



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 16/22 (2006.01)*A61K* 39/395 (2006.01)*C12N* 15/27 (2006.01)*C12N* 15/63 (2006.01)*C12N* 5/10 (2006.01)*A61P* 35/00 (2006.01)*A61P* 9/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011117410/10, 07.10.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.10.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

08.10.2008 EP 08017607.6;

16.12.2008 EP 08021834.0

(43) Дата публикации заявки: 20.12.2012 Бюл. № 35

(45) Опубликовано: 20.02.2015 Бюл. № 5

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2007089445 A2, 09.08.2007. WO 2007068895 A1, 21.06.2007. US 2007141065 A1, 21.06.2007. FISHER N. et al., "Bispecific antibodies: molecules that enable novel therapeutic strategies", Pathobiology. 2007;74 (1):3-14. RU 2295537 C2, 20.03.2007

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 10.05.2011

(86) Заявка РСТ:
EP 2009/007182 (07.10.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/040508 (15.04.2010)

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Моника БЭНЕР (DE),

Ульрих БРИНКМАНН (DE),

Ги ЖОРЖ (DE),

Ремко-Альберт ГРИЕП (NO),

Забине ИМХОФ-ЮНГ (DE),

Анита КАВЛЬЕ (NO),

Хуберт КЕТТЕНБЕРГЕР (DE),

Кристиан КЛАЙН (CH),

Йёрг Томас РЕГУЛА (DE),

Вольфганг ШЭФЕР (DE),

Юрген Михаэль ШАНЦЕР (DE),

Вернер ШОЙЕР (DE),

Штефан ЗЕЕБЕР (DE),

Маркус ТОМАС (DE)

(73) Патентообладатель(и):

Ф.ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИ-VEGF/АНТИ-ANG-2 АНТИТЕЛА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и иммунологии. Описаны биспецифические антитела против фактора роста сосудистого эндотелия человека VEGF и ангиопоэтина-2 человека ANG-2, способы их

получения, фармацевтические композиции, содержащие указанные антитела, и их применения. 6 н. и 7 з.п. ф-лы, 26 ил., 15 табл., 19 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 16/22 (2006.01)*A61K* 39/395 (2006.01)*C12N* 15/27 (2006.01)*C12N* 15/63 (2006.01)*C12N* 5/10 (2006.01)*A61P* 35/00 (2006.01)*A61P* 9/00 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2011117410/10, 07.10.2009

(24) Effective date for property rights:
07.10.2009

Priority:

(30) Convention priority:
08.10.2008 EP 08017607.6;
16.12.2008 EP 08021834.0

(43) Application published: 20.12.2012 Bull. № 35

(45) Date of publication: 20.02.2015 Bull. № 5

(85) Commencement of national phase: 10.05.2011

(86) PCT application:
EP 2009/007182 (07.10.2009)(87) PCT publication:
WO 2010/040508 (15.04.2010)Mail address:
105082, Moskva, Spartakovskij per., d. 2, str. 1,
seksija 1, ehtazh 3, "EVROMARKPAT"

(72) Inventor(s):

Monika BEhNER (DE),
Ul'rikh BRINKMANN (DE),
Gi ZhORZh (DE),
Remko-Al'bert GRIEP (NO),
Zabine IMKhOF-JuNG (DE),
Anita KAVL'E (NO),
Khubert KETTENBERGER (DE),
Kristian KLAJN (CH),
Jerg Tomas REGULA (DE),
Vol'fgang ShEhFER (DE),
Jurgen Mikhaehl' ShANTsER (DE),
Verner ShOJER (DE),
Shtefan ZEEBER (DE),
Markus TOMAS (DE)

(73) Proprietor(s):

F.KhOFFMANN-LJa ROSh AG (CH)

(54) **BISPECIFIC ANTI-VEGF/ANTI-ANG-2 ANTIBODIES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to biotechnology and immunology.

EFFECT: bispecific anti-human vascular endothelial growth factor VEGF and human angiopoietin-2 ANG-2

antibodies, methods for producing them, pharmaceutical compositions containing the above antibodies, and using them are described.

13 cl, 26 dwg, 15 tbl, 19 ex

Настоящее изобретение относится к биспецифическим антителам против фактора роста сосудистого эндотелия (human vascular endothelial growth factor - VEGF/VEGF-A) и против ангиопоэтина-2 человека (angiopoietin-2 - ANG-2), к способам их получения, фармацевтическим композициям, содержащим указанные антитела, и к их применению.

Предшествующий уровень техники

Ангиогенез присутствует в патогенезе различных заболеваний, в том числе солидных опухолей, внутриглазных неоваскулярных синдромов, например, пролиферативных ретинопатии или старческой дегенерации сетчатки (СДС), ревматоидного артрита и псориаза (Folkman J. и др., J. Biol. Chem. 267, 1992, сс.10931-10934; Klagsbrun M. и др., Annu. Rev. Physiol. 53, 1991, сс.217-239; и Garner A. в кн.: «Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach»), 1994, под ред. Garner A. и Klintworth G.K., 2-е изд., изд-во Marcel Dekker, Нью-Йорк, сс.1625-1710). При солидных опухолях неоваскуляризация обеспечивает опухолевым клеткам преимущество в росте и независимой пролиферации по сравнению с нормальными клетками. Таким образом, наблюдают корреляцию между плотностью микрососудов в срезах опухолей и выживаемостью пациента при раке груди, а также в некоторых других опухолях (Weidner N. И др., N Engl J Med. 324, 1991, сс.1-8; Horak E.R. и др., Lancet 340, 1992, сс.1120-1124; и Macchiarini P. И др., Lancet 340, 1992, сс.145-146).

VEGF и анти-VEGF антитела

Фактор роста сосудистого эндотелия человека (Human vascular endothelial growth factor - VEGF/VEGF-A) (SEQ ID NO:105) описан, например, в работах Leung D.W. и др., Science 246, 1989, сс.1306-1309; Keck P.J. и др., Science 246, 1989, сс.1309-1312; Connolly D.T. и др., J. Biol. Chem. 264, 1989, сс.20017-20024. VEGF участвует в регуляции нормального и нарушенного ангиогенеза и неоваскуляризации, связанных с опухолевыми и внутриглазными расстройствами (Ferrara N. и др., Endocr. Rev. 18, 1997, сс.4-25; Berkman R.A. и др., J. Clin. Invest. 91, 1993, сс.153-159; Brown L.F. и др., Human Pathol. 26, 1995, сс.86-91; Brown L.F. и др., Cancer Res. 53, 1993, сс.4727-4735; Mattern J. и др., Brit. J. Cancer. 73, 1996, сс.931-934; Dvorak H. и др., Am. J. Pathol. 146, 1995, сс.1029-1039). VEGF является гомодимерным гликопротеином, который выделен из разных источников. VEGF проявляет высокоспецифичное митогенное действие в отношении клеток эндотелия. VEGF обладает важными регуляторными функциями при формировании новых кровеносных сосудов на протяжении эмбрионального образования и развития сосудов и в процессе ангиогенеза на протяжении взрослого периода жизни (Carmeliet P. и др., Nature, 380, 1996, сс.435-439; Ferrara N. и др., Nature, 380, 1996, сс.439-442; обзор Ferrara и Davis-Smyth, Endocrine Rev., 18, 1997, сс.4-25). Значение действия VEGF показано в исследованиях, выявивших, что инактивация одного аллеля VEGF приводит к гибели эмбриона из-за недостаточного развития сосудистой сети (Carmeliet P. и др., Nature, 380, 1996, сс.435-439; Ferrara N. и др., Nature, 380, 1996, сс.439-442). Кроме того, VEGF обладает сильным хемоаттрактантным действием в отношении моноцитов и может индуцировать плазминогенный активатор и ингибитор плазминогенного активатора в клетках эндотелия, а также может индуцировать проницаемость микрососудов. Из-за указанной последней активности VEGF иногда относят к фактору проницаемости сосудов (vascular permeability factor - VPF). Выделение и свойства VEGF рассмотрены в обзорах; см. Ferrara N. и др., J. Cellular Biochem., 47, 1991, сс.211-218, и Connolly J., Cellular Biochem., 47, 1991, сс.219-223. В другом варианте сплайсинг иРНК одного гена VEGF дает до пяти изоформ VEGF.

Анти-VEGF нейтрализующие антитела супрессируют рост различных линий опухолевых клеток человека в мышцах (Kim I. и др., Nature 362, 1993, сс.841-844; Warren

S.R. и др., J. Clin. Invest., 95, 1995, сс.1789-1797; Borgstrom P. и др., Cancer Res. 56, 1996, сс.4032-4039; Melnyk O. и др., Cancer Res. 56, 1996, сс.921-924). WO 94/10202, WO 98/45332, WO 2005/00900 и WO 00/35956 относятся к антителам против VEGF. Гуманизированное моноклональное антитело бевацизумаб (продаваемое под коммерческим названием

5 продукта Avastin®) является анти-VEGF антителом, применяемым в лечении опухолей (WO 98/45331).

Ранибизумаб (коммерческое название продукта - Lucentis®) является фрагментом моноклонального антитела, производным от того же исходного антитела мыши, что и бевацизумаб (авастин). Его молекула намного меньше исходной молекулы и обладает

10 сродством, достаточным для обеспечения более сильного связывания с VEGF-A (WO 98/45331). Этот продукт является антиангиогенным средством, одобренным для лечения «влажного» типа возрастной дегенерации желтого пятна (age-related macular degeneration - ARMD), обычной формы возрастной потери зрения. Другим анти-VEGF антителом является, например, антитело HuMab G6-31, описанное, например, в US 2007/0141065.

