的 VH 和 VL 区域的氨基酸序列是尽管源自并涉及人种系 VH 和 VL 序列, 但在体内可能不天然存在于人抗体种系所有组成成分中的序列。

[0149] “可变结构域”(轻链 (VL) 的可变结构域, 重链 (VH) 的可变区) 用于本文中时, 表示直接参与抗体与抗原结合的每对轻链和重链对。可变人轻链和重链的结构域具有相同的一般结构且每个结构域包括 4 个构架 (FR) 区, 所述构架区的序列普遍保守, 其通过 3 个“高变区”(或互补性决定区, CDRs) 相连接。构架区采用  $\beta$ -折叠构象且 CDR 可以形成连接  $\beta$ -折叠结构的环。每条链中的 CDR 通过构架区以其三维结构保持并与来自另一条链的 CDR 一起形成抗原结合位点。抗体重链和轻链 CDR3 区在按照本发明的抗体的结合特异性 / 亲和力方面发挥特别重要的作用并因此提供本发明的另一个目的。

[0150] 用于本文时, 术语“高变区”或“抗体的抗原结合部分”指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。高变区包括来自“互补性决定区”或“CDRs”的氨基酸残基。“构架”或“FR”区是除本文中定义的高变区残基之外的那些可变结构域区域。因此, 抗体的轻链和重链从 N 端到 C 端包括结构域 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 和 FR4。各条链上的 CDR 通过所述构架氨基酸分开。特别地, 重链的 CDR3 是最有助于抗原结合的区域。按照 Kabat 等, 免疫目的蛋白质序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第 5 版, 公众健康服务, 国家健康研究所 (Public Health Service, National Institutes of Health), Bethesda, MD. (1991)) 的标准定义确定 CDR 和 FR 区域。

[0151] 根据本发明所述的双特异性抗体还包括具有“保守序列修饰”的这些抗体 (这是指双特异性抗体的“变体”)。这意味着不影响或改变根据本发明所述的抗体的上述特征的核苷酸和氨基酸序列修饰。可以通过本领域已知的标准技术引入修饰, 如位点定向诱变和 PCR 介导的诱变。保守氨基酸置换包括其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基取代的置换。具有类似侧链的氨基酸残基家族已经在本领域中定义。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸 (例如, 赖氨酸、精氨酸、组氨酸), 具有酸性侧链的氨基酸 (例如天冬氨酸、谷氨酸), 具有不带电荷的极性侧链的氨基酸 (例如, 甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸), 具有非极性侧链的氨基酸 (例如, 丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸), 具有  $\beta$  支链侧链的氨基酸 (例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸) 和具有芳香族侧链的氨基酸 (例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,

在双特异性〈VEGF-ANG-2〉抗体中的预测的非必需氨基酸残基可以优选地被来自相同侧链家族的另一种氨基酸残基置换。因此，“变体”双特异性〈VEGF-ANG-2〉抗体在本文是指这样的分子，其氨基酸序列与“母体”双特异性〈VEGF-ANG-2〉抗体氨基酸序列的不同之处在于在母体抗体的一个或多个可变区或恒定区中至多 10 个，优选约 2 个到约 5 个添加、缺失和 / 或置换。氨基酸置换可以通过基于分子建模的诱变进行，如在 Riechmann, L., 等，自然 (Nature) 332 (1988) 323–327 和 Queen, C., 等，美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 86 (1989) 10029–10033 中所述。根据本发明所述的“变体”双特异性〈VEGF-ANG-2〉抗体也包括这样的双特异性抗体形式，其中接头（如果存在）被修饰或被另一个接头替换。

[0152] 用于本文时，术语“结合”或“特异性结合”指在体外测定法中，优选地在用纯化的野生型抗原的等离子测定 (BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Sweden) (实施例 2) 中，抗体与抗原（人 VEGF 或人 ANG-2）的表位的结合。结合的亲和力由术语  $k_a$ （来自抗体 / 抗原复合物的抗体的结合的速率常数）， $k_d$ （解离常数）和  $K_D(k_d/k_a)$  定义。结合或特异性结合意为  $10^{-8}$ mol/l 以下，优选地  $10^{-9}$ M 到  $10^{-13}$ mol/l 的结合亲和力 ( $K_D$ )。

[0153] 抗体与 Fc $\gamma$ RIII 的结合可以通过 BIAcore 测定法 (GE-Healthcare, Uppsala, Sweden) 进行研究。结合的亲和力由术语  $k_a$ （来自抗体 / 抗原复合物的抗体的结合的速率常数）， $k_d$ （解离常数）和  $K_D(k_d/k_a)$  定义。

[0154] 用于本文时，术语“不结合 ANG-1”或“不特异性结合 ANG-1”表示在体外 ANG-1 结合 ELISA 测定法中抗体具有高于 8000ng/ml 的 EC50 值（根据实施例 9）。

[0155] 术语“表位”包括能够特异性结合抗体的任何多肽决定簇。在某些实施方案中，表位决定簇包括分子的化学活性表面分组 (groupings)，诸如氨基酸、糖侧链、磷酰基或磺酰基，在某些实施方案中，可以具有特定的三维结构特征，和 / 或特定的带电特性。表位是被抗体结合的抗原区域。

[0156] 在某些实施方案中，当抗体在蛋白和 / 或大分子的复杂混合物中优选识别其靶抗原时，将该抗体称为与抗原特异性结合。

[0157] 在本发明的一个实施方案中，所述双特异性抗体包含全长母体抗体作为支架。

[0158] 术语“全长抗体”指由两条“全长抗体重链”和两条“全长抗体轻链”组成的抗体。“全长抗体重链”是这样的多肽，其在 N 端到 C 端方向由抗体重链可变结构域 (VH)、抗体恒定重链结构域 1 (CH1)，抗体铰链区 (HR)，抗体重链恒定结构域 2 (CH2)，和抗体重链恒定结构域 3 (CH3) 组成，缩写为 VH-CH1-HR-CH2-CH3；并且在 IgE 亚类的抗体的情形中，任选地还包括抗体重链恒定结构域 4 (CH4)。优选地，“全长抗体重链”是在 N 端到 C 端方向由 VH, CH1, HR, CH2 和 CH3 组成的多肽。“全长抗体轻链”是在 N 端到 C 端方向由抗体轻链可变结构域 (VL)，和抗体轻链恒定结构域 (CL) 组成的多肽，缩写为 VL-CL。所述抗体轻链恒定结构域 (CL) 可以是  $\kappa$  (kappa) 或  $\lambda$  (lambda)。两条全长抗体链通过在 CL 结构域和 CH1 结构域之间的多肽间二硫键和全长抗体重链的铰链区之间的多肽间二硫键连接在一起。典型的全长抗体的实例是天然抗体如 IgG (例如，IgG1 和 IgG2), IgM, IgA, IgD, 和 IgE。根据本发明所述的全长抗体可以来自单一物种，例如人，或它们可以是嵌合的或人源化的抗体。根据本发明所述的全长抗体包含分别由 VH 和 VL 对形成的两个抗原结合位点，这两个抗原结合位点都特异性结合于相同的抗原。因此，包含第一抗原结合位点并且由两条抗体轻链和两条抗体重链组成的单特异性二价 (= 全长) 抗体是全长抗体。所述全长抗体的重链或轻

链的 C 端指在所述重链或轻链的 C 端的最后的氨基酸。所述全长抗体的重链或轻链的 N 端指在所述重链或轻链的 N 端的最后的氨基酸。

[0159] 对于根据本发明的特异性结合人血管内皮生长因子 (VEGF) 和人血管生成素 -2 (ANG-2) 的双特异性抗体，双特异性抗体形式的优选实施方案是具有两种不同特异性的二价抗体，如例如 a) 在 WO2009/080251, WO2009/080252 或 WO2009/080253 (结构域交换的抗体 - 见实施例 13) 中所述，或 b) 基于 scFab-Fc 融合抗体，其中一个单链 Fab 片段 (最终经二硫化物稳定的) 特异于 VEGF，而另一个单链 Fab 片段 (最终经二硫化物稳定的) 特异于 ANG-2 (见实施例 14)，或 c) 在 Ridgway, J. B., Protein Eng. 9 (1996) 617-621 ;W096/027011 ; Merchant, A. M. , 等，自然生物技术 (Nature Biotech) 16 (1998) 677-681 ;Atwell, S. , 等，分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 270 (1997) 26-35 和 EP1870459A1 中所描述的。

[0160] 在一个实施方案中，根据本发明的双特异性抗体特征在于包含 SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:123 和 SEQ ID NO:124 的氨基酸序列或其变体。

[0161] 在一个实施方案中，根据本发明的双特异性抗体特征在于包含 SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:127 和 SEQ ID NO:128 的氨基酸序列或其变体。

[0162] 在一个实施方案中，根据本发明的双特异性抗体特征在于包含 SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:131 和 SEQ ID NO:132 的氨基酸序列或其变体。

[0163] 在一个实施方案中，根据本发明的双特异性抗体特征在于包含 SEQ ID NO:133 和 SEQ ID NO:134 的氨基酸序列或其变体。

[0164] 在一个实施方案中，根据本发明的双特异性抗体特征在于包含 SEQ ID NO:135 和 SEQ ID NO:136 的氨基酸序列或其变体。

[0165] 这些氨基酸序列基于作为结合 VEGF 的第一抗原结合位点的 SEQ ID NO:7 的重链可变结构域，和 SEQ ID NO:8 的轻链可变结构域 (来自贝伐单抗 (阿瓦斯丁))，并且基于作为结合 ANG-2 的第二抗原结合位点的 SEQ ID NO:52 的重链可变结构域，和 SEQ ID NO:53 的轻链可变结构域 (来自 Ang2i\_LC06)。

[0166] 在一个实施方案中，所述双特异性抗体是三价的，使用例如基于特异性结合两种抗原 VEGF 或 ANG-2 之一的全长抗体的形式，仅在一条重链的一个 C 端，scFab 片段融合在所述全长抗体上，所述 scFab 片段特异性结合于两种抗原 VEGF 或 ANG-2 的另一种上，包括凸起 - 进入 - 孔洞技术 (knobs-into holes technology)，如在 EP 申请号 09004909. 9 (见实施例 11) 中所述，或例如基于特异性结合两种抗原 VEGF 或 ANG-2 之一的全长抗体的形式，在一条重链的一个 C 端，所述全长抗体融合 VH 或 VH-CH1 片段，并且在第二重链的另一个 C 端融合 VL 或 VL-CL 片段，所述 VL 或 VL-CL 片段特异性结合两种抗原 VEGF 或 ANG-2 的另一种，包括凸起 - 进入 - 孔洞技术，如在 EP 申请号 09005108. 7 中所述 (见实施例 12)。

[0167] 在一个实施方案中，根据本发明的双特异性抗体特征在于包含 SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:116 和 SEQ ID NO:117 的氨基酸序列或其变体。

[0168] 在一个实施方案中，根据本发明的双特异性抗体特征在于包含 SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:119 和 SEQ ID NO:120 的氨基酸序列或其变体。

[0169] 这些氨基酸序列基于作为结合 VEGF 的第一抗原结合位点的 SEQ ID NO:7 的重链可变结构域，和 SEQ ID NO:8 的轻链可变结构域 (来自贝伐单抗 (阿瓦斯丁))，并且基于作为结合 ANG-2 的第二抗原结合位点的 SEQ ID NO:52 的重链可变结构域，和 SEQ ID NO:53

的轻链可变结构域（来自 Ang2i\_LC06）。

[0170] 对于根据本发明的特异性结合人血管内皮生长因子(VEGF)和人血管生成素-2(ANG-2)的双特异性抗体的优选双特异性抗体形式是具有两种不同特异性的四价抗体(TvAb)，如例如在 WO2007/024715，或 WO2007/109254 或 EP 申请号 09004909.9 中所述。因此在一个实施方案中，所述双特异性抗体是四价的，使用如例如在 WO2007/024715，或 WO2007/109254 或 EP 申请号 09004909.9 中所述的形式（见实施例 1 或 10）。

[0171] 在本发明的一个实施方案中，双特异性四价抗体 TvAb-2441- 贝伐单抗-LC06 的特征在于包含 SEQ ID NO:102 的肽和 SEQ ID NO:62 的轻链或其变体。

[0172] 在一个实施方案中，根据本发明的双特异性抗体特征在于包含 SEQ ID NO:109 和 SEQ ID NO:110 的氨基酸序列或其变体。

[0173] 在一个实施方案中，根据本发明的双特异性抗体特征在于包含 SEQ ID NO:111 和 SEQ ID NO:112 的氨基酸序列或其变体。

[0174] 在一个实施方案中，根据本发明的双特异性抗体特征在于包含 SEQ ID NO:113 和 SEQ ID NO:114 的氨基酸序列或其变体。

[0175] 这些氨基酸序列基于作为结合 VEGF 的第一抗原结合位点的 SEQ ID NO:7 的重链可变结构域，和 SEQ ID NO:8 的轻链可变结构域（来自贝伐单抗（阿瓦斯丁）），并且基于作为结合 ANG-2 的第二抗原结合位点的 SEQ ID NO:52 的重链可变结构域，和 SEQ ID NO:53 的轻链可变结构域（来自 Ang2i\_LC06）。

[0176] 在本发明的一个实施方案中，双特异性四价抗体 TvAb-2441- 贝伐单抗-LC08 的特征在于包含 SEQ ID NO:103 的肽和 SEQ ID NO:62 的轻链或其变体。

[0177] 在根据本发明所述的抗体中的结合位点每个可以由两个可变结构域的对形成，即一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的一对形成。在抗体中的最小结合位点决定簇是重链 CDR3 区域。

[0178] 在一个实施方案中，根据本发明所述的双特异性抗体是四价的。在另一个实施方案中，所述四价双特异性抗体具有下列特征：

[0179] - 其由下列各项组成：

[0180] a) 由两条全长抗体重链和两条全长抗体轻链组成的单特异性二价母体抗体，其中每条链仅包含一个可变结构域，

[0181] b) 两个肽接头，

[0182] c) 两种单特异性单价单链抗体，每种由抗体重链可变结构域，抗体轻链可变结构域和在所述抗体重链可变结构域和所述抗体轻链可变结构域之间的单链接头组成；

[0183] 和优选地，所述单链抗体连接于单特异性二价抗体重链的相同末端(C 端和 N 端)，或备选地连接于单特异性二价抗体轻链的相同末端(优选地 C 端)，和更优选地连接于单特异性二价抗体重链的相同末端(C 端和 N 端)。

[0184] 在另一个实施方案中，所述双特异性抗体是四价的，并且由下列各项组成：

[0185] a) 全长抗体，其包含所述抗原结合位点并且由两条抗体重链和两条抗体轻链组成；和

[0186] b) 包含所述第二抗原结合位点的两个相同的单链 Fab 片段，

[0187] 其中在 b) 下的所述单链 Fab 片段通过在所述全长抗体的重链或轻链的 C 端或 N

端的肽连接体融合于在 a) 下的所述全长抗体。

[0188] 在另一个实施方案中,所述双特异性抗体是四价的,并且由下列各项组成:

[0189] a) 全长抗体,其包含所述第二抗原结合位点并且由两条抗体重链和两条抗体轻链组成;和

[0190] b) 包含所述第一抗原结合位点的两个相同的单链 Fab 片段,

[0191] 其中在 b) 下的所述单链 Fab 片段通过在所述全长抗体的重链或轻链的 C 端或 N 端的肽连接体融合于在 a) 下的所述全长抗体。

[0192] 优选地,在 b) 下的所述单链 Fab 片段通过在所述全长抗体的重链或轻链的 C 端的肽连接体融合于所述全长抗体。

[0193] 在一个实施方案中,结合第二抗原的两个相同的单链 Fab 片段通过在所述全长抗体的每个重链或轻链的 C 端的肽连接体融合于所述全长抗体。

[0194] 在一个实施方案中,结合第二抗原的两个相同的单链 Fab 片段通过在所述全长抗体的每个重链的 C 端的肽连接体融合于所述全长抗体。

[0195] 在一个实施方案中,结合第二抗原的两个相同的单链 Fab 片段通过在所述全长抗体的每个轻链的 C 端的肽连接体融合于所述全长抗体。

[0196] 包括单链 Fab 片段的此类实施方案在例如 EP 申请号 09004909. 9 中更详细的描述,其通过引用并入本文。

[0197] 术语“肽连接体”用于本发明时指具有氨基酸序列的肽,其优选地是合成来源的。这些根据本发明所述的肽接头用于连接不同的抗原结合位点和 / 或最终包含不同的抗原结合位点的抗体片段(例如单链 Fv, 全长抗体, VH 结构域和 / 或 VL 结构域, Fab, (Fab)2, Fc 部分)从而在一起形成根据本发明所述的双特异性抗体。所述肽接头可以包含下列在表 1 中列出的氨基酸序列中的一个或多个以及另外任意选择的氨基酸。所述肽接头是具有至少 5 个氨基酸长度,优选地至少 10 个氨基酸长度,更优选地 10–50 个氨基酸长度的氨基酸序列的肽。优选地,在 b) 下的所述肽接头是具有至少 10 个氨基酸长度的氨基酸序列的肽。在一个实施方案中,所述肽接头是 (GxS)<sub>n</sub>, 其中 G = 甘氨酸, S = 丝氨酸, (x = 3 和 n = 3, 4, 5 或 6) 或 (x = 4 和 n = 2, 3, 4 或 5), 优选地 x = 4 和 n = 2 或 3, 更优选地 x = 4, n = 2 ((G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>)。还可以将另外的 G = 甘氨酸, 例如 GG, 或 GGG 加入所述 (GxS)<sub>n</sub> 肽接头。

[0198] 术语“单链接头”用于本发明时指具有氨基酸序列的肽,其优选地是合成起源的。这些根据本发明所述的单链接头用于连接 VH 和 VL 结构域从而形成单链 Fv。优选地,在 c) 下的所述单链接头是具有至少 15 个氨基酸长度,更优选地具有至少 20 个氨基酸长度的氨基酸序列的肽。在一个实施方案中,所述单链接头是 (GxS)<sub>n</sub>, 其中 G = 甘氨酸, S = 丝氨酸, (x = 3 和 n = 4, 5 或 6) 或 (x = 4 和 n = 3, 4 或 5), 优选地 x = 4, n = 4 或 5, 更优选地 x = 4, n = 4。

[0199] 此外,所述单链(单链 Fv)抗体优选地是二硫化物稳定的。这样的单链抗体的进一步的二硫化物稳定通过在单链抗体的可变结构域之间引入二硫键实现,并且例如在 WO94/029350, Rajagopal, V., 等, Prot. Engin. 10(12) (1997) 1453–59 ;Kobayashi, H., 等, 核酸药物和生物学(Nuclear Medicine&Biology) 25(1998) 387–393 ;或 Schmidt, M., 等, 原癌基因(Oncogene) 18(1999) 1711 – 1721 中进行描述。

[0200] 在二硫化物稳定的单链抗体的一个实施方案中,包含在根据本发明所述的抗体中

的单链抗体的可变结构域之间的二硫键独立于每种单链抗体选自：

[0201] i) 重链可变结构域位置 44 到轻链可变结构域位置 100,

[0202] ii) 重链可变结构域位置 105 到轻链可变结构域位置 43, 或

[0203] iii) 重链可变结构域位置 101 到轻链可变结构域位置 100。

[0204] 在一个实施方案中, 包含在根据本发明所述的抗体中的单链抗体的可变结构域之间的二硫键在重链可变结构域位置 44 到轻链可变结构域位置 100 之间。

[0205] 在一个实施方案中, 包含在根据本发明所述的抗体中的单链抗体的可变结构域之间的二硫键在重链可变结构域位置 105 到轻链可变结构域位置 43 之间。

[0206] 根据本发明所述的双特异性抗体的该四价实施方案的结构特异性结合 VEGF 和 ANG-2, 其中抗原 A 或 B 之一是 VEGF, 而另一个是 ANG-2。所述结构基于特异性结合抗原 A 的全长抗体, 特异性结合抗原 B 的两条 (任选地二硫化物稳定的) 单链 Fv's 通过肽接头连接于所述全长抗体, 所述结构在图 1 和图 2 的示意图中例示。

[0207] 在一个实施方案中, 优选在单链抗体 (单链 Fv) 的可变结构域 VH 和 VL 之间不存在所述任选的二硫化物稳定的所述单链 (单链 Fv) 抗体。

[0208] 在另一个实施方案中, 所述四价双特异性抗体特征在于 : 在 a) 下的所述单特异性二价抗体部分特异性结合 VEGF 并且在 c) 下的所述两种单价单特异性单链抗体结合 ANG-2。

[0209] 在另一个实施方案中, 所述四价双特异性抗体特征在于 : 在 a) 下的所述单特异性二价抗体部分特异性结合 ANG-2 并且在 c) 下的所述两种单价单特异性单链抗体结合 VEGF。

[0210] “单链 Fab 片段” (见图 11) 是由抗体重链可变结构域 (VH), 抗体恒定结构域 1 (CH1), 抗体轻链可变结构域 (VL), 抗体轻链恒定结构域 (CL) 和接头组成的多肽, 其中所述抗体结构域和所述接头从 N 端到 C 端方向具有下列顺序之一 : a) VH-CH1- 接头 -VL-CL, b) VL-CL- 接头 -VH-CH1, c) VH-CL- 接头 -VL-CH1 或 d) VL-CH1- 接头 -VH-CL ; 和其中所述接头是至少 30 个氨基酸的多肽, 优选地 32-50 个氨基酸的多肽。所述单链 Fab 片段 a) VH-CH1- 接头 -VL-CL, b) VL-CL- 接头 -VH-CH1, c) VH-CL- 接头 -VL-CH1 和 d) VL-CH1- 接头 -VH-CL, 通过在 CL 结构域和 CH1 结构域之间的天然二硫键稳定。术语“N- 端”指 N 端的最后氨基酸。术语“C- 端”指 C 端的最后的氨基酸。

[0211] 在优选的实施方案中, 在所述单链 Fab 片段中的所述抗体结构域和所述接头具有从 N 端到 C 端方向的下列顺序之一 :

[0212] a) VH-CH1- 接头 -VL-CL, 或 b) VL-CL- 接头 -VH-CH1, 更优选地 VL-CL- 接头 -VH-CH1。

[0213] 在另一个优选的实施方案中, 在所述单链 Fab 片段中的所述抗体结构域和所述接头具有从 N 端到 C 端方向的下列顺序之一 :

[0214] a) VH-CL- 接头 -VL-CH1 或 b) VL-CH1- 接头 -VH-CL。

[0215] 术语“肽连接体”用于本发明时指具有氨基酸序列的肽, 所述肽优选地是合成来源的。将根据本发明所述的这些肽连接体用于将单链 Fab 片段与全长抗体的 C 端或 N 端融合从而形成根据本发明所述的多特异性抗体。优选地, 在 b) 下的所述肽连接体是具有至少 5 个氨基酸长度的氨基酸序列的肽, 优选地具有 5-100 个氨基酸长度的氨基酸序列的肽, 更优选地具有 10-50 个氨基酸长度的氨基酸序列的肽。在一个实施方案中, 所述肽连接体是 (GxS)<sub>n</sub> 或 (GxS)<sub>n</sub>G<sub>m</sub>, 其中 G = 甘氨酸, S = 丝氨酸, 和 (x = 3, n = 3, 4, 5 或 6, 和 m =

0, 1, 2 或 3) 或 ( $x = 4, n = 2, 3, 4$  或  $5$  和  $m = 0, 1, 2$  或  $3$ )，优选地  $x = 4$  和  $n = 2$  或  $3$ ，更优选地  $x = 4, n = 2$ 。在一个实施方案中，所述肽连接体是  $(G_4S)_2$ 。

[0216] 术语“接头”用于本发明时指具有氨基酸序列的肽，其优选地是合成来源的。将根据本发明所述的这些肽用于连接 a) VH-CH1 与 VL-CL, b) VL-CL 与 VH-CH1, c) VH-CL 与 VL-CH1 或 d) VL-CH1 与 VH-CL 从而形成下列根据本发明所述的单链 Fab 片段 a) VH-CH1- 接头 -VL-CL, b) VL-CL- 接头 -VH-CH1, c) VH-CL- 接头 -VL-CH1 或 d) VL-CH1- 接头 -VH-CL。在所述单链 Fab 片段中的所述接头是具有至少 30 个氨基酸长度的氨基酸序列，优选地具有 32-50 个氨基酸长度的氨基酸序列。在一个实施方案中，所述接头是  $(GxS)_n$ ，其中  $G = \text{甘氨酸}$ ,  $S = \text{丝氨酸}$ , ( $x = 3, n = 8, 9$  或  $10$  和  $m = 0, 1, 2$  或  $3$ ) 或 ( $x = 4$  和  $n = 6, 7$  或  $8$  和  $m = 0, 1, 2$  或  $3$ )，优选地其中  $x = 4, n = 6$  或  $7$  和  $m = 0, 1, 2$  或  $3$ ，更优选地  $x = 4, n = 7$  和  $m = 2$ 。在一个实施方案中，所述接头是  $(G_4S)_6G_2$ 。

[0217] 任选地在所述单链 Fab 片段中，除了在 CL- 结构域和 CH1 结构域之间的天然二硫键之外，还通过在下列位置之间引入二硫键来对抗体重链可变结构域 (VH) 和抗体轻链可变结构域 (VL) 进行二硫化物稳定：

[0218] i) 重链可变结构域位置 44 到轻链可变结构域位置 100，

[0219] ii) 重链可变结构域位置 105 到轻链可变结构域位置 43，或

[0220] iii) 重链可变结构域位置 101 到轻链可变结构域位置 100 (总是根据 Kabat 的 EU 索引进行编号)。

[0221] 单链 Fab 片段的这些另外的二硫化物稳定通过在单链 Fab 片段的可变结构域 VH 和 VL 之间引入二硫键来实现。引入非天然的二硫化物桥来稳定单链 Fv 的技术例如描述在 WO94/029350, Rajagopal, V., 等, Prot. Engin. (1997) 1453-59; Kobayashi, H., 等; 核药物和生物学 (Nuclear Medicine&Biology), 卷 25, (1998) 387 - 393; 或 Schmidt, M., 等, 原癌基因 (Oncogene) (1999) 18, 1711-1721 中。在一个实施方案中，包含在根据本发明所述的抗体中的单链 Fab 片段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 和轻链可变结构域位置 100 之间。在一个实施方案中，包含在根据本发明所述的抗体中的单链 Fab 片段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 和轻链可变结构域位置 43 之间 (总是根据 Kabat 的 EU 索引编号)。

[0222] 在一个实施方案中，优选在单链 Fab 片段的可变结构域 VH 和 VL 之间不具有所述任选的二硫化物稳定的单链 Fab 片段。

[0223] 优选地，根据本发明所述的四价双特异性抗体的所述第二实施方案包含两个相同的单链 Fab 片段 (优选地 VL-CL- 接头 -VH-CH1)，所述单链 Fab 片段都融合于在 a) 下的所述全长抗体的两条重链的两个 C 端或融合于在 a) 下的所述全长抗体的两条轻链的两个 C 端。这样的融合导致形成两个相同的融合肽 ((i) 重链和单链 Fab 片段或 ii) 轻链和单链 Fab 片段)，所述融合肽与 i) 全长抗体的轻链或重链共同表达从而提供根据本发明的双特异性抗体。

[0224] 在另一个实施方案中，所述双特异性抗体特征在于所述恒定区是人来源的。

[0225] 在另一个实施方案中，所述双特异性抗体特征在于根据本发明所述的双特异性抗体的恒定区是人 IgG1 亚类的，或是具有突变 L234A 和 L235A 的人 IgG1 亚类的。

[0226] 在另一个实施方案中，所述双特异性抗体特征在于根据本发明所述的双特异性抗

体的恒定区是人 IgG2 亚类的。

[0227] 在另一个实施方案中,所述双特异性抗体特征在于根据本发明所述的双特异性抗体的恒定区是人 IgG3 亚类的。

[0228] 在另一个实施方案中,所述双特异性抗体特征在于根据本发明所述的双特异性抗体的恒定区是人 IgG4 亚类的,或具有另外的突变 S228P 的人 IgG4 亚类的。

[0229] 目前已经发现根据本发明所述的针对人 VEGF 和人 ANG-2 的双特异性抗体具有改善的特征,如生物学或药理学活性、药物代谢动力学性质或毒性。当与针对 VEGF 和 ANG-2 的单特异性母体抗体相比时,它们显示出增加的体内肿瘤生长抑制和 / 或肿瘤血管生成抑制(见实施例 16、17 和 18 :将不同双特异性〈VEGF-ANG-2〉抗体贝伐单抗-ANG2i-LC06 与单特异性抗体单独的阿瓦斯丁(贝伐单抗),单独的 ANG2i-LC06 或两者的组合相比较)。

[0230] 另外,与将针对 VEGF 和 ANG-2 的两种相应单个单特异性抗体组合应用相比,更小的毒性副作用(其反应在体内应用过程中测试动物提高的体重以及测试动物更少的死亡)也代表了根据本发明所述双特异性抗体的优点。

[0231] 此外,根据本发明所述的双特异性抗体可以提供益处如减少的剂量和 / 或施用频率和伴随的费用节省。

[0232] 术语“恒定区”用于本申请时指除了可变区之外的抗体的结构域的总合。恒定区不直接涉及抗原的结合,但是显示不同的效应子功能。取决于它们重链的恒定区的氨基酸序列,抗体被分为下述类别:IgA, IgD, IgE, IgG 和 IgM, 并且这些中的一些可以被进一步分为亚类如 IgG1, IgG2, IgG3, 和 IgG4, IgA1 和 IgA2。对应于不同种类的抗体的重链恒定区分别被称为  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$  和  $\mu$ 。可以在所有 5 种抗体种类中发现的轻链恒定区被称为  $\kappa$  (kappa) 和  $\lambda$  (lambda)。

[0233] 术语“来自人来源的恒定区”在本申请中使用时,指亚类 IgG1, IgG2, IgG3, 或 IgG4 的人抗体的恒定重链区和 / 或恒定轻链  $\kappa$  或  $\lambda$  区域。这样的恒定区是现有技术中公知的并且例如由 Kabat, E. A., 描述(见例如 Johnson, G., 和 Wu, T. T., 核酸研究(Nucleic Acids Res.) 28 (2000) 214-218; Kabat, E. A., 等., 美国国家科学院学报(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 72 (1975) 2785-2788)。

[0234] 当 IgG4 亚类的抗体显示减少的 Fc 受体 (Fc  $\gamma$  RIIIa) 结合时,其它 IgG 亚类的抗体显示强烈的结合。然而, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297(失去 Fc 糖), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434, 和 His435 是这样的残基,其如果改变的话,还提供减少的 Fc 受体结合 (Shields, R. L., 等, 生物化学杂志(J. Biol. Chem.) 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., 等, FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., 等, 免疫学(Immunology) 86 (1995) 319-324; EP0307434)。

[0235] 在一个实施方案中,根据本发明所述的抗体与 IgG1 抗体比较具有减少的 FcR 结合,并且所述单特异性二价(全长)母体抗体涉及 IgG4 亚类的 FcR 结合或具有突变 S228, L234, L235 和 / 或 D265 的 IgG1 或 IgG2 亚类的 FcR 结合,和 / 或包含 PVA236 突变。在一个实施方案中,在单特异性二价(全长)母体抗体中的突变是 S228P, L234A, L235A, L235E 和 / 或 PVA236。

[0236] 在另一个实施方案中,在单特异性二价(全长)母体抗体中的突变在 IgG4 中是 S228P, 在 IgG1 中是 L234A 和 L235A。恒定重链区在 SEQ ID NO:35 和 36 中显示。在一个

实施方案中,单特异性二价(全长)母体抗体的恒定重链区是具有突变 L234A 和 L235A 的 SEQ ID N0:35 的恒定重链区。在另一个实施方案中,单特异性二价(全长)母体抗体的恒定重链区是具有突变 S228P 的 SEQ ID N0:36 的恒定重链区。在另一个实施方案中,单特异性二价(全长)母体抗体的恒定轻链区是 SEQ ID N0:37 的  $\kappa$  轻链区或 SEQ ID N0:34 的  $\lambda$  轻链区。优选的单特异性二价(全长)母体抗体的恒定重链区是 SEQ ID N0:35 或具有突变 S228P 的 SEQ ID N0:36 的恒定重链区。

[0237] 抗体的恒定区直接涉及 ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用)和 CDC(补体依赖的细胞毒性)。补体激活(CDC)由补体因子 C1q 与大多数 IgG 抗体亚类的恒定区结合而起始。C1q 与抗体的结合由在所谓的结合位点的定义的蛋白-蛋白相互作用所导致。这样的恒定区结合位点在现有技术中是已知的,并且例如由 Lukas, T. J., 等, 免疫学杂志 (J. Immunol.) 127(1981) 2555-2560; Brunhouse, R., 和 Cebra, J. J., 分子免疫学 (Mol. Immunol.) 16(1979) 907-917; Burton, D. R., 等, 自然 (Nature) 288(1980) 338-344; Thommesen, J. E., 等, 分子免疫学 (Mol. Immunol.) 37(2000) 995-1004; Idusogie, E. E., 等, 免疫学杂志 (J. Immunol.) 164(2000) 4178-4184; Hezareh, M., 等, 病毒学杂志 (J. Virol.) 75(2001) 12161-12168; Morgan, A., 等, 免疫学 (Immunology) 86(1995) 319-324; 和 EP0307434 所描述。所述恒定区结合位点例如特征在于氨基酸 L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, 和 P329(根据 Kabat 的 EU 索引编号)。

[0238] 术语“抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)”指在存在效应细胞时,由根据本发明的抗体裂解人靶细胞。ADCC 优选地通过用根据本发明的抗体在存在效应细胞时处理表达 CCR5 的细胞的制备物进行测量,所述效应细胞如新鲜分离的 PBMC 或来自暗黄覆盖层的纯化的效应细胞,如单核细胞或天然杀伤(NK)细胞或永久生长的 NK 细胞系。

[0239] 术语“补体依赖的细胞毒性(CDC)”指由补体因子 C1q 与大多数 IgG 抗体亚类的 Fc 部分结合而起始的过程。C1q 与抗体的结合由在所述结合位点的限定的蛋白-蛋白相互作用所导致。这些 Fc 部分结合位点是现有技术已知的(见上)。这些 Fc 部分结合位点例如特征在于氨基酸 L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, 和 P329(根据 Kabat 的 EU 索引编号)。亚类 IgG1, IgG2, 和 IgG3 的抗体通常显示包括 C1q 和 C3 结合的补体激活,而 IgG4 不激活补体系统并且不结合 C1q 和 / 或 C3。

[0240] 根据本发明所述的抗体由重组方式产生。因此,本发明的一个方面是编码根据本发明所述的抗体的核酸,并且另一个方面是包含编码根据本发明所述的抗体的核酸的细胞。用于重组生产的方法是现有技术中广泛已知的并且包含在原核细胞和真核细胞中的蛋白表达,以及随后的抗体分离和通常纯化为药用纯度。对于将前述抗体在宿主细胞中的表达,将编码各个修饰的轻链和重链的核酸通过标准方法插入表达载体中。在适合的原核或真核宿主细胞如 CHO 细胞, NS0 细胞, SP2/0 细胞, HEK293 细胞, COS 细胞, PER.C6 细胞, 酵母, 或大肠杆菌细胞中进行表达,并且将所述抗体从细胞(上清液或裂解后的细胞)中回收。用于重组生产抗体的一般方法是现有技术中公知的,并且例如在 Makrides, S. C., Protein Expr. Purif. 17(1999) 183-202; Geisse, S., 等, Protein Expr. Purif. 8(1996) 271-282; Kaufman, R. J., 分子生物技术 (Mol. Biotechnol.) 16(2000) 151-161; Werner, R. G., Drug Res. 48(1998) 870-880 的综述文章中

描述。

[0241] 双特异性抗体适当地从培养基中通过常规免疫球蛋白纯化方法分离,所述纯化方法如,例如蛋白A-琼脂糖,羟基磷灰石层析法,凝胶电泳,透析或亲和层析法。编码所述单克隆抗体的DNA和RNA容易地使用常规方法进行分离和测序。杂交瘤细胞可以充当所述DNA和RNA的来源。

[0242] 一旦被分离,可以将DNA插入表达载体中,所述表达载体接着被转染到不另外产生免疫球蛋白的宿主细胞如HEK293细胞,CHO细胞,或骨髓瘤细胞中,从而在宿主细胞中获得重组单克隆抗体的合成。

[0243] 双特异性抗体的氨基酸序列变体(或突变体)通过将适合的核苷酸变化引入抗体DNA中,或通过核苷酸合成进行制备。然而,这样的修饰可以仅在例如如上述的非常有限的范围内进行。例如,修饰不改变上述提及的抗体特征如IgG同种型和抗原结合,但是可以提高重组生产的产率、蛋白稳定性或有利于纯化。