15 ANG-2 и aHTH-ANG-2 антитела

Ангиопоэтин-2 человека (Human angiopoietin-2 - ANG-2) (в другом варианте используют аббревиатуру ANGPT2 или ANG2) (SEQ ID NO:106) описан в работах Maisonpierre P.C. и др., Science 277, 1997, сс.55-60, и Cheung A.H. и др., Genomics 48, 1998, сс.389-391. Ангиопоэтины-1 и -2 (ANG-1 (SEQ ID No:107) и ANG-2 (SEQ ID No:106)) были

20 обнаружены в качестве лигандов для Tie - семейства тирозинкиназ, которые избирательно экспрессируются в эндотелии сосудов. Yancopoulos G.D. и др., Nature 407, 2000, сс.242-248. В настоящее время установлено четыре безусловных представителя семейства ангиопоэтина. Ангиопоэтин-3 и -4 (Ang-3 и Ang-4) могут представлять в высокой степени дивергентные аналоги одного и того же генного локуса у мыши и

25 человека. Kim I. и др., FEBS Lett, 443, 1999, сс.353-56; Kim I. и др., J Biol Chem 274, 1999, сс.26523-26528. ANG-1 и ANG-2 первоначально были идентифицированы в экспериментах с культурами тканей в качестве агониста и антагониста, соответственно (по ANG-1 см. Davis S. и др., Cell 87, 1996, сс.1161-1169; по ANG-2 см. Maisonpierre P.C. и др., Science 277, 1997, сс.55-60). Все известные ангиопоэтины связываются в основном с Tie2, и оба,

30 Ang-1 и -2, связываются с Tie2 со сродством 3 нМ (Kd). Maisonpierre P.C. и др., Science 277, 1997, сс.55-60. Установлено, что Ang-1 поддерживает выживаемость EC и стимулирует целостность эндотелия, Davis S. и др., Cell 87, 1996, сс.1161-1169; Kwak H.J. и др., FEBS Lett 448, 1999, сс.249-253; Suri C. и др., Science 282, 1998, сс.468-471; Thurston G. и др., Science 286, 1999, сс.251 1-14; Thurston G. и др., Nat. Med. 6, 2000, сс.460-463,

35 несмотря на то, что ANG-2 обладает противоположным эффектом и стимулирует дестабилизацию и регрессию кровеносных сосудов при отсутствии факторов выживания VEGF или основного фактора роста фибробластов. Maisonpierre P.C. и др., Science 277, 1997, сс.55-60. Однако в результате многих исследований функции ANG-2 был сделан вывод о более сложной ситуации. ANG-2 может быть сложным регулятором

40 ремоделирования сосудов, которое играет роль и в распространении сосудов, и в регрессии сосудов. Подтверждая такие роли для ANG-2, исследование экспрессии показало, что ANG-2 быстро индуцируется вместе с VEGF у взрослых при распространении сосудов при ангиогенезе, хотя ANG-2 индуцируется в отсутствие VEGF при регрессии сосудов. Holash J. и др., Science 284, 1999, сс.1994-1998; Holash J. и др.,

45 Oncogene 18, 1999, сс.5356-5362. Согласно с контекстно-зависимой ролью, ANG-2 специфически связывает с тем же специфическим для эндотелия рецептором, Tie-2, который активируется Ang-1, но оказывает контекстно-зависимые воздействия на его активирование. Maisonpierre P.C. и др., Science 277, 1997, сс.55-60.

Исследования ангиогенеза в роговице показали, что и ANG-1, и ANG-2 обладают сходными эффектами, действуя синергично с VEGF по индукции роста новых кровеносных сосудов. Asahara T. и др., *Circ. Res.* 83, 1998, сс.233-240. Вероятность того, что это доза-зависимый ответ эндотелия, повышается за счет наблюдения,

5 заключающегося в том, что *in vitro* при высокой концентрации ANG-2 может также быть про-ангиогенным. Kim I. и др., *Oncogene* 19, 2000, сс.4549-4552. В высокой концентрации ANG-2 действует в качестве апоптозного фактора выживания для клеток эндотелия во время сывороточного депривационного апоптоза через активирование Tie2 через PI-3 киназу и метаболический путь Akt. Kim I. и др., *Oncogene* 19, 2000, сс.4549-
10 4552.

Кроме того, по результатам экспериментов *in vitro* был сделан вывод о том, что при продолжительном воздействии эффекты ANG-2 могут постепенно сдвигаться от эффекта антагониста к агонисту Tie2, и позднее может непосредственно участвовать в формировании сосудистых трубок и стабилизации новых сосудов. Teichert-Kuliszewska
15 К. и др., *Cardiovasc. Res.* 49, 2001, сс.659-670. Кроме того, если клетки эндотелия культивируют на фибриновом геле, также наблюдают активирование Tie2 за счет ANG-

2, что предположительно означает, что действие ANG-2 может зависеть от состояния дифференциации клеток эндотелия. Teichert-Kuliszewska К. и др., *Cardiovasc. Res.* 49, 2001, сс.659-670. В клетках эндотелия микрососудов, культивируемых в трехмерном
20 геле, ANG-2 также может индуцировать активирование Tie2 и формирование структур типа капилляров. Mochizuki Y. и др., *J. Cell. Sci.* 115, 2002, сс.175-183. Применение 3-D сферического совместного культивирования в качестве модели созревания сосудов *in vitro* показывает, что прямой контакт между клетками эндотелия и клетками мезенхимы аннулирует способность к реагированию на VEGF, хотя наличие VEGF и ANG-2

25 индуцирует распространение сосудов. Korff T. и др., *Faseb J.* 15, 2001, сс.447-457. Etoh T.H. и др. показали, что у клеток эндотелия, которые конститутивно экспрессируют Tie2, регуляция экспрессии MMP-1, -9 и u-PA сильно повышается за счет ANG-2 в присутствии VEGF. Etoh T. и др., *Cancer Res.* 61, 2001, сс.2145-2153. На модели зрачковой мембраны *in vivo* Lobov I.B. и др. показали, что ANG-2 в присутствии эндогенного VEGF
30 индуцирует быстрое повышение диаметра капилляров, ремоделируя базальную пластинку, пролиферацию и миграцию клеток эндотелия и стимулирует распространение новых кровеносных сосудов. Lobov LB. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2002, сс.11205-11210. Напротив, ANG-2 индуцирует гибель клеток эндотелия и регрессию сосудов без эндогенного VEGF. Lobov LB. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2002, сс.11205-11210.

35 Сходным образом на модели опухоли *in vivo* Vajkoczy P. и др. показали, что многоклеточные агрегаты инициируют рост сосудов путем ангиогенного распространения через одновременную экспрессию VEGFR-2 и ANG-2 эндотелием хозяина и опухоли. Vajkoczy P. и др., *J. Clin. Invest.* 109, 2002, сс.777-785. Эта модель показывает, что закончившая начальный рост микроциркуляторная часть растущих
40 опухолей отличается непрерывным ремоделированием, предположительно опосредованным экспрессией VEGF и ANG-2. Vajkoczy P. и др., *J Clin. Invest.* 09, 2002, сс.777-785.

Исследования Tie-2 и ангиопоэтина-1 на модели нокаутных мышей показывают сходные фенотипы и подтверждают, что фосфорилирование Tie-2 после стимуляции
45 ангиопоэтином-1 опосредует ремоделирование и стабилизацию формируемых сосудов, стимулируя полное развитие кровеносных сосудов во время ангиогенеза и поддержание адгезии клеток, поддерживающих клетки эндотелия (Dumont J. и др., *Genes & Development*, 8, 1994, сс.1897-1909; Sato T.N., *Nature*, 376, 1995, сс.70-74; Thurston G. и др., *Nature Medicine*,

6, 2000, сс.460-463). Предположительно роль ангиопоэтина-1 сохраняется у взрослых, у которых он экспрессируется в разных местах и конститутивно (Hanahan D., Science, 277, 1997, сс.48-50; Zagzag D. и др., Exp Neurology, 159, 1999, сс.391-400). Напротив, экспрессия ангиопоэтина-2 в основном ограничивается сайтами сосудистого ремоделирования, в которых ангиопоэтин-2 предположительно блокирует конститутивную стабилизацию или функцию созревания ангиопоэтина-1, позволяя сосудам ревертировать и остаться, пластическое состояние которых может быть в большей степени отвечающим на распространяющиеся сигналы (Hanahan D., 1997; Holash J. и др., Orzcogerze 18, 199, сс.5356-5362; Maisonpierre P.C, 1997). При экспрессии ангиопоэтина-2 при патологическом ангиогенезе установлено, что многие типы опухолей экспрессируют ангиопоэтин-2 (Maisonpierre P.C. и др., Science 277, 1997, сс.55-60). Функциональные исследования показали, что ангиопоэтин-2 вовлечен в опухолевый ангиогенез и установили ассоциацию сверхэкспрессии ангиопоэтина-2 с повышенным ростом опухолей на модели ксенотрансплантата у мышей (Ahmad S.A. и др., Cancer Res., 61, 2001, сс.1255-1259). В других исследованиях связывают сверхэкспрессию ангиопоэтина-2 с опухолевой гиперваскулярностью (Etoh T. и др., Cancer Res. 61, 2001, сс.2145-2153; Tanaka F. и др., Cancer Res. 62, 2002, сс.124-129).

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

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

Исследование воздействия очаговой экспрессии ангиопоэтина-2 показало, что противоборствующий ангиопоэтин 1 /Tie-2 сигнал ослабляет плотную сосудистую структуру, тем самым, подвергая воздействию клетки эндотелия для активации сигналов от индукторов ангиогенеза, например, VEGF (Hanahan D., Science, 277, 1997, сс.48-50). Такой проангиогенный эффект, возникающий из-за ингибирования ангиопоэтина-1, показывает, что терапия, направленная против ангиопоэтина-1, не будет эффективным противоопухолевым лечением.