[0244] 术语“宿主细胞”用于本申请时是指可以被改造从而产生根据本发明所述的抗体的细胞系统的任何种类。在一个实施方案中,将HEK293细胞和CHO细胞用作宿主细胞。用于本文时,表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可交替使用,且全部这些名称都包括后代。因此,词语“转化体”和“转化的细胞”包括原代受试者细胞和由其来源的培养物,而不考虑转移数。还理解所有的后代的DNA含量可能不精确一致,这归因于有意或无意的突变。包括在最初转化的细胞中筛选的具有相同功能或生物学活性的变异后代。

[0245] 在NS0细胞中的表达记述在,例如,Barnes,L.M.,等.,细胞技术学(Cytotechnology)32(2000)109-123; Barnes,L.M.,等.,生物技术和生物工程(Bioeng.)73(2001)261-270中。瞬时表达记述在,例如,Durocher,Y.,等.,核酸研究(Nucl.Acids.Res.)30(2002)E9中。可变结构域的克隆记述在Orlandi,R.,等.,美国国家科学院学报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)86(1989)3833-3837; Carter,P.,等.,美国国家科学院学报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)89(1992)4285-4289;和Norderhaug,L.,等.,免疫学方法杂志(J.Immunol.Method)204(1997)77-87中。优选的瞬时表达系统(HEK293)记述在Schlaeger,E.-J.,和Christensen,K.,在细胞技术学(Cytotechnology)30(1999)71-83中和Schlaeger,E.-J.,在免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods)194(1996)191-199中。

[0246] 适合用于原核生物的控制序列,例如包括启动子,任选地操纵子序列,和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、增强子和多腺苷酸化信号。

[0247] 当核酸在被置于与另一个核酸序列的功能关系中,是“可操作地连接的”。例如,前序列或分泌前导序列的DNA与多肽的DNA可操作地连接,条件是其表达为参与多肽分泌的前蛋白;启动子或增强子与编码序列可操作地连接,条件是其影响序列的转录;或核糖体结合位点与编码序列可操作地连接,条件是其被定位为促进翻译。一般地,“可操作地连接的”意指被连接的DNA序列是连续的,且在分泌前导序列的情形中,是连续的且在可读框中。然而,增强子不必是连续的。连接通过在方便的限制性位点处的连接来实现。如果所述位点不存在,则合成的寡核苷酸适体或接头根据常规实践使用。

[0248] 通过标准技术,包括碱/SDS处理,CsCl分级(CsCl banding),柱层析法,琼脂糖凝胶电泳,和其它本领域公知的技术,进行抗体的纯化从而消除细胞成分或其它污染物,例如其它细胞核酸或蛋白。见Ausubel,F.,等,编辑,现代分子生物学中

的方法 (Current Protocols in Molecular Biology), Greene Publishing 和 Wiley Interscience, New York (1987)。不同的方法是充分建立的并且广泛用于蛋白纯化, 如用微生物蛋白进行的亲和层析法 (例如, 蛋白 A 或蛋白 G 亲和层析法), 离子交换层析法 (例如阳离子交换 (羧甲基树脂), 阴离子交换 (氨基乙基树脂) 和混合模式的交换), 亲硫吸附 (例如, 用  $\beta$ -巯基乙醇和其它 SH 配体), 疏水相互作用或芳香吸附层析法 (例如用苯基 - 琼脂糖、氮杂 -arenophilic 树脂, 或间氨基苯基硼酸), 金属螯合亲和层析法 (例如用 Ni(II)- 和 Cu(II)- 亲和力材料), 大小排阻层析和电泳方法 (如凝胶电泳, 毛细管电泳) (Vijayalakshmi, M., A., 应用生物化学生物技术 (Appl. Biochem. Biotech). 75 (1998) 93-102)。

[0249] 本发明的一个方面是包含根据本发明所述的抗体的药物组合物。本发明的另一个方面是将根据本发明所述的抗体用于制备药物组合物的应用。本发明的另一个方面是用于制备包含根据本发明所述的抗体的药物组合物的方法。在另一个方面中, 本发明提供包含与药用载体一起配制的根据本发明所述的抗体的组合物, 例如药物组合物。

[0250] 本发明的一个实施方案是用于治疗癌症的根据本发明所述的双特异性抗体。

[0251] 本发明的另一个方面是用于治疗癌症的所述药物组合物。

[0252] 本发明的另一个方面是根据本发明所述的抗体用于制备治疗癌症的药物的应用。

[0253] 本发明的另一个方面是通过向需要所述治疗的患者施用根据本发明所述的抗体治疗遭受癌症的患者的方法。

[0254] 用于本文时, “药物载体”包括生理相容的任何和所有的溶剂、分散介质、涂层、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗试剂和吸附延缓试剂等。优选地, 所述载体适合用于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊或表皮施用 (例如通过注射或输注)。

[0255] 本发明的组合物可以通过多种本领域已知的方法施用。如技术人员清楚地, 施用的路径和 / 或方式将根据需要的结果变化。为了通过某些施用路径施用本发明的化合物, 可能需要用防止其失活的材料包被所述化合物, 或使所述化合物与防止其失活的材料共同施用。例如, 所述化合物可以在适合的载体中施用于受试者, 所述载体例如是脂质体或稀释剂。药用稀释剂包括盐水和水性缓冲溶液。药物载体包括无菌水溶液或分散体和用于即时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。这些介质和药剂用于药物活性物质是本领域已知的。

[0256] 术语“肠胃外施用”和“肠胃外地施用”用于本文时意为除了肠和局部施用之外的施用方式, 通常通过注射施用, 并且包括, 但不限于, 静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、角质下 (subcuticular)、关节内、囊下、蛛网膜下、脊内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0257] 术语癌症用于本文时指增生性疾病, 如淋巴瘤 (lymphomas), 淋巴细胞性白血病 (lymphocytic leukemias), 肺癌 (lung cancer), 非小细胞肺 (NSCL) 癌 (non small cell lung (NSCL) cancer), 支气管肺泡细胞肺癌 (bronchioloalveolar cell lung cancer), 骨癌 (bone cancer), 胰腺癌 (pancreatic cancer), 皮肤癌 (skin cancer), 头或颈癌 (cancer of the head or neck), 皮肤或眼内黑素瘤 (cutaneous or intraocular melanoma), 子宫癌 (uterine cancer), 卵巢癌 (ovarian cancer), 直肠癌 (rectal cancer), 肛区癌 (cancer of the anal region), 胃癌 (stomach cancer), 胃癌 (gastric cancer), 结肠癌 (colon

cancer), 乳腺癌 (breast cancer), 子宫癌 (uterine cancer), 输卵管癌 (carcinoma of the fallopian tubes), 子宫内膜癌 (carcinoma of the endometrium), 子宫颈癌 (carcinoma of the cervix), 阴道癌 (carcinoma of the vagina), 外阴癌 (carcinoma of the vulva), 霍奇金病 (Hodgkin's Disease), 食管癌 (cancer of the esophagus), 小肠癌 (cancer of the small intestine), 内分泌系统癌 (cancer of the endocrine system), 甲状腺癌 (cancer of the thyroid gland), 甲状旁腺癌 (cancer of the parathyroid gland), 肾上腺癌 (cancer of the adrenal gland), 软组织肉瘤 (sarcoma of soft tissue), 尿道癌 (cancer of the urethra), 阴茎癌 (cancer of the penis), 前列腺癌 (prostate cancer), 膀胱癌 (cancer of the bladder), 肾癌或输尿管癌 (cancer of the kidney or ureter), 肾细胞癌 (renal cell carcinoma), 肾盂癌 (carcinoma of the renal pelvis), 间皮瘤 (mesothelioma), 肝细胞癌 (hepatocellular cancer), 胆管癌 (biliary cancer), 中枢神经系统 (CNS) 肿瘤 (neoplasms of the central nervous system(CNS)), 脊椎轴肿瘤 (spinal axis tumors), 脑干胶质瘤 (brain stem glioma), 多形性成胶质细胞瘤 (glioblastoma multiforme), 星形细胞瘤 (astrocytomas), 神经鞘瘤 (schwanomas), 室管膜瘤 (ependymomas), 成髓细胞瘤 (medulloblastomas), 脑膜瘤 (meningiomas), 鳞状细胞癌 (squamous cell carcinomas), 垂体腺瘤 (pituitary adenoma), 和埃文斯肉瘤 (Ewing's sarcoma), 包括上述癌症任一的难治性形式, 或一种或多种上述癌症的组合。

[0258] 本发明的另一方面是作为抗 - 血管生成剂的根据本发明所述的双特异性抗体或所述药物组合物。这种抗 - 血管生成剂可用于治疗癌症 (特别是实体瘤) 和其它血管疾病。

[0259] 本发明的一个实施方案是用于治疗血管疾病的根据本发明所述的双特异性抗体。

[0260] 本发明的另一方面是用于治疗血管疾病的所述药物组合物。

[0261] 本发明的另一方面是根据本发明所述的抗体在制备治疗血管疾病的药物中的应用。

[0262] 本发明的另一方面是通过向需要这种治疗的患者使用根据本发明所述的抗体治疗患有血管疾病的患者的方法。

[0263] 术语“血管疾病 (vascular diseases)”包括癌症 (Cancer), 炎症疾病 (Inflammatory diseases), 动脉粥样硬化 (Atherosclerosis), 缺血 (Ischemia), 创伤 (Trauma), 脓毒症 (Sepsis), COPD, 哮喘 (Asthma), 糖尿病 (Diabetes), AMD, 视网膜病 (Retinopathy), 中风 (Stroke), 肥胖 (Adipositas), 急性肺损伤 (Acute lung injury), 出血 (Hemorrhage), 血管渗漏 (Vascular leak) 例如细胞因子诱导的血管渗漏, 变态反应 (Allergy), 格雷夫斯病 ((Graves' Disease), 桥本自身免疫性甲状腺炎 (Hashimoto's Autoimmune Thyroiditis), 特发性血小板减少性紫癜 (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura), 巨细胞动脉炎 (Giant Cell Arteritis), 类风湿性关节炎 (Rheumatoid Arthritis), 系统性红斑狼疮 (Systemic Lupus Erythematosus(SLE)), 狼疮性肾炎 (Lupus Nephritis), 局限性回肠炎 (Crohn's Disease), 多发性硬化 (Multiple Sclerosis), 溃疡性结肠炎 (Ulcerative Colitis), 特别是实体瘤, 眼内新血管综合征 (intraocular neovascular syndrome) 诸如增殖性视网膜病 (proliferative retinopathies) 或年龄相关的黄斑变性 (age-related macular degeneration(AMD)), 类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis) 和银屑病 (psoriasis)。(Folkman, J., 等, J. Biol. Chem.

(生物的化学杂志)267(1992)10931-10934;Klagsbrun, M., 等, Annu. Rev. Physiol. (物理学年度综述)53(1991)217-239; 和 Garner, A., Vascular diseases(血管疾病), 在: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach(眼科疾病, 即动力学途径的病理学), Garner, A., 和 Klintworth, G. K., (eds.) 第二版 Marcel Dekker, 纽约, (1994), 第1625-1710页)。

[0264] 这些组合物还可以包含辅药如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。防止微生物的存在可以通过灭菌方法, 见上文和通过包含各种抗细菌和抗真菌药剂, 例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸等来确保。可能需要在组合物中包含等渗剂, 如糖、氯化钠等。此外, 可以通过包含延缓吸附的试剂如单硬脂酸铝和明胶来导致可注射药物形式的延长的吸收。

[0265] 不管所选择的施用路径为何, 可以以适合的水合形式使用的本发明的化合物, 和 / 或本发明的药物组合物通过本领域技术人员已知的常规方式配制到药用剂型中。

[0266] 在本发明的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可以变化从而获得这样的活性成分的量, 其对于特定的患者、组合物和施用方式有效获得需要的治疗反应, 而不会对于患者具有毒性。选定的剂量水平将取决于多种药物代谢动力学因素包括所用的本发明的特定组合物的活性、施用路径、施用时间、使用的特定化合物的排泄速率、治疗的延续时间、与所用的特定组合物组合使用的其它药物、化合物和 / 或材料、待治疗的患者的年龄、性别、体重、病症、一般健康和以前的医疗病史, 以及医疗领域已知的类似因素。

[0267] 所述组合物必需是无菌和可流动的, 到所述组合物可通过注射器递送的程度。除了水之外, 所述载体优选地是等渗缓冲的盐水溶液。

[0268] 适当的流动性可以例如通过使用涂层如磷脂酰胆碱, 在分散体的情形中通过维持需要的颗粒大小和通过使用表面活性剂来维持。在许多情形中, 优选在所述组合物中包括等渗剂, 例如, 糖、多元醇如甘露醇或山梨醇, 和氯化钠。

[0269] 用于本文中时, 表达“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可交替使用, 且全部这些名称都包括子代。因此, 词语“转化体”和“转化的细胞”包括原代受试细胞和由其来源的培养物, 而不考虑转移的次数。还理解所有的子代的DNA含量可能不精确一致, 这归因于有意或无意的突变。包括在最初转化的细胞中筛选的具有相同功能或生物学活性的变异子代。在意指不同名称时, 通过上下文其将是清楚的。

[0270] 术语“转化”用于本文中时, 指将载体 / 核酸转移到宿主细胞中的过程。如果将无难以克服的细胞壁屏障的细胞用作宿主细胞, 则转染例如通过如 Graham, F. L., van der Eb. A. J., Virology(病毒学)52(1978)546ff所述的磷酸钙沉淀法来进行。然而, 还可以使用其他将DNA引入细胞的方法, 诸如通过核注射或通过原生质体融合。如果使用原核细胞或包含实质细胞壁结构的细胞, 例如一种转染方法是利用氯化钙的钙处理, 如 Cohen, S. N, 等, PNAS(美国科学院院报). 69(1972)2110-2114所述。

[0271] 用于本文中时, “表达”指将核酸转录为mRNA的过程和 / 或将转录的mRNA(也称为转录物)随后翻译为肽、多肽或蛋白质的过程。转录物和被编码的多肽共同称为基因产物。如果多核苷酸源自基因组DNA, 则在真核细胞中的表达可以包括mRNA的剪接。

[0272] “载体”是核酸分子, 特别是自体复制的, 其将插入的核酸分子转移到宿主细胞之中和 / 或之间。该术语包括主要功能为将DNA或RNA插入细胞(例如, 染色体整合)的载

体,主要功能是复制 DNA 或 RNA 的复制载体,和功能是转录和 / 或翻译 DNA 或 RNA 的表达载体。还包括提供多于一种上述功能的载体。

[0273] “表达载体”是多核苷酸,其在引入到合适的宿主细胞中时能够被转录和翻译为多肽。“表达系统”通常指包括表达载体的适当宿主细胞,所述表达载体可以起作用产生所需的表达产物。

[0274] 氨基酸序列的描述

[0275]

SEQ ID NO:	1	重链 CDR3, <VEGF>贝伐单抗
SEQ ID NO:	2	重链 CDR2, <VEGF>贝伐单抗
SEQ ID NO:	3	重链 CDR1, <VEGF>贝伐单抗
SEQ ID NO:	4	轻链 CDR3, <VEGF>贝伐单抗
SEQ ID NO:	5	轻链 CDR2, <VEGF>贝伐单抗
SEQ ID NO:	6	轻链 CDR1, <VEGF>贝伐单抗
SEQ ID NO:	7	重链可变结构域, <VEGF>贝伐单抗
SEQ ID NO:	8	轻链可变结构域, <VEGF>贝伐单抗
SEQ ID NO:	9	重链 CDR3, <VEGF>雷珠单抗
SEQ ID NO:	10	重链 CDR2, <VEGF>雷珠单抗
SEQ ID NO:	11	重链 CDR1, <VEGF>雷珠单抗
SEQ ID NO:	12	轻链 CDR3, <VEGF>雷珠单抗
SEQ ID NO:	13	轻链 CDR2, <VEGF>雷珠单抗

[0276]

SEQ ID NO:	14	轻链 CDR1, <VEGF>雷珠单抗
SEQ ID NO:	15	重链可变结构域, <VEGF>雷珠单抗
SEQ ID NO:	16	轻链可变结构域, <VEGF>雷珠单抗
SEQ ID NO:	17	重链 CDR3, <VEGF>HuMab G6-31
SEQ ID NO:	18	重链 CDR2, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	19	重链 CDR1, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	20	轻链 CDR3, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	21	轻链 CDR2, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	22	轻链 CDR1, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	23	重链可变结构域, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	24	轻链可变结构域, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	25	重链 CDR3, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	26	重链 CDR2, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	27	重链 CDR1, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	28	轻链 CDR3, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	29	轻链 CDR2, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	30	轻链 CDR1, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	31	重链可变结构域, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	32	轻链可变结构域, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	33	(G4S)4 接头
SEQ ID NO:	34	λ 轻链恒定区

[0277]

SEQ ID NO:	35	来自于 IgG1 的人重链恒定区
SEQ ID NO:	36	来自于 IgG4 的人重链恒定区
SEQ ID NO:	37	$\kappa$ 轻链恒定区
SEQ ID NO:	38	重链 CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	39	重链 CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	40	重链 CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	41	轻链 CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	42	轻链 CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	43	轻链 CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	44	重链可变结构域, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	45	轻链可变结构域, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	46	重链 CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	47	重链 CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	48	重链 CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	49	轻链 CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	50	轻链 CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	51	轻链 CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	52	重链可变结构域, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	53	轻链可变结构域, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	54	重链 CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	55	重链 CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC07

[0278]

SEQ ID NO:	56	重链 CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	57	轻链 CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	58	轻链 CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	59	轻链 CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	60	重链可变结构域, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	61	轻链可变结构域, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	62	重链 CDR3, <ANG-2>Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	63	重链 CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	64	重链 CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	65	轻链 CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	66	轻链 CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	67	轻链 CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	68	重链可变结构域, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	69	轻链可变结构域, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	70	重链 CDR3, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	71	重链 CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	72	重链 CDR1, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	73	轻链 CDR3, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	74	轻链 CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	75	轻链 CDR1, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	76	重链可变结构域, <ANG-2> Ang2s_LC09

[0279]

SEQ ID NO:	77	轻链可变结构域, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	78	重链 CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	79	重链 CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	80	重链 CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	81	轻链 CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	82	轻链 CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	83	轻链 CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	84	重链可变结构域, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	85	轻链可变结构域, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	86	重链 CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	87	重链 CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	88	重链 CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	89	轻链 CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	90	轻链 CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	91	轻链 CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	92	重链可变结构域, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	93	轻链可变结构域, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	94	重链 CDR3, <VEGF>B20-4.1
SEQ ID NO:	95	重链 CDR2, <VEGF>B20-4.1
SEQ ID NO:	96	重链 CDR1, <VEGF>B20-4.1
SEQ ID NO:	97	轻链 CDR3, <VEGF>B20-4.1

[0280]	SEQ ID NO:	98	轻链 CDR2, <VEGF>B20-4.1
	SEQ ID NO:	99	轻链 CDR1, <VEGF>B20-4.1
	SEQ ID NO:	100	重链可变结构域, <VEGF>B20-4.1
	SEQ ID NO:	101	轻链可变结构域, <VEGF>B20-4.1
	SEQ ID NO:	102	<VEGF-ANG-2>TvAb-2441-贝伐单抗-LC06 的贝伐单抗重链 Ang2i_LC06 scFv 融合肽
	SEQ ID NO:	103	<VEGF-ANG-2>TvAb-2441-贝伐单抗-LC08 的贝伐单抗重链 Ang2i_LC08 scFv 融合肽
	SEQ ID NO:	104	贝伐单抗的轻链
	SEQ ID NO:	105	人血管内皮生长因子(VEGF)
	SEQ ID NO:	106	人血管生成素-2 (ANG-2)
	SEQ ID NO:	107	人血管生成素-1 (ANG-1)
	SEQ ID NO:	108	人 Tie-2 受体
	SEQ ID NO:	109	双特异性、四价单链 Fab <VEGF-ANG-2>抗体分子 scFab-阿瓦斯丁-LC06-2620 的重链 1
	SEQ ID NO:	110	双特异性、四价单链 Fab <VEGF-ANG-2>抗体分子 scFab-阿瓦斯丁-LC06-2620 的轻链
	SEQ ID NO:	111	双特异性、四价单链 Fab <VEGF-ANG-2>抗体分子 scFab-阿瓦斯丁-Ang2i-LC06-2640 的重链 1
	SEQ ID NO:	112	双特异性、四价单链 Fab <VEGF-ANG-2>抗体分子 scFab-阿瓦斯丁-Ang2i-LC06-2640 的轻链
	SEQ ID NO:	113	双特异性、四价单链 Fab <VEGF-ANG-2>抗体分子 scFab-阿瓦斯丁-Ang2i-LC06-2641 的重链 1
	SEQ ID NO:	114	双特异性、四价单链 Fab <VEGF-ANG-2>抗体分子 scFab-阿瓦斯丁-Ang2i-LC06-2641 的轻链

[0281]

SEQ ID NO:	115	双特异性、三价单链 Fab <VEGF-ANG-2>抗体分子 阿瓦斯丁-LC06-KiH-C-scFab 的重链 1
SEQ ID NO:	116	双特异性、三价单链 Fab <VEGF-ANG-2>抗体分子 阿瓦斯丁-LC06-KiH-C-scFab 的重链 2
SEQ ID NO:	117	双特异性、三价单链 Fab <VEGF-ANG-2>抗体分子 阿瓦斯丁-LC06-KiH-C-scFab 的轻链
SEQ ID NO:	118	双特异性、三价<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁 -LC06-C-Fab-6CSS 的重链 1
SEQ ID NO:	119	双特异性、三价<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁 -LC06-C-Fab-6CSS 的重链 2
SEQ ID NO:	120	双特异性、三价<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁 -LC06-C-Fab-6CSS 的轻链
SEQ ID NO:	121	双特异性、二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体 分子阿瓦斯丁-LC06-CH1-CL 的重链 1
SEQ ID NO:	122	双特异性、二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体 分子阿瓦斯丁-LC06-CH1-CL 的重链 2
SEQ ID NO:	123	双特异性、二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体 分子阿瓦斯丁-LC06-CH1-CL 的轻链 1
SEQ ID NO:	124	双特异性、二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体 分子阿瓦斯丁-LC06-CH1-CL 的轻链 2
SEQ ID NO:	125	双特异性、二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体 分子阿瓦斯丁-LC06-VH-VL 的重链 1
SEQ ID NO:	126	双特异性、二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体 分子阿瓦斯丁-LC06-VH-VL 的重链 2
SEQ ID NO:	127	双特异性、二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体 分子阿瓦斯丁-LC06- VH-VL 的轻链 1
SEQ ID NO:	128	双特异性、二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体 分子阿瓦斯丁-LC06- VH-VL 的轻链 2

[0282]

SEQ ID NO:	129	双特异性、二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-VH-VL-SS 的重链 1
SEQ ID NO:	130	双特异性、二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-VH-VL-SS 的重链 2
SEQ ID NO:	131	双特异性、二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06- VH-VL-SS 的轻链 1
SEQ ID NO:	132	双特异性、二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06- VH-VL-SS 的轻链 2
SEQ ID NO:	133	双特异性、二价 ScFab-Fc 融合<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-N-scFab 的重链 1
SEQ ID NO:	134	双特异性、二价 ScFab-Fc 融合<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-N-scFab 的重链 2
SEQ ID NO:	135	双特异性、二价 ScFab-Fc 融合<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-N-scFabSS 的重链 1
SEQ ID NO:	136	双特异性、二价 ScFab-Fc 融合<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-N-scFabSS 的重链 2

[0283] 提供下面的实施例、序列表和附图帮助理解本发明，本发明的真实范围在所附的权利要求书中给出。要理解的是可以在不背离本发明精神的情况下在提出的方法中进行修改。

#### [0284] 附图描述

[0285] 图 1A 结合 VEGF 和 ANG-2 的根据本发明所述的双特异性抗体的一个四价实施方案的示意性结构，其中抗原 A 或 B 之一是 VEGF，而另一个是 ANG-2。所述结构基于结合抗原 A 的全长抗体，结合抗原 B 的两个（任选地二硫化物稳定的）单链 Fv's 通过肽 - 接头连接于所述全长抗体。

[0286] 图 1B 使用 TvAb 命名法所产生的双特异性四价抗体的图示（见实施例）——具有或不具有二硫化物稳定的 scFv。

[0287] 图 2A 二硫化物稳定的<VEGF-ANG-2> 双特异性四价抗体（= <VEGF-ANG-2>TvAb6；No. 2331，见表 3）图示。

[0288] 图 2B 用于表达二硫化物稳定的<VEGF-ANG-2>TvAb6 的修饰的重链和轻链载体的质粒图。

[0289] 图 3 纯化的二硫化物稳定的<VEGF-ANG-2>TvAb6 与“标准”人 IgG1 抗体 G6-31(<VEGF>HuMab G6-31) 相比在还原和非还原条件下的 SDS-PAGE。

[0290] 图 4 纯化的二硫化物稳定的<VEGF-ANG-2>TvAb6 与“标准”人 IgG1 抗体 G6-31 的大小排阻层析相比显示在纯化时二硫化物稳定的 TvAb6 不再形成凝聚物。

[0291] 图 5 VEGF 结合 ELISA 的结果和示意图。二硫化物稳定的  $\langle \text{VEGF-ANG-2} \rangle \text{TvAb6}$  结合 VEGF 与  $\langle \text{VEGF} \rangle \text{G6-31}$  相当。 $\langle \text{ANG-2} \rangle \text{Mab536}$  不结合 VEGF。

[0292] 图 6A ANG-2 结合 ELISA 的结果和示意图。二硫化物稳定的  $\langle \text{VEGF-ANG-2} \rangle \text{TvAb6}$  结合 ANG-2 与  $\langle \text{ANG-2} \rangle \text{Mab536}$  相当。 $\langle \text{VEGF} \rangle \text{G6-31}$  不结合 ANG-2。

[0293] 图 6B 通过表面等离子共振 ((surface plasmon resonance, Biacore) 的 ANG-2 结合分析的示意图和结果。二硫化物稳定的  $\langle \text{VEGF-ANG-2} \rangle \text{TvAb6}$  以与  $\langle \text{ANG-2} \rangle \text{Mab536}$  相当的亲和力结合 ANG-2。

[0294] 图 7 VEGF-ANG-2 桥连 ELISA 的示意图和结果。二硫化物稳定的  $\langle \text{VEGF-ANG-2} \rangle \text{TvAb6}$  同时结合 VEGF 和 ANG-2, 而  $\langle \text{VEGF} \rangle \text{G6-31}$  和  $\langle \text{ANG-2} \rangle \text{Mab536}$  不能同时结合 VEGF 和 ANG-2。

[0295] 图 8a 在 Scid beige 小鼠分期皮下 Colo205 异种移植模型中, 与  $\langle \text{ANG-2} \rangle \text{Mab536}$ ,  $\langle \text{VEGF} \rangle \text{G6-31}$  以及 Mab536 和 G6-31 的组合相比, 二硫化物稳定的  $\langle \text{VEGF-ANG-2} \rangle \text{TvAb6}$  的效应 (研究 ANG2\_Pz\_Colo205\_003)。

[0296] 图 8b 在 Scid beige 小鼠分期皮下 Colo205 异种移植模型中, 与  $\langle \text{ANG-2} \rangle \text{Mab536}$ ,  $\langle \text{VEGF} \rangle \text{G6-31}$  以及 Mab536 和 G6-31 的组合相比, 二硫化物稳定的  $\langle \text{VEGF-ANG-2} \rangle \text{TvAb6}$  的效应 (研究 ANG2\_Pz\_Colo205\_005)。

[0297] 图 9 通过双特异性四价抗体  $\langle \text{VEGF-ANG-2} \rangle \text{TvAb6}$  阻断 VEGF- 诱导的管形成——结果。

[0298] 图 10A+B 通过 b 二硫化物稳定的  $\langle \text{VEGF-ANG-2} \rangle \text{TvAb6}$  阻断 VEGF- 诱导的管形成——定量分析。

[0299] 图 11 通过表面等离子共振 (Biacore) 的 VEGF 结合分析的示意图。

[0300] 图 12 两种  $\langle \text{VEGF} \rangle$  抗体  $\langle \text{VEGF-Ang-2} \rangle \text{TvAb6}$  和  $\langle \text{VEGF} \rangle \text{G6-31}$  在 Ka-Kd 图表中的动力学特征。

[0301] 图 13 表面等离子共振 (Biacore) 测定检测 ANGPT2 和 VEGF 与双特异性抗体同时结合的示意图。

[0302] 图 14 表面等离子共振 (Biacore) 实验的结果显示 TvAb6 同时结合 ANGPT2 和 VEGF。

[0303] 图 15A+B A)  $\langle \text{VEGF-ANG-2} \rangle$  双特异性抗体的双特异性测定和同时 Biacore 结合测定的示意图。B) Biacore 数据证明 ANG-2 和 VEGF 同时结合 TvAb-2441- 贝伐单抗 \_LC06。

[0304] 图 16A+B 与抗 -Ang2 抗体  $\langle \text{ANG-2} \rangle \text{Ang2i_LC06}$  和  $\langle \text{ANG-2} \rangle \text{Ang2k_LC08}$  相比, 双特异性抗体  $\langle \text{VEGF-ANG-2} \rangle \text{TvAb-2441-}$  贝伐单抗 -LC06 和  $\langle \text{VEGF-ANG-2} \rangle \text{TvAb-2441}$  的 Tie2 磷酸化。

[0305] 图 17 人血管生成素相互作用 ELISA 的图示。

[0306] 图 18  $\langle \text{VEGF-ANG-2} \rangle \text{TvAb-2441-}$  贝伐单抗 -LC06 和  $\langle \text{VEGF-ANG-2} \rangle \text{TvAb-2441-}$  贝伐单抗 -LC08 和贝伐单抗的 VEGF- 诱导的 HUVEC 增殖。

[0307] 图 19 在 Calu3 异种移植模型中通过标记的抗 -CD31 抗体和治疗过程中 CD31 信号的相对变化监测的双特异性抗体  $\langle \text{VEGF-ANG-2} \rangle$  贝伐单抗 -LC06 抗体的体内抗 - 血管生成效应 (与  $\langle \text{ANG-2} \rangle \text{ANG2i-LC06}$ 、以及  $\langle \text{ANG-2} \rangle \text{ANG2i-LC06}$  和阿瓦斯丁 (贝伐单抗) 的组合相比较)。

[0308] 实验方法

## 实施例

### [0309] 材料和一般方法

[0310] 在 Kabat, E. A., 等, 免疫目的的蛋白序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第 5 版, 公众健康服务 (Public Health Service), 国家健康研究所 (National Institutes of Health), Bethesda, MD(1991) 中提供关于人免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列的一般信息。根据 EU 编号 (Edelman, G. M., 等, 美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 63(1969) 78–85 ;Kabat, E. A., 等, 免疫目的的蛋白序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第 5 版, 公众健康服务 (Public Health Service), 国家健康研究所 (National Institutes of Health), Bethesda, MD(1991) 对抗体链的氨基酸进行编号和参考。

### [0311] 重组 DNA 技术

[0312] 将标准方法用于操作 DNA, 如在 Sambrook, J., 等, 分子克隆 : 实验室手册 (Molecular cloning:A laboratory manual) ;冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 冷泉港, 纽约, 1989 中所述。根据生产商的说明书使用分子生物学试剂。

### [0313] 基因合成

[0314] 需要的基因片段制备自通过化学合成制备的寡核苷酸。侧邻单限制性内切酶切割位点的基因片段通过包括 PCR 扩增的退火和寡核苷酸连接进行组装, 并且将其随后通过指定的限制性酶切位点, 例如 KpnI/SacI 或 AscI/PacI 克隆到基于 pGA4 克隆载体的 pPCRScript (Stratagene) 中。通过 DNA 测序证实亚克隆的基因片段的 DNA 序列。根据在 Geneart (Regensburg, Germany) 的指定说明对基因合成片段进行排序。合成编码 Ang-2/VEGF 双特异性抗体的轻链和重链的所用基因区段, 这些基因区段具有编码导肽 (MGWSCIILFLVATATGVHS) 的 5' 末端 DNA 序列 (该导肽靶向用于真核细胞中分泌的蛋白) 和 5' -BamHI 和 3' -XbaI 限制性位点。设计了带有二硫化物稳定的“凸起 – 进入 – 孔洞”修饰的重链的 DNA 序列, 其中 S354C 和 T366W 突变在“突起”重链中, 并且 Y349C, T366S, L368A 和 Y407V 突变在“孔洞”重链中。

### [0315] DNA 序列确定

[0316] DNA 序列通过在 MediGenomix GmbH (Martinsried, Germany) 或 Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Germany) 进行的双链测序来确定 DNA 序列。

### [0317] DNA 和蛋白序列分析和序列数据处理

[0318] 使用 GCG's (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) 软件包 10.2 版本和 Infomax's Vector NT1Advance suite 版本 8.0 来用于序列产生、作图、分析、注释和举例说明。

### [0319] 表达载体 (用于实施例 1)

[0320] 为了表达所述抗体, 应用基于具有 CMV- 内含子 A 启动子的 cDNA 构造 (organization) 或基于具有 CMV 启动子 (例如图 2B) 的基因组构造的用于在细胞中瞬时表达 (例如在 HEK293EBNA 或 HEK293-F 中) 或稳定表达 (例如在 CHO 细胞中) 的表达质粒的变体。

[0321] 除抗体表达盒以外, 所述载体包括 :

- [0322] - 复制起点, 其容许该质粒在大肠杆菌中复制, 和
- [0323] -  $\beta$ -内酰胺酶基因, 其在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性。
- [0324] 抗体基因的转录单元由以下元件组成 :
- [0325] - 5' 末端处的独特限制位点
- [0326] - 来自人巨细胞病毒的立即早期增强子和启动子,
- [0327] - 在 cDNA 组构的情形中, 随后是内含子 A 序列,
- [0328] - 人抗体基因的 5' - 非翻译区,
- [0329] - 免疫球蛋白重链信号序列,
- [0330] - 人抗体链 (重链、修饰的重链或轻链) 作为 cDNA 或作为具有免疫球蛋白外显子 - 内含子组构的基因组组构
- [0331] - 具有聚腺苷酸化信号序列的 3' 非翻译区, 和
- [0332] - 3' 末端处的独特限制位点。
- [0333] 如下所述的包括选定抗体重链序列和 C 端 scFv 融合体的融合基因通过 PCR 和 / 或基因合成产生并使用已知的重组方法和技术, 通过在基因组重链载体中例如利用独特 NsiI 和 EcoRI 位点来连接相应的核酸区段来装配。亚克隆的核酸序列通过 DNA 测序来验证。为了瞬时且稳定转染, 通过来自转化的大肠杆菌培养物的质粒制剂来制备更大量的质粒 (Nucleobond AX, Macherey-Nagel)。
- [0334] 表达载体 (用于实施例 10-14)
- [0335] 使用由下述元件构成的表达载体 :
- [0336] - 作为选择性标记的潮霉素抗性基因 ,
- [0337] - EB 病毒 (Epstein-Barr virus, (EBV)) 的复制起点, oriP,
- [0338] - 载体 pUC18 的复制起点, 其允许该质粒在大肠杆菌 (E. coli) 中复制
- [0339] -  $\beta$ -内酰胺酶基因, 其在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性 ,
- [0340] - 来自人巨细胞病毒 (HCMV) 的立即早期增强子和启动子 ,
- [0341] - 人 1- 免疫球蛋白多腺苷酸化 (“poly A”) 信号序列 , 和
- [0342] - 独特的 BamHI 和 XbaI 限制性位点。
- [0343] 如所描述的, 通过基因合成制备免疫球蛋白融合基因, 其包含重链或轻链构建体以及具有 C 端 VH 和 VL 结构域的“凸起 - 进入 - 孔洞”构建体, 将该融合基因克隆进入 pGA18(ampR) 质粒。带有合成的 DNA 区段和 Roche 表达载体的 pG18(ampR) 质粒用 BamHI 和 XbaI 限制性酶 (Roche Molecular Biochemicals) 消化并进行琼脂糖凝胶电泳。然后将纯化的重链和轻链编码 DNA 区段连接到分离的 Roche 表达载体 BamHI/XbaI 片段, 产生最终表达载体。最终表达载体转化到大肠杆菌细胞中, 分离表达质粒 DNA (Miniprep) 并进行限制性酶分析和 DNA 测序。正确的克隆在 150ml LB-Amp 培养基中生长, 再次分离质粒 DNA (Maxiprep) 并通过 DNA 测序确认序列完整性。
- [0344] 细胞培养技术
- [0345] 如在细胞生物学中的当前方法 (Current Protocols in Cell Biology) (2000), Bonifacino, J. S., Dasso, M. , Harford, J. B. , Lippincott-Schwartz, J. 和 Yamada, K. M. (编辑), John Wiley&Sons, Inc 中所述使用标准细胞培养技术。
- [0346] HEK293-F 系统中的瞬时转染 (用于实施例 1)

[0347] 通过利用 HEK293-F 系统 (Invitrogen) 按照制造商的说明瞬时转染两种质粒 (分别编码重链或修饰的重链和相应的轻链) 来生成抗体。简言之,用两种各自的表达质粒和 293fectin 或 fectin (Invitrogen) 的混合物来转染在摇瓶中或在搅拌发酵器中在无血清 FreeStyle293 表达培养基 (Invitrogen) 中悬浮生长的 HEK293-F (Invitrogen)。对于例如 2L 摆瓶 (Corning), 以 1.0E\*6 细胞 /mL 的密度接种 600mL HEK293-F 细胞并以 120rpm, 8% CO<sub>2</sub> 温育。第二天,用 ca. 42mL 的混合物,以 ca. 1.5E\*6 细胞 /mL 的细胞密度来转染细胞,所述混合物为 A) 具有 600 μg 分别编码等摩尔比的重链或修饰的重链, 和相应轻链的总质粒 DNA(1 μg/mL) 的 20mL Opti-MEM (Invitrogen) 和 B) 20mL Opti-MEM+1.2mL293fectin 或 fectin(2 μl/mL) 的混合物。在发酵过程中根据葡萄糖的消耗,添加葡萄糖溶液。在 5-10 天后收获包含分泌的抗体的上清液,并且直接由上清液纯化抗体或冷冻并保存上清液。

[0348] HEK293-F 系统中的瞬时转染 (用于实施例 10-14)

[0349] 根据生产商的说明书, 使用 FreeStyle<sup>TM</sup>293 表达系统 (Invitrogen, USA) 通过人胚肾 293-F 细胞的瞬时转染来表达重组免疫球蛋白变体。简言之, 将混悬液 FreeStyle<sup>TM</sup>293-F 细胞在 FreeStyle<sup>TM</sup>293 表达培养基中, 在 37 °C /8% CO<sub>2</sub> 进行培养, 并在转染当天将细胞以 1-2x10<sup>6</sup> 活细胞 /ml 的密度接种在新鲜的培养基中。使用 325 μl 的 293fectin<sup>TM</sup> (Invitrogen, Germany) 和 250 μg 1:1 摩尔比率的重链和轻链质粒 DNA 在 Opti-MEM<sup>®</sup> I 培养基 (Invitrogen, USA) 中制备 DNA-293fectin<sup>TM</sup> 复合物, 最终转染体积为 250ml。具有两条重链和一条轻链的“凸起 - 进入 - 孔洞”DNA-293fectin 复合物如下制备, 在 Opti-MEM<sup>®</sup> I 培养基 (Invitrogen, USA) 中使用 325 μl 的 293fectin<sup>TM</sup> (Invitrogen, Germany) 和 250 μg 的 1:1:2 摩尔比的“凸起 - 进入 - 孔洞”重链 1 和 2 和轻链质粒 DNA (对于 250ml 最终转染体积) 制备。具有两条重链的“凸起 - 进入 - 孔洞”DNA-293fectin 复合物如下制备, 在 Opti-MEM<sup>®</sup> I 培养基 (Invitrogen, USA) 中使用 325 μl 的 293fectin<sup>TM</sup> (Invitrogen, Germany) 和 250 μg 的 1:1 摩尔比的“凸起 - 进入 - 孔洞”重链 1 和 2 和轻链质粒 DNA (对于 250ml 最终转染体积) 制备。CrossMab DNA-293fectin 复合物在 Opti-MEM<sup>®</sup> I 培养基 (Invitrogen, USA) 中使用 325 μl 的 293fectin<sup>TM</sup> (Invitrogen, Germany) 和 250 μg 的 1:1:1:1 摩尔比的“凸起 - 进入 - 孔洞”重链 1 和 2 和轻链质粒 DNA (对于 250ml 最终转染体积) 制备。在转染后 7 天, 通过在 14000g 离心 30 分钟并通过无菌滤器 (0.22 μm) 过滤收获包含抗体的细胞培养物上清液。将上清液贮存在 -20 °C 直到纯化。

[0350] 蛋白确定

[0351] 使用基于根据 Pace 等, 蛋白科学 (Protein Science), 1995, 4, 2411-1423 的氨基酸序列计算的摩尔消光系数通过确定 280nm 的光密度 (OD), 来确定纯化的抗体和衍生物的蛋白浓度。

[0352] 在上清液中的抗体浓度确定

[0353] 抗体和衍生物在细胞培养物上清液中的浓度通过使用蛋白质 A 琼脂糖 - 珠 (Roche (罗氏)) 的免疫沉淀法来评估。60 μL 蛋白质 A 琼脂糖珠在 TBS-NP40 (50mM Tris, pH7.5, 150mM NaCl, 1% Nonidet-P40) 洗涤三次。随后, 将 1-15mL 细胞培养物上

清液加样于在 TBS-NP40 中预平衡的蛋白质 A 琼脂糖珠。室温下温育 1h 后, 将该珠在 Ultrafree-MC- 过滤柱 (Amicon) 上用 0.5mL TBS-NP40 洗涤 1 次, 用 0.5mL 2x 磷酸盐缓冲液 (2xPBS, Roche (罗氏)) 洗涤 2 次并用 0.5mL 100mM Na- 柠檬酸盐 pH5.0 简单洗涤 4 次。通过添加 35 μl NuPAGE® LDS 样品缓冲液 (Invitrogen) 洗脱结合的抗体。样品的一半分别与 NuPAGE® 样品还原剂混合或保持未还原, 并在 70°C 加热 10min。因此, 将 20 μl 应用于 4-12% NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen) (具有 MOPS 缓冲液, 以用于非还原的 SDS-PAGE, 和具有 NuPAGE® 抗氧化运行缓冲液添加剂的 MES 缓冲液 (Invitrogen), 以用于还原的 SDS-PAGE) 并用考马斯蓝染色。

[0354] 通过蛋白 A-HPLC 层析法测量细胞培养物上清液中的抗体和衍生物的浓度。简言之, 将包含结合蛋白 A 的抗体和衍生物的细胞培养物上清液施加到 HiTrap 蛋白 A 柱 (GE Healthcare) 上, 所述柱在 50mM KH2PO4, 300mM NaCl, pH7.3 中, 并在 Dionex HPLC 系统上, 用 550mM 乙酸, pH2.5 从基质中洗脱。通过 UV 吸光度并整合峰面积来量化洗脱的蛋白。将纯化的标准 IgG1 抗体用作标准。

[0355] 备选地, 抗体和衍生物在细胞培养物上清液中的浓度通过夹心式 -IgG-ELISA 来测量。简言之, StreptaWell 高结合链霉亲和素 (StreptaWell High Bind Streptavidin) A-96 孔 微滴定板 (Roche (罗氏)) 用 100 μL/孔 生物素化的抗人 IgG 捕获分子 F(ab')2<sub>h</sub>-Fc γ BI (Dianova), 以 0.1 μg/mL 在室温下包被 1h 或备选地在 4°C 包被过夜, 并随后用 200 μL/孔 PBS, 0.05% 吐温 (PBST, Sigma (西格玛)) 洗涤 3 次。将 100 μL/孔 包含各种抗体的细胞培养物上清液在 PBS (Sigma (西格玛)) 中的稀释物系列加入到孔中并在微滴定板摇动器上, 以室温温育 1-2h。孔用 200 μL/孔的 PBST 洗涤三次并且用 100 μL 浓度为 0.1 μg/mL 的 F(ab')2<sub>h</sub>-Fc γ POD (Dianova) 作为检测抗体, 在微滴定板摇动器上, 以室温检测结合的抗体 1-2h。未结合的检测抗体用 200 μL/孔的 PBST 以三次洗掉, 并且结合的检测抗体通过添加 100 μL ABTS/孔来检测。在 Tecan Fluor 分光计上, 以 405nm 的测量波长 (参比波长 492nm) 来进行吸光度的测定。

#### [0356] 蛋白质纯化

[0357] 参考标准流程, 从过滤的细胞培养物上清液中纯化蛋白。简言之, 将抗体加样于蛋白质 A 琼脂糖柱 (GE Healthcare (GE 健康护理)) 并用 PBS 洗涤。在酸性 pH 进行抗体洗脱, 并随后立即中和样品。在 20mM 组氨酸, 140mM NaCl pH6.0 中, 通过大小排阻层析法 (Superdex200, GE healthcare (GE 健康护理)) 将聚集的蛋白质与单体抗体分开。将单体抗体级分合并, 如果需要, 利用例如 MILLIPORE Amicon Ultra (30MWCO) 离心浓缩器浓缩, 在 -80°C 保存。提供部分样品进行随后的例如通过 SDS-PAGE、大小排阻层析法、质谱法和内毒素测量 (见图 3 和 4) 进行的蛋白质分析和分析表征。

#### [0358] SDS-PAGE

[0359] NuPAGE® 预制凝胶系统 (Invitrogen) 按照制造商的说明来使用。具体地, 使用 4-20% NuPAGE® Novex® TRIS- 甘氨酸预制 (Pre-Cast) 凝胶和 Novex® TRIS- 甘氨酸 SDS 运行缓冲液。 (见例如图 3)。样品的还原通过在运行凝胶前添加 NuPAGE® 样品还原剂完成。

[0360] 分析大小排阻层析法

[0361] 用于确定抗体聚集和低聚状态的大小排阻层析法是通过 HPLC 层析法来进行。简言之,将蛋白质 A 纯化抗体加样于安捷伦 (Agilent) HPLC1100 系统上的 300mM NaCl, 50mM KH2PO4/K2HP04, pH7. 5 中的 Tosoh TSKgel G3000SW 柱或 Dionex HPLC- 系统上的 2x PBS 中的 Superdex200 柱 (GE healthcare(GE 健康护理))。洗脱的蛋白通过 UV 吸光度和峰面积的积分 (integration) 来量化。BioRad 凝胶过滤标准 151 - 1901 起标准物的作用。(见例如图 4)。

[0362] 质谱法

[0363] 交换型 (crossover) 抗体的总去糖基化质量通过电喷雾离子化质谱法 (ESI-MS) 来确定和验证。简言之,用处于 100mM KH2PO4/K2HP04, pH7 中的 50mU N- 糖苷酶 F (PNGaseF, ProZyme) 在 37°C, 以蛋白质浓度至多为 2mg/ml 来将 100 μg 纯化的抗体去糖基化达 12–24h, 并随后通过 Sephadex G25 柱 (GE healthcare(GE 健康护理)) 上的 HPLC 来脱盐。各种重链和轻链的质量在去糖基化和还原后通过 ESI-MS 来确定。简言之, 处于 115 μl 中的 50 μg 抗体用 60 μl 1M TCEP 和 50 μl 1M 盐酸胍来温育并随后脱盐。总质量和还原的重链和轻链的质量通过在装配了 NanoMate 源的 Q-Star Elite MS 系统上进行 ESI-MS 来确定。

[0364] VEGF 结合 ELISA

[0365] 四价抗体 (TvAb) 的结合性质在使用全长 VEGF165-His 蛋白 (R&D Systems) 的 ELISA 测定中评估 (图 5)。为了该目的, Falcon 聚苯乙烯增透 (clear enhanced) 微量滴定板用 100 μl 12 μg/mL 重组人 VEGF165 (R&D Systems) 在 PBS 中室温包被 2h 或在 4°C 包被过夜。用 300 μl PBST (0.2% Tween20) 洗涤孔三次并用 200 μl 12% BSA 0.1% Tween20 室温封闭 30min 并且随后用 300 μl PBST 洗涤三次。将 100 μL/ 孔稀释物系列 (40pM–0.01pM) 的处于 PBS (Sigma(西格玛)) 中的纯化的 <VEGF-ANG-2>TvAb 和作为参比的人抗-ANG-2 抗体 <ANG-2> 抗体 Mab536 (Oliner 等, Cancer Cell. (癌细胞) 2004 Nov; 6(5):507–16, US2006/0122370) 和抗 VEGF 抗体 <VEGF> 抗体 G6-31 (Liang 等, J Biol Chem. (生物化学杂志) 2006 Jan 13; 281(2):951–61; US2007/0141065) 加入到孔中并在微滴定板摇动器上在室温下温育 1h。该孔用 300 μl PBST (0.2% Tween20) 洗涤三次, 并且结合的抗体用 100 μL/ 孔在 2% BSA 0.1% Tween20 中的 0.1 μg/ml F(ab')<sub>y</sub>>POD (Immuno research) 作为检测抗体在微滴定板摇动器上室温 1h 进行检测。未结合的检测抗体使用 300 μL/ 孔的 PBST, 以三次洗掉, 并且结合的检测抗体通过添加 100 μL ABTS/ 孔来检测。在 Tecan Fluor 分光计上, 以 405nm 的测量波长 (参比波长 492nm) 来进行吸光度的确定。

[0366] VEGF 结合 :通过表面等离子共振 (Biacore) 在 37° 动力学表征 VEGF 的结合

[0367] 为进一步确证 ELISA 发现, 使用表面等离子共振技术在 Biacore T100 仪器上对 <VEGF> 抗体 G6-31 或阿瓦斯丁和 <VEGF-Ang-2>TvAb6 或 TvAb-2441- 贝伐单抗-LC06 或 TvAb-2441- 贝伐单抗-LC08 与 VEGF 的结合根据下述方案定量分析, 并使用 T100 软件包进行分析: 简言之, <VEGF> 抗体通过结合山羊抗 - 人 IgG (JIR109-005-098) 在 CM5- 芯片上捕获。该捕获抗体通过胺偶联固定, 使用下述标准胺偶联:HBS-N 缓冲液作为运行缓冲液, 活化通过 EDC/NHS 混合物来进行, 目标是配体密度为 700RU。捕获 - 抗体在偶联缓冲液 NaAc, pH5. 0, c = 2 μg/mL 中稀释, 最终仍然活化的羧基通过注射 1M 乙醇胺封闭。

Mabs<VEGF>抗体的捕获在5 μL/min的流速和c(Mabs<VEGF>) = 10nM(用运行缓冲液+1mg/mL BSA稀释)进行;应当达到约30RU的捕获水平。rhVEGF(rhVEGF, R&D-SystemsCat.-No., 293-VE)用作分析物。VEGF结合<VEGF>抗体的动力学表征在37°C在作为运行缓冲液的PBS+0.005% (v/v) Tween20中进行。样品用50 μL/min的流速注射并用300-0.29nM浓度系列的rhVEGF结合80秒的时间,并且解离1200秒的时间。在每次分析物循环后用10mM对羟苯甘氨酸(Glycin)pH1.5和60秒的接触时间进行自由捕获抗体表面的再生。使用通常的双参比法(对照参比:rhVEGF结合捕获分子山羊抗人IgG,测量流动细胞的空白,rhVEGF浓度“0”,模型:朗格缪尔结合(Langmuir binding)1:1,(由于捕获分子的结合R<sub>max</sub>设定为局部(local))计算动力学常数。图11显示Biacore测定的示意图。

[0368] ANG-2结合ELISA

[0369] 四价抗体(TvAb)的结合性质在使用全长血管生成素-2-His蛋白(R&D Systems)的ELISA测定中评估(图6a)。为了该目的,Falcon聚苯乙烯增透微量滴定板用100 μL 11 μg/mL重组人血管生成素-2(R&D Systems,无载体)在PBS中室温包被2h或在4°C包被过夜。用300 μL PBST(0.2% Tween20)洗涤孔三次并用200 μL 12% BSA 0.1% Tween20室温封闭30min并且随后用300 μL PBST洗涤三次。将100 μL/孔稀释物系列(40pM-0.01pM)的处于PBS(Sigma(西格玛))中的纯化的<VEGF-ANG-2>TvAb和作为参比的<ANG-2>抗体Mab536和<VEGF>抗体G6-31加入到孔中并在微滴定板摇动器上在室温下温育1h。该孔用300 μL PBST(0.2% Tween20)洗涤三次,并且结合的抗体用100 μL/孔在2% BSA 0.1% Tween20中的0.1 μg/ml F(ab')<hk>POD(Biozol Cat. No. 206005)作为检测抗体在微滴定板摇动器上室温1h进行检测。未结合的检测抗体使用300 μL/孔的PBST,以三次洗掉,

[0370] 并且结合的检测抗体通过添加100 μL ABTS/孔来检测。在Tecan Fluor分光计上,以405nm的测量波长(参比波长492nm)来进行吸光度的确定。

[0371] 与ANG-1和ANG-2结合的比较(ANG-1和ANG-2结合ELISA)

[0372] 抗体的结合性质在使用全长血管生成素-2-His蛋白(R&D Systems#623-AN/CF或内部生产的材料)或血管生成素-1-His(R&D systems#923-AN)的ELISA测定中评估。因此,96孔板(Falcon聚苯乙烯增透微量滴定板或Nunc Maxisorb)用100 μL 11 μg/mL重组人血管生成素-1或血管生成素-2(无载体)在PBS(Sigma)中室温包被2h或在4°C包被过夜。用300 μL PBST(0.2% Tween20)洗涤孔三次并用200 μL 12% BSA 0.1% Tween20室温封闭30min并且随后用300 μL PBST洗涤三次。将100 μL/孔稀释系列(40pM-0.01pM)的处于PBS中的纯化的测试抗体加入到孔中并在微滴定板摇动器上在室温下温育1h。该孔用300 μL PBST(0.2% Tween20)洗涤三次,并且结合的抗体用100 μL/孔在2% BSA 0.1% Tween20中的0.1 μg/ml F(ab')<hk>POD(Biozol Cat. No. 206005)作为检测抗体在微滴定板摇动器上室温1h进行检测。未结合的检测抗体使用300 μL/孔的PBST,以三次洗掉,并且结合的检测抗体通过添加100 μL ABTS/孔来检测。在Tecan Fluor分光计上,以405nm的测量波长(参比波长492nm)来进行吸光度的确定。

[0373] ANG-2结合BIACORE

[0374] 抗体与抗原(例如人ANG-2)的结合通过利用BIACORE T100仪器(GE healthcare Biosciences AB, Uppsala,瑞典)的表面等离子共振来研究。简言之,为了亲和力测量,山

羊 <hIgG-Fcgamma> 多克隆抗体通过胺偶联固定在 CM5 芯片上用于呈递针对人 ANG-2 的抗体 (图 6)。结合在 HBS 缓冲液 (HBS-P(10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.005% Tween20, pH7.4) 中, 25°C 测量。将纯化的 ANG-2-His (R&D 系统或内部纯化的) 以 6.25nM 和 200nM 之间的不同浓度加入到溶液中。缔合通过 ANG-2- 注射 3 分钟来测量 ;解离通过用 HBS 缓冲液洗涤芯片表面 3 分钟来测量且 KD 值利用 1:1 朗缪尔结合模型 (Langmuir binding model) 来评估。由于 ANG-2 制剂的异质性, 不能观察到 1:1 的结合 ;因此 KD 值仅是相对评估。从样品曲线中减去阴性对照数据 (例如缓冲液曲线), 以用于校正系统固有的基线漂移和用于噪音信号的降低。使用 Biacore T100 评估软件版本 1.1.1 来分析传感图 (sensorgrams) 和用于计算亲和力数据。备选地, Ang-2 以捕获水平 2000–1700RU 通过经胺偶联 (无 BSA) 固定在 CM5 芯片上的五组氨酸抗体 (无 BSA 的 5-His-Ab, Qiagen No. 34660) 捕获 (见下文)。

[0375] 抑制 huANG-2 与 Tie-2 的结合 (ELISA)

[0376] 相互作用 ELISA 在 384 孔微量滴定板 (MicroCoat, DE, Cat. No. 464718) 上, 在 RT 下进行。每次温育步骤后, 用 PBST 洗涤板 3 次。用 0.5 μg/ml Tie-2 蛋白 (R&D Systems, 英国, Cat. No. 313-TI) 包被 ELISA 板至少 2 小时 (h)。其后, 用增补了 0.2% 吐温 -20 和 2% BSA (Roche Diagnostics GmbH (罗氏诊断 GmbH), DE) 的 PBS 封闭孔 1 小时。纯化的抗体在 PBS 中的稀释物与 0.2 μg/ml 人血管生成素 -2 (huAngiopoietin-2, R&D Systems (R&D 系统), UK, Cat. No. 623-AN) 一起在 RT 下温育 1 小时。洗涤后, 添加 0.5 μg/ml 生物素化的抗 - 血管生成素 -2 克隆 BAM0981 (R&D Systems (R&D 系统), UK) 和 1:3000 稀释的链霉亲和素 HRP (Roche Diagnostics GmbH (罗氏诊断 GmbH), DE, Cat. No. 11089153001) 的混合物 1 小时。其后, 用 PBST 洗涤板 6 次。在 RT 下, 用新鲜制备的 ABTS 试剂 (Roche Diagnostics GmbH (罗氏诊断 GmbH), DE, 缓冲液 #204530001, 片剂 #11112422001) 对该板进行显色 30 分钟。在 405nm 处测量吸光度。

[0377] ANG-2-VEGF 桥连 ELISA

[0378] 四价抗体 (TvAb) 的结合特性在使用固定的全长 VEGF165-His 蛋白 (R&D Systems (R&D 系统)) 和人 ANG-2-His 蛋白 (R&D Systems (R&D 系统)) 的 ELISA 测定中进行, 以检测结合的双特异性抗体 (图 7)。只有双特异性 <VEGF-ANG-2>TvAb 能够同时结合 VEGF 和 ANG-2 并由此桥连这两种抗原, 而单特异性 “标准” IgG1 抗体应该不能够同时结合 VEGF 和 ANG-2 (图 7)。

[0379] 为了该目的, 将 Falcon 聚苯乙烯透明强化微量滴定板用处于 PBS 中的 100 μL 12 μg/mL 重组人 VEGF165 (R&D Systems (R&D 系统)) 在室温下包被 2 小时或在 4°C 包被过夜。孔用 300 μL PBST (0.2% 吐温 20) 洗涤 3 次, 并用 200 μL 12% BSA, 1% 吐温 20 在室温下封闭 30 分钟, 并随后用 300 μL PBST 洗涤 3 次。将 100 μL/ 孔稀释物系列 ((40pM-0.01pM)) 的处于 PBS (Sigma (西格玛)) 中的纯化的 <VEGF-ANG-2>TvAb 和作为参比的 <ANG-2> 抗体 Mab536 和 VEGF 抗体 G6-31 加入到孔中并在微量滴定板摇动器上在室温下温育 1 小时。该孔用 300 μL PBST (0.2% 吐温 20) 洗涤 3 次, 并且结合的抗体通过添加处于 PBS 中的 100 μL 10.5 μg/ml 人 ANG-2-His (R&D Systems (R&D 系统)) 来检测。该孔用 300 μL PBST (0.2% 吐温 20) 洗涤 3 次, 并且结合的 ANG-2 用 100 μL 10.5 μg/ml <ANG-2>mIgG1- 生物素抗体 (BAM0981, R&D Systems (R&D 系统)) 在室温下检测 1 小时。未结合的检测抗体使用 300 μL PBST (0.2% 吐温 20) 洗涤三次洗掉, 并且结合的抗体通过添加以 1:4 稀释在

封闭缓冲液中的 100  $\mu$  11:2000 链霉亲和素 -POD 缀合物 (Roche Diagnostics GmbH (罗氏诊断 GmbH), Cat. No. 11089153), 在室温下检测 1 小时。未结合的链霉亲和素 -POD 缀合物用 300  $\mu$  l PBST(0, 2% 吐温 20) 洗涤 3-6 次洗掉, 并且结合的链霉亲和素 -POD 缀合物通过添加 100  $\mu$  L ABTS/ 孔来检测。在 Tecan Fluor 分光计上, 以 405nm 的测量波长 (参比波长 492nm) 来进行吸光度的确定。

[0380] 通过 Biacore 证明双特异性四价抗体 <VEGF-Ang-2>TvAb6 与 VEGF-A 和 Ang-2 的同时结合

[0381] 为进一步确证来自于桥连 ELISA 的数据, 使用表面等离子共振技术在 Biacore T100 仪器上根据下述方案建立另外的测定来确认对 VEGF 和 Ang-2 的同时结合, 并使用 T100 软件包 (T100 对照, 版本 2.01, T100 评估, 版本 2.01, T100 动力学总结 (Kinetics Summary), 版本 1.01) 进行分析 :Ang-2 以捕获水平 2000-1700RU 在 PBS, 0.005 % (v/v) Tween20 运行缓冲液中通过五组氨酸抗体 (PentaHisAntibody, 无 BSA 的 5-His-Ab, Qiagen No. 34660) 捕获, 该抗体经胺偶联 (无 BSA) 固定在 CM5 芯片上。在偶联过程中, HBS-N 缓冲液作为运行缓冲液, 活化通过 EDC/NHS 混合物来进行。5-His-Ab 无 BSA 的捕获 - 抗体在偶联缓冲液 NaAc, pH4.5, c = 30  $\mu$  g/mL 中稀释, 最终仍然活化的羧基通过注射 1M 乙醇胺封闭 ; 测试了 5000 和 17000RU 的配体密度。500nM 浓度的 Ang-2 用运行缓冲液 +1mg/mL BSA 稀释以 5  $\mu$  L/min 的流速被 5-His-Ab 捕获。其后, <Ang-2, VEGF> 双特异性抗体与 Ang-2 和 VEGF 的结合通过与 rhVEGF 一起温育并形成夹心复合物 (sandwich complex) 来证明。为此, 双特异性 <VEGF-Ang-2>TvAb6 以 50  $\mu$  L/min 的流速和的 100nM 浓度 (用运行缓冲液 +1mg/mL BSA 稀释) 与 Ang-2 结合, 并且通过与以 50  $\mu$  L/min 的流速和 150nM 的 VEGF 浓度的 VEGF (rhVEGF, R&D-Systems Cat. -No, 293-VE) 在 PBS+0.005 % (v/v) Tween20 运行缓冲液中一起温育来检测同时结合。缔合时间 120 秒, 解离时间 1200 秒。在每次循环后用 50  $\mu$  L/min 的流速以 2x10mM 对羟苯甘氨酸 (Glycin) pH2.0 和 60 秒的接触时间进行再生。传感图利用常规双参照 (对照参比 : 双特异性抗体和 rhVEGF 与捕获分子 5-His-Ab 的结合) 来校正。关于每种 Ab 的空白使用 rhVEGF 浓度“0”来测量。Biacore 测定图显示在图 13 中。备选的 Biacore 测定形式显示于图 15 中。

[0382] HEK293-Tie2 细胞系的产生

[0383] 为确定血管生成素 -2 抗体干扰 ANGPT2 刺激的 Tie2 磷酸化和 ANGPT2 与 Tie2 在细胞上的结合, 产生了重组 HEK293-Tie 细胞系。简言之, 基于 pcDNA3 的质粒 (RB22-pcDNA3Topo hTie2), 其编码在 CMV 启动子控制下的全长人 Tie2 (SEQ ID108) 和新霉素抗性标记, 该质粒使用 Fugene (Roche Applied Science) 作为转染试剂转染到 HEK293 细胞 (ATCC) 中, 并在 DMEM10% FCS, 500  $\mu$  g/ml G418 中选择抗性细胞。单个克隆通过克隆量筒 (cylinder) 分离, 并随后通过 FACS 分析 Tie2 的表达。克隆 22 被鉴定为具有高且稳定 Tie2 表达的克隆 (即使在没有 G418 时) (HEK293-Tie2 克隆 22)。HEK293-Tie2 克隆 22 随后用于细胞测定 :

[0384] ANGPT2 诱导的 Tie2 磷酸化和 ANGPT2 细胞配体结合测定。

[0385] ANGPT2 诱导 Tie2 磷酸化测定

[0386] 根据下述测定原则测量 ANGPT2 抗体对 ANGPT2 诱导的 Tie2 磷酸化的抑制。HEK293-Tie2 克隆 22 在不存在或存在 ANGPT2 抗体时用 ANGPT2 刺激 5 分钟并且 P-Tie2 通

过夹心 ELISA 定量。简言之，每孔  $2 \times 10^5$  HEK293-Tie2 克隆 22 细胞在聚-D-赖氨酸包被的 96 孔微量滴定板上于  $100 \mu l$  DMEM, 10% FCS,  $500 \mu g/ml$  遗传霉素 (Geneticin) 中培养过夜。第二天在微量滴定板中制备一排滴定 ANGPT2 抗体 (4- 倍浓缩,  $75 \mu l$  终体积 / 孔, 两份) 并与  $75 \mu l$  的 ANGPT2 (R&D systems#623-AN] 稀释物 ( $3.2 \mu g/ml$  作为 4- 倍浓缩液) 混合。抗体和 ANGPT2 在室温预温育 15 分钟。添加  $100 \mu l$  混合物到 HEK293-Tie2 克隆 22 细胞 (与  $1mM$  NaV304, Sigma#S6508 预温育 5 分钟) 中并在  $37^\circ C$  温育 5 分钟。随后, 用每孔  $200 \mu l$  冰冷 PBS+ $1mM$  NaV304 洗涤细胞, 并通过在冰上每孔添加  $120 \mu l$  裂解缓冲液 ( $20mM$  Tris, pH8.0,  $137mM$  NaCl, 1% NP-40, 10% 丙三醇,  $2mM$  EDTA,  $1mM$  NaV304,  $1mM$  PMSF 和  $10 \mu g/ml$  抑肽酶) 裂解细胞。细胞在微量滴定板摇动器上  $4^\circ C$  裂解 30 分钟, 并且  $100 \mu l$  裂解物直接转移到 p-Tie2ELISA 微量滴定板 (R&D Systems, R&D#DY990) 中, 不进行在先离心和不进行总蛋白测量。P-Tie2 的量根据制造商说明书定量, 且抑制的 IC<sub>50</sub> 值使用用于 Excel 的 XLfit4 分析插件 (plug-in) (剂量 - 反应单点 (dose-response one site), 模式 205) 测量。IC<sub>50</sub> 值可在实验内比较但可以在实验与实验之间变化。

[0387] VEGF 诱导的 HUVEC 增殖测定

[0388] 选择 VEGF 诱导的 HUVEC (人脐静脉内皮细胞, Promocell#C-12200) 增殖用来测量 VEGF 抗体的细胞功能。简言之, 每 96 孔 5000HUVEC 细胞 (低传代数目,  $\leq 5$  代) 在  $100 \mu l$  饥饿培养基 (EBM-2 内皮基础培养基 2, Promocell#C-22211, 0.5% FCS, 青霉素 / 链霉素) 中于胶原 I- 包被的 BD Biocoat 胶原 I96- 孔微量滴定板 (BD#354407/35640) 中温育过夜。不同浓度的抗体与 rhVEGF ( $30ng/ml$  终浓度, BD#354107) 混合并在室温预温育 15 分钟。随后, 将该混合物添加到 HUVEC 细胞中并将它们在  $37^\circ C$ ,  $5\%$  CO<sub>2</sub> 中温育 72 小时。在分析当天板平衡到室温 30 分钟, 并且使用 CellTiter-GloTM 发光细胞活力测定试剂盒 (Promega, #G7571/2/3) 根据手册测量细胞活力 / 增殖。发光在分光光度计中测量。

[0389] 四价双特异性和四价单特异性抗体的设计

[0390] 根据本发明所述的结合 VEGF(VEGF-A) 和 ANG-2 (血管生成素-2) 的双特异性抗体包含结合于 VEGF 的第一抗原结合位点和结合于 ANG-2 的第二抗原结合位点。可以使用例如 SEQ ID NO:23 的重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:24 的轻链可变结构域作为结合 VEGF 的第一抗原结合位点, 所述重链可变结构域和轻链可变结构域都来自人噬菌体展示来源的抗-VEGF 抗体 G6-31, 其在 Liang, W. C., 等, J Biol Chem. 281(2) (2006) 951-61 和在 US2007/0141065 中详细描述。备选地, 例如特异性结合 VEGF 的第二抗原结合位点包括 SEQ ID NO:7, 或 SEQ ID NO:100 的重链可变结构域和 SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:101 的轻链可变结构域, 它们来自于抗-VEGF 抗体 <VEGF> 贝伐单抗和 <VEGF>B20-4.1, 优选来自于 <VEGF> 贝伐单抗。

[0391] 可以使用 SEQ ID NO:31 的重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:32 或具有突变 T92L, H93Q 和 W94T (Kabat 编号) 的 SEQ ID NO:32 的轻链可变结构域作为第二抗原结合位点, 所述重链可变结构域和轻链可变结构域都来自人抗-ANG-2 抗体 <ANG-2>Mab536, 其在 Oliner, J., 等, Cancer Cell. 6(5) (2004) 507-16 和在 US2006/0122370 中详细描述。备选地, 例如特异性结合 ANG-2 的第二抗原结合位点包括 SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:84 或 SEQ ID NO:92 的重链可变结构域, 和 SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ

ID NO:85, SEQ ID NO:93 的轻链可变结构域,它们来自于抗-ANG-2 抗体 <ANG-2>Ang2s\_R3\_LC03, <ANG-2>Ang2i\_LC06, <ANG-2>Ang2i\_LC07, <ANG-2>Ang2k\_LC08, <ANG-2>Ang2s\_LC09, <ANG-2>Ang2i\_LC10, 或 <ANG-2>Ang2k\_LC11, 优选来自于 <ANG-2>Ang2i\_LC06, 或 <ANG-2>Ang2k\_LC08。

[0392] 为了产生组合两种抗体特征的试剂,构建新的四价双特异性抗体来源的蛋白实体。在这些分子中,一种抗体的重组单链结合分子通过重组蛋白融合技术连接于另一种抗体,其保留全长 IgG1 的形式。该第二抗体具有需要的第二结合特异性。

[0393] 通过基因合成和重组分子生物学技术,将各自抗体的重链可变结构域 (VH) 和轻链可变结构域 (VL) 通过甘氨酸丝氨酸 (G4S)3 或 (G4S)4 单链接头连接从而提供单链 Fv (scFv),其使用 (G)6- 或 (G4S)3- 接头连接于另一抗体重链的 C 端。

[0394] 此外,将半胱氨酸残基引入结合 ANG-2 或 VEGF 的 scFv 的 VH(包括 Kabat 位置 44) 和 VL(包括 Kabat 位置 100) 结构域,如前所述(例如 WO94/029350 ;Reiter, Y., 等,自然生物技术 (Nature biotechnology) (1996) 1239-1245 ;Young, N. M., 等, FEBS Letters (1995) 135-139 ; 或 Rajagopal, V., et al, 蛋白工程 (Protein Engineering) (1997) 1453-59)。

[0395] 将所有这些分子进行重组产生、纯化和表征并评估蛋白表达、稳定性和生物学活性。

[0396] 在表 3 中提供用于产生四价、双特异性 <VEGF-ANG-2>, <ANG-2-VEGF> 抗体和四价单特异性 <ANG-2> 抗体的双特异性抗体设计的总结。对于该研究,我们使用术语 ‘TvAb’ 来描述各种四价蛋白实体。

[0397] 为获得双特异性四价抗体 <VEGF-ANG-2>TvAb5 和 TvAb6, 将结合血管生成素 -2 的单链 Fv (scFv) (衍生自 SEQ ID NO:31 的重链可变结构域 (VH), 和具有突变 T92L, H93Q 和 W94T 突变的 SEQ ID NO:32 的轻链可变结构域 (VL), 其衍生自人抗-ANG-2 抗体 <ANG-2>Mab536) 融合到如下序列上, 该序列对应于 SEQ ID NO:23 的人抗-VEGF 抗体 <VEGF>G6-31 的重链载体的 C 端, 并与基于 SEQ ID NO:24 的各自轻链表达载体一起共表达。将设计形式的表示显示在图 1B 中并在表 3 中列举。

[0398] 为获得双特异性四价抗体 TvAb9 和 TvAb15, 将结合 VEGF 的单链 Fv (scFv) (衍生自 SEQ ID NO:23 的重链可变结构域 (VH), 和 SEQ ID NO:24 的轻链可变结构域 (VL), 其衍生自人抗-VEGF 抗体 <VEGF>G6-31) 融合到如下序列上, 该序列对应于 SEQ ID NO:31 的人抗-ANG-2 抗体 <ANG-2>Mab536 的重链载体的 C 端, 并与基于 SEQ ID NO:32 的各自轻链表达载体一起共表达。将设计形式的表示显示在图 1B 中并在表 3 中列举。

[0399] 表 3 - - 具有 C 端 scFv 连接物的不同的双特异性四价抗体形式和相应的 TvAb- 命名法。表中“-”意指“不存在”。

[0400]

分子名称(关于双特异性抗体的命名法)	衍生自下列表的抗体主链	衍生自下列表的 scFv	可变结构域 VH 和 VL: SEQ ID NO :	与抗体连接的 scFv 头的位置	单链接头	肽接头	scFv 二硫化物 VH44/ VL100 稳定的
G6-31 (1000)	<VEGF> G6-31	-	23 + 24	-	-	-	-
Mab536 (1000)	<ANG-2> Mab536	-	31 + 32	-	-	-	-
贝伐单抗	<VEGF> 贝伐单抗	-	23 + 24	-	-	-	-
Ang2i_LC06 (LC06)	<ANG-2> Ang2i_LC06	-	52 + 53	-	-	-	-

[0401]