ANG-2 экспрессируется во время развития в местах ремоделирования кровеносных сосудов. Maisonpierre P.C. и др., Science 277, 1997, сс.55-60. У взрослых индивидуумов экспрессия ANG-2 ограничена местами сосудистого ремоделирования, а также присутствует в высоко васкуляризованных опухолях, включая глиому, Osada H. и др., Int. J. Oncol. 18, 2001, сс.305-309; Koga K. и др., Cancer Res. 61, 2001, сс.6248-6254, гепатоклеточную карциному, Tanaka S. и др., J. Clin. Invest. 103, 1999, сс.341-345,

бородавчатый рак желудка, Etoh T. и др., *Cancer Res.* 61, 2001, сс.2145-2153; Lee J.H. и др., *Int. J. Oncol.* 18, 2001, сс.355-361, рак щитовидки, Bunone G. и др., *Am J Pathol* 155, 1999, сс.1967-1976, немелкоклеточный рак легких, Wong M.P. и др., *Lung Cancer* 29, 2000, сс.11-22, рак толстой кишки, Ahmad S.A. и др., *Cancer* 92, 2001, сс.1138-1143, рак простаты

5 Wurmbach J.H. и др., *Anticancer Res.* 20, 2000, сс.5217-5220. Установлено, что некоторые опухолевые клетки экспрессируют ANG-2. Например, Tanaka S. и др., *J. Clin. Invest.* 103, 1999, сс.341-345, обнаружили иРНК ANG-2 в 10 из 12 образцов гепатоклеточной карциномы человека (ГКК). Сотрудники группы Ellis установили, что ANG-2 экспрессируется повсеместно в эпителии опухоли. Ahmad S.A. и др., *Cancer* 92, 2001,

10 1138-1143. Другие исследователи опубликовали сходные результаты. Chen L. и др., *J. Tongji Med. Univ.* 21, 2001, сс.228-235. Путем выявления уровней иРНК ANG-2 в архивированных образцах рака груди человека, Sfiligoi C. и др., *Int. J. Cancer* 103, 2003, сс.466-474, установили, что иРНК ANG-2 существенным образом ассоциирована с инвазией вспомогательных лимфатических узлов, коротким периодом отсутствия

15 болезни и плохой общей выживаемостью. Tanaka F. и др., *Cancer Res.* 62, 2002, сс.7124-7129, проанализировали в общей сложности 236 пациентов с немелкоклеточным раком легких (НМКРЛ) на стадиях развития заболевания с I по IIIA, соответственно. С помощью иммуногистохимии они установили, что 16,9% пациентов НМКРЛ являются ANG-2-положительными. Плотность микрососудов для ANG-2-положительных опухолей

20 существенно выше, чем плотность микрососудов у ANG-2-отрицательных опухолей. Такой ангиогенный эффект ANG-2 наблюдают только при высокой экспрессии VEGF. Кроме того, положительная экспрессия ANG-2 является существенным фактором прогнозирования послеоперационного выживания. Tanaka F. и др., *Cancer Res.* 62, 2002, сс.7124-7129. Однако ими было установлено отсутствие существенной корреляции

25 между экспрессией Ang-1 и плотностью микрососудов. Tanaka F. и др., *Cancer Res.* 62, 2002, сс.7124-7129. Эти результаты означают, что ANG-2 является индикатором плохого прогноза для пациентов с тяжелыми формами некоторых типов рака.

Ранее, используя модель ANG-2 нокаутных мышей, группа под руководством Yancopoulos сообщила, что ANG-2 необходим для постнатального ангиогенеза. Gale

30 N.W. и др., *Dev. Cell* 3, 2002, сс.411-423. Ими было установлено, что запрограммированная в ходе развития регрессия сосудистой системы стекловидного тела не происходит у ANG-2 нокаутных мышей, и их кровеносные сосуды сетчатки не могут распространяться от центральной артерии сетчатки. Gale N.W. и др., *Dev. Cell* 3, 2002, сс.411-423. Они также установили, что делеция ANG-2 приводит к серьезным

35 дефектам в структуре и функции лимфатической сосудистой сети. Gale N.W. и др., *Dev. Cell* 3, 2002, сс.411-423. Генетическое сохранение Ang-1 устраняет лимфатические дефекты, но не дефекты ангиогенеза. Gale N.W. и др., *Dev. Cell* 3, 2002, сс.411-423.

Peters и др. сообщают, что растворимый Tie-2, когда высвобождается либо в качестве рекомбинантного белка, либо в вирусном векторе экспрессии, ингибирует *in vivo* рост

40 карциномы молочных желез мыши и меланому у модельных мышей. Lin P. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1998, сс.8829-8834; Lin P. и др., *J. Clin. Invest.* 100, 1997, сс.2072-2078. Плотность сосудов в ткани опухоли, которую лечили указанным способом, существенно понизилась. Кроме того, растворимый Tie-2 блокирует ангиогенез в роговице крысы, вызванный кондиционированными средами культур опухолевых

45 клеток. Lin P. и др., *J. Clin. Invest.* 100, 1997, сс.2072-2078. Кроме того, Isner и др. показали, что добавление ANG-2 к VEGF индуцирует намного более длительный и в большей степени периферический процесс формирования новых сосудов, чем добавление только одного VEGF. Asahara T. и др., *Circ. Res.* 83, 1998, сс.233-240. Избыток рецептора Tie-2

предотвращает модулирование за счет ANG-2 индуцированного VEGF процесса формирования новых сосудов. Asahara T. и др., *Circ. Res.* 83, 1998, сс.233-240. Siemeister G. и др., *Cancer Res.* 59, 1999, сс.3185-3191, показали на голых мышцах с ксенотрансплантатами, что сверхэкспрессия внеклеточных связывающих лиганды доменов, либо Fit-1, либо Tie-2, у ксенотрансплантатов, приводящая к существенному подавлению метаболического пути, не может быть компенсирована сверхэкспрессией другого указанного домена, следовательно, метаболический путь рецептора VEGF и метаболический путь Tie-2 не следует рассматривать в качестве двух независимых медиаторов, имеющих существенное значение для процесса ангиогенеза *in vivo*. Siemeister G. и др., *Cancer Res.* 59, 1999, сс.3185-3191. Это подтверждено в нескольких последующих публикациях White R. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 2003, сс.5028-5033. В этих исследованиях было показано, что устойчивый к нуклеазе аптамер РНК, который специфически связывает и ингибирует ANG-2, в значительной степени подавляет процесс формирования новых сосудов, индуцированный bFGF, на модели ангиогенеза в микрокармане роговицы крысы.

Биспецифические антитела

В последнее время было создано много различных структур рекомбинантных антител, например, четырехвалентных биспецифических антител, путем гибридизации, например, структуры антитела и одноцепочечных доменов (см., например, Coloma M.J. и др., *Nature Biotech* 15, 1997, сс.159-163; WO 2001/077342; и Morrison, S.L., *Nature Biotech* 25 (2007) 1233-1234).

Кроме того, несколько других новых форматов, в которых сердцевинная структура антитела (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) больше не сохраняется, например, диатела, триатела или тетратела, миниантитела, было создано несколько одноцепочечных структур (scFv, Bis-scFv), которые могут связывать два или несколько антигенов (Holliger P. и др., *Nature Biotech* 23, 2005, сс.1126-1136; Fischer N., Leger O., *Pathobiology* 74, 2007, сс.3-14; Shen J. и др., *Journal of Immunological Methods* 318, 2007, сс.65-74; Wu C. и др., *Nature Biotech.* 25, 2007, сс.1290-1297).

Все такие форматы используют линкеры, или для гибридизации сердцевины антитела (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) с дополнительным связывающим белком (например, scFv), или для гибридизации, например, двух фрагментов Fab или scFv (Fischer N., Leger O., *Pathobiology* 74, 2007, сс.3-14). Следует учитывать, что может быть желательно сохранение эффекторных функций, например, комплементзависимой цитотоксичности (complement-dependent cytotoxicity - CDC) или антителозависимой клеточной цитотоксичности (antibody-dependent cellular cytotoxicity - ADCC), которые опосредуются через связывание с рецептором Fc, путем поддержания высокой степени сходства с природными антителами.

В WO 2007/024715 сообщают об иммуноглобулинах с доменами двойной вариабельности в качестве сконструированных поливалентных и полиспецифичных связывающих белков. Способ получения димер антител с биологическим действием описан в US 6897044. Конструкция поливалентного Fv антитела, обладающая по меньшей мере четырьмя вариабельными доменами, которые связаны между собой через пептидные линкеры, описана в US 7129330. Димерные и полимерные антигенсвязывающие структуры описаны в US 2005/0079170. Трех- или четырехвалентный моноспецифический антигенсвязывающий белок, включающий три или четыре фрагмента Fab, связанные друг с другом через соединяющие структуры, который не является природным иммуноглобулином, описан в US 6511663. В WO 2006/020258 описаны четырехвалентные биспецифические антитела, которые могут

эффективно экспрессироваться в прокариотических и эукариотических клетках и используются в лечении и методах диагностики. Способ разделения или преимущественного синтеза димеров, связанных через по меньшей мере одну внутрицепочечную дисульфидную связь, от димеров, которые не связаны через по меньшей мере одну внутрицепочечную дисульфидную связь, из смеси, включающей два типа полипептидных димеров, описан в US 2005/0163782. Биспецифические четырехвалентные рецепторы описаны в US 5959083. Сконструированные антитела с тремя или более функциональными сайтами связывания антигена описаны в WO 2001/077342.

Полиспецифичные и поливалентные антигенсвязывающие полипептиды описаны в WO 1997/001580. В WO 1992/004053 описаны гомоконъюгаты, обычно получаемые из моноклональных антител класса IgG, которые связываются с тем же антигенным детерминантом и являются ковалентно связанными синтетической перекрестной связью. Олигомерные моноклональные антитела с высокой авидностью в отношении антигена, описаны в WO 1991/06305, посредством чего олигомеры, обычно класса IgG, секретируются, имея два или несколько мономеров иммуноглобулина, связанных вместе для формирования четырехвалентных или шестивалентных молекул IgG. Полученные от овец антитела и сконструированные конструкции антител описаны в US 6350860, они могут применяться для лечения заболеваний, при которых действие интерферона гамма является патогенным. В US 2005/0100543 описаны нацеливаемые конструкции, которые являются поливалентными носителями биспецифичных антител, т.е. каждая молекула нацеливаемой конструкции может выступать в качестве носителя двух или нескольких биспецифичных антител. Генетически сконструированные биспецифические четырехвалентные антитела описаны в WO 1995/009917. В WO 2007/109254 описаны стабилизированные связывающие молекулы, которые состоят или включают стабилизированный фрагмент scFv.

Комбинация ингибиторов VEGF и ANG-2

WO 2007/068895 относится к комбинации антагониста ANG-2 и VEGF, KDR и/или FLT1L антагонистов. WO 2007/089445 относится к комбинациям ингибиторов ANG-2 и VEGF.

WO 2003/106501 относится к гибридным белкам, связывающимся с ангиопоэтином и содержащим домен полимеризации. WO 2008/132568 гибридные белки связываются с ангиопоэтином и VEGF.

Краткое описание изобретение

Первым объектом по настоящему изобретению является биспецифическое антитело, специфически связывающееся с фактором роста сосудистого эндотелия человека (human vascular endothelial growth factor - VEGF) и с ангиопоэтином-2 человека (angiotensin-2 - ANG-2), включающее первый сайт связывания антигена, который специфически связывается с VEGF человека, и второй сайт связывания антигена, который специфически связывается с ANG-2 человека.

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

i) каждый из указанных сайтов связывания антигена представляет пару переменного домена тяжелой цепи антитела и переменного домена легкой цепи антитела;

ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в переменный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:17 или SEQ ID NO:94, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:95, и

область CDR1 последовательности SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:96, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:20 или SEQ ID NO:97, область CDR2

последовательности SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:21 или SEQ ID NO:98 и

5 область CDR1 последовательности SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:22 или SEQ ID NO:99;

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:

10 70, SEQ ID NO:78 или SEQ ID NO:86, область CDR2 последовательности 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 или SEQ ID NO:87 и область CDR1 последовательности 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 или SEQ ID NO:88, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ

15 ID NO:28, SEQ ID NO:28 с мутациями T92L, H93Q и W94T, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:81 или SEQ ID NO:89, область CDR2 последовательности 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 или SEQ ID NO:90, область CDR1

последовательности SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:59, SEQ

20 ID NO:67, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:83 или SEQ ID NO:91.

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

i) каждый из указанных сайтов связывания антигена представляет пару варибельного домена тяжелой цепи антитела и варибельного домена легкой цепи антитела;

25 ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:1, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:2 и область CDR1

последовательности SEQ ID NO:3, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:4, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:5 и

30 область CDR1 последовательности SEQ ID NO:6;

или указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:9, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:10 и область CDR1

последовательности SEQ ID NO:11, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:12, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:13

35 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:14;

или указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:17, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:18 и область CDR1

40 последовательности SEQ ID NO:19, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:20, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:21 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:22; и

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности

45 SEQ ID NO:25, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:26 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:27, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:28 или SEQ ID NO:28 с мутациями T92L, H93Q и W94T,

область CDR2 последовательности SEQ ID NO:29 и область CDR1 последовательности

SEQ ID NO:30.

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

- i) каждый из указанных сайтов связывания антигена представляет пару варибельного домена тяжелой цепи антитела и варибельного домена легкой цепи антитела;
- ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в качестве варибельного домена тяжелой цепи последовательность SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:100, и в качестве варибельного домена легкой цепи последовательность SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:101, и
- iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в варибельный домен тяжелой цепи последовательность 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 или SEQ ID NO:92, и в качестве варибельного домена легкой цепи последовательность SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:32 с мутациями T92L, H93Q и W94T SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:85 или SEQ ID NO:93.

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

- i) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:94, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:95 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:96, в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:97, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:98 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:99;
- iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в качестве варибельного домена тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78 или SEQ ID NO:86, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:79 или SEQ ID NO:87 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:80 или SEQ ID NO:88, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:81 или SEQ ID NO:89, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:82 или SEQ ID NO:90 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:83 или SEQ ID NO:91.

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

- ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в качестве варибельного домена тяжелой цепи последовательность SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:100, и включает в качестве варибельного домена легкой цепи последовательность SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:101, и
- iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в качестве варибельного домена тяжелой цепи последовательность SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:

84 или SEQ ID NO:92, и в качестве варибельного домена легкой цепи последовательность SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:85 или SEQ ID NO:93.

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

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78 или SEQ ID NO:86, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:

63, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:79 или SEQ ID NO:87, и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:

64, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:80 или SEQ ID NO:88, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:81 или SEQ ID NO:89, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:82 или SEQ ID NO:90 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:83 или SEQ ID NO:91.

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

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в качестве варибельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:84 или SEQ ID NO:92, и в качестве варибельного домена легкой цепи последовательность SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:85 или SEQ ID NO:93.

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

ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:1, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:2 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:3, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:4, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:5 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:6; и

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в варибельный домен тяжелой цепи CDR3 область последовательности SEQ ID NO:46, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:47 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:48, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:49, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:50 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:51.

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

ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в качестве варибельного домена тяжелой цепи последовательность SEQ ID NO:7, и в качестве варибельного домена легкой цепи последовательность SEQ ID NO:8, и

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с

ANG-2, включает в качестве вариабельного домена тяжелой цепи последовательность SEQ ID NO:52 и в качестве вариабельного домена легкой цепи последовательность SEQ ID NO:53.

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

ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в вариабельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:94, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:95 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:96, и в вариабельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:4, или SEQ ID NO:97, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:98, и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:99;

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в вариабельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:62 или SEQ ID NO:86, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:63 или SEQ ID NO:87 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:64 или SEQ ID NO:88, и в вариабельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:65 или SEQ ID NO:89, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:66 или SEQ ID NO:90 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:67 или SEQ ID NO:91.

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

ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в качестве вариабельного домена тяжелой цепи последовательность SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:100 и в качестве вариабельного домена легкой цепи

последовательность SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:101, и

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в качестве вариабельного домена тяжелой цепи последовательность SEQ ID NO:68 или SEQ ID NO:92 и в качестве вариабельного домена легкой цепи последовательность SEQ ID NO:69, или SEQ ID NO:93.

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

ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в вариабельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:1, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:2 и область CDR1

последовательности SEQ ID NO:3, и в вариабельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:4, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:5 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:6;

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в вариабельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:62, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:63 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:64, и в вариабельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:65, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:66 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:67.

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

ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в качестве вариабельного домена тяжелой цепи последовательность SEQ ID NO:7, и в качестве вариабельного домена легкой цепи последовательность SEQ

ID NO:8; и

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в качестве вариабельного домена тяжелой цепи последовательность SEQ ID NO:68 и в качестве вариабельного домена легкой цепи последовательность SEQ ID NO:69.

Указанные биспецифические антитела являются по меньшей мере двухвалентными и могут быть трехвалентными, четырехвалентными или поливалентными.

Предпочтительно биспецифическое антитело по настоящему изобретению является двухвалентным, трехвалентным или четырехвалентным.

Другой объект настоящего изобретения является молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей цепочку указанного биспецифического антитела.

Настоящее изобретение также предусматривает векторы экспрессии, содержащие указанную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, способные экспрессировать указанную нуклеиновую кислоту в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, и клетки-хозяева, содержащие такие векторы, для рекомбинантной выработки антитела по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение дополнительно включает прокариотические или эукариотические клетки-хозяева, включающие вектор по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также предусматривает способ получения биспецифического антитела по настоящему изобретению, отличающийся экспрессией нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах и выделением указанного биспецифического антитела из указанных клеток или из супернатанта культуры клеток. Настоящее изобретение дополнительно включает антитело, полученное таким рекомбинантным способом.

Другими объектами настоящего изобретения являются фармацевтическая композиция, включающая указанное биспецифическое антитело, указанная композиция для лечения рака, применение указанного биспецифического антитела для получения лекарственного средства для лечения рака, способ лечения пациента, больного раком, путем введения указанного биспецифического антитела пациенту, нуждающемуся в таком лечении.

Биспецифические антитела по настоящему изобретению полезны для больных людей, нуждающихся в лечении, нацеливаемом на VEGF и ANG-2. Антитела по настоящему изобретению обладают новыми и обладающими признаками изобретения свойствами, полезными для пациента с таким заболеванием, особенно с раковым заболеванием.

Неожиданно было установлено, что биспецифические антитела по настоящему изобретению более эффективны при раковом росте и/или подавлении ангиогенеза опухоли по сравнению с комбинацией соответствующих моноспецифических исходных антител.

Подробное описание изобретения

Одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является биспецифическое антитело, специфически связывающееся с VEGF человека и ANG-2 человека, включающее первый сайт связывания антигена, который специфически связывается с VEGF человека, и второй сайт связывания антигена, который специфически связывается с ANG-2 человека, отличающееся тем, что i) каждый из указанных сайтов связывания антигена представляет пару вариабельного домена тяжелой цепи антитела и вариабельного домена легкой цепи антитела;

ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в вариабельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:17 или SEQ ID NO:94, область CDR2

последовательности SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:95 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:96, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:20 или SEQ ID NO:97, область CDR2

5 последовательности SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:21 или SEQ ID NO:98 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:22 или SEQ ID NO:99;

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности 10 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 или SEQ ID NO:86, область CDR2 последовательности 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 или SEQ ID NO:87, и область CDR1 последовательности 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 или SEQ 15 ID NO:88, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:28 с мутациями T92L, H93Q и W94T, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:81 или SEQ ID NO:89, область CDR2 последовательности 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 или SEQ ID NO:90, и область CDR1 20 последовательности 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 или SEQ ID NO:91.

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

i) каждый из указанных сайтов связывания антигена представляет пару варибельного 25 домена тяжелой цепи антитела и варибельного домена легкой цепи антитела;

ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:1, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:2 и область CDR1 30 последовательности SEQ ID NO:3, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:4, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:5 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:6; или указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:9, область CDR2 35 последовательности SEQ ID NO:10 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:11, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:12, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:13 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:14; или указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:17, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:18 40 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:19, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:20, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:21 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:22; и

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с 45 ANG-2, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:25, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:26 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:27, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:28 или SEQ ID NO:28 с мутациями T92L, H93Q и W94T,

область CDR2 последовательности SEQ ID NO:29 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:30.