分子名称(关于双特异性抗体的命名法)	衍生自下列表的抗体的主链	衍生自下列表的 scFv	可变结构域 VH 和 VL: SEQ ID NO:	与抗体连接的 scFv 头的位置	单链接头	肽接头	scFv 二硫化物 VH44/VL100 稳定的
Ang2k_LC06 (LC08)	<ANG-2> >Ang2k_LC08	-	68 + 69				
TvAb5 (2310)	<VEGF> G6-31	<ANG-2> Mab536	23 + 24, 31 + 32	C-端 HC 具有突变 T92L, H93Q 和 W94T 的	(G4S)3	(G)6	-
TvAb6 (2331)	<VEGF> G6-31	<ANG-2> Mab536	23 + 24, 31 + 32	C-端 HC 具有突变 T92L, H93Q 和 W94T 的	(G4S)3	(G4S)3	scFv 二硫化物 VH44/VL100 稳定的
TvAb9 (2330)	<ANG-2> G6-31	<VEGF> Mab536	31 + 32, 和 23 + 24	C-端 HC	(G4S)3	(G4S)3	-
TvAb15 (2431)	<ANG-2> G6-31	<VEGF> Mab536	31 + 32, 和 23 + 24	C-端 HC	(G4S)4	(G4S)3	scFv 二硫化物 VH44/VL100 稳定的
TvAb-2441-贝伐单抗-LC06	贝伐单抗	LC06	7 + 8 和 52 + 53	C-端 HC	(G4S)4	(G4S)4	scFv 二硫化物 VH44/VL100 稳定的

[0402]

分子名称(关于双特异性抗体的命名法)	衍生自下列表的抗体主链	衍生自下列表的 scFv SEQ ID NO:	可变结构域 VH 和 VL: 的位置	与抗体连接的 scFv	单链接头	肽头	接头	scFv 二硫化物 VH44/VL100 稳定的
<b>TvAb-2441-贝伐单抗-LC08</b>	贝伐单抗	LC08	7 + 8 和 68 + 69	C-端 HC	(G4S)4	(G4S)4	scFv 二硫化物	VH44/VL100 稳定的
<b>TvAb-3421-贝伐单抗-LC06</b>	贝伐单抗	LC06	7 + 8 和 52 + 53	N-端 HC	(G4S)4	(G4S)2	scFv 二硫化物	VH44/VL100 稳定的
<b>TvAb-4421-贝伐单抗-LC06</b>	贝伐单抗	LC06	7 + 8 和 52 + 53	C-端 LC	(G4S)4	(G4S)2	scFv 二硫化物	VH44/VL100 稳定的
<b>TvAb-4461-贝伐单抗-LC06</b>	贝伐单抗	LC06	7 + 8 和 52 + 53	C-端 LC	(G4S)4	(G4S)6	scFv 二硫化物	VH44/VL100 稳定的

[0403] TvAb 形式基于,例如

[0404] a) aa) 人抗 -VEGF 抗体 <VEGF>G6-31 和 ab) 结合血管生成素 -2 的两个单链 Fv (scFv) (衍生自 SEQ ID NO:31 的重链可变结构域 (VH), 和具有突变 T92L, H93Q 和 W94T 的 SEQ ID NO:32 的轻链可变结构域 (VL)), 其连接到抗 -VEGF 抗体 <VEGF>G6-31 的重链 (SEQ ID NO:23) 的 C- 端 ; 或

[0405] b) ba) 人抗 -ANG-2 抗体 <ANG-2>Mab536 和 bb) 结合 VEGF 的两个单链 Fv (scFv) (衍生自 SEQ ID NO:23 的重链可变结构域 (VH), 和 SEQID NO:24 的轻链可变结构域 (VL)), 其连接到抗 -ANG-2 抗体 <ANG-2>Mab536 的重链 (SEQ ID NO:31) 的 C- 端 ; 或

[0406] c) ca) 人抗 -VEGF 抗体 <VEGF> 贝伐单抗 (阿瓦斯丁) 和 cb) 结合血管生成素 -2 的两个单链 Fv (scFv) (衍生自 SEQ ID NO:52 或 SEQ ID NO:68 的重链可变结构域 (VH), 和 SEQ ID NO:53 或 SEQ ID NO:69 的轻链可变结构域 (VL)), 其连接到抗 -VEGF 抗体 <VEGF>

贝伐单抗（阿瓦斯丁）重链的 C- 端（所产生的融合肽序列是 SEQ ID NO:102 或 SEQ ID NO:103，其与贝伐单抗轻链 SEQ ID NO:104 一起共表达。（备选地结合血管生成素 -2 的两个单链 Fv (scFv) 也可连接到轻链的 C- 端或重链的 N- 端）。

[0407] 替代单独两个单链 Fv (scFv)，也可使用单链 Fab 片段，如上所述（使用肽连接体用于融合到 C 末端或 N- 末端），在 EP 申请号 09004909. 9 和在实施例 10 中描述。

[0408] 实施例 1

[0409] 双特异性四价抗体的表达和纯化

[0410] <VEGF-ANG-2>TvAb5, TvAb6, TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC06 和 TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC08

[0411] 将相应的四价双特异性抗体 TvAb5 和 TvAb6 的轻链和重链构建在如上文描述的基因组表达载体中。将这些质粒在大肠杆菌中扩增，纯化，并随后转染从而在 HEK293-F 细胞（使用 Invitrogen's FreeStyle293 系统）中进行重组蛋白的瞬时表达。7 天后，收获、过滤 HEK293-F 细胞上清液，并通过蛋白 A 和大小排阻层析法纯化该双特异性抗体。通过在非还原和还原条件下的 SDS-PAGE 和分析大小排阻层析法证实所有的双特异性抗体构建体的均一性。在还原条件下（图 3），携带 C 端 scFv 融合物的 <VEGF-ANG-2>TvAb6 的多肽重链在 SDS-PAGE 上显示 ca. 75kDa 的表观分子大小（类似于计算的分子量）。质谱确认了所纯化抗体构建体的身份。通过蛋白 A HPLC 分析所有的构建体的表达水平，其类似于‘标准’ IgGs 的表达产率。蛋白产率是每升细胞培养物上清液获得达到 150mg 的 TvAb6<VEGF-ANG-2>（通过蛋白 A HPLC 确定）。

[0412] 纯化的非二硫化物稳定的在重链 C 端融合 scFv 的构建体 TvAb5 的大小排阻层析分析显示，在通过大小排阻层析纯化单体抗体后与‘标准’ IgGs 比较显示增加的再凝聚倾向（所谓的“菊花链 (daisy chain)”现象）。这种发现得到其它实例的支持 (Rajagopal, V., 等, Prot. Engin. (1997) 1453–1459 ;Kobayashi, H., et al, Nucl Med Biol. (1998) 387–393 或 Schmidt, M., et al, Oncogene (1999) 18, 1711 – 1721)，这些实例显示包含未由 VH 和 VL 之间的链间二硫化物稳定的 scFvs 的分子表现出增加的凝聚倾向和降低的产率。为了解决这些双特异性抗体聚集的问题，使用所述 scFv 结构部分的二硫化物稳定。对此，我们在指定位置（位置 VH44/VL100，根据 Kabat 编号方案）引入 scFv 的 VH 和 VL 内的单半胱氨酸置换。这些突变能够形成 VH 和 VL 之间稳定的链间二硫化物，这又稳定得到的二硫化物稳定的 scFv 组件。将 VH44/VL100 二硫化物在 TvAb6<VEGF-ANG-2> 中 Fv 的 C 端引入 scFvs 产生稳定的四价抗体，其在纯化后不再显示凝聚倾向并保持单体状态（图 4）。此外，在例如体外和体内应用的浓度 3mg/kg 经反复冻融循环 TvAb6<VEGF-ANG-2> 没有显示凝聚倾向的增加。

[0413] 制备表 3 中所描述的所有其它 TvAb 分子（例如 TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC06 和 TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC08）并根据所描述程序类似地进行分析表征。

[0414] 实施例 2

[0415] 双特异性四价抗体 <VEGF-ANG-2>TvAb6, TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC06 和 TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC08 对 VEGF-A 和 ANG-2 的同时结合

[0416] 不同双特异性抗体形式的 IgG- 组件中保留的 scFv 组件的结合和 Fvs 的结合与该结合组件和双特异性抗体所来自的“野生型” IgGs 的结合相比较。这些分析通过进行生化

结合 ELISA 和通过使用表面等离子共振 (Biacore) 在等摩尔浓度进行。

[0417] 对于 <VEGF-ANG-2>TvAb6, 通过如上所述的 VEGF 结合 ELISA 显示其在 0.625pM 的等摩尔浓度与其母体抗体 G6-31 相当的结合 VEGF( 图 5)。该发现是可以预期的, 因为 TvAb 的 Fv 区与 G6-31 的相同。<VEGF-ANG-2>TvAb6 和 <VEGF>G6-31 之间微弱的差异是由于蛋白浓度的小的差异和 C 端 scFv 结合 <hFc>-POD 检测抗体的轻度立体干扰, 可通过如用于 ANG-2 结合 ELISA 中一样应用 <hk>POD(Biozol Cat. No. 206005) 检测抗体来克服。

[0418] 使用 Biacore 这些发现被使用经典浓度系列在 37°C 中确认 (图 11)。这些数据显示快的 4.7-4.8E+61/(Ms) 的 K 结合率 k(a), 用最高浓度的 VEGF 达到饱和。解离率达到技术规格的局限 (即 5x E-6(s/s)), 可能是由于在这种条件下仍有由于二聚体分析物 rhVEGF 的二价结合 (亲和效应), 尽管使用了非常低的配体密度产生最终 10-15RU 的 VEGF- 反应。然而, 不同 <VEGF> 抗体的动力学常数可通过这种方法比较, 并且在该方法的误差内, 在四价双特异性抗体 <VEGF-Ang-2>TvAb6 和最初的抗体 <VEGF>G6-31 可检测的动力学常数中没有显著差异。通过这种方法在这些条件下 <VEGF-Ang-2>TvAb6 和 <VEGF>G6-31 的动力学常数实际上是相同的。因此, 可得出结论 TvAb6 完全保留了其 VEGF 结合性质。表 4 显示各自的动力学常数, 图 12 显示两种 <VEGF> 抗体 <VEGF-Ang-2>TvAb6 和 <VEGF>G6-31 在 Ka-Kd 图表中的动力学特征。

[0419] 表 14:<VEGF-Ang-2>TvAb6 和 <VEGF>G6-31 的动力学性质

[0420]

在 37°C 测量	Ka	kd	t1/2	KD
抗体	[1/(Ms)]	[1/s]	[min]	[M]
<VEGF>G6-31	4.83E+06	9.33E-06	1237.8	1.93E-12
<VEGF-Ang-2>TvAb6	4.72E+06	7.24E-06	1596.7	1.53E-12

[0421] 在另一个实验中, 如上所述通过使用 <hk>-POD 检测抗体 (Biozol 商品号 206005) 的 ANG-2 结合 ELISA 显示在 0.039pM 的等摩尔浓度 <VEGF-ANG-2>TvAb6 以与 Mab536 相当的方式结合 ANG-2( 图 6A)。这显示 TvAb6 的 scFv 组件保留了其在 TvAb 构建体中的结合性质。

[0422] 为进一步确认这种发现, <ANG-2>Mab536 和 <VEGF-ANG-2>TvAb6 通过次级抗体固定在 BiacoreCM5 芯片上并测量与人 ANG-2 的结合动力学。由于 ANG-2 制剂的异质性不能观察到 1:1 结合;因此 KD 值仅是相对估算。Biacore 分析显示 <VEGF-ANG-2>TvAb6 对于 ANG-2 具有 4.4nM 的估算的 KD 值。相比之下, Mab536 具有 1.6nM 的估算的 KD 值。在该方法的误差内, 未观察到 <ANG-2>Mab536 和 <VEGF-ANG-2>TvAb6 之间在结合方式和亲和力方面的差异 (图 6B)。因此, 可得出结论 TvAb6 的 scFv 组件完全保留了其在 TvAb 构建体中的结合性质。

[0423] 为证明 <VEGF-ANG-2>TvAb6 能够同时结合 VEGF 和 ANG-2, 使用了如上所述的桥连 ELISA 测定和 Biacore 测定。

[0424] 通过使用如上所述的 VEGF-ANG-2- 桥连 ELISA 显示, 仅 <VEGF-ANG-2>TvAb6 能够以 0.625pM 的等摩尔浓度同时结合 VEGF 和 ANG-2, 而单特异性“标准” IgG1 抗体

<ANG-2>Mab536 和 <VEGF>G6-31 不能同时结合 VEGF 和 ANG-2(图 7)。

[0425] 图 14 显示来自 Biacore 测定的各自的数据。对于四价双特异性抗体 <VEGF-Ang-2>TvAb6 可以显示对两种抗原 Ang-2 和 VEGF 的同时结合。阴性对照如所预期的：单特异性抗体 <Ang-2>Mab536 显示仅结合 Ang-2，但不结合 VEGF。单特异性抗体 <VEGF>G6-31 显示结合 VEGF 但根本不结合 Ang-2(数据未显示)。从四价双特异性抗体 <VEGF-Ang-2>TvAb6 结合 Ang-2 包被表面和随后结合二聚体 VEGF 结合的相对反应单位 (relative response units)，可以计算化学计量学范围在 1:1 至 1:1.4。总之，通过应用所述的 ELISA 和 Biacore 测定显示仅 <VEGF-Ang-2>TvAb6 能够同时结合 VEGF 和 Ang-2，而单特异性“标准”IgG1 抗体 <Ang-2>Mab536 和 <VEGF> G6-31 不能同时结合 VEGF 和 Ang-2(图 15)。

[0426] 使用构建体 TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC06 和 TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC08 在类似的 Biacore 测定中获得了相似的结果，显示于图 15A 中。抗体与抗原（例如人 ANG-2 和 VEGF）的结合通过表面等离子共振使用 BIACORE T100 仪器 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden) 进行研究。简言之，对于亲和力测量，山羊 <hIgG-Fc □> 多克隆抗体通过胺偶联固定在 CM4 芯片上用于展示针对人 ANG-2 和 VEGF 的双特异性抗体。结合在 HBS 缓冲液 (HBS-P(10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.005% Tween20, pH7.4), 25°C 中测量。纯化的 ANG-2-His (R&D systems 或内部纯化的) 以溶液中 6.25nM 和 200nM 之间的多种浓度添加。通过 ANG-2- 注射 3 分钟测量结合；通过用 HBS 缓冲液洗涤芯片表面 3 分钟测量解离，并且使用 1:1 朗格缪尔 (Langmuir) 结合模型估算 KD 值。由于 ANG-2 制剂的异质性不能观察到 1:1 结合；因此 KD 值仅是相对估算。

[0427] VEGF(R&D systems) 以溶液中 6.25nM 和 200nM 之间的多种浓度添加。通过 VEGF- 注射 3 分钟测量结合；通过用 HBS 缓冲液洗涤芯片表面 3 分钟测量解离，并且使用 1:1 朗格缪尔 (Langmuir) 结合模型估算 KD 值。

[0428] 注射结合配偶体的顺序可以改变，先是 VEGF 然后是 Ang2 或反之亦然。

[0429] 从样品曲线中减去阴性对照数据（例如缓冲液曲线），以用于校正系统固有的基线漂移和用于噪音信号的降低。使用 Biacore T100 评估软件版本 1.1.1 来分析传感图 (sensorgrams) 和用于计算亲和力数据。

[0430]

抗体	亲和力 hAng-2	亲和力 hVEGF
TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC06	2. 3nM	0. 35nM
TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC08	0. 7nM	0. 34nM
G6-31	--	<0. 1nM
MAB536	3nM	--
贝伐单抗	--	0. 59nM

[0431] 最后, TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC06 和 TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC08 的同时结合可通过与 ANGPT2 和 VEGF 以连续的方式温育来显示。如图 15B 中所示, ANGPT2 和 VEGF 可同时结合双特异性抗体。

[0432] 实施例 3

[0433] 在 Scid beige 小鼠分期皮下 Colo205 异种移植模型中, 与 <ANG-2>Mab536, <VEGF>G6-31 以及 Mab536 和 G6-31 的组合相比较, 二硫化物稳定的双特异四价抗体 <VEGF-ANG-2>TvAb6 的体内效应

[0434] 在雌性 Scid beige 小鼠两个分期皮下 Colo205 异种移植模型研究 (Ang2\_PZ\_Colo205\_003 和 Ang2\_PZ\_Colo205\_005) 中, 不同剂量的纯化的二硫化物稳定的 <VEGF-ANG-2>TvAb6 (n00.2331 见表 3) 与抗体 <ANG-2>Mab536, <VEGF>G6-31 以及 <ANG-2>Mab536 和 <VEGF>G6-31 的组合相比较。

[0435] 抗体 :<ANG-2>Mab536 作为冷冻的母液 ( $c = 4.5\text{mg/mL}$ ), <VEGF>G6-31 作为冷冻的母液 ( $c = 0.6\text{mg/mL}$ ) 和 <VEGF-ANG-2>TvAb6 作为冷冻的母液 ( $c = 0.5\text{mg/mL}$ ) 在 20mM 组氨酸, 140mM NaCl, pH6.0 中提供。需要时在注射前抗体溶液在 PBS 中从母液适当稀释, PBS 用作赋形剂。

[0436] 细胞系和培养条件 :Colo205 人结肠直肠癌细胞最初从 ATCC 获得, 扩增后保藏在 Roche Penzberg 内部细胞库中。肿瘤细胞系在补充了 10% 胎牛血清 (PAA Laboratories, Austria) 和 2mM L- 谷氨酰胺的 RPMI1640 培养基 (PAA, Laboratories, Austria) 中, 在 37°C 于水饱和大气中在 5%  $\text{CO}_2$  中常规地培养。传代 2-5 用于移植。

[0437] 动物 : 雌性 SCID beige 小鼠 ;4-5 周龄到达 (购自 Charles River Germany) 时根据确定指南 (GV-Solas ;Felasa ;TierschG) 维持在无特异病原体、每日 12h 光 /12h 暗循环条件。实验研究方案经地方政府评审且批准。到达后动物维持在动物实验室的检疫部一周以适应新环境和用于观察。定期进行连续健康监测。无限制提供饮食 (Provimi Kliba3337) 和水 (酸化的 pH2.5-3)。研究开始时鼠龄是大约 10 周。

[0438] 监测 : 每日管控 (control) 动物的临床症状并检测副作用。对于监测整个实验中记录动物的体重并在分期后用测径器测量肿瘤体积。

[0439] 肿瘤细胞注射 : 注射当天, 离心 Colo205 细胞, 洗涤一次并在 PBS 中重悬浮。再次用 PBS 洗涤后细胞浓缩物和细胞大小使用细胞计数器和分析系统 (Vi-CELL, Beckman Coulter) 测量。对于 Colo205 细胞的注射, 最终滴度调整为  $5.0 \times 10^6$  细胞 /ml, 活力 ca. 90%。随后对应于每只动物  $2.5 \times 10^6$  细胞的  $100 \mu\text{l}$  这种悬浮物 s. c. 注射到小鼠的右腹。

[0440] 动物处理在随机化的天数、细胞移植后 16 天 (研究 Ang2\_PZ\_Colo205\_003) 和细胞移植后 14 天 (研究 Ang2\_PZ\_Colo205\_005) 在平均肿瘤体积分别是  $100\text{mm}^3$  或  $150\text{mm}^3$  时开始。

[0441] 研究 Ang2\_PZ\_Colo205\_003 直至 74 天的给药方案 (见图 8A) :

[0442]

[0443]

组	动物 数目	化合物	剂 量 (mg/kg)	施用途径/方式	处理数 目	累 积 剂 量
						mg/kg
1	10	赋形剂		i.p. 每周一次	4	
2	10	<VEGF> G6-31	6 mg/kg	i.p. 每周一次	8	48
3	10	<ANG-2> Mab536	6 mg/kg	i.p. 每周一次	8	48
4	10	<VEGF> G6-31 + <ANG-2> Mab536	5mg/kg + 6 mg/kg	i.p. 每周一次 i.p. 每周一次	8 8	40 48
5	10	<VEGF-AN G-2>TvAb6	7mg/kg	i.p. 每周一次	8	56

[0444] 在研究 Ang2\_PZ\_Colo205\_003 中, <VEGF-ANG-2>TvAb6 在等摩尔比方面错误地给予了不足量 (underdosed)。在研究 Ang2\_PZ\_Colo205\_005 中调整了 <VEGF-ANG-2>TvAb6 的剂量从而动物接受等摩尔比的 ANG-2 和 VEGF 结合位点的 <VEGF-ANG-2>TvAb6 以及 <VEGF>G6-31 和 <ANG-2>Mab536 的组合。

[0445] 肿瘤生长抑制直至第 74 天 (见图 8a)。Ang2\_PZ\_Colo205\_003 研究：

[0446] 剂量为 7mg/kg 的 <VEGF-ANG-2>TvAb6 显示出与 5mg/kg 的 <VEGF>G6-31 和 6mg/kg 的 <ANG-2>Mab536 的组合、以及剂量为 6mg/kg 的作为单剂的 <VEGF>G6-31 相当的效应 (图 8A), 并且比剂量为 6mg/kg 的作为单剂的 <ANG-2>Mab536 更好。由于皮下 Colo205 模型对阻断人以及鼠 VEGF 的 <VEGF>G6-31 抗体非常有反应性, 导致几乎完全的肿瘤生长抑制, 因此在所选的实验条件下 <VEGF-ANG-2>TvAb6 不能与作为单剂的 G6-31(6mg/kg) 区分, 而 <VEGF-ANG-2>TvAb6 在清楚地更低的累积剂量 (与 <ANG-2>Mab536 和 <VEGF>G6-31 的组合 =  $40+48 = 88\text{mg/kg}$  抗体相比较, <VEGF-ANG-2>TvAb6 =  $56\text{mg/kg}$  抗体) 显示与 <ANG-2>Mab536 和 <VEGF>G6-31 的组合的相当的抑制。

[0447] 直至第 63 天研究 Ang2\_PZ\_Colo205\_005 的剂量方案：

[0448]

组	动物数目	化合物	剂 量 (mg/kg)	施用途径/ 方式	处理数 目	累积剂量
6	10	赋形剂		i.p. 每 周 一 次	6	
7	10	<VEGF> G6-31	3	i.p. 每 周 一 次	7	21mg/kg
8	10	<VEGF> G6-31 + <ANG-2> Mab536	3 3	i.p. 每 周 一 次 i.p. 每 周 一 次 I	7 7	21 mg/kg 21 mg/kg
9	10	<ANG-2> Mab536	3	i.p. 每 周 一 次	7	21 mg/kg
10	10	<VEGF-A NG-2>Tv Ab6	4	i.p. 每 周 一 次	7	28 mg/kg

[0449] 直至第 63 天研究 Ang2\_PZ\_Colo205\_005 肿瘤生长抑制：

[0450] 剂量为 4mg/kg 的 <VEGF-ANG-2>TvAb6 显示出与每种为 3mg/kg 的 <VEGF>G6-31 和 <ANG-2>Mab536 的组合相当的效应，并且比剂量为 3mg/kg 的单剂 <VEGF>G6-31 和单剂 <ANG-2>Mab536 更好（图 8B）。这是第一个这样的实例，其显示更低剂量（关于总抗体浓度 - 该组合的累积剂量是  $21+21 = 42\text{mg/kg}$  相对于  $28\text{mg/kg}$  的双特异性抗体 TvAb6）靶向 VEGF 和 ANG-2 的双特异性抗体可产生强烈的抗 - 肿瘤效应，该效应与阻断 VEGF 和 ANG-2 的各自单剂的组合相当并优于每种单剂。

[0451] 实施例 4

[0452] 阻断 VEGF- 诱导的管形成 (tube formation)

[0453] 为确认双特异性四价 <VEGF-ANG-2>TvAb6 中保留了抗 -VEGF 相关的活性，在 VEGF 诱导的管形成测定 AngioKit TCS CellWorks (CellSystems) 中显示，<VEGF-ANG-2>TvAb6 介导的管形成剂量依赖性抑制与单特异性抗体 <VEGF>G6-31 相当。根据下述程序进行 AngioKit TCS CellWorks 测定：在第 1, 4, 7 和 9 天每次抗体处理前用 2ng/ml 的 VEGF 刺激细胞。通过在第 11 天用 CD31-PE 抗体 (BD Pharmingen#555446) 染色内皮细胞显示血管 (Vascular tubes)。以 4x 放大率拍摄照片并使用 MetaMorph (Molecular Devices) 中的血管生成管形成应用组件 (Angiogenesis Tube Formation Application Module) 定量分析管长度的数值和分支点数目。重复计算数值和标准差并且每个样品分析 4 张照片。图 9 显示各自的结果，并且图 10A 和 B 显示定量分析的结果。血管生成素 -2 对管形成没有影响，

因此在本测定中未研究 ANG-2 的抑制。数据显示在抑制 VEGF 刺激的管形成中, 双特异性 <VEGF-ANG-2>TvAb6 和单特异性 <VEGF>G6-31 抗体同样有效。

[0454] 实施例 5

[0455] Tie2 磷酸化

[0456] 为了确认双特异性四价 <VEGF-ANGPT2> 抗体 TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC06 和 TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC08 中保留了抗 -ANGPT2 相关的活性, 在如上所述的 ANGPT2 刺激的 Tie2 磷酸化测定中显示, TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC06 和 TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC08 以与其母体克隆 LC06 和 LC08 相当的方式干扰 ANGPT2 刺激的 Tie2 磷酸化。

[0457] 在第一个实验中, 双特异性抗体 TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC06 和 TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC08 两者均显示剂量依赖性干扰 ANGPT2 刺激的 Tie2 磷酸化, 其 IC<sub>50</sub> 值与母体克隆 LC06 和 LC08 的相当 (如图 16A 中所示)。TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC06 干扰 ANGPT2 刺激的 Tie2 磷酸化的 IC<sub>50</sub> 值约 721ng/ml, 而 LC06 干扰 ANGPT2 刺激的 Tie2 磷酸化的 IC<sub>50</sub> 值约 508ng/ml。TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC08 干扰 ANGPT2 刺激的 Tie2 磷酸化的 IC<sub>50</sub> 值约 364ng/ml, 而 LC08 干扰 ANGPT2 刺激的 Tie2 磷酸化的 IC<sub>50</sub> 值约 499ng/ml。

[0458] 在第二个实验中, 双特异性抗体 TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC06 和 TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC08 两者均显示剂量依赖性干扰 ANGPT2 刺激的 Tie2 磷酸化, 其 IC<sub>50</sub> 值与母体克隆 LC06 和 LC08 的相当 (如图 16B 中所示)。TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC06 干扰 ANGPT2 刺激的 Tie2 磷酸化的 IC<sub>50</sub> 值约 488ng/ml, 而 LC06 干扰 ANGPT2 刺激的 Tie2 磷酸化的 IC<sub>50</sub> 值约 424ng/ml。TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC08 干扰 ANGPT2 刺激的 Tie2 磷酸化的 IC<sub>50</sub> 值约 490ng/ml, 而 LC08 干扰 ANGPT2 刺激的 Tie2 磷酸化的 IC<sub>50</sub> 值约 399ng/ml。

[0459] 总之, 这些数据显示在本细胞测定的误差内, 双特异性四价 <VEGF-ANGPT2> 抗体 TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC06 和 TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC08 以与它们的母体克隆 LC06 和 LC08 相当的方式干扰 ANGPT2 刺激的 Tie2 磷酸化。

[0460] 实施例 6

[0461] 抑制 huANG-2 与 Tie-2 的结合 (ELISA)

[0462] 相互作用 ELISA 在 384 孔微量滴定板 (MicroCoat, DE, Cat. No. 464718) 上, 在 RT 下进行。每次温育步骤后, 用 PBST 洗涤板 3 次。用 0.5 μg/ml Tie-2 蛋白 (R&D Systems, 英国, Cat. No. 313-TI) 包被 ELISA 板至少 2 小时 (h)。其后, 用增补了 0.2% 吐温 -20 和 2% BSA 的 PBS (Roche Diagnostics GmbH (罗氏诊断 GmbH), DE) 封闭孔 1 小时。纯化的抗体在 PBS 中的稀释物与 0.2 μg/ml 人血管生成素 -2 (huAngiopoietin-2, R&D Systems (R&D 系统), UK, Cat. No. 623-AN) 一起在 RT 下温育 1 小时。洗涤后, 添加 0.5 μg/ml 生物素化的抗 - 血管生成素 -2 克隆 BAM0981 (R&D Systems (R&D 系统), UK) 和 1:3000 稀释的链霉亲和素 HRP (Roche Diagnostics GmbH (罗氏诊断 GmbH), DE, Cat. No. 11089153001) 的混合物 1 小时。其后, 用 PBST 洗涤板 6 次。在 RT 下, 用新鲜制备的 ABTS 试剂 (Roche Diagnostics GmbH (罗氏诊断 GmbH), DE, 缓冲液 #204530001, 片剂 #11112422001) 对该板进行显色 30 分钟。在 405nm 处测量吸光度。

[0463] Ang2 相互作用 ELISA 总结数据 :

[0464]	<VEGF-ANG-2>双特异性抗体 (或单特异性母体抗体)	AVG (ng/ml)	IC50	STDEV
[0465]	hANG2			
	<VEGF-ANG-2>G6_31	>20000		
	TvAb-2441_G6_31_Ang2i_LC06	75	39	
	TvAb-2441_G6_31_Ang2k_LC08	66	31	
	TvAb-2441_贝伐单抗_LC06	44	8	
	TvAb-2441_贝伐单抗_LC08	42	11	
	<ANG-2>Mab 536	15	8	
	<VEGF>贝伐单抗	>20000		
	TvAb-3421_贝伐单抗_LC06	31	1	
	TvAb-4421_贝伐单抗_LC06	35	17	
	TvAb-4461_贝伐单抗_LC06	46	10	

[0466] 实施例 7

[0467] 抑制 hVEGF 与 hVEGF 受体的结合 (ELISA)

[0468] 测试在 384 孔微量滴定板 (MicroCoat, DE, Cat. No. 464718) 上, 在 RT 下进行。每次温育步骤后, 用 PBST 洗涤板 3 次。开始时, 用 0.5 μg/ml huVEGF-R 蛋白 (R&D Systems, 英国, Cat. No. 321-FL) 包被板至少 2 小时 (h)。其后, 用增补了 0.2% 吐温-20 和 2% BSA 的 PBS (Roche Diagnostics GmbH (罗氏诊断 GmbH), DE) 封闭孔 1 小时。纯化的抗体在 PBS 中的稀释物与 0.15 μg/ml huVEGF121 (R&D Systems (R&D 系统), UK, Cat. No. 298-VS) 一起在 RT 下温育 1 小时。洗涤后, 添加 0.5 μg/ml 抗 VEGF 克隆 Mab923 (R&D Systems (R&D 系统), UK) 和 1:2000 辣根过氧化物酶 (HRP)-缀合的 F(ab')2 抗小鼠 IgG (GE Healthcare, UK, Cat. No. NA9310V) 的混合物 1 小时。其后, 用 PBST 洗涤板 6 次。在 RT 下, 用新鲜制备的 ABTS 试剂 (Roche Diagnostics GmbH (罗氏诊断 GmbH), DE, 缓冲液 #204530001, 片剂 #11112422001) 对该板进行显色 30 分钟。在 405nm 处测量吸光度。

[0469] VEGF 相互作用 ELISA 总结数据 :

[0470]

<VEGF-ANG-2>双特异性抗体	AVG (ng/ml)	IC50	STDEV
VEGF			
<VEGF-ANG-2>G6_31	1431	130	
TvAb-2441_G6_31_Ang2i_LC06	1654	213	
TvAb-2441_G6_31_Ang2k_LC08	1392	184	
TvAb-2441_贝伐单抗_LC06	2831	503	
[0471] TvAb-2441_贝伐单抗_LC08	2305	972	
TvAb-<ANG-2>Mab 536	>20000		
TvAb-<VEGF>贝伐单抗	1584	357	
TvAb-3421_贝伐单抗_LC06	2660	284	
TvAb-4421_贝伐单抗_LC06	1980	1319	
TvAb-4461_贝伐单抗_LC06	1677	394	

[0472] 实施例 8

[0473] HUVEC 增殖

[0474] 为确认双特异性四价<VEGF-ANG2>抗体TvAb-2441-贝伐单抗-LC06和TvAb-2441-贝伐单抗-LC08中保留了抗-VEGF相关活性,在如上所述的VEGF诱导的HUVEC增殖测定中显示,TvAb-2441-贝伐单抗-LC06和TvAb-2441-贝伐单抗-LC08以与它们的母体克隆LC06和LC08相当的方式干扰VEGF-诱导的HUVEC增殖。

[0475] 图18显示TvAb-2441-贝伐单抗-LC06和TvAb-2441-贝伐单抗-LC08的确以与母体抗体贝伐单抗相当的浓度依赖性方式干扰VEGF-诱导的HUVEC增殖。

[0476] 实施例 9

[0477] 人ANG-1和人ANG-2的ELISA结合测定

[0478] 母体<ANG-2>抗体Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 和 Ang2k-LC08与人ANG-1和人ANG-2的结合在ANG-1或ANG-2结合ELISA中测量,如上文所述(见与ANG-1和ANG-2结合的比较(ANG-1和ANG-2结合ELISA))。简言之,该ELISA-型测定是基于在微量滴定板中固定人野生型血管生成素-1或-2。针对固定的ANG-1或ANG-2的抗体的结合通过带有POD缀合物的<人Fc>(抗-IgG)抗体测量。<ANG-2>抗体的系列稀释物允许测量EC50浓度。使用人抗-ANG-2抗体<ANG-2>抗体Mab536(Oliner等,Cancer Cell. 2004Nov; 6(5):507-16, US2006/0122370)作为参比。测量的EC50浓度总结在下表中。

抗体	hANG-1 结合 EC50	hANG-2 结合 EC50
[0479]	<ANG-2>MAb536	2538 ng/mL
	<ANG-2>Ang2i-LC06	> 8000 ng/mL
	<ANG-2>Ang2i-LC07	> 8000 ng/mL
	<ANG-2>Ang2i-LC08	4044 ng/mL
		133 ng/mL
		84 ng/mL
		3006 ng/mL
		105 ng/mL

[0480] 所有抗体特异性结合 ANG-2。 MAb536 和 Ang2k-LC08 也显示对 ANG-1 的特异性结合, 而 Ang2i-LC06 和 Ang2i-LC07 不特异性结合 ANG-1, 因为它们具有高于 8000ng/ml (检测限) 的 EC50- 值。

#### [0481] 实施例 10

[0482] 双特异性、四价单链 Fab<VEGF-ANG-2> 抗体分子 scFab- 阿瓦斯丁 -LC06-2620, scFab- 阿瓦斯丁 -Ang2i-LC06-2640 和 scFab- 阿瓦斯丁 -Ang2i-LC06-2641 的表达和纯化

[0483] 类似于实施例 1 中描述的程序和上述的材料和方法, 表达和纯化双特异性、四价单链 Fab<VEGF-ANG-2> 抗体分子 scFab- 阿瓦斯丁 -LC06-2620, scFab- 阿瓦斯丁 -LC06-2640 和 scFab- 阿瓦斯丁 -LC06-2641, 所有三种都是基于 <VEGF> 贝伐单抗和 <ANG-2>Ang2i-LC06。如上述实施例所述测量结合亲和力和其它性质。这些双特异性抗体的有关 (可能修饰的) 轻链和重链氨基酸序列在 SEQ ID NO:109-110 (scFab- 阿瓦斯丁 -LC06-2620), 在 SEQ ID NO:111-112 (scFab- 阿瓦斯丁 -LC06-2640) 和在 SEQ ID NO:113-114 (scFab- 阿瓦斯丁 -LC06-2641) 中给出。

0484	关键数据	scFab-阿瓦斯丁 -LC06-2620	scFab-阿瓦斯丁 -LC06-2640	scFab-阿瓦斯丁 -LC06-Ang2i-2641
[0485]	表达 (产率)	29 μg/mL	27 μg/mL	18 μg/mL
	纯化 (产率, 蛋白 A 同源物)	21 mg, 57%	19 mg, 86%	12 mg, 90%
	制备 SEC 后的同质性	98%	98%	99%
	功能			
	hANG-2 亲和力 (Biacore)	1.9 E-9 M	1.8 E-9 M	1.9 E-9 M
	hVEGF 亲和力 (Biacore)	1 E-10 M	1E-10 M	1E-10 M

#### [0486] 实施例 11

[0487] 双特异性、三价单链 Fab<VEGF-ANG-2> 抗体分子阿瓦斯丁 -LC06-KiH-C-scFab 的

表达和纯化

[0488] 类似于实施例 1 中描述的程序和上述的材料和方法, 表达和纯化双特异性、三价单链 Fab<VEGF-ANG-2> 抗体分子阿瓦斯丁 -LC06-KiH-C-scFab( 基于 <VEGF> 贝伐单抗和 <ANG-2>Ang2i-LC06)。如上述实施例所述测量结合亲和力和其它性质。这种双特异性抗体的有关(可能修饰的)轻链和重链氨基酸序列在 SEQ ID NO:115-117( 阿瓦斯丁 -LC06-KiH-C-scFab) 中给出。