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

- 5 i) каждый из указанных сайтов связывания антигена представляет пару варибельного домена тяжелой цепи антитела и варибельного домена легкой цепи антитела;
- ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в качестве варибельного домена тяжелой цепи последовательность SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:100, и в качестве
- 10 варибельного домена легкой цепи последовательность SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:101, и
- iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в качестве варибельного домена тяжелой цепи последовательность SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:
- 15 76, SEQ ID NO:84 или SEQ ID NO:92 и в качестве варибельного домена легкой цепи последовательность SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:32 с мутациями T92L, H93Q и W94T SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:85 или SEQ ID NO:93.

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

- 20 ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:94, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:95 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:96, и
- 25 в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:97, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:98 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:99;
- iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности
- 30 SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78 или SEQ ID NO:86, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:79 или SEQ ID NO:87 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:
- 35 64, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:80 или SEQ ID NO:88, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:81 или SEQ ID NO:89, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:82 или SEQ ID NO:90, и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:83 или
- 40 SEQ ID NO:91.

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

- ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в качестве варибельного домена тяжелой цепи последовательность
- 45 SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:100, и в качестве варибельного домена легкой цепи последовательность SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:101, и
- iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в качестве варибельного домена тяжелой цепи последовательности

SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:84 или SEQ ID NO:92, и в качестве варибельного домена легкой цепи последовательности SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:85 или SEQ ID NO:93.

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

ii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:78 или SEQ ID NO:86, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:

63, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:79 или SEQ ID NO:87 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:

15 64, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:80 или SEQ ID NO:88, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:81 или SEQ ID NO:

89, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:82 или SEQ ID NO:90 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:83 или SEQ ID NO:91.

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

ii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в качестве варибельного домена тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:84 или SEQ ID NO:92 и в качестве варибельного домена легкой цепи последовательности SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:85 или SEQ ID NO:93.

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

ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:1, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:2 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:3, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:4, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:5 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:6; и

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в варибельный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:46, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:47 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:48, и в варибельный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:49, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:50 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:51.

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

45 ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в качестве варибельного домена тяжелой цепи последовательность SEQ ID NO:7, и в качестве варибельного домена легкой цепи последовательность SEQ ID NO:8, и

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в качестве переменного домена тяжелой цепи последовательность SEQ ID NO:52 и в качестве переменного домена легкой цепи последовательность SEQ ID NO:53.

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

ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в переменный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:94, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:95 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:96, и в переменный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:97, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:98 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:99;

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в переменный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:62 или SEQ ID NO:86, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:63 или SEQ ID NO:87 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:64 или SEQ ID NO:88, и в переменный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:65 или SEQ ID NO:89, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:66 или SEQ ID NO:90 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:67 или SEQ ID NO:91.

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

ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в качестве переменного домена тяжелой цепи последовательность SEQ ID NO:7, или SEQ ID NO:100, и в качестве переменного домена легкой цепи последовательность SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:101, и

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в качестве переменного домена тяжелой цепи последовательность SEQ ID NO:68, или SEQ ID NO:92 и в качестве переменного домена легкой цепи последовательность SEQ ID NO:69, или SEQ ID NO:93.

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

ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в переменный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:1, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:2 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:3, и в переменный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:4, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:5 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:6;

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает в переменный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:62, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:63 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:64, и в переменный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:65, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:66 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:67.

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

ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает в качестве переменного домена тяжелой цепи последовательность

SEQ ID NO:7 и переменного домена легкой цепи последовательность SEQ ID NO:8; и
 iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с
 ANG-2, включает в качестве переменного домена тяжелой цепи последовательность
 SEQ ID NO:68 и в качестве переменного домена легкой цепи последовательность SEQ
 ID NO:69.

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

ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с
 VEGF, включает в переменный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности
 SEQ ID NO:1, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:2 и область CDR1
 последовательности SEQ ID NO:3, и в переменный домен легкой цепи область CDR3
 последовательности SEQ ID NO:4, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:5 и
 область CDR1 последовательности SEQ ID NO:6; и

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с
 ANG-2, включает в переменный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности
 SEQ ID NO:78, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:79 и область CDR1
 последовательности SEQ ID NO:80, и в переменный домен легкой цепи область CDR3
 последовательности SEQ ID NO:81, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:82
 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:83.

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

ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с
 VEGF, включает в качестве переменного домена тяжелой цепи последовательность
 SEQ ID NO:7 и в качестве переменного домена легкой цепи последовательность SEQ
 ID NO:8, и

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с
 ANG-2, включает в качестве переменного домена тяжелой цепи последовательность
 SEQ ID NO:84 и в качестве переменного домена легкой цепи последовательность SEQ
 ID NO:85.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено
 биспецифическое антитело, специфически связывающееся с фактором роста сосудистого
 эндотелия (human vascular endothelial growth factor - VEGF) и ангиопоэтином-2 человека
 (angiopoietin-2 - ANG-2), отличающееся тем, что исходное aHTH-ANG-2 антитело не
 является специфически связывающимся с ангиопоэтином-1 человека (ANG-1). К

типичным исходным антителам, которые специфически связываются с ANG-2 человека,
 но не с ANG-1 человека, относятся, например, Ang2s_R3_LC03, Ang2s_LC09, Ang2i_LC06,
 Ang2i_LC07 и предпочтительно Ang2i_LC10, или антитела, связывающиеся с тем же
 эпитопом, что и Ang2s_R3_LC03, Ang2s_LC09, Ang2i_LC06, Ang2i_LC07, Ang2i_LC10,
 предпочтительно антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и Ang2i_LC06, или
 Ang2i_LC10. Таким образом, в одном из вариантов осуществления настоящего
 изобретения биспецифическое антитело специфически связывается с фактором роста
 сосудистого эндотелия человека (VEGF) и ангиопоэтином-2 человека (ANG-2), но не с
 ANG-1 человека (или в котором исходное aHTH-ANG-2 антитело не связывается
 специфически с ангиопоэтином-1 человека (ANG-1)) связывается с тем же эпитопом,
 что и Ang2s_R3_LC03, Ang2s_LC09, Ang2i_LC06, Ang2i_LC07, Ang2i_LC10,
 предпочтительно с тем же эпитопом, что и Ang2i_LC06 или Ang2i_LC10. Такие
 биспецифические антитела, специфически связывающиеся с фактором роста сосудистого
 эндотелия человека (VEGF) и ангиопоэтином-2 человека (ANG-2), но не с ANG-1 человека

(или в котором исходное aНТН-ANG-2 антитело не связывается специфически с ангиопоэтином-1 человека (ANG-1)), могут обладать улучшенными свойствами, например, биологическим или фармакологическим действием, пониженной токсичностью или фармакокинетическим профилем, по сравнению с биспецифическими антителами, специфически связывающимися с фактором роста сосудистого эндотелия человека (VEGF) и ангиопоэтином-2 человека (ANG-2), а также с ANG-1 человека.

Таким образом, предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает биспецифическое антитело, специфически связывающееся с VEGF человека и ANG-2 человека, включающее первый сайт связывания антигена, который специфически связывается с VEGF человека, и второй сайт связывания антигена, который специфически связывается с ANG-2 человека, отличающееся тем, что второй сайт связывания антигена не связывается специфически с ангиопоэтином-1 человека (ANG-1).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусмотрено биспецифическое антитело, специфически связывающееся с фактором роста сосудистого эндотелия человека (VEGF) и ангиопоэтином-2 человека (ANG-2), включающее первый сайт связывания антигена, который специфически связывается с VEGF человека, и второй сайт связывания антигена, который специфически связывается с ANG-2 человека, отличающееся тем, что соотношение величин связывающего сродства KD (антигенсвязывающий сайт, специфичный в отношении VEGF)/KD (антигенсвязывающий сайт, специфичный в отношении ANG-2) составляет 1,0-10,0, предпочтительно 1,5-8,0 (в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения - 5,0-8,0) и

предпочтительно абсолютная величина KD находится в диапазоне 10^{-8} - 10^{-13} моля/л. Величины KD определяют по ANG-2/VEGF связыванию BIACORE (см. пример 2 и фиг.15А). Поскольку оба белка, VEGF человека и ANG-2 человека, выступают в качестве растворимых рецепторов-лигандов в сыворотке человека примерно в равных концентрациях, блокирование указанных обоих рецепторов-лигандов биспецифическим антителом, отличающимся тем, что соотношения величин связывающего сродства KD (антигенсвязывающий сайт, специфичный в отношении VEGF)/KB (антигенсвязывающий сайт, специфичный в отношении ANG-2) составляют 1,0-10,0, предпочтительно 1,5-8,0, и в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения - 5,0-8,0 и может привести к улучшенным свойствам, связанным с антиангиогенными эффектами, подавлением роста опухолей или с механизмом устойчивости во время лечения рака или сосудистых заболеваний с помощью такого биспецифического антитела.

Предпочтительно указанное биспецифическое антитело отличается тем, что соотношение величин связывающего сродства KD (антигенсвязывающий сайт, специфичный в отношении VEGF)/KD (антигенсвязывающий сайт, специфичный в отношении ANG-2) составляет 1,0-10,0, предпочтительно 1,5-8,0 (в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения - 5,0-8,0), и указанное биспецифическое антитело включает в качестве первого сайта связывания антигена, специфически связывающегося с VEGF, переменный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:7 и переменный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO:8, в качестве указанного второго сайта связывания антигена специфически связывающегося с ANG-2, а) или переменный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:52, и переменный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO:53, или б) переменный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:84 и переменный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO:85.

В контексте настоящего изобретения понятие «антитело» относится к связывающему

белку, который включает сайты связывания антигена. Понятия «сайт связывания» или «сайт связывания антигена» в контексте настоящего изобретения означают область (области) молекулы антитела, с которыми фактически связывается лиганд. Понятие «сайт связывания антигена» относится к переменным доменам тяжелой цепи антитела (VH), и/или переменным доменам легкой цепи антитела (VL), или к паре VH/VL, и может быть производным от целых антител или фрагментов антител, например, одноцепочечного фрагмента Fv, домена VH и/или домена VL, Fab или (Fab)₂. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения каждый из сайтов связывания включает переменный домен тяжелой цепи антитела (VH) и/или переменный домен легкой цепи антитела (VL), и предпочтительно сформирован парой, состоящей из переменного домена легкой цепи антитела (VL) и переменного домена тяжелой цепи антитела (VH).