[0489]

<b>关键数据</b>	阿瓦斯丁 -LC06-KiH-C-scFab
表达(产率)	15 μg/mL
纯化(产率,蛋白A同源物)	4.8 mg, 91%
制备 SEC 后的同质性	97%
<b>功能</b>	
hANG-2 亲和力(Biacore)	4.4 E-9 M
hVEGF 亲和力(Biacore)	1 E-10 M

[0490]

实施例 12

[0491] 双特异性、三价 <VEGF-ANG-2> 抗体分子阿瓦斯丁 -LC06-C-Fab-6CSS 的表达和纯化

[0492] 类似于实施例 1 中描述的程序和上述的材料和方法(也见,表达和纯化双特异性、三价 <VEGF-ANG-2> 抗体分子阿瓦斯丁 -LC06-C-Fab-6CSS( 基于 <VEGF> 贝伐单抗和 <ANG-2>Ang2i-LC06)。如上述实施例所述测量结合亲和力和其它性质。这种形式的双特异性、三价抗体分子一般在 EP 申请号 09005108.7 中描述。这种双特异性 <VEGF-ANG-2> 抗体的有关(可能修饰的)轻链和重链氨基酸序列在 SEQ ID NO:118-120( 阿瓦斯丁 -LC06-C-Fab-6CSS) 中给出。

[0493]

<b>关键数据</b>	scFab-阿瓦斯丁 -LC06-2620	scFab-阿瓦斯丁 -LC06-2640	scFab-阿瓦斯丁 -LC06-2641
表达(产率)	29 μg/mL	27 μg/mL	18 μg/mL
纯化(产率,蛋白A同源物)	21 mg, 57%	19 mg, 86%	12 mg, 90%
制备 SEC 后的同质性	98%	98%	99%
<b>功能</b>			
hANG-2 亲和力(Biacore)	1.9 E-9 M	1.8 E-9 M	1.9 E-9 M
hVEGF 亲和力(Biacore)	1 E-10 M	1E-10 M	1E-10 M

[0494] 实施例 13

[0495] 双特异性、二价结构域交换的〈VEGF-ANG-2〉抗体分子阿瓦斯丁-LC06-CH1-CL, 阿瓦斯丁-LC06-VH-VL 和阿瓦斯丁-LC06-VH-VL-SS 的表达和纯化

[0496] 类似于实施例 1 中描述的程序和上述的材料和方法, 表达和纯化基于〈VEGF〉贝伐单抗和〈ANG-2〉Ang2i-LC06 的双特异性、二价结构域交换的〈VEGF-ANG-2〉抗体分子阿瓦斯丁-LC06-CH1-CL(如 WO2009/080253 中所述进行 CH-CL 交换)、阿瓦斯丁-LC06-VH-VL(如 WO2009/080252 中所述进行 VH-VL 交换)和阿瓦斯丁-LC06-VH-VL-SS(如 WO2009/080252 中所述进行 VH-VL 交换并额外引入 VH44VL100 二硫化物桥)。如上述实施例所述测量结合亲和力和其它性质。这些双特异性抗体的有关(可能修饰的)轻链和重链氨基酸序列在 SEQ ID NO:121-124(阿瓦斯丁-LC06-CH1-CL), 在 SEQ ID NO:125-128(阿瓦斯丁-LC06-VH-VL)和在 SEQ ID NO:129-132(阿瓦斯丁-LC06-VH-VL-SS) 中给出。

关键数据	阿瓦斯丁 -LC06-CM-CH1-CL	阿瓦斯丁 -LC06-CM-VH-VL	阿瓦斯丁 -LC06-VH-VL-SS
表达(产率)	87 μg/mL	44 μg/mL	65 μg/mL
纯化(产率, 蛋白 A 同源物)	50 mg, 62%	22 mg, 95%	91 mg, 74%
制备 SEC 后的同 质性	84%	> 99%	95%
功能			
hANG-2 亲和力 (Biacore)	1.3 E-9 M	2.1 E-9 M	1.46 E-9 M
hVEGF 亲和力 (Biacore)	1 E-10 M	1 E-10 M	1 E-10 M

[0498] 实施例 14

[0499] 双特异性、二价 ScFab-Fc 融合 〈VEGF-ANG-2〉抗体分子阿瓦斯丁-LC06-N-scFab 和阿瓦斯丁-LC06-N-scFabSS 的表达和纯化

[0500] 类似于实施例 1 中描述的程序和上述的材料和方法, 表达和纯化双特异性、二价 ScFab-Fc 融合 〈VEGF-ANG-2〉抗体分子阿瓦斯丁-LC06-N-scFab 和阿瓦斯丁-LC06-N-scFabSS(基于 〈VEGF〉贝伐单抗和 〈ANG-2〉Ang2i-LC06)。如上述实施例所述测量结合亲和力和其它性质。这些双特异性抗体的有关修饰的重链氨基酸序列在 SEQ ID NO:133-134(阿瓦斯丁-LC06-N-scFab), 和在 SEQ ID NO:135-136(阿瓦斯丁-LC06-N-scFabSS) 中给出。

[0501]	关键数据	阿瓦斯丁 -LC06-N-scFab	阿瓦斯丁 -LC06-N-scFabSS
	表达(产率)		62 μg/mL
	纯化(产率,蛋白A同源物)		43%
	功能		
	hANG-2亲和力(Biacore)		1 nM
	hVEGF亲和力(Biacore)		1 nM

[0502] 实施例 15

[0503] 实施例 10 至 14 的双特异性〈VEGF-ANG-2〉抗体分子抑制 hVEGF 结合 hVEGF 受体 (ELISA), 阻断 VEGF- 诱导的管形成, 抑制 huANG-2 结合 Tie-2 (ELISA), Tie2 磷酸化和 HUVEC 增殖

[0504] 实施例 10 至 14 的双特异性〈VEGF-ANG-2〉抗体分子抑制 hVEGF 结合 hVEGF 受体 (ELISA), 阻断 VEGF- 诱导的管形成, 抑制 huANG-2 结合 Tie-2 (ELISA), Tie2 磷酸化和 HUVEC 增殖可类似地根据材料和方法以及上述实施例 4 至 9 中描述的程序测量。

[0505] 实施例 16

[0506] 在 Scid beige 小鼠难治性 Colo205 异种移植模型 (在对贝伐单抗 (阿瓦斯丁) 处理抵抗后) 中, 与 <ANG-2>ANG2i-LC06、以及 <ANG-2>ANG2i-LC06 和阿瓦斯丁的组合相比较, 双特异性抗体〈VEGF-ANG-2〉的体内效应

## [0507] 细胞系和培养条件 :

[0508] Colo205 人结肠直肠癌细胞最初从 ATCC 获得, 扩增后保藏在 Roche Penzberg 内部细胞库中。肿瘤细胞系在补充了 10% 胎牛血清 (PAA Laboratories, Austria) 和 2mM L- 谷氨酰胺的 RPMI1640 培养基 (PAA, Laboratories, Austria) 中, 在 37 °C 于水饱和大气中在 5% CO<sub>2</sub> 中常规地培养。传代 2-5 用于移植。

## [0509] 动物 :

[0510] 雌性 SCID beige 小鼠 ;4 - 5 周龄到达 (购自 Charles River Germanyd) 时根据确定指南 (GV-Solas ;Felasa ;TierschG) 维持在无特异病原体、每日 12h 光 /12h 暗循环条件。实验研究方案经地方政府评阅且批准。到达后动物维持在动物实验室的检疫部一周以适应新环境和用于观察。定期进行连续健康监测。无限制提供饮食 (Provimi Kliba3337) 和水 (酸化的 pH2.5-3)。研究开始时鼠龄是大约 10 周。

## [0511] 肿瘤细胞注射 :

[0512] 注射当天, 从培养瓶 (Greiner) 中收获肿瘤细胞 (胰蛋白酶 -EDTA) 并转移到 50ml 培养基中, 洗涤一次并在 PBS 中重悬浮。用 PBS 再次洗涤步骤和过滤 (细胞滤过器 ; Falcon Ø 100μm) 后调整终细胞滴度至 2.5x10<sup>7</sup>/ml。肿瘤细胞悬浮物用移液器小心混合以避免细胞聚集。此后, 细胞悬浮物使用宽针 (wide needle, 1.10x40mm) 装入 1.0ml 结核菌素注射器 (Braun Melsungen) ;对于注射, 改变针的大小 (0.45x25mm) 并且每次注射使用新的针。麻醉如下进行, 对小动物使用带有预温育室 (聚甲基丙烯酸甲酯有机玻璃

(plexiglas)) 的 Stephens 吸入装置、个体小鼠鼻罩 (nose-mask) (silicon) 并使用不燃烧或爆炸的麻醉化合物异氟烷 (cp-pharma) 在闭式循环系统中进行。注射前两天将动物刮毛, 对于细胞注射, 用解剖镊子小心的提起麻醉动物的皮肤在动物的右腹皮下注射 100  $\mu$  l 细胞悬液 (= 2.5x10<sup>6</sup> 细胞)。

[0513] 动物的处理

[0514] 预处理 :

[0515] 细胞移植后 14 天开始动物处理 (研究 Ang2\_PZ\_Colo205\_008), 平均肿瘤体积分别是 100mm<sup>3</sup> 至 150mm<sup>3</sup>。在 5 周的时间期间每周一次用阿瓦斯丁 (10mg/kg) 处理小鼠。

[0516] 二次处理 :

[0517] 其后为了二次处理对小鼠进行随机化并分为四组 (每组 10 只小鼠)。在二次处理开始时 (第 51 天) 肿瘤体积范围在 336 至 341mm<sup>3</sup>。小鼠用下表所示的不同化合物每周一次 i. p. 进行处理。

组	动 物 数 目	化 合 物	剂 量 (mg/kg) (nMol/kg)	施用途径/方 式	处 理 数 目	累 积 剂 量 (mg/kg)
11	10	阿瓦斯丁	10 mg/kg (68 nMol/kg)	i.p. 每周 一 次	11	110
12	10	ANG2i-L C06	10 mg/kg (68 nMol/kg)	i.p. 每周 一 次	6	60
13	10	ANG2i-L C06 +  阿瓦斯丁	10 mg/kg (68 nMol/kg)  +  10 mg/kg (68 nMol/kg)	i.p. 每周 一 次  i.p. 每周 一 次	6  11	60  110
14	10	TvAb-244 1-贝伐单 抗-LC06	13 mg/kg (64 nMol/kg)	i.p. 每周 一 次	6	78

[0519] 监测 :

[0520] 为了动物的健康状况, 每周 2x 管控动物。细胞注射后每周 2x 记录体重。肿瘤大小在分期当天 (on the staging day) 和随后在整个处理期间每周 2 次通过测径器进行测量。肿瘤体积根据 NCI 方法 (肿瘤重量 = 1/2ab<sup>2</sup>, 其中 “a” 和 “b” 分别是肿瘤的长径和短径) 计算。终止标准是临界肿瘤团块 (达到 1.7g 或  $\varnothing > 1.5$  cm), 体重减轻大于基线的 20%, 动物的肿瘤溃疡或不良的一般状况。

[0521] 结果 : 基于第 91 天的中值 (以百分比表示) 的肿瘤生长抑制

	TGI
ANG2i-LC06 10 mg/kg (68 nMol/kg)	
[0522] i.p.; 阿瓦斯丁 10 mg/kg (68 nMol/kg)	45.3
i.p.	
ANG2i-LC06 10 mg/kg i.p. (68 nMol/kg)	44.4

nMol/kg)	
[0523] TvAb-2441-贝伐单抗-LC06_13 mg/kg i.p. (64 nMol/kg)	60.4

[0524] 结果显示, 在 Scid beige 小鼠贝伐单抗 (阿瓦斯丁) - 抵抗性异种移植肿瘤模型 Colo205 中, 与单特异性抗体 ANG2i-LC06 单独或 ANG2i-LC06 和阿瓦斯丁组合处理相比较, 双特异性 <VEGF-ANG-2> 抗体 TvAb-2441- 贝伐单抗 -LC06 显示更高的肿瘤生长抑制 (在更低的剂量)。

[0525] 实施例 17

[0526] 在 s. c. Calu-3NSCLC 异种移植中肿瘤血管生成的体内抑制

[0527] - 使用标记的抗 -CD31 经非 - 侵入的体内血管生成成像检测

[0528] 细胞系和培养条件 :

[0529] 这种人肺腺癌细胞系从患有肺癌的白人男性建立。细胞从 Roche, Kamakura 获得并在内部 (in house) 传代用于工作细胞库。肿瘤细胞系在补充了 10% 胎牛血清 (PAN Biotech, Germany) 和 2mM L- 谷氨酰胺 (PAN Biotech, Germany) 的 RPMI1640 培养基 (PAN Biotech, Germany) 中, 在 37°C 于水饱和大气中在 5% CO<sub>2</sub> 中常规地培养。用胰蛋白酶 / EDTA1x (PAN) 每周分离一次进行培养物传代。

[0530] 动物 :

[0531] 雌性 BALB/c 裸鼠 ;4 - 5 周龄到达 (购自 Charles River Germany) 时根据确定指南 (GV-Solas ;Felasa ;TierschG) 维持在无特异病原体、每日 12h 光 /12h 暗循环条件。实验研究方案经地方政府评阅且批准。到达后动物维持在动物实验室的检疫部一周以适应新环境和用于观察。定期进行连续健康监测。无限制提供饮食 (Provimi Kliba3337) 和水 (酸化的 pH2.5-3)。研究开始时鼠龄是大约 10 周。

[0532] 肿瘤细胞注射 :

[0533] 注射当天, 从培养瓶 (Greiner) 中收获肿瘤细胞 (胰蛋白酶 -EDTA) 并转移到 50ml 培养基中, 洗涤一次并在 PBS 中重悬浮。用 PBS 再次洗涤步骤和过滤 (细胞滤过器 ; Falcon  $\varnothing$  100 $\mu$ m) 后调整终细胞滴度至 5.0x10<sup>7</sup>/ml。肿瘤细胞悬浮物用移液器小心混合以避免细胞聚集。此后, 细胞悬浮物使用宽针 (wide needle, 1.10x40mm) 装入 1.0ml 结核菌素注射器 (Braun Melsungen) ;对于注射, 改变针的大小 (0.45x25mm) 并且每次注射使用新的针。麻醉如下进行, 对小动物使用带有预温育室 (聚甲基丙烯酸甲酯有机玻璃

(plexiglas)) 的 Stephens 吸入装置、个体小鼠鼻罩 (nose-mask) (silicon) 并使用不燃烧或爆炸的麻醉化合物异氟烷 (cp-pharma) 在闭式循环系统中进行。注射前两天将动物刮毛, 对于细胞注射, 用解剖镊子小心的提起麻醉动物的皮肤在动物的右腹皮下注射 100  $\mu$  l 细胞悬液 (= 5.0  $\times$  10<sup>6</sup> 细胞)。

[0534] 动物的处理

[0535] 在研究第 35 天, 根据它们的体重和肿瘤大小将小鼠随机化成统计学良好的分布组。对于治疗性抗体的处理, 每组由 10 只小鼠组成, 并在 6 周的时间期间每周一次 i. p. 应用治疗性抗体处理。(见图 19)。

[0536] 组 1: 赋形剂 (奥马珠单抗 (Xolair)) 10mg/kg

[0537] 组 2: 阿瓦斯丁 10mg/kg

[0538] 组 3: 单特异性 <VEGF> 阿瓦斯丁 10mg/kg+ 单特异性 <ANG-2>Ang2i-LC06 10mg/kg 的组合 (=阿瓦斯丁 /Ang2i-LC06)

[0539] 组 4: 双特异性 <VEGF-ANG-2> 抗体 2441- 阿瓦斯丁 -scFv-LC06 13.3mg/kg

[0540] 监测 :

[0541] 为了动物的健康状况, 每周 2x 管控动物。细胞注射后每周 2x 记录体重。肿瘤大小在分期当天 (on the staging day) 和随后在整个处理期间每周 2 次通过测径器进行测量。肿瘤体积根据 NCI 方法 (肿瘤重量 = 1/2ab<sup>2</sup>, 其中 “a” 和 “b” 分别是肿瘤的长径和短径) 计算。终止标准是临界肿瘤团块 (达到 1.7g 或  $\varnothing > 1.5$  cm), 体重减轻大于基线的 20%, 动物的肿瘤溃疡或不良的一般状况。

[0542] 用标记的抗 -CD31 抗体对血管和血管生成进行监测

[0543] 初步研究揭示抗 -CD31 抗体是肿瘤血管成像的最佳试剂。该试剂靶向小鼠内皮 CD31 受体并以低信号 - 背景比值显示单个血管。因此, 抗 -CD31 抗体成像代表肿瘤血管成像的可行方式。选择每个治疗组的三只小鼠并用 50  $\mu$  g/ 小鼠的用有机荧光基团 Alexa610 共价标记的抗 -CD3 抗体在第 35, 49 和 79 天 i. v. 注射。在吸入麻醉下每次应用标记的抗体后 24 小时进行近红外成像。通过使用图像比较工具 MAESTRO 系统显示肿瘤血管的增加或减少。在对照单克隆抗体奥马珠单抗 (Xolair) 和治疗性抗体阿瓦斯丁的处理下, 在第 35 天至第 79 天观察到肿瘤血管的增加。相反, 阿瓦斯丁 +Ang2i-LC06 和 2441- 阿瓦斯丁 -scFv-LC06 的组合处理显示肿瘤脉管系统的降低 (图 19)。

[0544] 肿瘤区通过手工画图测量面积进行定量并且信号强度以强度值 (总信号 / 暴露时间) 进行评估。从第 35 至 49 天和从第 49 至 79 天 CD31 信号的平均变化在图 19 中作图。从第 35 至 49 天所有处理组揭示肿瘤脉管系统的增加。尽管在组 1 (奥马珠单抗 (Xolair)) 和组 2 (阿瓦斯丁) 中 CD31 肿瘤信号稳定地加速增加, 在组 3 (阿瓦斯丁 +<ANG-2>Ang2i-LC06 组合) 和组 4 (双特异性 <VEGF-ANG-2> 抗体 2441- 阿瓦斯丁 -scFv-LC06) 中肿瘤脉管系统显著减少, 组 4 清楚地显示最明显的抗血管生成效应 (图 19)。

[0545] 在最后体内成像研究后, 立即移出肿瘤 (第 79 天), 在福尔马林中固定并植入石蜡中进行离体 (ex vivo) 研究。在用对照单克隆抗体奥马珠单抗 (Xolair) 处理的肿瘤中荧光显微镜显示许多界限清楚的毛细血管。在阿瓦斯丁处理的小鼠中观察到数个肿瘤血管。相比之下, 处理组 3 和 4 与处理组 1 和 2 相比在肿瘤中具有显著更少的且更不清楚的血管, 而组 4 显示最清楚的效应。组 4 揭示更低的微血管密度, 毛细血干一般更小且无组

织 (unstructured) 并且与组 1, 2 和 3 相比它们显示更弱的抗 -CD31 荧光信号。组织化学 HE- 染色显示组 4 双特异性抗体的处理组中瘤内坏死区达到所有区的 90%，其比其它处理组显著更高 ( 数据未显示 )。

[0546] 实施例 18

[0547] 在 Scid beige 小鼠分期皮下 Colo205 异种移植模型中双特异性抗体 <VEGF-ANG-2> 的体内效应和与母体单特异性抗体 (单独或组合) 的比较

[0548] 细胞系和培养条件 :

[0549] Colo205 人结肠直肠癌细胞最初从 ATCC 获得, 扩增后保藏在 Roche Penzberg 内部细胞库中。肿瘤细胞系在补充了 10% 胎牛血清 (PAA Laboratories, Austria) 和 2mM L- 谷氨酰胺的 RPMI1640 培养基 (PAA, Laboratories, Austria) 中, 在 37 °C 于水饱和大气中在 5% CO<sub>2</sub> 中常规地培养。传代 2-5 用于移植。

[0550] 动物 :

[0551] 雌性 SCID beige 小鼠 ;4-5 周龄到达 (购自 Charles River Germany) 时根据确定指南 (GV-Solas ;Felasa ;TierschG) 维持在无特异病原体、每日 12h 光 /12h 暗循环条件。实验研究方案经地方政府评阅且批准。到达后动物维持在动物实验室的检疫部一周以适应新环境和用于观察。定期进行连续健康监测。无限制提供饮食 (Provimi Kliba3337) 和水 (酸化的 pH2.5-3)。研究开始时鼠龄是大约 10 周。

[0552] 肿瘤细胞注射 :

[0553] 注射当天, 离心 Colo205 细胞, 洗涤一次并在 PBS 中重悬浮。再次用 PBS 洗涤后细胞浓缩物和细胞大小使用细胞计数器和分析系统 (Vi-CELL, Beckman Coulter) 测量。对于 Colo205 细胞的注射, 最终滴度调整为 5.0x10E7 细胞 /ml, 活力 ca. 90%。随后对应于每只动物 2.5\*10<sup>6</sup> 细胞的 100 μl 这种悬浮物 s. c. 注射到小鼠的右腹。

[0554] 动物处理在随机化的天数、细胞移植后 16 天 (研究 Ang2\_PZ\_Colo205\_009) 在平均肿瘤体积分别是 100mm<sup>3</sup> 时开始。

[0555] 研究 Ang2\_PZ\_Colo205\_009 的剂量方案 :

[0556]

动物 数目	化合物	剂量 (mg/kg)	施用途径/方式
10	奥 马 珠 单 抗 (Xolair)	10	i.p. 每周一次
10	<VEGF > 阿瓦斯 丁	10	i.p. 每周一次
10	<ANG-2> Ang2i-LC06	10	i.p. 每周一次
10	Ang2i-LC06 + 阿瓦斯丁	10	i.p.每周一次
10	<VEGF-ANG-2>T vAb-2441- 贝伐单 抗-LC06	13.3	i.p. 每周一次
10	<VEGF-ANG-2> 阿瓦斯丁 -LC06- CH1-CL	20	i.p. 每周一次
10	<VEGF-ANG-2>s cFAb- 阿瓦斯丁 -LC06-2620	16.6	i.p. 每周一次

[0558] 监测 :

[0559] 为了动物的健康状况,每周 2x 管控动物。细胞注射后每周 2x 记录体重。肿瘤大小在分期当天 (on the staging day) 和随后在整个处理期间每周 2 次通过测径器进行测量。肿瘤体积根据 NCI 方法 (肿瘤重量 =  $1/2ab^2$ , 其中“a”和“b”分别是肿瘤的长径和短径) 计算。终止标准是临界肿瘤团块 (达到 1.7g 或  $\varnothing > 1.5 \text{ cm}$ ), 体重减轻大于基线的 20%, 动物的肿瘤溃疡或不良的一般状况。

[0560] 结果 :

[0561] 基于第 61 天的中值 (以百分比表示) 的肿瘤生长抑制 (TGI)

	TGI
<VEGF> 阿瓦斯丁	66
<ANG-2> Ang2i-LC06	47
Ang2i-LC06 + 阿瓦斯丁	78
[0562] <VEGF-ANG-2>TvAb-2441- 贝伐单抗-LC06	87
<VEGF-ANG-2> 阿瓦斯丁 -LC06-CH1-CL	92
<VEGF-ANG-2>scFAb- 阿瓦斯丁 -LC06-2620	86

[0563] 结果显示,在 Scid beige 小鼠异种移植肿瘤模型 Colo205 中,与单特异性抗体 ANG2i-LC06 和阿瓦斯丁单独或 ANG2i-LC06 和阿瓦斯丁的组合的处理相比,所有三种双特异性 <VEGF-ANG-2> 阿瓦斯丁 (贝伐单抗)-ANG2i-LC06 抗体 (都是基于贝伐单抗序列 SEQ ID No:7 和 8 以及基于 ANG2i-LC06 序列 SEQ ID No:52 和 53) 显示更高的肿瘤生长抑制。

[0564] 实施例 19

[0565] 双特异性 <VEGF-ANG-2> 抗体分子 scFAb- 阿瓦斯丁 -LC10-2620, scFab- 阿瓦斯丁 -LC10-2640 和 scFab- 阿瓦斯丁 -LC10-2641, 阿瓦斯丁 -LC10-KiH-C-scFab, 阿瓦斯丁 -LC10-C-Fab-6CSS, 阿瓦斯丁 -LC10-CH1-CL, 阿瓦斯丁 -LC10-VH-VL 和阿瓦斯丁 -LC10-VH-VL-SS, 阿瓦斯丁 -LC10-N-scFab 和阿瓦斯丁 -LC10-N-scFabSS 的表达和纯化以及性质

[0566] 通过将 Ang2i-LC06 的 VH 和 VL 结构域 (SEQ ID No:52 和 53) 替换为 Ang2i-LC10 相应的 VH 和 VL 结构域 (SEQ ID No:84 和 85), 并使用如实施例 10 至 14 中所述的类似程序和序列 (除了这种替换之外), 表达和纯化了双特异性 <VEGF-ANG-2> 抗体分子 scFAb- 阿瓦斯丁 -LC10-2620, scFab- 阿瓦斯丁 -LC10-2640 和 scFab- 阿瓦斯丁 -LC10-2641, 阿瓦斯丁 -LC10-KiH-C-scFab, 阿瓦斯丁 -LC10-C-Fab-6CSS, 阿瓦斯丁 -LC10-CH1-CL, 阿瓦斯丁 -LC10-VH-VL 和阿瓦斯丁 -LC10-VH-VL-SS, 阿瓦斯丁 -LC10-N-scFab 和阿瓦斯丁 -LC10-N-scFabSS, 它们都是基于 <VEGF> 贝伐单抗和 <ANG-2>Ang2i-LC10。

[0567] 结合亲和力和其它体外性质如上述实施例所述进行确定。

[0568] 实施例 20

[0569] 双特异性抗体 <VEGF-ANG-2> 分子 scFAb- 阿瓦斯丁 -LC10-2620, scFab- 阿瓦斯丁 -LC10-2640 和 scFab- 阿瓦斯丁 -LC10-2641, 阿瓦斯丁 -LC10-KiH-C-scFab, 阿瓦斯丁 -LC10-C-Fab-6CSS, 阿瓦斯丁 -LC10-CH1-CL, 阿瓦斯丁 -LC10-VH-VL 和阿瓦斯丁 -LC10-VH-VL-SS, 阿瓦斯丁 -LC10-N-scFab 和阿瓦斯丁 -LC10-N-scFabSS 的体内效应。

[0570] 双特异性抗体 <VEGF-ANG-2> 分子 scFAb- 阿瓦斯丁 -LC10-2620, scFab- 阿瓦

斯丁-LC10-2640 和 scFab- 阿瓦斯丁-LC10-2641, 阿瓦斯丁-LC10-KiH-C-scFab, 阿瓦斯丁-LC10-C-Fab-6CSS, 阿瓦斯丁-LC10-CH1-CL, 阿瓦斯丁-LC10-VH-VL 和阿瓦斯丁-LC10-VH-VL-SS, 阿瓦斯丁-LC10-N-scFab 和阿瓦斯丁-LC10-N-scFabSS 的体内效应根据上述对应实施例类似地确定。

[0001]

## 序列表

<110> 霍夫曼-拉罗奇有限公司  
 <120> 双特异性抗-VEGF/抗-ANG-2抗体  
 <130> 25401 FT  
 <150> EP 08017607.6  
 <151> 2008-10-08  
 <150> EP 08021834.0  
 <151> 2008-12-16  
 <160> 136  
 <170> PatentIn version 3.2  
 <210> 1  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 重链CDR3, <VEGF>贝伐单抗  
 <400> 1

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10

<210> 2  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 重链CDR2, <VEGF>贝伐单抗  
 <400> 2

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys  
 1 5 10 15

## Arg

<210> 3  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 重链CDR1, <VEGF>贝伐单抗  
 <400> 3

Asn Tyr Gly Met Asn  
 1 5

<210> 4  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 轻链CDR3, <VEGF>贝伐单抗  
 <400> 4

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr  
 1 5

[0002]

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR2, <VEGF>贝伐单抗

<400> 5

Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser
1				5		

<210> 6  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR1, <VEGF>贝伐单抗

<400> 6

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

<210> 7  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链可变结构域, <VEGF>贝伐单抗

<400> 7

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	Thr	Phe	Thr	Asn	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	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	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
				100			105				110				

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

<210> 8  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

[0003]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 重链可变结构域, &lt;VEGF&gt;贝伐单抗

&lt;400&gt; 8

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	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			

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 重链CDR3, &lt;VEGF&gt;雷珠单抗

&lt;400&gt; 9

Tyr	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
1					5				10				

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 重链CDR2, &lt;VEGF&gt;雷珠单抗

&lt;400&gt; 10

Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Phe	Lys
1					5			10				15			

Arg

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 重链CDR1, &lt;VEGF&gt;雷珠单抗

&lt;400&gt; 11

His	Tyr	Gly	Met	Asn
1			5	

[0004]

<210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR3, <VEGF>雷珠单抗

<400> 12

Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	Thr
1					5			

<210> 13  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR2, <VEGF>雷珠单抗

<400> 13

Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser
1				5		

<210> 14  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR1, <VEGF>雷珠单抗

<400> 14

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

<210> 15  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链可变结构域, <VEGF>雷珠单抗

<400> 15

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

[0005]

Ala Lys Tyr Pro 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> 16  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 轻链可变结构域, <VEGF>雷珠单抗

<400> 16

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> 17  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 重链CDR3, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 17

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

<210> 18  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 重链CDR2, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 18

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

Gly

[0006]

<210> 19  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链CDR1, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 19  
 Asp Tyr Trp Ile His  
 1 5

<210> 20  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR3, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 20  
 Gln Gln Gly Tyr Gly Asn Pro Phe Thr  
 1 5

<210> 21  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR2, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 21  
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser  
 1 5

<210> 22  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR1, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 22  
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala  
 1 5 10

<210> 23  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链可变结构域, <VEGF> HuMab G6-31

<400> 23  
 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 Ile Ser Asp Tyr  
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0007]

35

40

45

Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr 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 Phe Val Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 24  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链可变结构域, <VEGF> HuMab G6-31

<400> 24

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 Val Ser Thr Ala  
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Gly Tyr Gly Asn Pro Phe  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 25  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链CDR3, <ANG-2> Mab 536

<400> 25

Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Tyr  
 1 5 10

<210> 26

[0008]

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链CDR2, <ANG-2> Mab 536

<400> 26

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

Gly

<210> 27  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链CDR1, <ANG-2> Mab 536

<400> 27

Ser	Tyr	Gly	Met	His
1		5		

<210> 28  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR3, <ANG-2> Mab 536

<400> 28

Met	Gln	Gly	Thr	His	Trp	Pro	Pro	Thr
1				5				

<210> 29  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR2, <ANG-2> Mab 536

<400> 29

Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser
1			5			

<210> 30  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR1, <ANG-2> Mab 536

<400> 30

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

<210> 31  
 <211> 122  
 <212> PRT

[0009]

<213> 人工的

<220>

<223> 重链可变结构域, <ANG-2> Mab 536

<400> 31

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile 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 Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链可变结构域, <ANG-2> Mab 536

<400> 32

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
85 90 95

Thr His Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

[0010]

<210> 33  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> (G4S)4 接头  
 <400> 33

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser  
 20

<210> 34  
 <211> 104  
 <212> PRT  
 <213> 人类 (Homo sapiens)  
 <400> 34

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 100

<210> 35  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 35

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

[0011]

65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
85		90	95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
100		105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
115		120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
130		135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
145		150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
165		170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
180		185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
195		200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
210		215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
225		230	235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
245		250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
260		265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
275		280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
290		295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
305		310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
325		330	
<210> 36			
<211> 327			
<212> PRT			
<213> 人类 (Homo sapiens)			
<400> 36			
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg			
1	5	10	15

[0012]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0013]

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
325

<210> 37  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 37

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

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

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

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

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

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

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

<210> 38  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 重链CDR3, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03

<400> 38

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val  
1 5

<210> 39  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 重链CDR2, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03

<400> 39

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

Val Lys Gly

<210> 40  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工的

[0014]

<220>  
 <223> 重链CDR1, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03  
 <400> 40  
 Asn Ala Trp Met Ser  
 1 5

<210> 41  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR3, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03  
 <400> 41  
 Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Met Tyr Thr  
 1 5 10

<210> 42  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR2, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03  
 <400> 42  
 His Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
 1 5

<210> 43  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR1, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03  
 <400> 43  
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Arg Leu Asn  
 1 5 10

<210> 44  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链可变结构域, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03  
 <400> 44  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

[0015]

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 45  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>

<223> 轻链可变结构域, <ANG-2> Ang2s\_R3\_LC03

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

<210> 46  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3, <ANG-2>Ang2i\_LC06

<400> 46

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

Ala Phe Asp Ile  
20

<210> 47  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工的

[0016]

<220>  
 <223> 重链CDR2, <ANG-2>Ang2i\_LC06  
 <400> 47  
 Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15  
 Gly  
  
 <210> 48  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
  
 <220>  
 <223> 重链CDR1, <ANG-2>Ang2i\_LC06  
 <400> 48  
 Gly Tyr Tyr Met His  
 1 5  
  
 <210> 49  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
  
 <220>  
 <223> 轻链CDR3, <ANG-2>Ang2i\_LC06  
 <400> 49  
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val  
 1 5 10  
  
 <210> 50  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
  
 <220>  
 <223> 轻链CDR2, <ANG-2>Ang2i\_LC06  
 <400> 50  
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
 1 5  
  
 <210> 51  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
  
 <220>  
 <223> 轻链CDR1, <ANG-2>Ang2i\_LC06  
 <400> 51  
 Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His  
 1 5 10  
  
 <210> 52  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
  
 <220>  
 <223> 重链可变结构域, <ANG-2>Ang2i\_LC06

[0017]

<400> 52

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr 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> 53

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链可变结构域, <ANG-2>Ang2i\_LC06

<400> 53

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

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

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

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

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

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

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

<210> 54

[0018]

<211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链CDR3, <ANG-2>Ang2i\_LC07

<400> 54

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

Ala Phe Asp Ile  
20

<210> 55  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链CDR2, <ANG-2>Ang2i\_LC07

<400> 55

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

Gly

<210> 56  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链CDR1, <ANG-2>Ang2i\_LC07

<400> 56

Gly	Tyr	Tyr	Met	His
1			5	

<210> 57  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR3, <ANG-2>Ang2i\_LC07

<400> 57

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

<210> 58  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR2, <ANG-2>Ang2i\_LC07

<400> 58

Asp	Asp	Ser	Glu	Arg	Pro	Ser
1			5			

[0019]

<210> 59  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR1, <ANG-2>Ang2i\_LC07

<400> 59

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

<210> 60  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链可变结构域, <ANG-2>Ang2i\_LC07

<400> 60

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

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

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

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

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

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

Ala	Arg	Ser	Pro	Asn	Pro	Tyr	Tyr	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> 61  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链可变结构域, <ANG-2>Ang2i\_LC07

<400> 61

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

Thr Ala Arg Val Ala Cys Gly Gly Asn Phe Ile Gly Gly Lys Ser Val

[0020]

20

25

30

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

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

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

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

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

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3, <ANG-2>Ang2k\_LC08

<400> 62

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

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR2, <ANG-2>Ang2k\_LC08

<400> 63

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

Gly

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR1, <ANG-2>Ang2k\_LC08

<400> 64

Ser Tyr Gly Met His  
 1 5

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链CDR3, <ANG-2>Ang2k\_LC08

[0021]

<400> 65  
 Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val  
 1 5 10

<210> 66  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR2, <ANG-2>Ang2k\_LC08

<400> 66  
 Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 67  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR1, <ANG-2>Ang2k\_LC08

<400> 67  
 Ser Gly Phe Ala Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Asn  
 1 5 10

<210> 68  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链可变结构域, <ANG-2> Ang2k\_LC08

<400> 68  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 69  
 <211> 112

[0022]

<212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链可变结构域, <ANG-2> Ang2k\_LC08

<400> 69

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

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

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

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

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

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

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

<210> 70

<211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链CDR3, <ANG-2> Ang2s\_LC09

<400> 70

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val  
 1 5

<210> 71

<211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链CDR2, <ANG-2> Ang2s\_LC09

<400> 71

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

Val Lys Gly

<210> 72

<211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链CDR1, <ANG-2> Ang2s\_LC09

[0023]

<400> 72

Asn Ala Trp Met Ser  
1 5

<210> 73

<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>

<223> 轻链CDR3, <ANG-2> Ang2s\_LC09

<400> 73

Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro  
1 5

<210> 74

<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>

<223> 轻链CDR2, <ANG-2> Ang2s\_LC09

<400> 74

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser  
1 5

<210> 75

<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>

<223> 轻链CDR1, <ANG-2> Ang2s\_LC09

<400> 75

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

<210> 76

<211> 119  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>

<223> 重链可变结构域, <ANG-2> Ang2s\_LC09

<400> 76

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

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

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

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

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

[0024]

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 77  
<211> 109  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 轻链可变结构域, <ANG-2> Ang2s\_LC09

<400> 77

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr  
100 105

<210> 78  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 重链CDR3, <ANG-2> Ang2i\_LC10

<400> 78

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

Ala Phe Asp Ile  
20

<210> 79  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 重链CDR2, <ANG-2> Ang2i\_LC10

<400> 79

[0025]

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

Gly

<210> 80  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链CDR1, <ANG-2> Ang2i\_LC10  
 <400> 80

Gly Tyr Tyr Met His  
 1 5

<210> 81  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR3, <ANG-2> Ang2i\_LC10  
 <400> 81

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

<210> 82  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR2, <ANG-2> Ang2i\_LC10  
 <400> 82

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 83  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 轻链CDR1, <ANG-2> Ang2i\_LC10  
 <400> 83

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

<210> 84  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 重链可变结构域, <ANG-2> Ang2i\_LC10  
 <400> 84

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

[0026]

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 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> 85

<211> 105

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链可变结构域, <ANG-2> Ang2i\_LC10

<400> 85

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln  
100 105

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

[0027]

<220>  
 <223> 重链CDR3, <ANG-2> Ang2k\_LC11  
 <400> 86  
 Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10 15  
 <210> 87  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 重链CDR2, <ANG-2> Ang2k\_LC11  
 <400> 87  
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 <210> 88  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 重链CDR1, <ANG-2> Ang2k\_LC11  
 <400> 88  
 Ser Tyr Gly Met His  
 1 5  
 <210> 89  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 轻链CDR3, <ANG-2> Ang2k\_LC11  
 <400> 89  
 Glu Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Pro Gly Val  
 1 5 10  
 <210> 90  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 轻链CDR2, <ANG-2> Ang2k\_LC11  
 <400> 90  
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
 1 5  
 <210> 91  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 轻链CDR1, <ANG-2> Ang2k\_LC11

[0028]

<400> 91

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

<210> 92  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 重链可变结构域, <ANG-2> Ang2k\_LC11

<400> 92

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 93  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 轻链可变结构域, <ANG-2> Ang2k\_LC11

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (98)..(98)  
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (102)..(102)  
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 93

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

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

[0029]

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

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

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

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

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

<210> 94

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR3, <VEGF>B20-4. 1

<400> 94

Trp Gly His Ser Thr Ser Pro Trp Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR2, <VEGF>B20-4. 1

<400> 95

Ala Ile Trp Pro Phe Gly Gly Tyr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链CDR1, <VEGF>B20-4. 1

<400> 96

Phe Ser Ile Asn Gly Ser Trp Ile  
1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链CDR3, <VEGF>B20-4. 1

<400> 97

Gln Gln Ser Asn Thr Ser Pro Leu Thr

[0030]

1 5

<210> 98  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 轻链CDR2, <VEGF>B20-4. 1

<400> 98

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5

<210> 99  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 轻链CDR1, <VEGF>B20-4. 1

<400> 99

Arg Ala Ser Gln Val Ile Arg Arg Ser Leu Ala  
1 5 10

<210> 100  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 重链可变结构域, <VEGF>B20-4. 1

<400> 100

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  
115

<210> 101  
<211> 108  
<212> PRT

[0031]

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链可变结构域, <VEGF>B20-4. 1

<400> 101

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 Arg  
100 105

<210> 102

<211> 730

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-贝伐单抗-LC06的贝伐单抗重链Ang2i\_LC06 scFv融合肽

<400> 102

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn 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 His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
115 120 125

[0032]

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140

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

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430

[0033]

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser  
 465 470 475 480

Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys  
 485 490 495

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln  
 500 505 510

Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser  
 515 520 525

Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr  
 530 535 540

Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg  
 545 550 555 560

Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr  
 565 570 575

Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp  
 580 585 590

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Pro  
 610 615 620

Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala  
 625 630 635 640

Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp  
 645 650 655

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp  
 660 665 670

Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser  
 675 680 685

Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu  
 690 695 700

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val  
 705 710 715 720

Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
 725 730

[0034]

<210> 103  
 <211> 727  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-贝伐单抗-LC08的贝伐单抗重链Ang2i\_LC08 scFv融合肽  
 <400> 103  
 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 Thr Phe Thr Asn 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 His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125  
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140  
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 145 150 155 160  
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205  
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255

[0035]

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser  
 465 470 475 480

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala  
 485 490 495

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln  
 500 505 510

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

Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
 530 535 540

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
 545 550 555 560

[0036]

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Thr Leu Asp Ile  
 565 570 575  
  
 Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 580 585 590  
  
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 595 600 605  
  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro  
 610 615 620  
  
 Pro Ser Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser  
 625 630 635 640  
  
 Gly Phe Ala Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln  
 645 650 655  
  
 Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Asn Asp Gln Arg  
 660 665 670  
  
 Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser  
 675 680 685  
  
 Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
 690 695 700  
  
 Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Cys  
 705 710 715 720  
  
 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 725  
  
 <210> 104  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
  
 <220>  
 <223> 贝伐单抗的轻链  
  
 <400> 104  
  
 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 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

[0037]

Thr Phe Gly Gln 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

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> 105  
 <211> 191  
 <212> PRT  
 <213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 105

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

[0038]

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> 106  
 <211> 504  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 带有导肽和His-tag的人血管生成素-2 (ANG-2)

<400> 106

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

[0039]



<211> 506  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 带有导肽和His-tag的人血管生成素-1 (ANG-1)  
 <400> 107

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser  
 180 185 190

Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu  
 195 200 205

Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr  
 210 215 220

Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala  
 225 230 235 240

Thr Thr Asn Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu Met Asp  
 245 250 255

Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu  
 260 265 270

[0041]

Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp  
 275 280 285

Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile  
 290 295 300

Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn  
 305 310 315 320

Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp  
 325 330 335

Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser  
 340 345 350

Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln  
 355 360 365

Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg  
 370 375 380

Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn  
 385 390 395 400

Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser  
 405 410 415

Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn  
 420 425 430

Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp  
 435 440 445

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

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

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

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

<210> 108  
 <211> 1124  
 <212> PRT  
 <213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 108

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

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

[0042]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0043]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Glu Leu Cys Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly Glu Gly  
 515 520 525

His Pro Gly Pro Val Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro  
 530 535 540

Pro Pro Arg Gly Leu Asn Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Thr Leu Asn  
 545 550 555 560

Leu Thr Trp Gln Pro Ile Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Val  
 565 570 575

Glu Val Glu Arg Arg Ser Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys  
 580 585 590

Val Pro Gly Asn Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu His Pro Arg  
 595 600 605

Glu Gln Tyr Val Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu  
 610 615 620

Trp Ser Glu Asp Leu Thr Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro  
 625 630 635 640

[0044]

Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val  
645 650 655

Ile Ser Trp Thr Ile Leu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Thr Ile  
660 665 670

Arg Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Val Asp Val Lys  
675 680 685

Ile Lys Asn Ala Thr Ile Thr Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro  
690 695 700

Glu Thr Ala Tyr Gln Val Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser  
705 710 715 720

Ser Asn Pro Ala Phe Ser His Glu Leu Val Thr Leu Pro Glu Ser Gln  
725 730 735

Ala Pro Ala Asp Leu Gly Gly Lys Met Leu Leu Ile Ala Ile Leu  
740 745 750

Gly Ser Ala Gly Met Thr Cys Leu Thr Val Leu Leu Ala Phe Leu Ile  
755 760 765

Ile Leu Gln Leu Lys Arg Ala Asn Val Gln Arg Arg Met Ala Gln Ala  
770 775 780

Phe Gln Asn Val Arg Glu Glu Pro Ala Val Gln Phe Asn Ser Gly Thr  
785 790 795 800

Leu Ala Leu Asn Arg Lys Val Lys Asn Asn Pro Asp Pro Thr Ile Tyr  
805 810 815

Pro Val Leu Asp Trp Asn Asp Ile Lys Phe Gln Asp Val Ile Gly Glu  
820 825 830

Gly Asn Phe Gly Gln Val Leu Lys Ala Arg Ile Lys Lys Asp Gly Leu  
835 840 845

Arg Met Asp Ala Ala Ile Lys Arg Met Lys Glu Tyr Ala Ser Lys Asp  
850 855 860

Asp His Arg Asp Phe Ala Gly Glu Leu Glu Val Leu Cys Lys Leu Gly  
865 870 875 880

His His Pro Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Glu His Arg Gly  
885 890 895

Tyr Leu Tyr Leu Ala Ile Glu Tyr Ala Pro His Gly Asn Leu Leu Asp  
900 905 910

Phe Leu Arg Lys Ser Arg Val Leu Glu Thr Asp Pro Ala Phe Ala Ile  
915 920 925

Ala Asn Ser Thr Ala Ser Thr Leu Ser Ser Gln Gln Leu Leu His Phe  
930 935 940

[0045]

Ala Ala Asp Val Ala Arg Gly Met Asp Tyr Leu Ser Gln Lys Gln Phe  
945 950 955 960

Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn Tyr  
965 970 975

Val Ala Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ser Arg Gly Gln Glu Val Tyr  
980 985 990

Val Lys Lys Thr Met Gly Arg Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Ile Glu  
995 1000 1005

Ser Leu Asn Tyr Ser Val Tyr Thr Thr Asn Ser Asp Val Trp Ser  
1010 1015 1020

Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Val Ser Leu Gly Gly Thr Pro  
1025 1030 1035

Tyr Cys Gly Met Thr Cys Ala Glu Leu Tyr Glu Lys Leu Pro Gln  
1040 1045 1050

Gly Tyr Arg Leu Glu Lys Pro Leu Asn Cys Asp Asp Glu Val Tyr  
1055 1060 1065

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

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

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

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

<210> 109

<211> 946

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 双特异性，四价单链Fab <VEGF-ANG-2>抗体分子scFab-阿瓦斯丁-LC06-2620的重链1

<400> 109

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn 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

[0046]

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140

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

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380

[0047]

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gln  
 450 455 460

Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr  
 465 470 475 480

Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His  
 485 490 495

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp  
 500 505 510

Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn  
 515 520 525

Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp  
 530 535 540

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr  
 545 550 555 560

Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala  
 565 570 575

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 580 585 590

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 595 600 605

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 610 615 620

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 625 630 635 640

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 645 650 655

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 660 665 670

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

[0048]

675

680

685

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 690 695 700

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu  
 705 710 715 720

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
 725 730 735

Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
 740 745 750

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr  
 755 760 765

Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr  
 770 775 780

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp  
 785 790 795 800

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp  
 805 810 815

Ser Ser Gly Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
 820 825 830

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 835 840 845

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 850 855 860

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 865 870 875 880

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 885 890 895

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 900 905 910

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 915 920 925

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 930 935 940

Thr His  
 945

<210> 110  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

[0049]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 双特异性，四价单链Fab &lt;VEGF-ANG-2&gt;抗体分子scFab-阿瓦斯丁-LC06-2620的轻链

&lt;400&gt; 110

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	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	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					

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				

&lt;210&gt; 111

&lt;211&gt; 956

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 双特异性，四价单链Fab &lt;VEGF-ANG-2&gt;抗体分子scFab-阿瓦斯丁-Ang2i-LC06-2640的重链1

&lt;400&gt; 111

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

[0050]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn 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 His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140

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

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

[0051]

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro  
 465 470 475 480

Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly  
 485 490 495

Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 500 505 510

Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
 515 520 525

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr  
 530 535 540

Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 545 550 555 560

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr  
 565 570 575

Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
 580 585 590

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
 595 600 605

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
 610 615 620

[0052]

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
625 630 635 640

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
645 650 655

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
660 665 670

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
675 680 685

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly  
690 695 700

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly  
705 710 715 720

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
725 730 735

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
740 745 750

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
755 760 765

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
770 775 780

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
785 790 795 800

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
805 810 815

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr  
820 825 830

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser  
835 840 845

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser  
850 855 860

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp  
865 870 875 880

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
885 890 895

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
900 905 910

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln  
915 920 925

[0053]

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp  
930 935 940

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
945 950 955

<210> 112  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 双特异性，四价单链Fab <VEGF-ANG-2>抗体分子scFab-阿瓦斯丁-Ang2i-LC06-2640的轻链  
<400> 112

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 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 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

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> 113  
<211> 956

[0054]

<212> PRT  
 <213> 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 双特异性，四价单链Fab &lt;VEGF-ANG-2&gt;抗体分子scFab-阿瓦斯丁-Ang2i-LC06-2641的重链1

&lt;400&gt; 113

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	Thr	Phe	Thr	Asn	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	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
					100			105			110				

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
					115			120			125				

Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
					130			135			140				

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

Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
					165			170			175				

Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
					180			185			190				

Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
						195			200		205				

Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys
						210			215			220			

Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
					225			230		235		240			

Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
					245			250			255				

Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
						260			265			270			

[0055]

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro  
 465 470 475 480

Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly  
 485 490 495

Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 500 505 510

Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
 515 520 525

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr  
 530 535 540

Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 545 550 555 560

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr  
 565 570 575

[0056]

Lys	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe
580							585						590		
Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys
595						600					605				
Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val
610						615				620					
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln
625					630				635			640			
Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser
645							650				655				
Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His
660							665				670				
Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys
675						680				685					
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
690						695			700						
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly		
705						710			715			720			
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
725								730					735		
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr
740								745				750			
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Cys	Leu	Glu	Trp	Met
755								760			765				
Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
770							775			780					
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
785							790			795			800		
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
805								810					815		
Ala	Arg	Ser	Pro	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	
820								825			830				
Pro	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser
835							840				845				
Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
850							855				860				
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
865							870			875			880		

[0057]

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
885 890 895

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
900 905 910

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln  
915 920 925

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp  
930 935 940

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
945 950 955

<210> 114

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 双特异性，四价单链Fab <VEGF-ANG-2>抗体分子scFab-阿瓦斯丁-Ang2i-LC06-2641的轻链

<400> 114

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 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 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

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

[0058]

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> 115  
<211> 946  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 双特异性，三价单链Fab <VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-KiH-C-scFab的重链1

<400> 115

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 Thr Phe Thr Asn 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 His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
130 135 140

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

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
210 215 220

[0059]

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln  
 450 455 460

Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr  
 465 470 475 480

Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His  
 485 490 495

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp  
 500 505 510

Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn  
 515 520 525

[0060]

Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp  
 530 535 540  
 Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr  
 545 550 555 560  
 Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala  
 565 570 575  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 580 585 590  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 595 600 605  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 610 615 620  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 625 630 635 640  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 645 650 655  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 660 665 670  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 675 680 685  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 690 695 700  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu  
 705 710 715 720  
 Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
 725 730 735  
 Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
 740 745 750  
 Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr  
 755 760 765  
 Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr  
 770 775 780  
 Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp  
 785 790 795 800  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Asp  
 805 810 815  
 Ser Ser Gly Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
 820 825 830

[0061]

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 835 840 845

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 850 855 860

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 865 870 875 880

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 885 890 895

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 900 905 910

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 915 920 925

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 930 935 940

Thr His  
 945

<210> 116  
 <211> 453  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 双特异性，三价单链Fab <VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-KiH-C-scFab的重链2

<400> 116

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 Thr Phe Thr Asn 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 His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125

[0062]

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140

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

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350

Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365

Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu  
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430

[0063]

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 117  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 双特异性，三价单链Fab<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-KiH-C-scFab的轻链

<400> 117

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 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 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

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> 118

[0064]

<211> 698  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 双特异性，三价<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-C-Fab-6CSS的重链1  
 <400> 118  
 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 Thr Phe Thr Asn 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 His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125  
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140  
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 145 150 155 160  
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205  
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

[0065]

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285  
  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300  
  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320  
  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335  
  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350  
  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365  
  
 Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380  
  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400  
  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 405 410 415  
  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430  
  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445  
  
 Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 450 455 460  
  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 465 470 475 480  
  
 Gly Gly Ser Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala  
 485 490 495  
  
 Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser  
 500 505 510  
  
 Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu  
 515 520 525  
  
 Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe  
 530 535 540  
  
 Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val  
 545 550 555 560  
  
 Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser  
 565 570 575

[0066]

Ser Asp His Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg  
580 585 590

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
595 600 605

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Asn Asn Phe Tyr  
610 615 620

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
625 630 635 640

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
645 650 655

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
660 665 670

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
675 680 685

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
690 695

<210> 119

<211> 719

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 双特异性，三价<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-C-Fab-6CSS的重链2

<400> 119

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn 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 His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
115 120 125

[0067]

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140

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

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350

Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365

Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu  
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430

[0068]

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 465 470 475 480

Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 485 490 495

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 500 505 510

Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu  
 515 520 525

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala  
 530 535 540

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser  
 545 550 555 560

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val  
 565 570 575

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly  
 580 585 590

Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val  
 595 600 605

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
 610 615 620

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 625 630 635 640

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
 645 650 655

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 660 665 670

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
 675 680 685

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
 690 695 700

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
 705 710 715

<210> 120  
 <211> 214  
 <212> PRT

[0069]

<213> 人工的

<220>

<223> 双特异性，三价<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-C-Fab-6CSS的轻链

<400> 120

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 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 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

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> 121

<211> 459

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 双特异性，二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-CH1-CL的重链1

<400> 121

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

[0070]

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 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 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser			
130	135	140	
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp			
145	150	155	160
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr			
165	170	175	
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr			
180	185	190	
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln			
195	200	205	
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp			
210	215	220	
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro			
225	230	235	240
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro			
245	250	255	
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			
260	265	270	
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn			
275	280	285	
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg			
290	295	300	
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val			

[0071]

[0072]

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  
 145 150 155 160

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 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 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 225 230 235 240

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 245 250 255

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 260 265 270

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 275 280 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 325 330 335

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 340 345 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
 355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 385 390 395 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 405 410 415

[0073]

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
450 455

<210> 123

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 双特异性，二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-CH1-CL的轻链1

<400> 123

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

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

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

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

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

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

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala  
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser  
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu  
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
195 200 205

[0074]

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 124  
<211> 212  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 双特异性，二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-CH1-CL的轻链2

<400> 124

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 Cys 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 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  
210

<210> 125  
<211> 459  
<212> PRT  
<213> 人工的

[0075]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 双特异性，二价结构域交换的&lt;VEGF-ANG-2&gt;抗体分子阿瓦斯丁-LC06-VH-VL的重链1

&lt;400&gt; 125

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

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr
								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	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	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
						130		135			140				

Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
145					150				155			160			

Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
					165			170			175				

Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
						180		185			190				

Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
						195		200			205				

Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
					210		215			220					

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

Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
						245		250			255				

Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
					260			265			270				

Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[0076]

275	280	285
-----	-----	-----

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp  
355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe  
370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
405 410 415

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
450 455

<210> 126

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 双特异性，二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-VH-VL的重链2

<400> 126

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 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

[0077]

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 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile 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 His 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

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 325 330 335

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
 340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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

[0078]

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435

<210> 127

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 双特异性，二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06- VH-VL的轻链1

<400> 127

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

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

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

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

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

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

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala  
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser  
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu  
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
180 185 190

[0079]

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 128

<211> 230

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 双特异性，二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06- VH-VL的轻链2

<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 Tyr Thr Phe Thr Asn 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 His Tyr Tyr Gly Ser 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  
145 150 155 160

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
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

[0080]

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230

<210> 129  
<211> 459  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 双特异性，二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-VH-VL-SS的重链1

<400> 129

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys 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 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser  
130 135 140

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp  
145 150 155 160

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
165 170 175

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln  
195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp  
210 215 220

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

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro

[0081]

245

250

255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
 275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp  
 355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 405 410 415

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455

<210> 130

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 双特异性，二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-VH-VL-SS的重链2

<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 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

[0082]

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 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile 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 His 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

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 325 330 335

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
 340 345 350

[0083]

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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 His Tyr Thr Gln Lys Ser  
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435

<210> 131

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 双特异性，二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06- VH-VL-SS的轻链1

<400> 131

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

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

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

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

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

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

Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala  
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser  
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu  
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
145 150 155 160

[0084]

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 132  
 <211> 230  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 双特异性，二价结构域交换的<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06- VH-VL-SS的轻链2

<400> 132

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 Thr Phe Thr Asn 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 His Tyr Tyr Gly Ser 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  
 145 150 155 160

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 165 170 175

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 180 185 190

[0085]

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> 133  
 <211> 706  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 双特异性，二价ScFab-Fc融合<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-N-scFab的重链1

<400> 133

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

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

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

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

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

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

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala  
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser  
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu  
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

[0086]

210

215

220

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala  
 245 250 255

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
 260 265 270

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 275 280 285

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly  
 290 295 300

Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp  
 305 310 315 320

Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp  
 325 330 335

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr  
 340 345 350

Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
 355 360 365

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 370 375 380

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 385 390 395 400

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 405 410 415

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 420 425 430

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 435 440 445

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 450 455 460

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 465 470 475 480

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 485 490 495

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 500 505 510

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

[0087]

515

520

525

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 530 535 540

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 545 550 555 560

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 565 570 575

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 580 585 590

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 595 600 605

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 610 615 620

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 625 630 635 640

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 645 650 655

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 660 665 670

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 675 680 685

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 690 695 700

Gly Lys  
 705

<210> 134

<211> 699

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 双特异性，二价ScFab-Fc融合<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-N-scFab的重链2

<400> 134

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 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

[0088]

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 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

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 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly  
 245 250 255

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
 260 265 270

Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
 275 280 285

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro  
 290 295 300

Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr  
 305 310 315 320

Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 325 330 335

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser  
 340 345 350

His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 355 360 365

[0089]

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser  
 370 375 380  
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp  
 385 390 395 400  
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
 405 410 415  
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
 420 425 430  
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln  
 435 440 445  
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp  
 450 455 460  
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
 465 470 475 480  
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 485 490 495  
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 500 505 510  
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
 515 520 525  
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 530 535 540  
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 545 550 555 560  
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 565 570 575  
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 580 585 590  
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 595 600 605  
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe  
 610 615 620  
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 625 630 635 640  
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 645 650 655  
 Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 660 665 670

[0090]

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
675 680 685

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
690 695

<210> 135  
<211> 706  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 双特异性，二价ScFab-Fc融合<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-N-scFabSS的重链1  
<400> 135

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

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

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

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

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

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

Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala  
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser  
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu  
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
210 215 220

[0091]

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala  
 245 250 255  
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
 260 265 270  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 275 280 285  
 Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly  
 290 295 300  
 Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp  
 305 310 315 320  
 Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp  
 325 330 335  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr  
 340 345 350  
 Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
 355 360 365  
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 370 375 380  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 385 390 395 400  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 405 410 415  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 420 425 430  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 435 440 445  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 450 455 460  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 465 470 475 480  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 485 490 495  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 500 505 510  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 515 520 525

[0092]

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
530 535 540

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
545 550 555 560

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
565 570 575

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
580 585 590

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
595 600 605

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
610 615 620

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
625 630 635 640

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
645 650 655

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
660 665 670

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
675 680 685

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
690 695 700

Gly Lys  
705

<210> 136

<211> 699

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 双特异性，二价ScFab-Fc融合<VEGF-ANG-2>抗体分子阿瓦斯丁-LC06-N-scFabSS的重链2

<400> 136

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 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

[0093]

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Cys 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

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 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly  
 245 250 255

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
 260 265 270

Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
 275 280 285

Lys Cys Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro  
 290 295 300

Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr  
 305 310 315 320

Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 325 330 335

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser  
 340 345 350

His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 355 360 365

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser  
 370 375 380

[0094]

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp  
385 390 395 400

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
405 410 415

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
420 425 430

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln  
435 440 445

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp  
450 455 460

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
465 470 475 480

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
485 490 495

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
500 505 510

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
515 520 525

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
530 535 540

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
545 550 555 560

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
565 570 575

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
580 585 590

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
595 600 605

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe  
610 615 620

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
625 630 635 640

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
645 650 655

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
660 665 670

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
675 680 685

[0095]

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
690 695

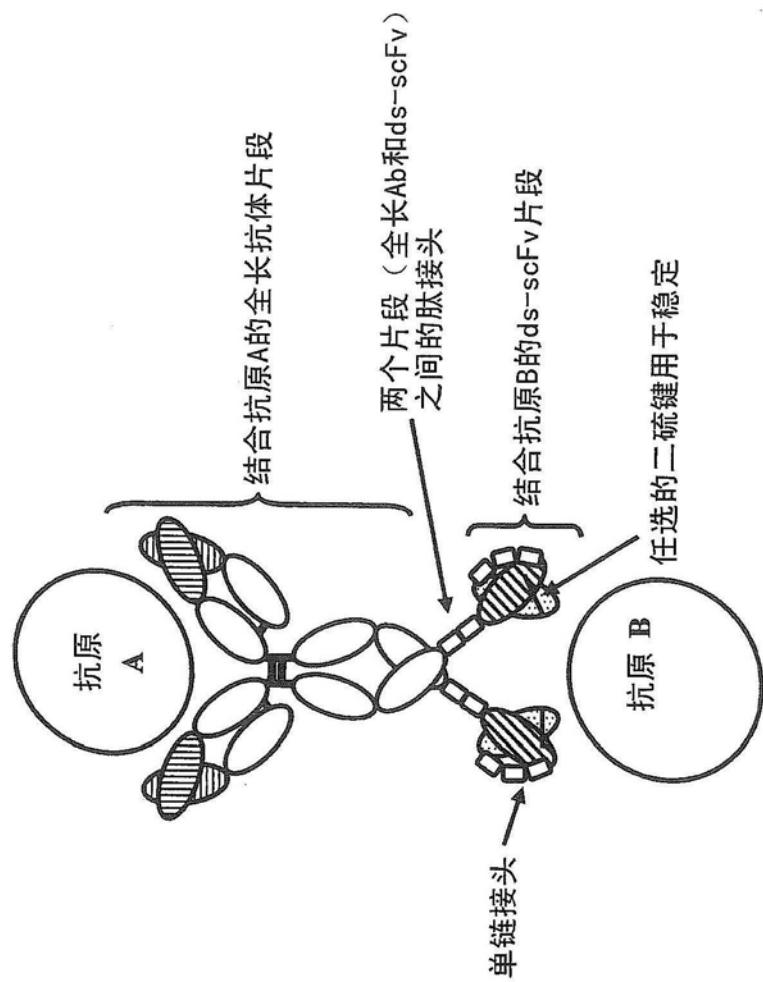


图 1A

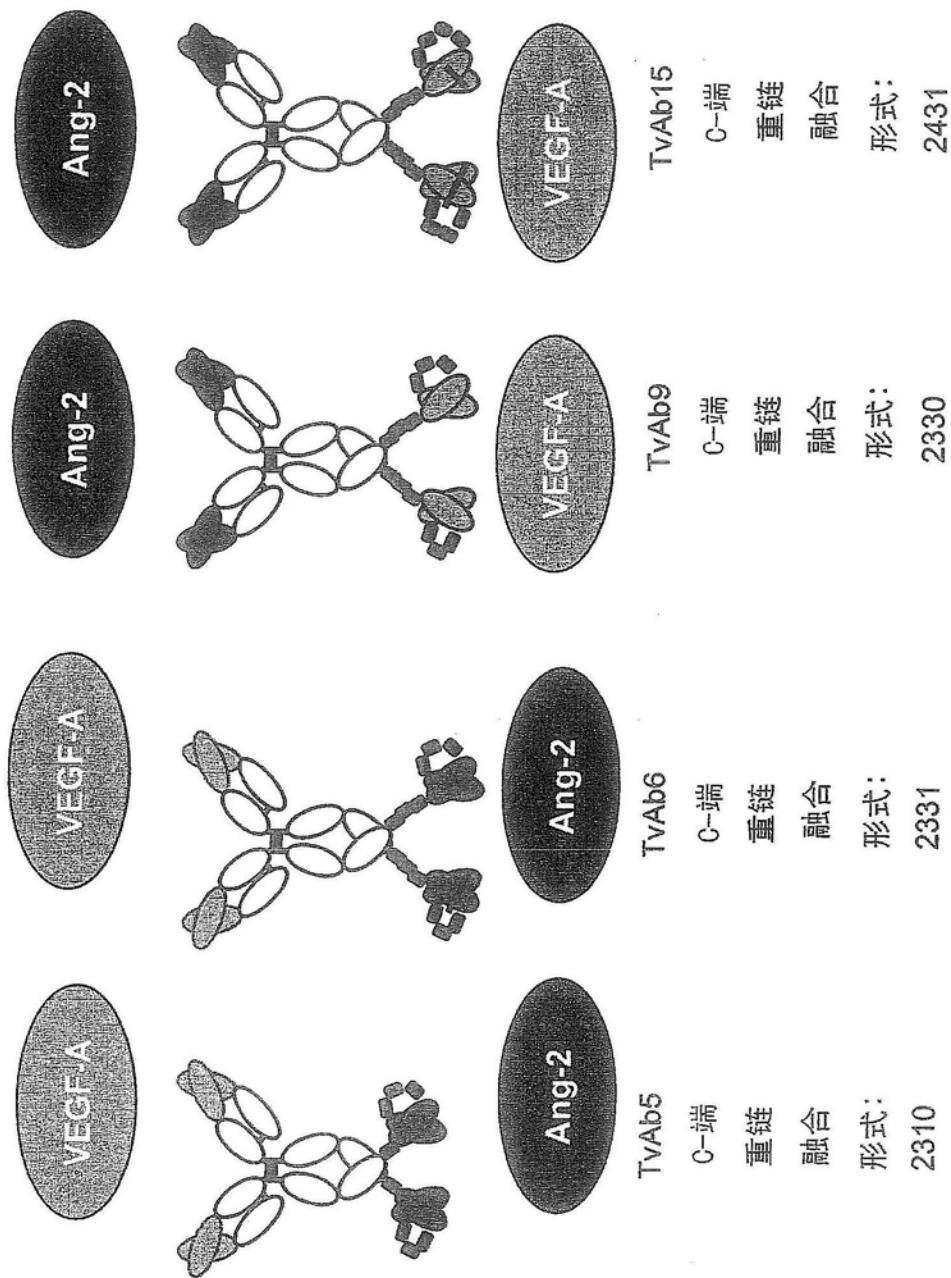


图 1B

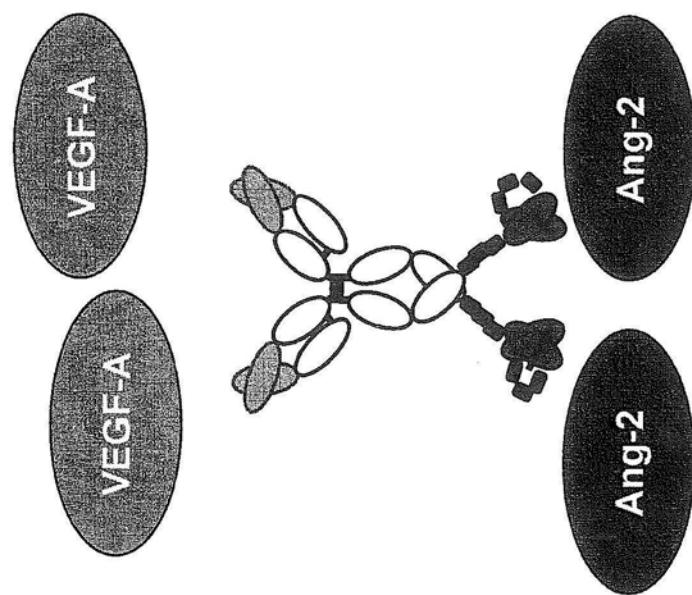


图 2A

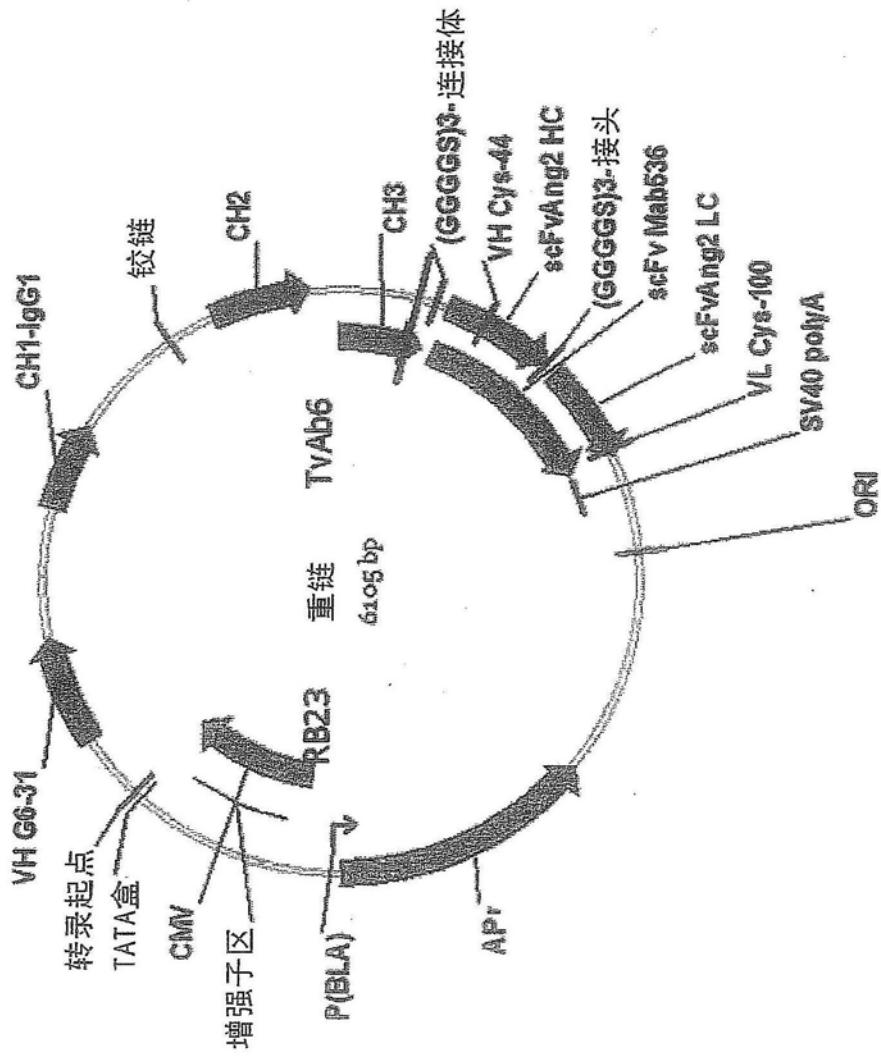


图 2B- 第一部分

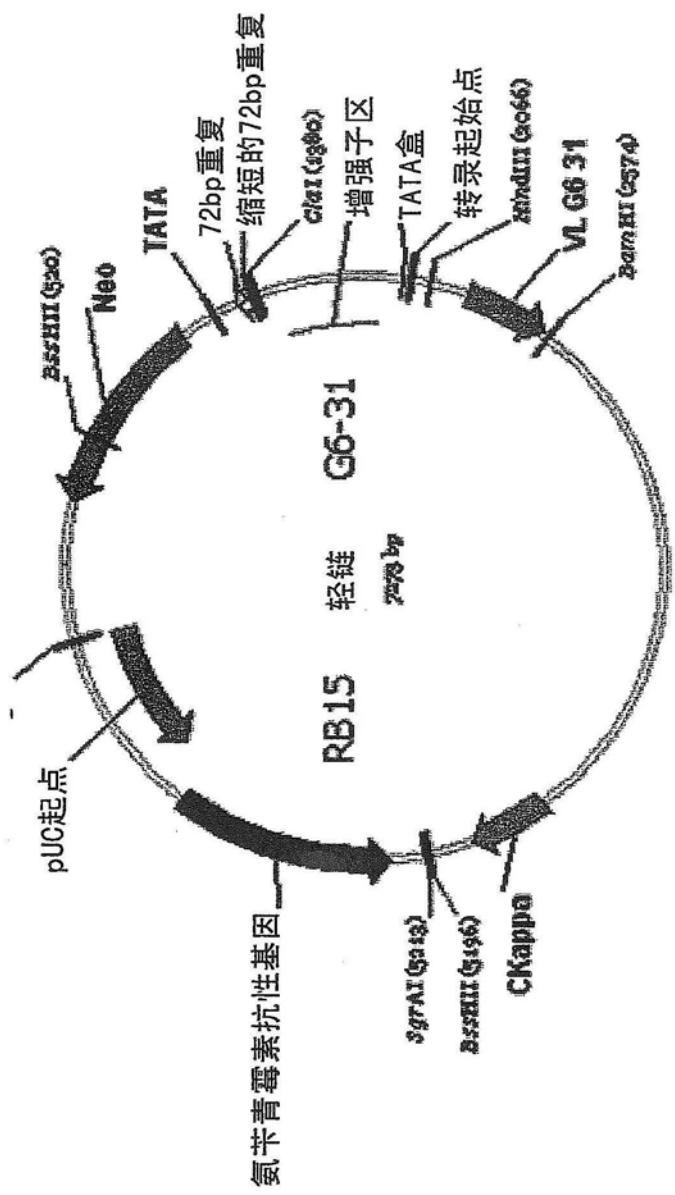


图 2B- 第二部分

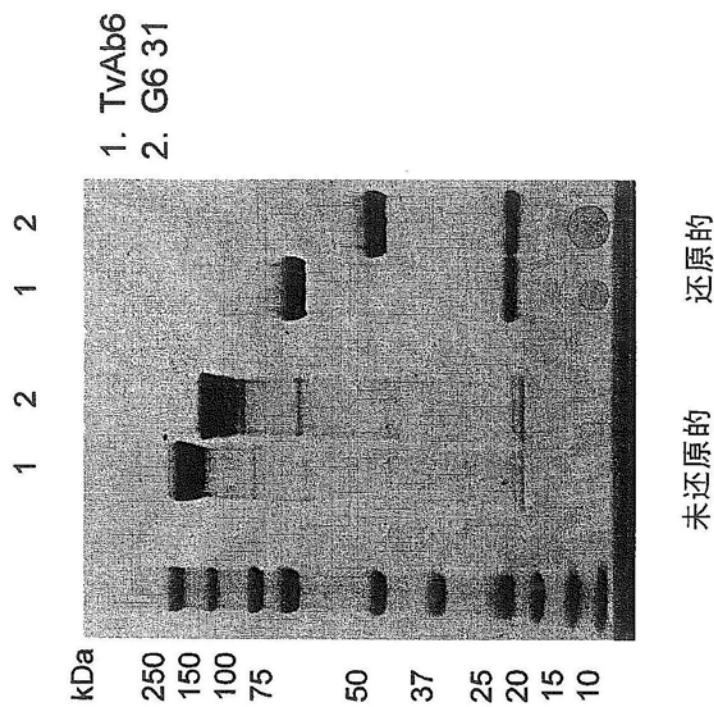
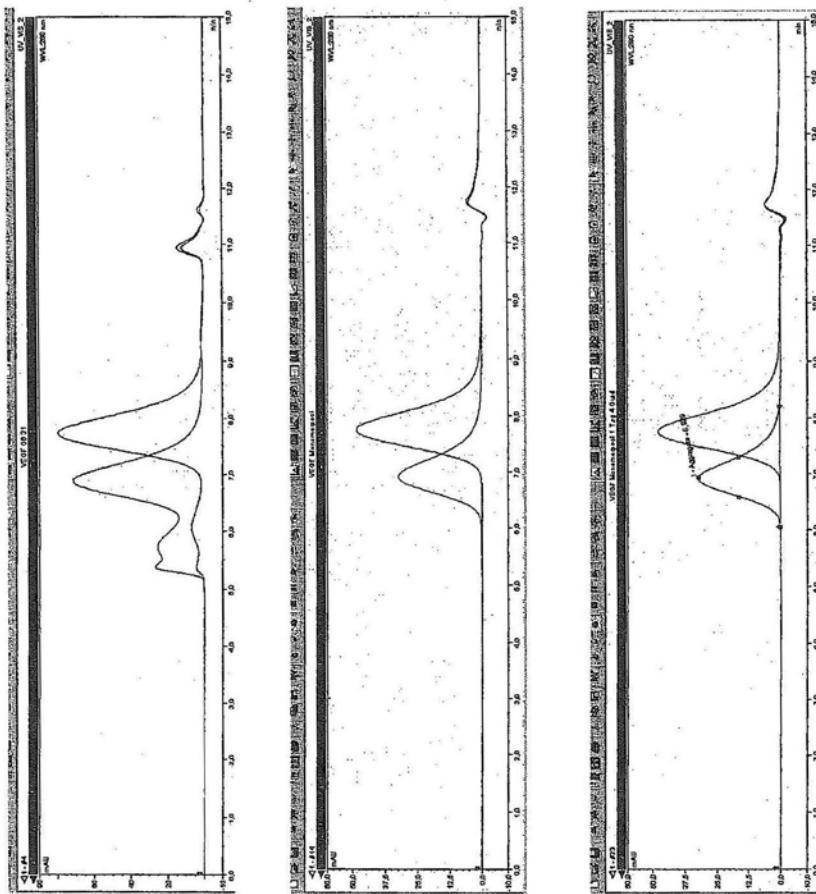