Сайт связывания антигена и особенно переменные домены тяжелой цепи (VH) и/или переменные домены легкой цепи (VL) антитела, которые специфически связываются с фактором роста сосудистого эндотелия (VEGF), могут быть производными от а) известных анти-VEGF антител, например, описанных Kim и др., Nature 362, 1993, сс.841-844; Warren R.S. и др., J. Clin. Invest. 95, 1995, сс.1789-1797; Borgstrom P. и др., Cancer Res. 56, 1996, сс.4032-4039; Melnyk O. и др., Cancer Res. 56, 1996, сс.921-924, WO 94/10202, WO 98/45332, WO 2005/00900, WO 00/35956 и US 2007/0141065, или б) новых анти-VEGF антител, полученных методами иммунизации de novo, используя inter alia или белок VEGF человека, или нуклеиновую кислоту или ее фрагменты, или методом фагового дисплея.

Сайт связывания антигена и особенно переменные домены тяжелой цепи (VH) антитела и/или переменные домены легкой цепи (VL) антитела, которые специфически связываются с ангиопоэтином-2 человека (ANG-2), могут быть производными от а) от известных aHTH-ANG-2 антител, например, описанных в WO 03/030833, WO 2006/068953, WO 2006/045049 или US 6166185, или б) из новых aHTH-ANG-2 антител, полученных, например, методами иммунизации de novo, используя inter alia или белок ANG-2 человека, или нуклеиновую кислоту, или ее фрагменты, или методом фагового дисплея.

Специфичностью антитела обозначают избирательное распознавание антитела для конкретного эпитопа антигена. Природные антитела, например, являются моноспецифическими.

Понятие «биспецифичные антитела» по настоящему изобретению означает антитела, которые обладают двумя разными специфичностями связывания антигена. Если антитело имеет более одной специфичности, распознаваемые эпитопы могут быть ассоциированы с одним антигеном или более чем с одним антигеном. Антитела по настоящему изобретению являются специфичными для двух разных антигенов, т.е. VEGF в виде первого антигена и ANG-2 в виде второго антигена.

Понятие «моноспецифичное антитело» в контексте настоящего изобретения относится к антителу, которое имеет один или несколько сайтов связывания, каждый из которых связывается с одним и тем же эпитопом одного и того же антигена.

Понятие «валентность» в контексте настоящего изобретения означает наличие специфического числа сайтов связывания в молекуле антитела. По существу понятия «двухвалентный», «четырёхвалентный» и «шестивалентный» означают наличие двух, четырех сайтов связывания и шести сайтов связывания, соответственно, в молекуле антитела. Биспецифические антитела по настоящему изобретению являются по меньшей мере «двухвалентными» и могут быть «трехвалентными» или «поливалентными» (например, «четырёхвалентными» или

«шестивалентными»). Предпочтительно биспецифическое антитело по настоящему изобретению является двухвалентным, трехвалентным или четырехвалентным. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело является двухвалентным. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело является четырехвалентным.

Антитела по настоящему изобретению имеют два или более сайтов связывания и являются биспецифическими. То есть, антитела могут быть биспецифическими даже в тех случаях, когда имеется более двух сайтов связывания (т.е. если антитело трехвалентно или поливалентно). Биспецифические антитела по настоящему изобретению включают, например, поливалентные одноцепочечные антитела, диантитела и триантитела, а также антитела, имеющие структуру константного домена антитела полной длины, с которой связаны дополнительные сайты связывания антигена (например, одноцепочечный фрагмент Fv, домен VH и/или домен VL, Fab или (Fab)₂) через один или несколько пептидных линкеров. Антитела могут быть полной длины от одного вида, или химерными, или гуманизированными. У антител с более чем двумя сайтами связывания антигена некоторые сайты связывания могут быть идентичными, пока белок имеет сайты связывания для двух разных антигенов. То есть, если первый сайт связывания специфичен для VEGF, то второй сайт связывания специфичен для ANG-2, и наоборот.

Фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF/VEGF-A) (SEQ ID NO:105) описан, например, Leung D.W. и др., Science 246, 1989, сс.1306-1309; Keck P.J. и др., Science 246, 1989, сс.1309-1312, и Connolly D.T. и др., J. Biol. Chem. 264, 1989, сс.20017-20024. VEGF участвует в регуляции нормального и измененного ангиогенеза и неоваскуляризации, связанных с опухолями и внутриглазными расстройствами (Ferrara N. и др., Endocr. Rev. 18, 1997, сс.4-25; Berkman R.A. и др., J. Clin. Invest. 91, 1993, сс.153-159; Brown L.F. и др., Human Pathol. 26, 1995, сс.86-91; Brown L.F. и др., Cancer Res. 53, 1993, сс.4727-4735; Mattern J. и др., Brit. J. Cancer. 73, 1996, сс.931-934; и Dvorak H. и др., Am. J. Pathol. 146, 1995, сс.1029-1039). VEGF является гомодимерным гликопептидом, выделенным из нескольких источников. VEGF проявляет высокоспецифичное митогенное действие в отношении клеток эндотелия.

Ангиопоэтин-2 человека (ANG-2) (также обозначаемый «ANGPT2» или «ANG2») (SEQ ID NO:106) описан Maisonpierre P.C. и др., Science 277, 1997, сс.55-60, и Cheung A.H. и др., Genomics 48, 1998, сс.389-391. Ангиопоэтин-1 и ангиопоэтин-2 (ANG-1 (SEQ ID NO:107) и ANG-2 (SEQ ID NO:106)) описаны в качестве лигандов для Tie - семейства тирозинкиназ, которые избирательно экспрессируются сосудистым эндотелием. Yancopoulos G.D. и др., Nature 407, 2000, сс.242-248. В настоящее время известно четыре характерных представителя семейства ангиопоэтина. Ангиопоэтин-3 и ангиопоэтин-4 (Ang-3 и Ang-4) могут представлять значительно измененные аналоги того же генного локуса у мышей и людей. Kim I. и др., FEBS Lett, 443, 1999, сс.353-356; Kim I. и др., J Biol Chem 274, 1999, сс.26523-26528. ANG-1 и ANG-2 первоначально были выявлены в экспериментах с культурами ткани в качестве агонистов и антагонистов, соответственно (см. по ANG-1: Davis S. и др., Cell 87, 1996, сс.1161-1169; и по ANG-2: Maisonpierre P.C. и др., Science 277, 1997, сс.55-60). Все известные ангиопоэтины связываются главным образом с Tie-2, и оба, Ang-1 и Ang-2 связываются с Tie-2 со сродством 3 нМ (Kd). Maisonpierre P.C. и др., Science 277, 1997, сс.55-60.

Сайты связывания антигена антител по настоящему изобретению обычно содержат шесть комплементарно детерминируемых областей (complementarity determining область

- CDR), которые влияют на различную степень сродства сайта связывания с антигеном. Имеется три переменных домена CDR тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2 и CDRH3) и три переменных домена CDR легкой цепи (CDRL1, CDRL2 и CDRL3). Протяженность CDR и каркасных участков (FR) определяют путем сравнения с базами данных аминокислотных последовательностей, в которых такие области идентифицируют по вариативности среди последовательностей. Также включенными в рамки охвата настоящего изобретения являются функциональные сайты связывания антигена, состоящие из меньшего числа CDR (т.е. где специфичность связывания определяется тремя, четырьмя или пятью областями CDR). Например, менее чем полный комплект из 6 CDR может быть достаточным для связывания. В некоторых случаях домена VH или VL может быть достаточно.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела по настоящему изобретению дополнительно включают константные области иммуноглобулина из одного или нескольких классов иммуноглобулинов. К классам иммуноглобулина относятся изотипы IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, а также в случае IgG и IgA их подтипы. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению имеет константную доменную структуру антитела типа IgG, но содержит четыре сайта связывания антигена. Это дополняется, например, связыванием двух полных сайтов связывания антигена (например, одноцепочечного фрагмента Fv), специфически связывающихся с EGFR или с N-, или с C-конца тяжелой или легкой цепи полного антитела, специфически связывающегося с ANG-2. В другом варианте это дополняется, например, связыванием двух полных связывающих пептидов, специфически связывающихся с ANG-2 с одним C-концом тяжелой цепи полного антитела, специфически связывающегося с VEGF. Четыре сайта связывания антигена предпочтительно включают два сайта связывания для каждой из двух разных связывающих специфичностей.

Понятия «моноклональное антитело» или «композиция моноклонального антитела» в контексте настоящего изобретения относятся к получению молекул антитела одного аминокислотного состава.

Понятие «химерное антитело» относится к антителу, включающему переменную область, т.е. область связывания, из одного источника или вида, и по меньшей мере часть константной области, производной от другого источника или вида, обычно полученных методами рекомбинации ДНК. Химерные антитела, включающие переменную область грызуна и константную область человека, являются предпочтительными. К другим предпочтительным формам «химерного антитела», охватываемым настоящим изобретением, относятся те формы, в которых константная область была модифицирована и изменена относительно исходного антитела для выработки свойств по настоящему изобретению, особенно в отношении связывания Clq и/или связывания рецептора Fc (FcR). Такие химерные антитела также называются «антителами переключения класса». Химерные антитела являются продуктом экспрессии генов иммуноглобулина, включающих сегменты ДНК, кодирующие переменные области иммуноглобулина, и сегменты ДНК, кодирующие константные области иммуноглобулина. Методы получения химерных антител включают традиционные методики рекомбинации ДНК и трансфекции генов, хорошо известные в данной области. См., например, Morrison S.L. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, ss.6851-6855; US 5202238 и US 5204244.