图 3



1. 蛋白A库  
G6-31: 10 % 凝集物  
TvAb6: 25 % 凝集物

2. SEC库, 纯化后  
G6-31: > 99 % 单体  
TvAb6: > 99 % 单体

3. SEC库, 在4°C 24小时后  
G6-31: > 99 % 单体  
TvAb6: > 99 % 单体

图 4

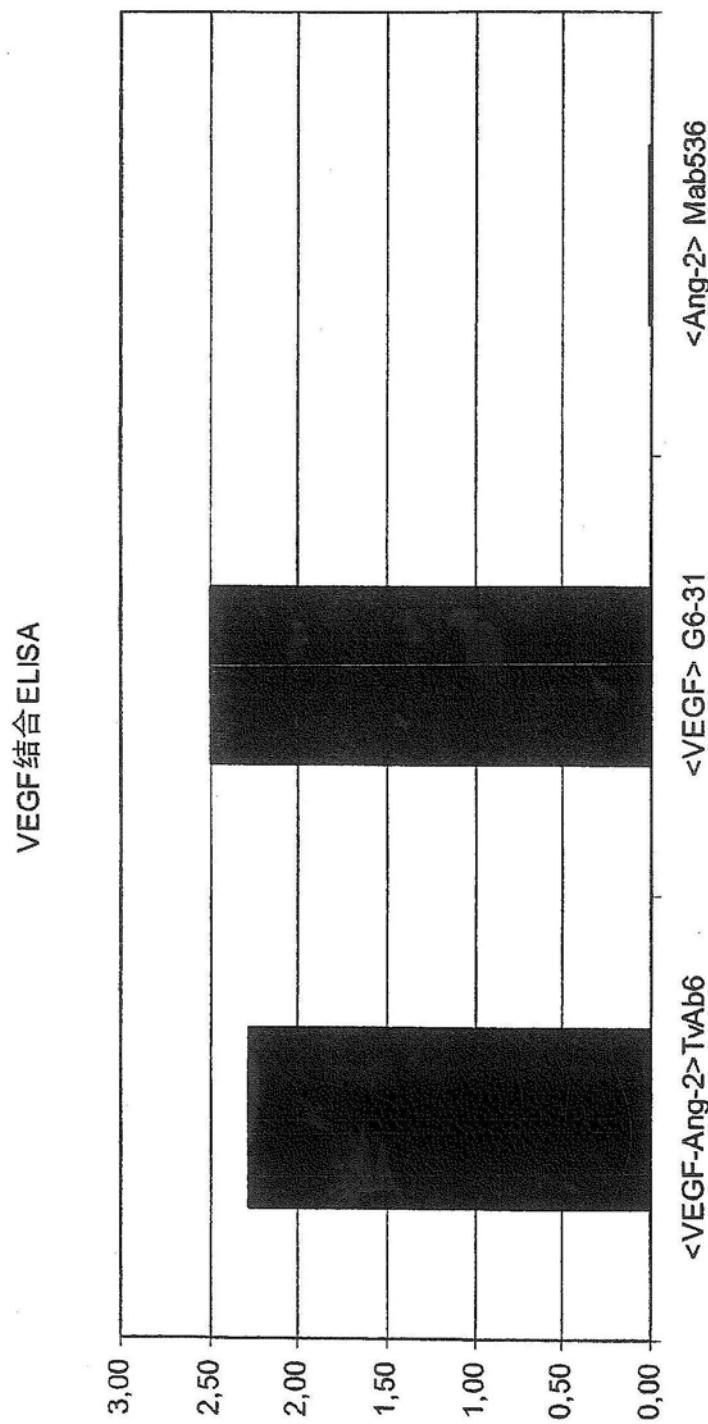


图 5- 第一部分

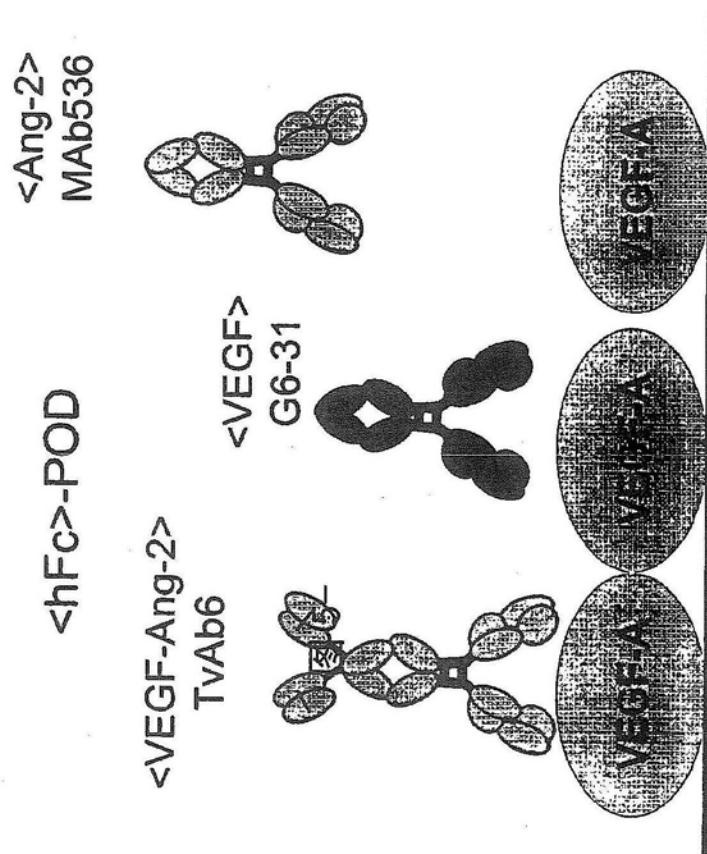


图 5- 第二部分

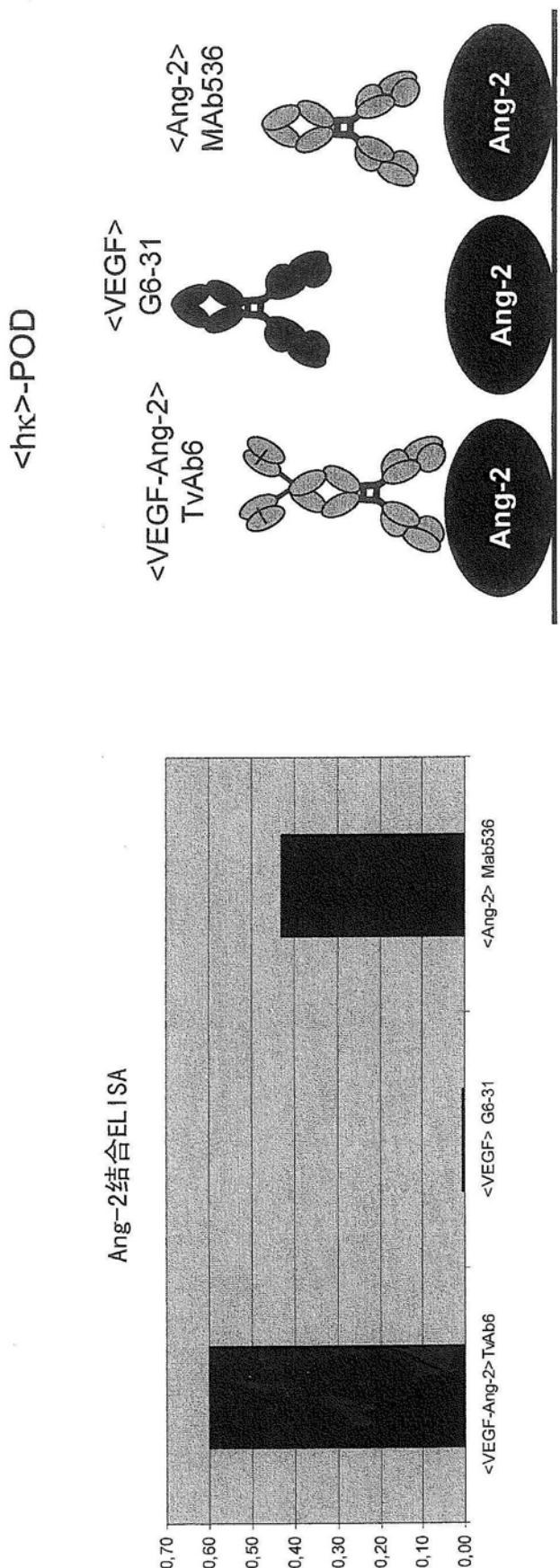


图 6A

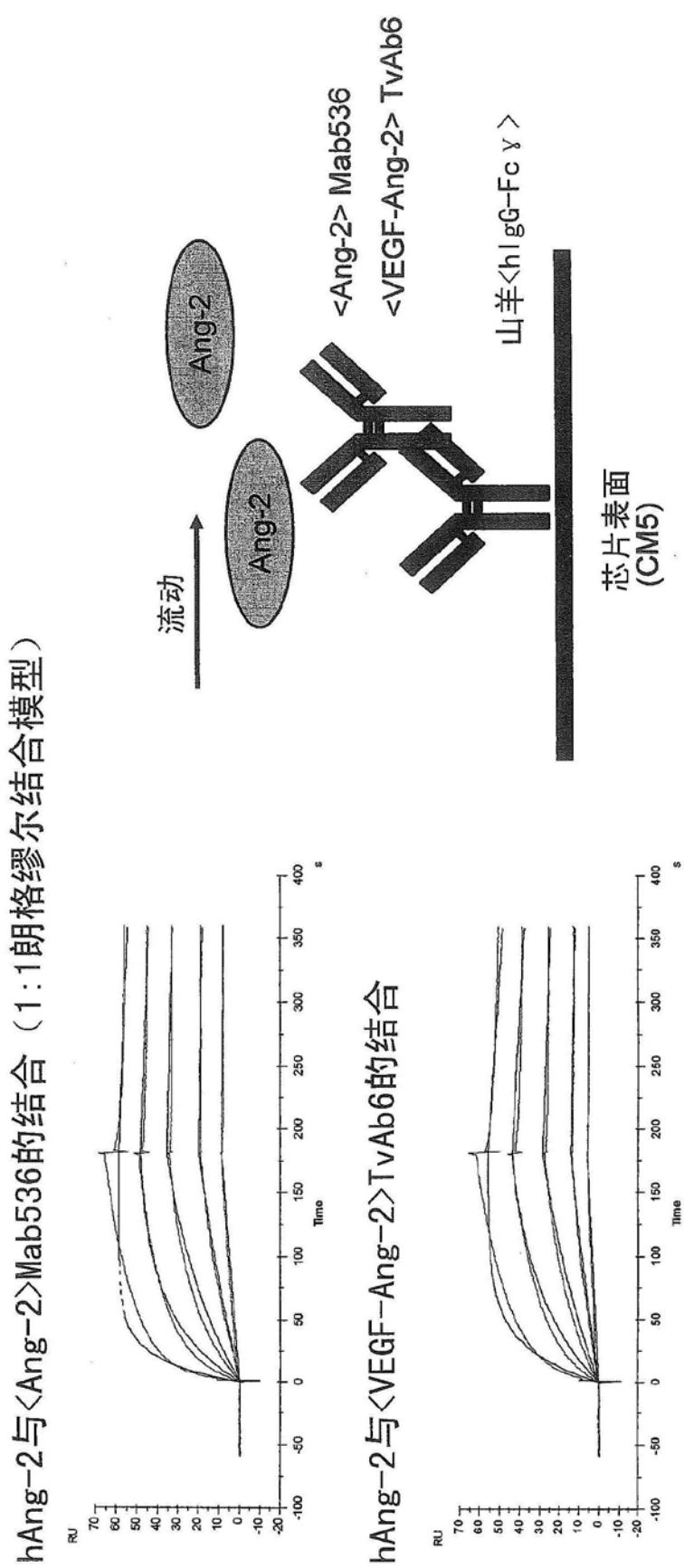


图 6B

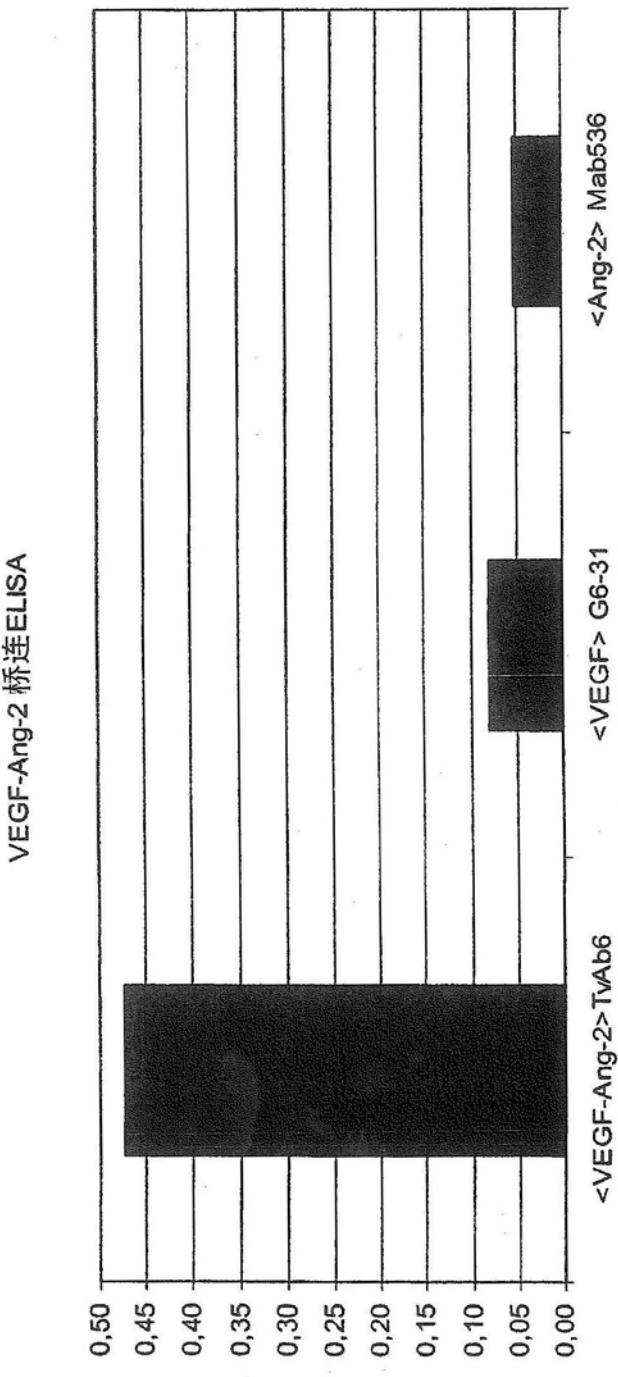


图 7- 第一部分

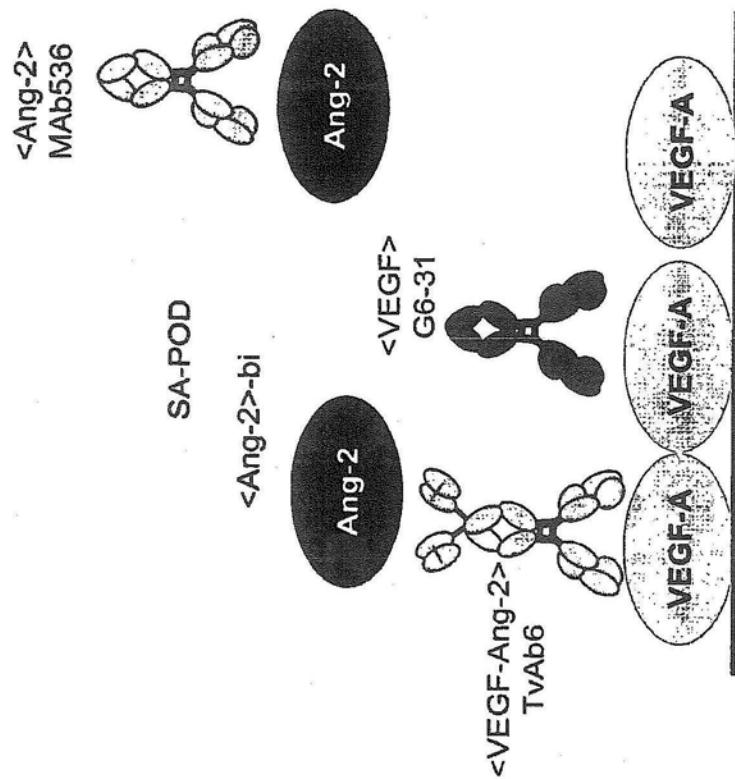


图 7- 第二部分

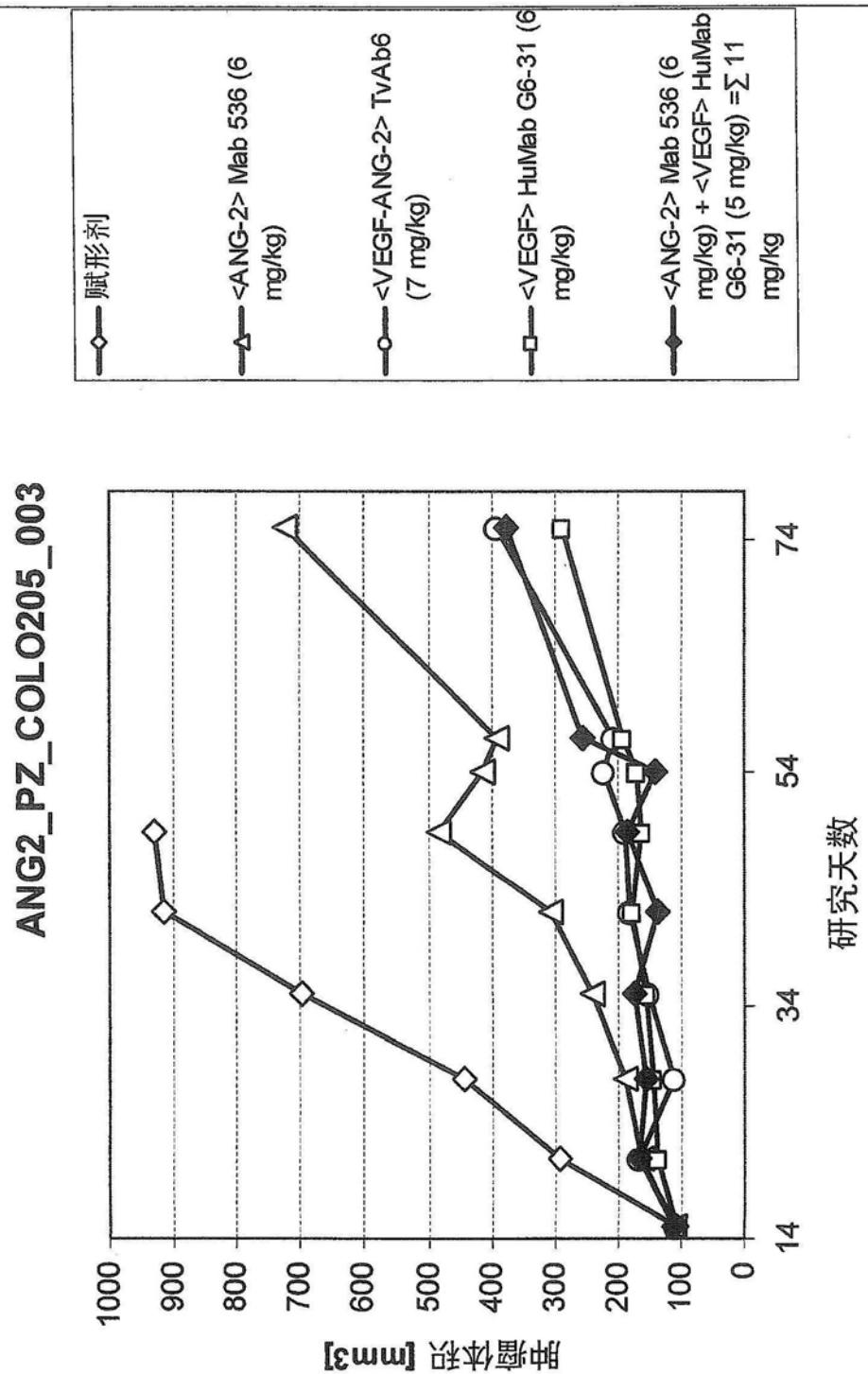


图 8a

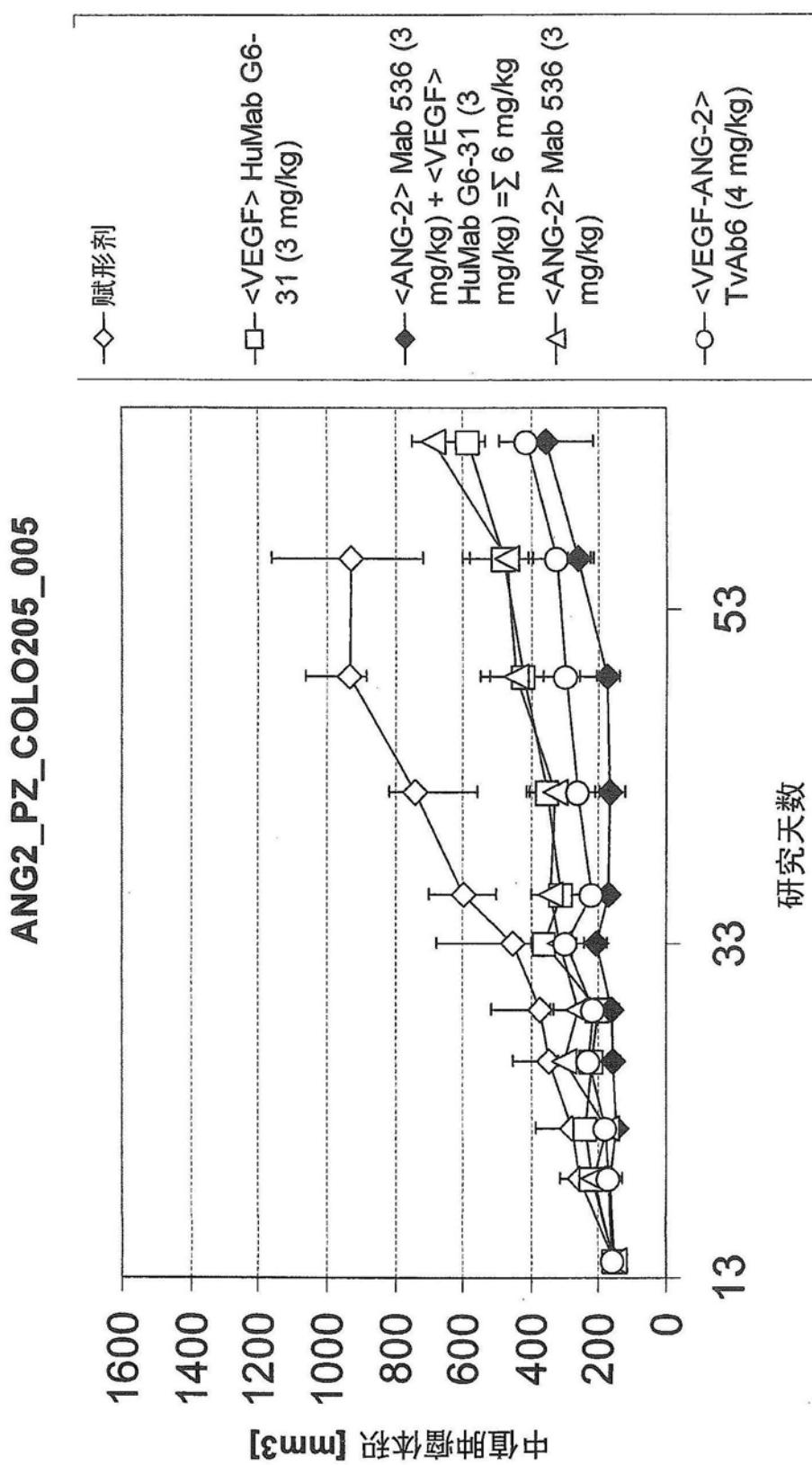


图 8b

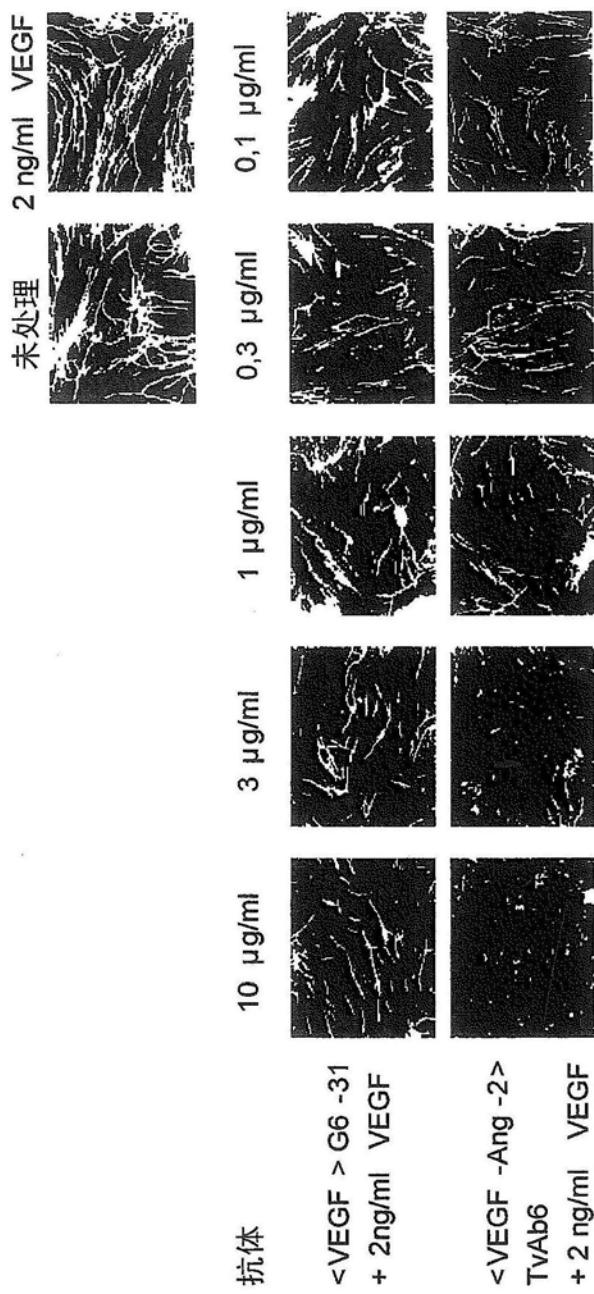


图 9

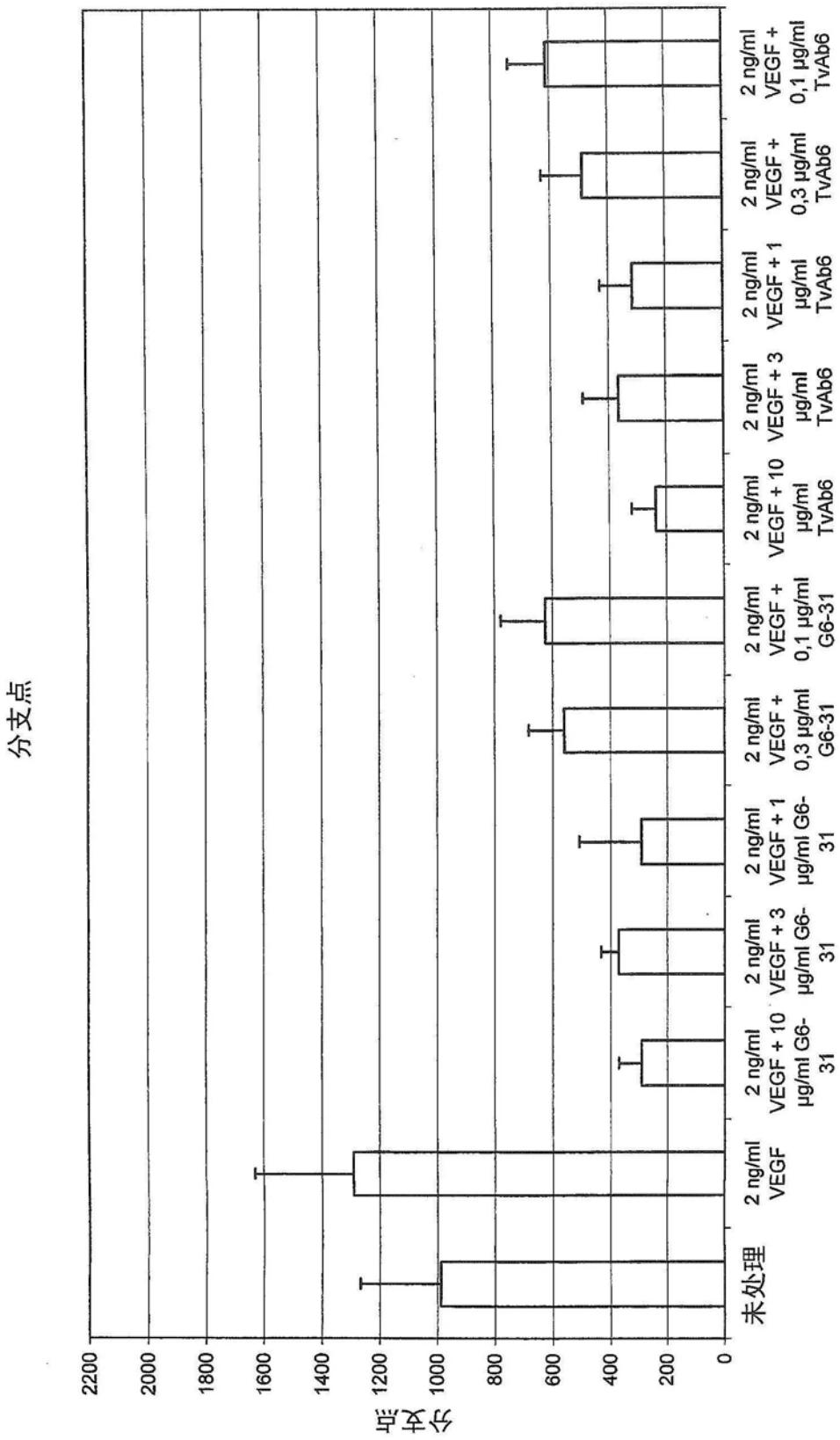


图 10A

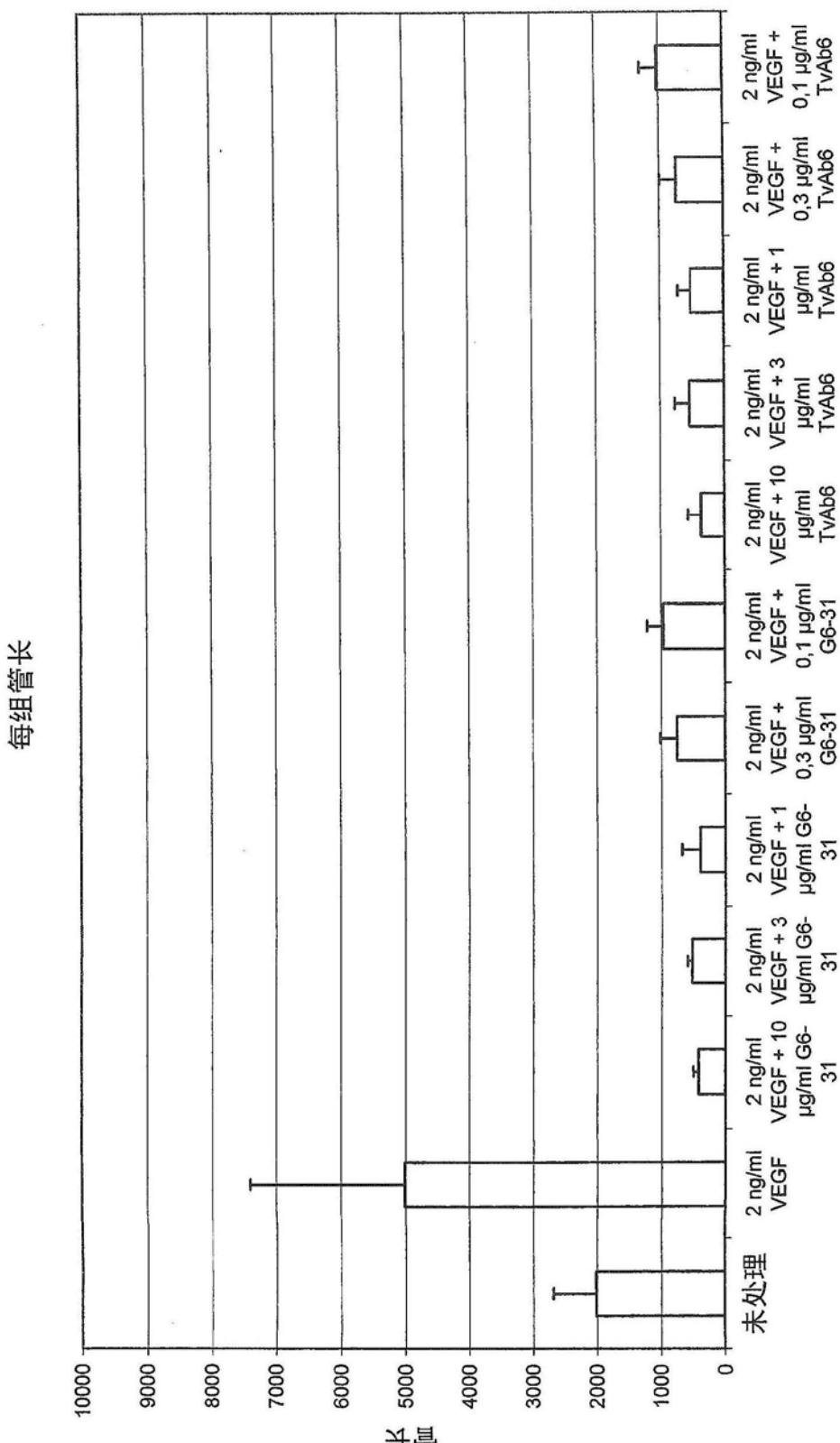


图 10B

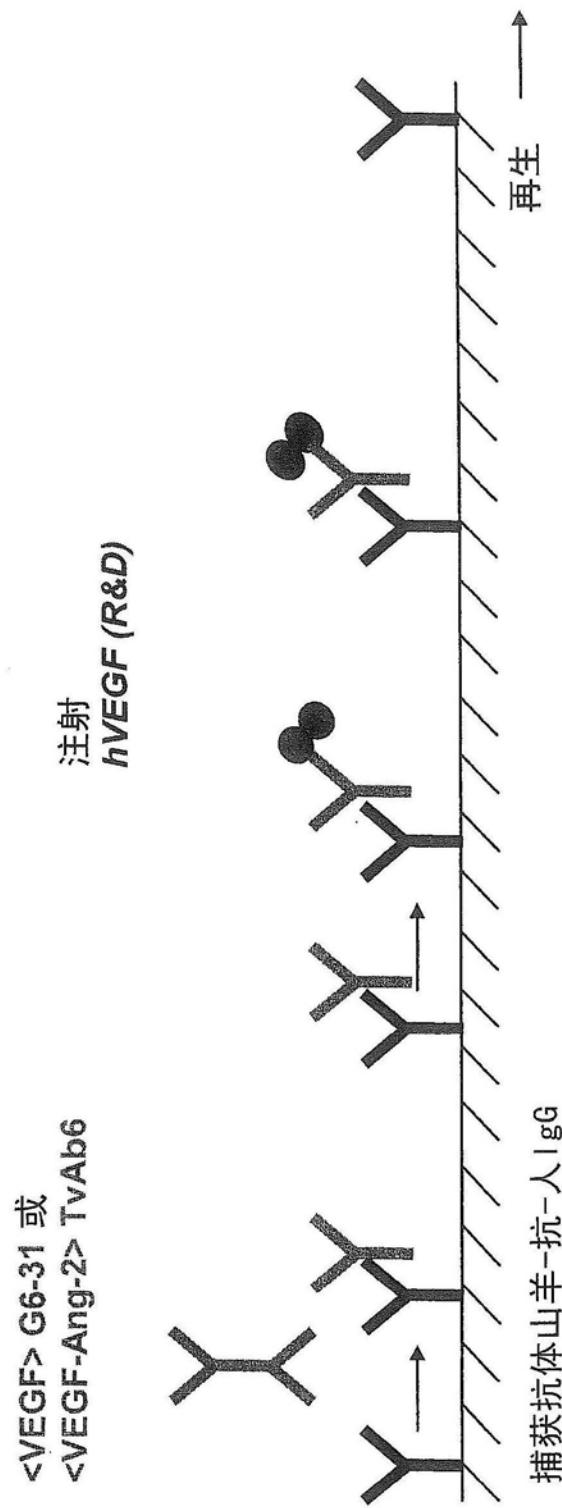
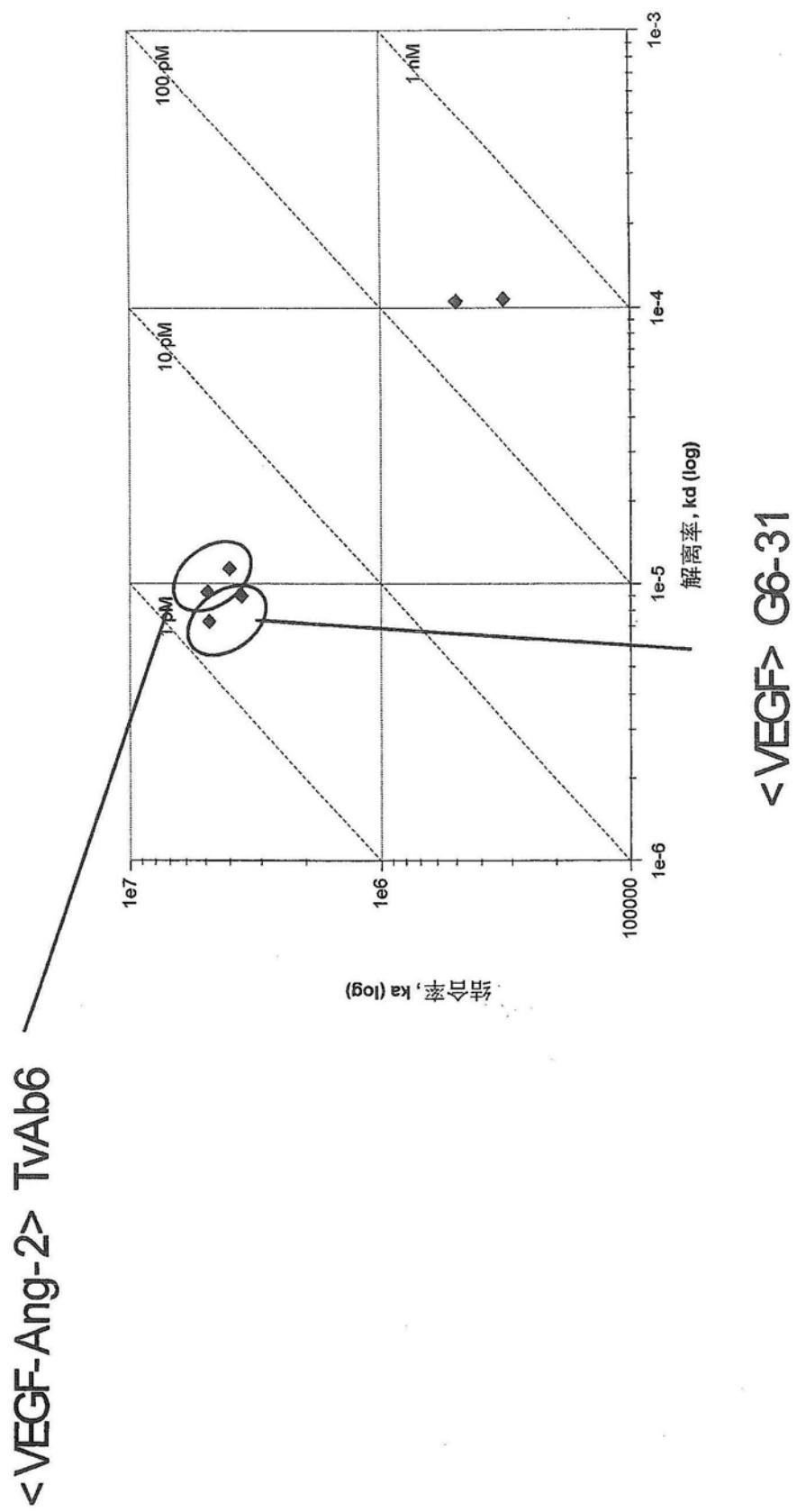


图 11



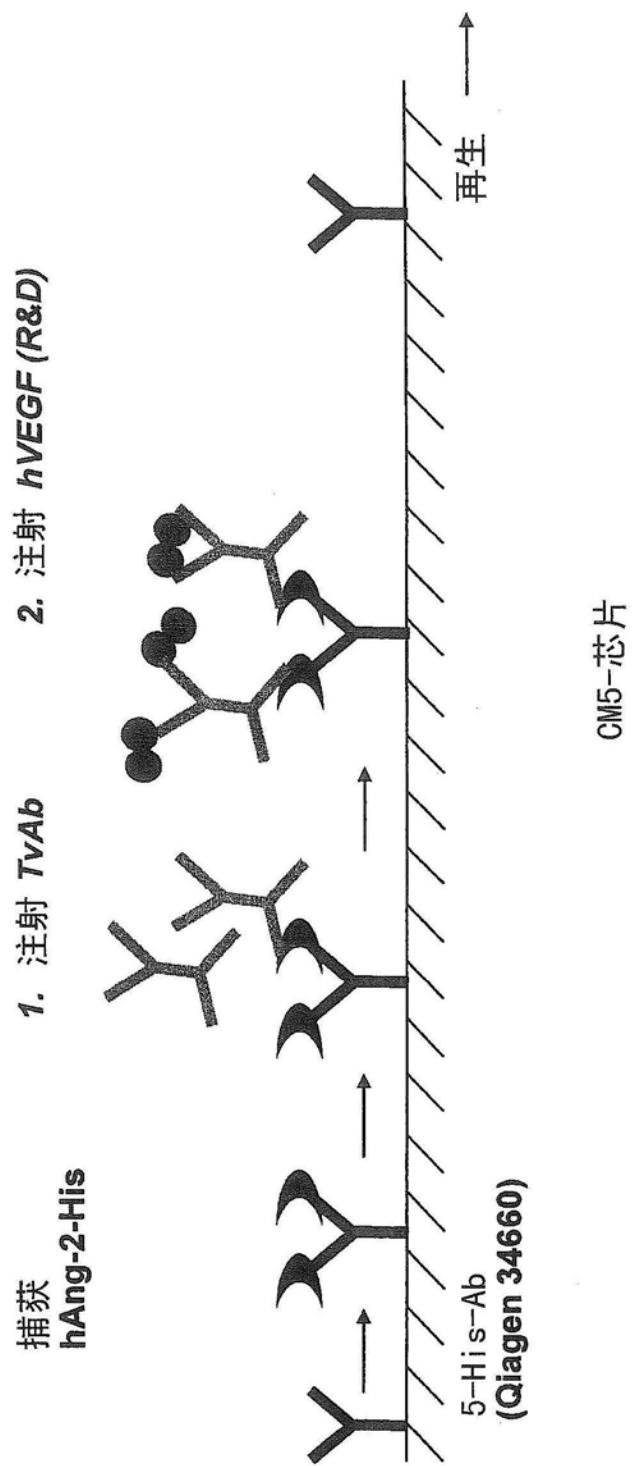


图 13

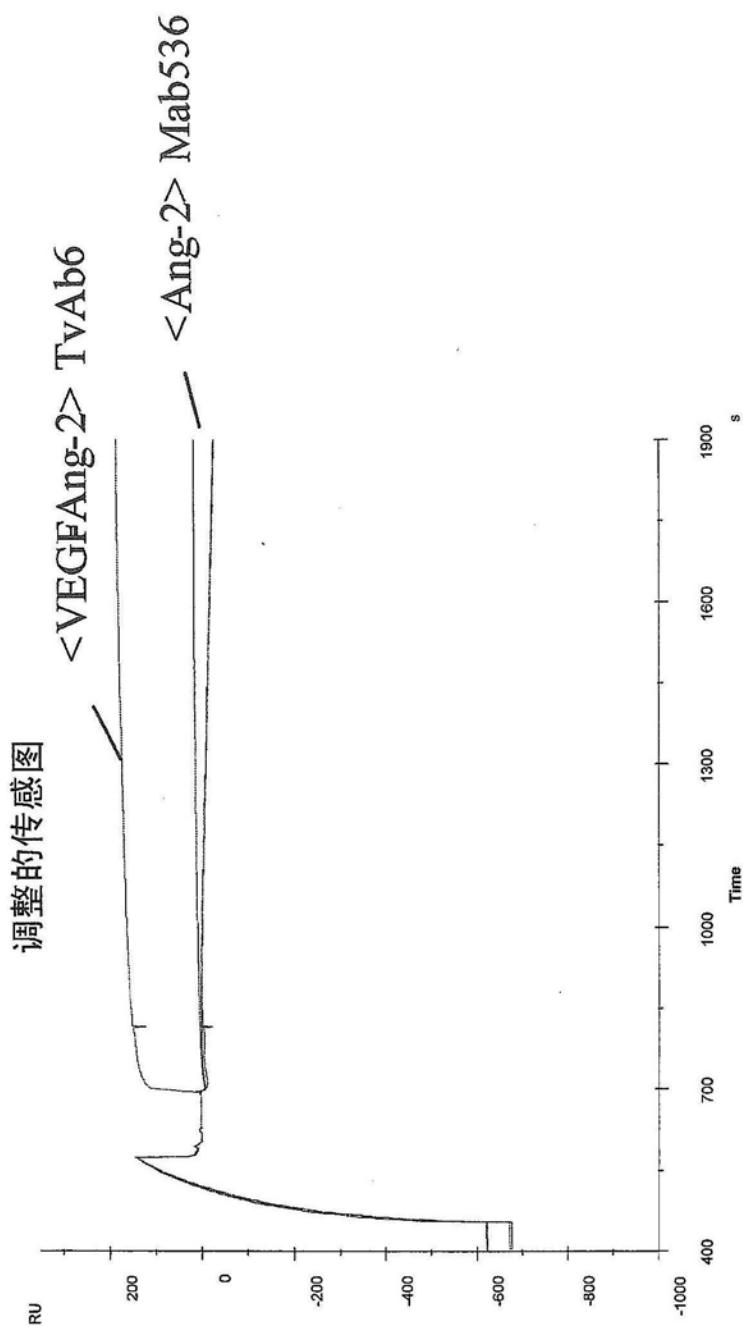


图 14

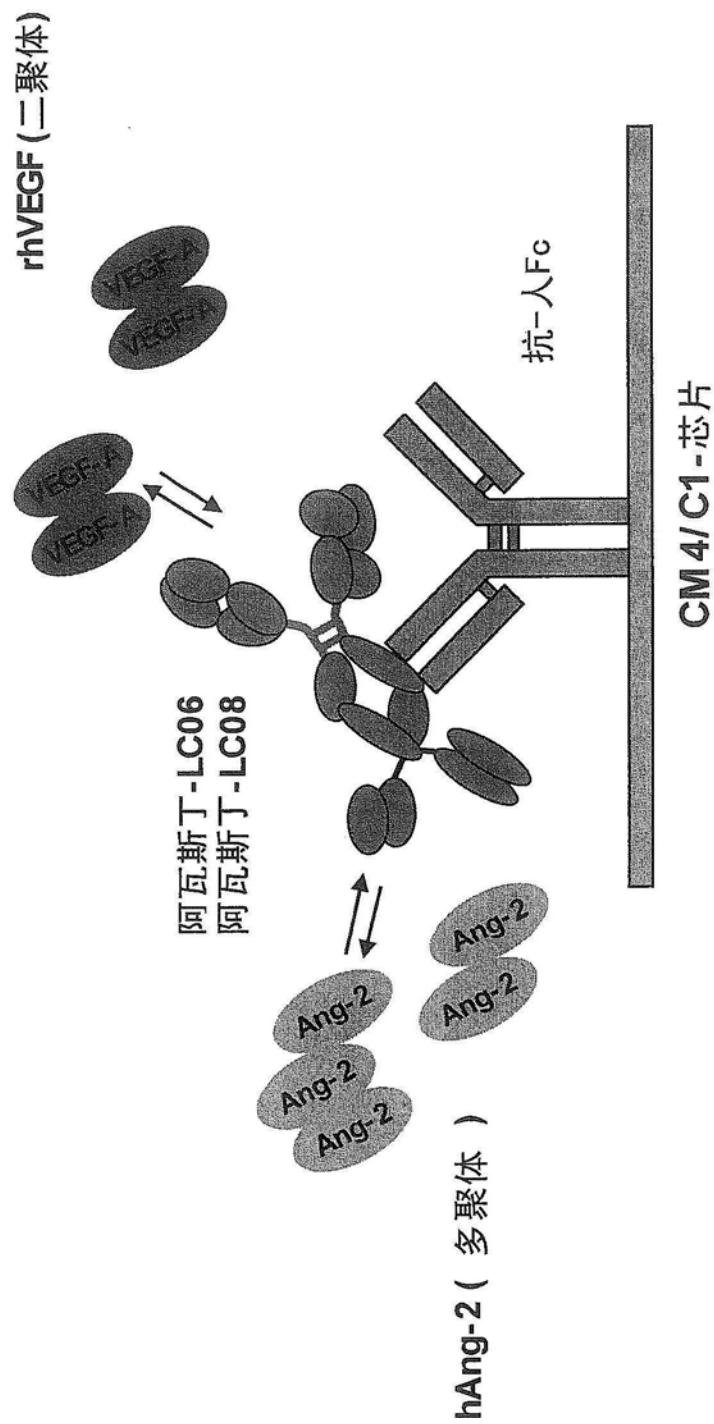


图 15A

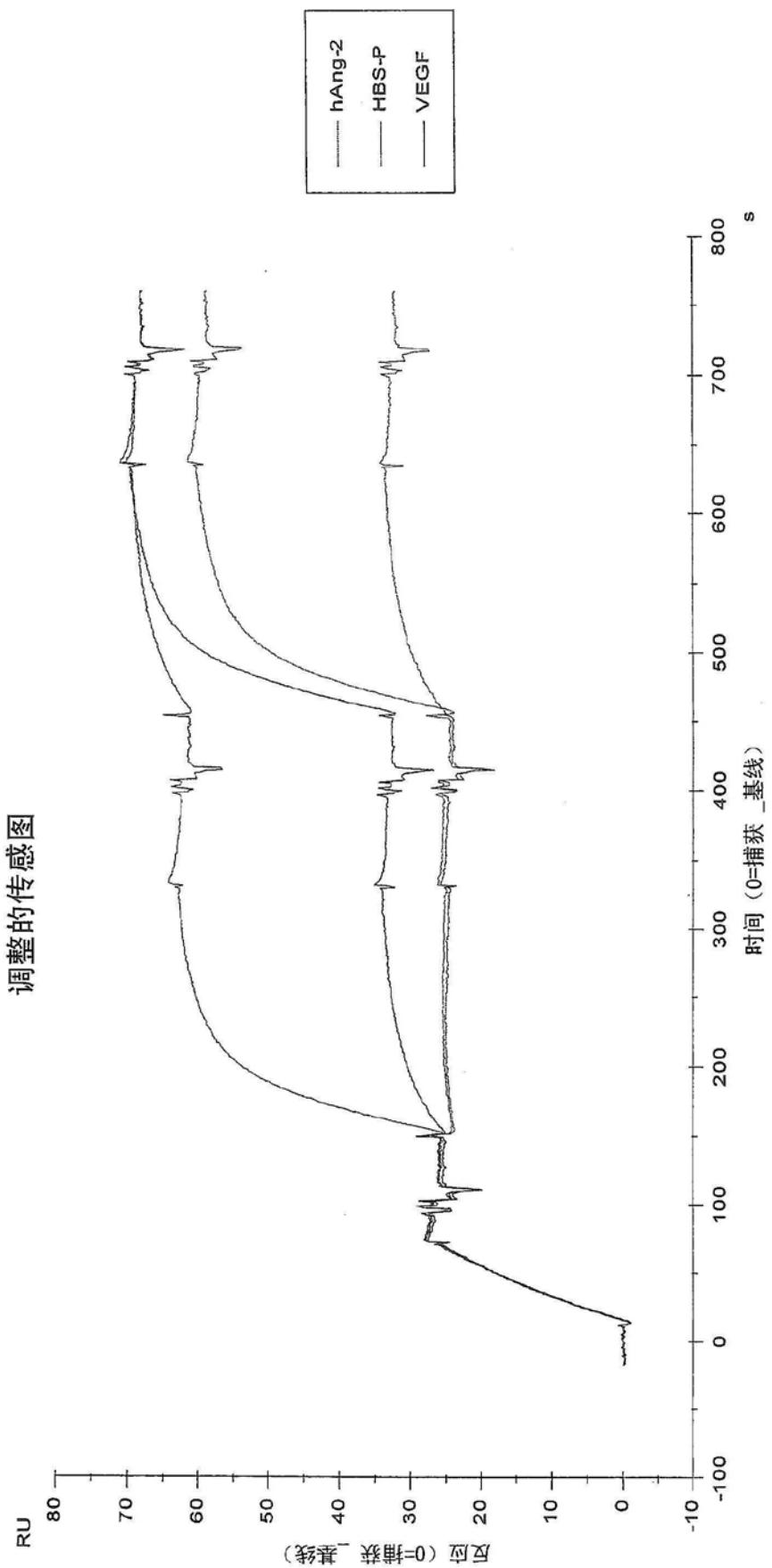


图 15B

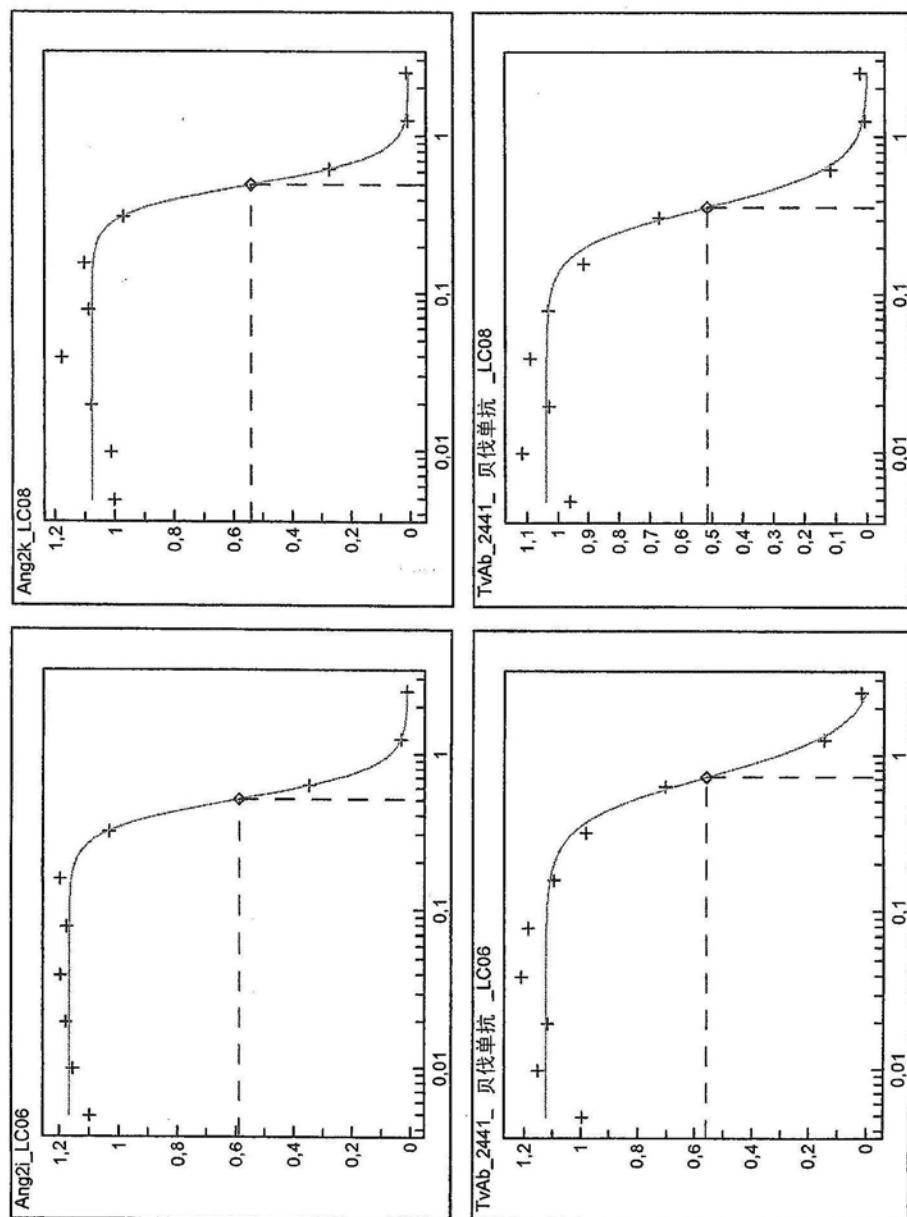


图 16A

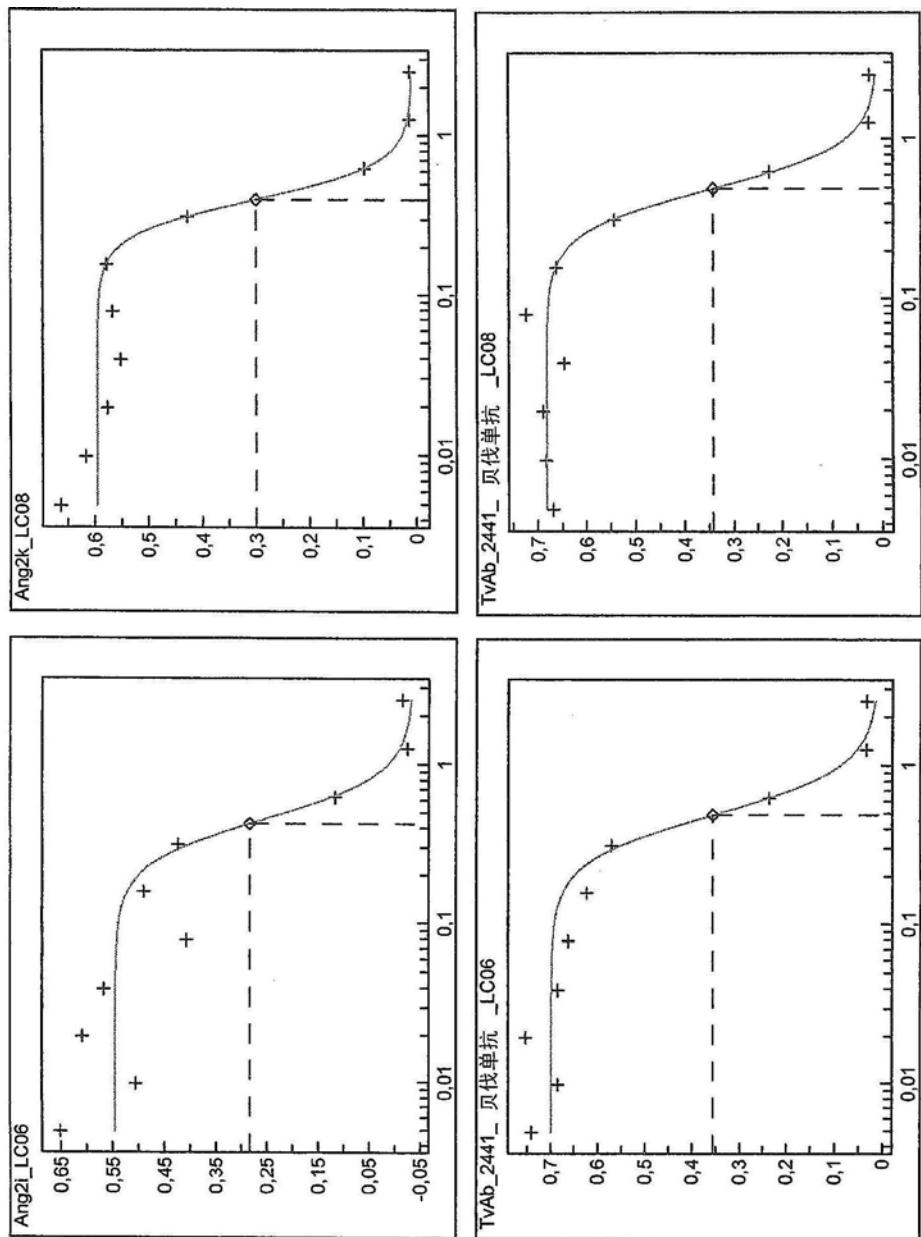


图 16B

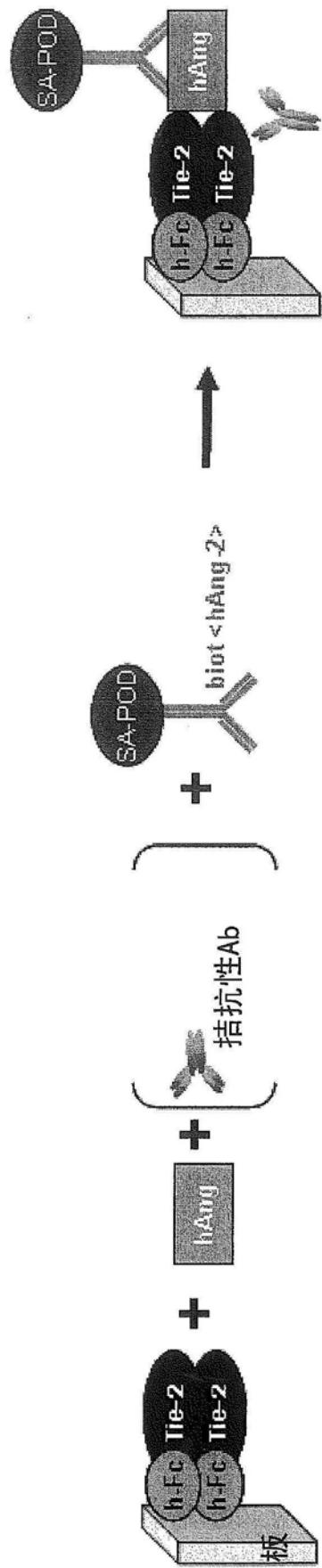


图 17

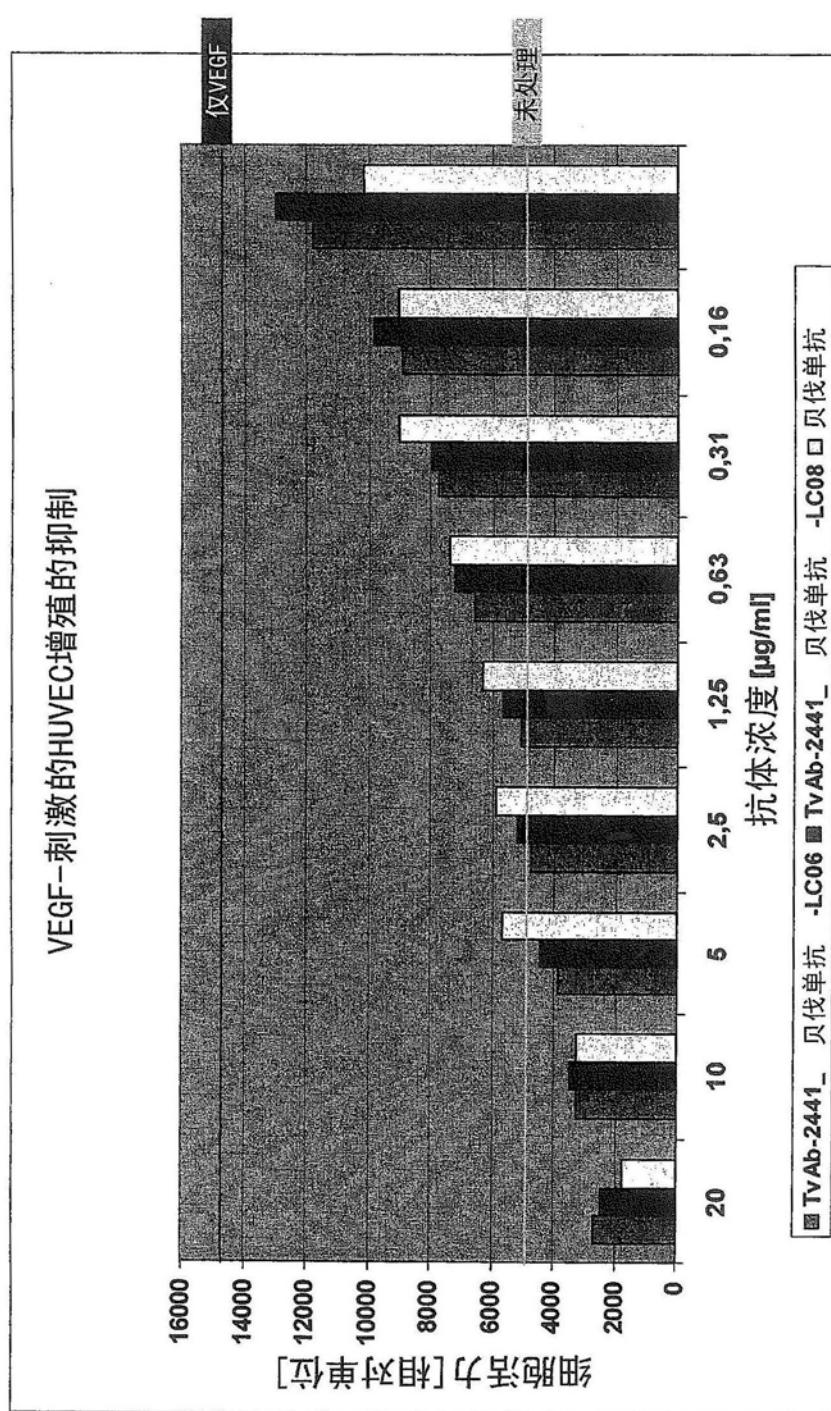
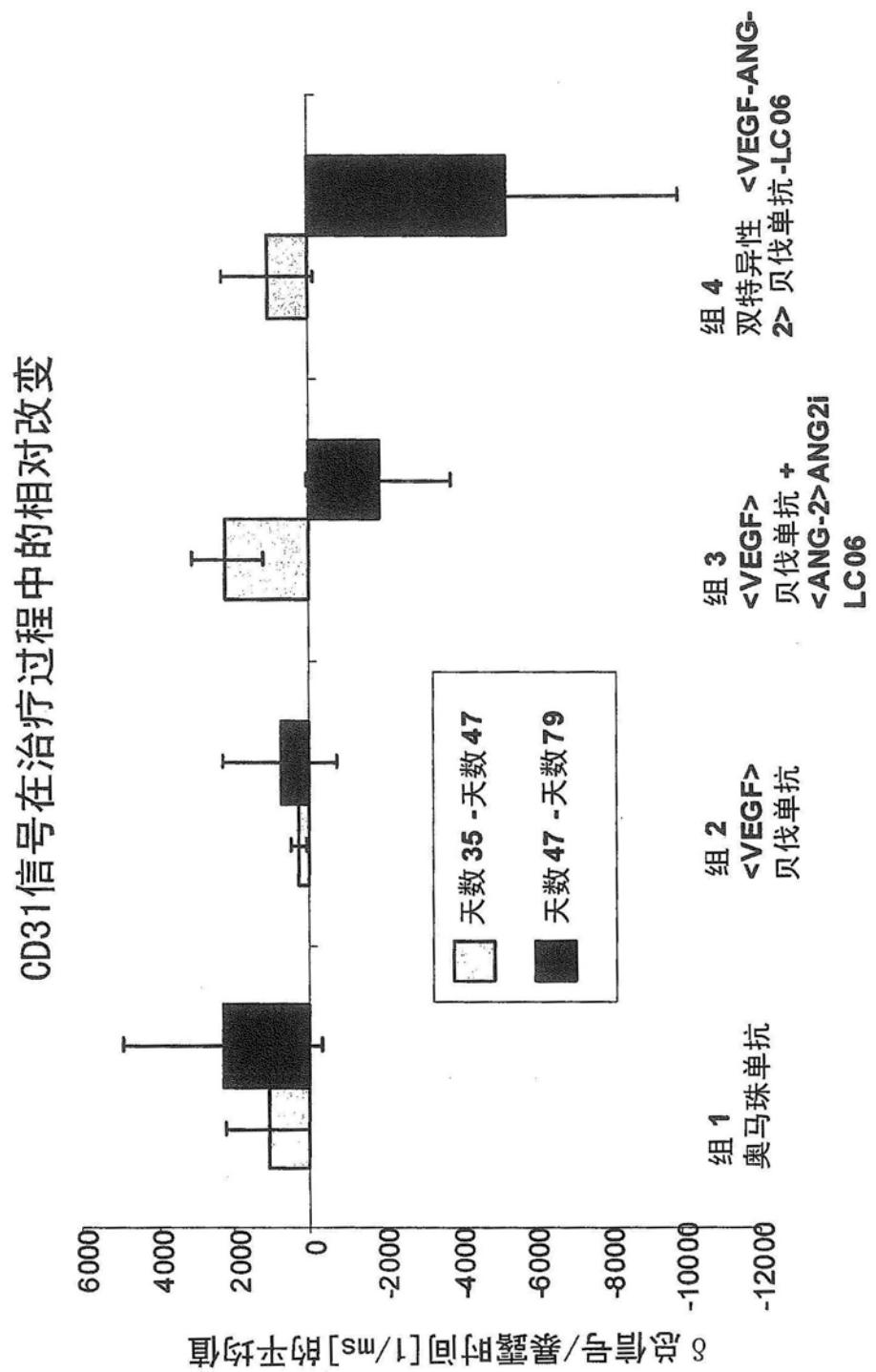


图 18



### **Abstract**

The present invention relates to bispecific antibodies against human VEGF and against human ANG-2, methods for their production, pharmaceutical compositions containing said antibodies, and uses thereof.