Понятие «гуманизированное антитело» относится к антителам, в которых каркасный участок или «комплементарно детерминирующие области (CDR)» модифицированы

для включения CDR иммуноглобулина другой специфичности по сравнению с CDR иммуноглобулина отличной специфичности по сравнению с иммуноспецифичностью исходного иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения CDR мыши переносят в каркасный участок антитела человека для

5 получения «гуманизированного антитела». См., например, Riechmann L. и др., *Nature* 332, 1988, сс.323-327; и Neuberger M.S. и др., *Nature* 314, 1985, сс.268-270. Особенно предпочтительные области CDR соответствуют областям, представляющим

10 последовательности, которые распознают антигены, указанные выше, для химерных антител. К другим формам «гуманизированного антитела» в настоящем изобретении относятся те формы, у которых константная область дополнительно модифицирована или изменена по сравнению с исходным антителом для получения свойств по настоящему изобретению, особенно в связи со связыванием Clq и/или со связыванием с рецептором Fc (FcR).

Понятие «антитело человека» в контексте настоящего изобретения относится к

15 антителам, имеющим переменные и константные области, происходящие от последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека известны в данной области (van Dijk M.A., van de Winkel J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 2001, сс.368-374). Антитела людей также могут быть получены у трансгенных животных (например, мышей), которые могут при иммунизации вырабатывать полный

20 набор или определенные антитела человека при отсутствии выработки эндогенного иммуноглобулина. Перенос генных последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека у таких мутантных мышей зародышевой линии может привести к выработке антител человека в отношении измененного антигена (см. например, Jakobovits A. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, сс.2551-2555; Jakobovits

25 A. и др., *Nature* 362, 1993, сс.255-258; Bruggemann M. и др., *Year Immunol.* 7, 1993, сс.33-40). Антитела человека также могут быть получены методом библиотек фагового дисплея (Hoogenboom H.R., Winter G.J. *Mol. Biol.* 227, 1992, сс.381-388; Marks J.D. и др., *J. Mol. Biol.* 222, 1991, сс.581-597). Методы Cole и др. и Boerner и др. также применимы для получения моноклональных антител человека (Cole S.P.C. и др., *Monoclonal antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 1985, сс.77-96; Boerner P. и др., *J. Immunol.* 147, 1991,

30 сс.86-95). Согласно указанному выше для химерных и гуманизированных антител по настоящему изобретению понятие «антитело человека», используемое в настоящем изобретении, также включает такие антитела, которые модифицированы в константной области для получения свойств по настоящему изобретению, особенно в связи со

35 связыванием Clq и/или связыванием FcR, например, путем «переключения класса», т.е. изменения или мутации частей Fc (например, с IgG1 на IgG4 и/или мутация IgG1/IgG4).

Понятие «рекомбинантное антитело человека» в контексте настоящего изобретения включает все антитела человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют методами рекомбинации, например, антитела, выделенные из клеток-хозяев,

40 например, клеток NSO или CHO, или из животного (например, мыши), трансгенного по генам иммуноглобулина человека, или антитела, экспрессированные с применением вектора рекомбинантной экспрессии, трансфицированного в клетки-хозяева. Такие рекомбинантные антитела людей содержат переменные и константные области в переустроенной форме. Рекомбинантные антитела по настоящему изобретению

45 подвергаются соматической гипермутации *in vivo*. Таким образом, аминокислотными последовательностями областей VH и VL рекомбинантных антител являются последовательности, которые происходят от последовательностей VH и VL зародышевой линии человека или связаны с ними, и могут в норме не существовать в природе в

составе зародышевой линии антитела человека *in vivo*.

Понятие «вариабельный домен» (вариабельный домен легкой цепи (VL), вариабельная область тяжелой цепи (VH)), используемое в настоящем изобретении, означает каждую пару легкой и тяжелой цепи, которая участвует непосредственно в связывании антитела с антигеном. Домены вариабельных легкой и тяжелой цепей человека имеют одинаковую общую структуру, и каждый домен включает четыре каркасных участка (FR), у которых последовательности в высокой степени консервативны, соединенные тремя «гипервариабельными областями» (или комплементарно детерминируемыми областями, CDR). Каркасные участки принимают конформацию β -слоя, и области CDR могут формировать петли, соединяющие структуру β -слоя. Области CDR в каждой цепи поддерживаются в трехмерной структуре за счет каркасных участков и формируют вместе с областями CDR из другой цепи сайт связывания антигена. Области CDR3 тяжелой и легкой цепей антитела играют особенно важную роль в связывающей специфичности/сродстве антител по настоящему изобретению и, следовательно, представляют другой объект по настоящему изобретению.

Понятия «гипервариабельная область» или «антигенсвязывающая часть антитела» при использовании в настоящем изобретении относятся к аминокислотным остаткам антитела, ответственным за связывание антигена. Гипервариабельная область включает аминокислотные остатки из «комплементарно детерминируемых областей (complementarity determining областьs - CDR)». К понятию «каркасные участки (Framework - FR)» относятся те области вариабельного домена, которые отличаются от остатков гипервариабельной области, согласно описанному в настоящем изобретении. Следовательно, легкие и тяжелые цепи антитела включают от N-конца к C-концу домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Области CDR в каждой цепи отделены такими аминокислотами каркасных участков. Особенно CDR3 тяжелой цепи представляют область, которая наибольшим образом влияет на связывание антигена. Области CDR и FR определяют по стандартному подходу Kabat и др., описанному в кн. «Sequences of Proteins of Immunological Interest»), 1991, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Мэриленд.

Биспецифические антитела по настоящему изобретению включают, помимо прочего, такие антитела, которые имеют «модификации консервативной последовательности» (обозначаемые «вариантами» биспецифических антител). К ним относятся модификации нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, которые не влияют или не изменяют указанные выше свойства антитела по настоящему изобретению.

Модификации могут быть интродуцированы стандартными методами, известными в данной области, например, сайт-направленным мутагенезом и ПЦР-опосредованным мутагенезом. К консервативным аминокислотным замещениям относятся замещения, при которых аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком со сходной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков со сходными боковыми цепями описаны в данной области. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, прогнозируемые аминокислотные остатки в биспецифическом <VEGF-ANG-2> <EGFR-IGF1R> антителе

могут быть предпочтительно замещены другими аминокислотными остатками из семейства той же боковой цепи. «Вариантом» биспецифического <VEGF-ANG-2> антитела в контексте настоящего изобретения называется молекула, которая отличается по аминокислотной последовательности от «исходной» аминокислотной последовательности биспецифического <VEGF-ANG-2> антитела десятию, предпочтительно примерно двумя-пятью, добавлениями, делециями и/или замещениями в одной или нескольких переменных областях или константных областях исходного антитела. Аминокислотные замещения могут быть получены мутагенезом, основанным на молекулярном моделировании, описанном Riechmann L. и др., Nature 332, 1988, сс.323-327, и Queen C. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1989, сс.10029-10033. К «варианту» биспецифического антитела <VEGF-ANG-2> по настоящему изобретению также относятся биспецифические антитела такого формата, в котором линкер (если он имеется) модифицирован или замещен другим линкером.

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

Связывание антитела с FcγRIII может быть исследовано методом BIAcore (фирма Pharmacia Biosensor AB, Упсала, Швеция). Сродство при связывании выражают в терминах k_a (константа скорости ассоциации антитела из комплекса антитело/антиген), k_D (константа диссоциации) и K_D (k_D/k_a).

В контексте настоящего изобретения понятие «не связывающееся с ANG-1» или «не связывающееся специфически с ANG-1» означает, что антитело имеет величину EC₅₀ примерно 8000 нг/мл в анализе связывания ANG-1 методом ELISA *in vitro* (по примеру 9).

Понятие «эпитоп» относится к какому-либо полипептидному детерминанту, способному специфически связываться с антителом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения детерминант эпитопа включает химически активные группы молекул, например, аминокислоты, боковые цепочки сахаров, фосфорил или сульфонил и, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, могут иметь специфические трехмерные структурные свойства и/или специфические характеристики заряда. Эпитоп является областью антигена, которая связывается антителом.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело рассматривают в качестве специфически связывающегося с антигеном, если оно преимущественно распознает антиген-мишень в сложной смеси белков и/или макромолекул.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело включает исходное антитело полной длины в качестве основы.

Понятие «антитело полной длины» означает антитело, состоящее из двух «тяжелых цепей антитела полной длины» и двух «легких цепей антитела полной длины». Понятие

«тяжелой цепи антитела полной длины» относится к полипептиду, состоящему в направлении от N-конца к С-концу из варибельного домена тяжелой цепи антитела (VH), константного домена 1 тяжелой цепи антитела (CH1), шарнирной области антитела (HR), константного домена 2 тяжелой цепи антитела (CH2) и константного домена 3 тяжелой цепи антитела (CH3), кратко обозначаемому VH-CH1-HR-CH2-CH3; и необязательно константному домену 4 тяжелой цепи антитела (CH4) в случае антитела подкласса IgE. Предпочтительно «тяжелой цепью антитела полной длины» является полипептид, состоящий в направлении от N-конца к С-концу из VH, CH1, HR, CH2 и CH3. Понятие «легкой цепи антитела полной длины» относится к полипептиду, состоящему в направлении от N-конца к С-концу из варибельного домена легкой цепи антитела (VL) и константного домена легкой цепи антитела (CL), кратко обозначаемому VL-CL. Константный домен легкой цепи антитела (CL) может быть κ (каппа) или λ (лямбда). Две цепи антитела полной длины связаны вместе через внутримолекулярные дисульфидные связи между доменом CL и доменом CH1 и между шарнирными областями тяжелых цепей антитела полной длины. Примерами типичного антитела полной длины являются природные антитела типа IgG (например, IgG1 и IgG2), IgM, IgA, IgD и IgE. Антитела полной длины по настоящему изобретению могут происходить от одного вида, например, от человека, или они могут быть химерными или гуманизированными антителами. Антитела полной длины по настоящему изобретению включают два сайта связывания антигена, каждый из которых сформирован парой VH и VL, причем оба специфически связываются с одним и тем же антигеном. Таким образом, моноспецифическое двухвалентное (= полной длины) антитело, включающее первый сайт связывания антигена и состоящее из двух легких цепей антитела и двух тяжелых цепей антитела, является антителом полной длины. С-конец тяжелой и легкой цепи указанного антитела полной длины означает последнюю аминокислоту с С-конца указанной тяжелой или легкой цепи. N-конец тяжелой цепи или легкой цепи указанного антитела полной длины означает последнюю аминокислоту с N-конца указанной тяжелой или легкой цепи.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения структуры биспецифических антител, а именно применительно к биспецифическим антителам, специфически связывающимся с фактором роста сосудистого эндотелия человека (human vascular endothelial growth factor - VEGF) и с ангиопоэтином-2 человека (angiopoietin-2 - ANG-2) по настоящему изобретению, являются двухвалентными антителами с двумя разными специфичностями, например, а) описанными в WO 2009/080251, WO 2009/080252 или WO 2009/080253 (антитела с замененными доменами - см. пример 13) или б) основанными на scFab-Fc гибридном антителе, в котором один одноцепочечный фрагмент Fab (в итоге стабилизированный дисульфидной связью) является специфичным в отношении VEGF, и другой одноцепочечный фрагмент Fab (в итоге стабилизированный дисульфидной связью) является специфичным в отношении ANG-2 (см. пример 14) или в) описанными Ridgway J.B., Protein Eng. 9, 1996, сс.617-621; WO 96/027011; Merchant A.M. и др., Nature Biotech 16, 1998, сс.677-681; Atwell S. и др., J. Mol. Biol. 270, 1997, сс.26-35 и EP 1870459A1.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанное биспецифическое антитело по настоящему изобретению отличается включением аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:123 и SEQ ID NO:124 или их вариантов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело по настоящему изобретению отличается включением аминокислотных

последовательностей SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:127 и SEQ ID NO:128 или их вариантов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело по настоящему изобретению отличается включением аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:131 и SEQ ID NO:132 или их вариантов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело по настоящему изобретению отличается включением аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:133, и SEQ ID NO:134 или их вариантов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело по настоящему изобретению отличается включением аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:135, и SEQ ID NO:136 или их вариантов.

Эти аминокислотные последовательности основаны на переменных доменах тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:7 и переменных доменах легкой цепи последовательности SEQ ID NO:8 (производной от бевацизумаба (авастина)) в качестве первого сайта связывания антигена с VEGF, и на переменных доменах тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:52 и на переменных доменах легкой цепи последовательности SEQ ID NO:53 (производной от Ang2i_LC06)) в качестве второго сайта связывания антигена с ANG-2.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанное биспецифическое антитело является трехвалентным, использующим, например, форматы, основанные на антителе полной длины, специфически связывающемся с одним из двух антигенов VEGF или ANG-2, с которыми только с одного С-конца тяжелой цепи гибридизирован фрагмент scFab, который специфически связывается с другим из двух антигенов, VEGF или ANG-2, включая методику «выступ-во-впадину», согласно описанному, например, в патентной заявке EP Appl. No 09004909.9 (см. пример 11), или, например, форматы, основанные на антителе полной длины, специфически связывающемся с одним из двух антигенов, VEGF или ANG-2, с которым только с одного С-конца тяжелой цепи VH или VH-CH1 фрагмента и гибридизированы с другого С-конца второй тяжелой цепи VL или VL-CL фрагмента, который специфически связывается с другим из двух антигенов, VEGF или ANG-2, включая методику «выступ-во-впадину», согласно описанию, например, в EP Appl. No 09005108.7 (см. пример 12).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело по настоящему изобретению отличается включением аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:116, и SEQ ID NO:117 или их вариантов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело по настоящему изобретению отличается включением аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:119, и SEQ ID NO:120 или их вариантов.

Эти аминокислотные последовательности основаны на последовательности SEQ ID NO:7 переменных доменов тяжелой цепи и последовательности SEQ ID NO:8 переменных доменов легкой цепи (производных от бевацизумаба (авастина)) в качестве первого сайта связывания антигена, связывающегося с VEGF, и на последовательности SEQ ID NO:52 переменных доменов тяжелой цепи, и на последовательности SEQ ID NO:53 переменных доменов легкой цепи (производных от Ang2i_LC06)) в качестве второго сайта связывания антигена, связывающегося с ANG-2.

Предпочтительными форматами биспецифического антитела для биспецифического антитела, специфически связывающимися с фактором роста сосудистого эндотелия (VEGF) и с ангиопоэтином-2 человека (ANG-2) по настоящему изобретению, являются

четырёхвалентные антитела (TvAb) с двумя разными специфичностями согласно описанию, например, в WO 2007/024715, WO 2007/109254 или EP Appl. No 09004909.9. Так в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанное биспецифическое антитело является четырёхвалентным, в котором использованы форматы согласно описанию, например, в WO 2007/024715, WO 2007/109254 или EP Appl. No 09004909.9 (см. примеры 1 или 10).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения биспецифическое четырёхвалентное антитело TyAb-2441-бевацизумаб-LC06 отличается включением пептида последовательности SEQ ID NO:102 и легкой цепи последовательности SEQ ID NO:62 или их вариантов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело по настоящему изобретению отличается включением аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:109, и SEQ ID NO:110 или их вариантов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело по настоящему изобретению отличается включением аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:111 и SEQ ID NO:112 или их вариантов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело по настоящему изобретению отличается включением аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:113 и SEQ ID NO:114 или их вариантов.

Эти аминокислотные последовательности основаны на переменных доменах тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:7 и переменных доменах легкой цепи последовательности SEQ ID NO:8 (производных от бевацизумаба (авастина)) в качестве первого сайта связывания антигена, связывающегося с VEGF, и на переменных доменах тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:52 и на переменных доменах легкой цепи последовательности SEQ ID NO:53 (производных от Ang2i_LC06)) в качестве второго сайта связывания антигена, связывающегося с ANG-2.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения биспецифическое четырёхвалентное антитело TyAb-2441-бевацизумаб-LC08 отличается включением пептида последовательности SEQ ID NO:103 и легкой цепи последовательности SEQ ID NO:62 или их вариантов.

Каждый сайт связывания антитела по настоящему изобретению может быть сформирован парой двух переменных доменов, т.е. одним переменным доменом тяжелой цепи и одним переменным доменом легкой цепи.

Минимальной детерминантой сайта связывания в антителе является область CDR3 тяжелой цепи.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело по настоящему изобретению является четырёхвалентным. В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанное четырёхвалентное биспецифическое антитело отличается следующими признаками:

оно состоит из:

а) моноспецифического двухвалентного исходного антитела, состоящего из двух тяжелых цепей антитела полной длины и двух легких цепей антитела полной длины, в соответствии с чем каждая цепь включает только один переменный домен,

б) двух пептидных линкеров,

в) двух моноспецифических одновалентных одноцепочечных антител, каждое из которых состоит из переменного домена тяжелой цепи антитела, переменного домена легкой цепи антитела и одноцепочечного линкера между переменным доменом тяжелой цепи указанного антитела и переменным доменом легкой цепи указанного

антитела;

и предпочтительно указанные одноцепочечные антитела связаны с одним и тем же концом (С- и N-концом) тяжелых цепей моноспецифического двухвалентного антитела, или, в другом варианте, с тем же концом (предпочтительно с С-концом) легких цепей моноспецифического двухвалентного антитела, и более предпочтительно с одним и тем же концом (С- и N-концом) тяжелых цепей моноспецифического двухвалентного антитела.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанное биспецифическое антитело является четырехвалентным и состоит из

а) антитела полной длины, включающего указанный сайт связывания антигена и состоящего из двух тяжелых цепей антитела и двух легких цепей антитела; и

б) двух идентичных одноцепочечных фрагментов Fab, включающих указанный второй сайт связывания антигена,

причем указанные одноцепочечные фрагменты Fab по пункту б) гибридизированы с указанным антителом полной длины по пункту а) через пептидный коннектор с С- или N-конца тяжелой или легкой цепи указанного антитела полной длины.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанное биспецифическое антитело является четырехвалентным и состоит из

а) антитела полной длины, включающего указанный второй сайт связывания антигена и состоящего из двух тяжелых цепей антитела и двух легких цепей антитела; и

б) двух идентичных одноцепочечных фрагментов Fab, включающих указанный первый сайт связывания антигена,

причем указанные одноцепочечные фрагменты Fab по пункту б) гибридизированы с указанным антителом полной длины по пункту а) через пептидный коннектор с С- или N-конца тяжелой или легкой цепи указанного антитела полной длины.

Предпочтительно указанные одноцепочечные фрагменты Fab по пункту б) гибридизированы с указанным антителом полной длины по пункту а) через пептидный коннектор с С-конца тяжелой цепи или легкой цепи указанного антитела полной длины.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения два идентичных одноцепочечных фрагмента Fab, связывающихся со вторым антигеном, гибридизированы с указанным антителом полной длины через пептидный коннектор по С-концу каждой, тяжелой или легкой, цепи указанного антитела полной длины.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения два идентичных одноцепочечных фрагмента Fab, связывающихся со вторым антигеном, гибридизированы с указанным антителом полной длины через пептидный коннектор по С-концу каждой тяжелой цепи указанного антитела полной длины.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения два идентичных одноцепочечных фрагмента Fab, связывающихся со вторым антигеном, гибридизированы с указанным антителом полной длины через пептидный коннектор по С-концу каждой легкой цепи указанного антитела полной длины.

Такие варианты осуществления настоящего изобретения, включающие одноцепочечные фрагменты Fab, более подробно описаны, например, в патентной заявке EP Appl. No 09004909.9, включенной в настоящее изобретение в виде ссылки.

Понятие «пептидный линкер», используемый в настоящем изобретении, означает пептид с аминокислотными последовательностями, который предпочтительно является синтетическим. Эти пептидные линкеры по настоящему изобретению используют для связывания разных антигенсвязывающих сайтов и/или фрагментов антитела, в результате включающих разные антигенсвязывающие сайты (например, одноцепочечный фрагмент

Fv, антитело полной длины, домен VH и/или домен VL, Fab, (Fab)₂, часть Fc) вместе для формирования биспецифического антитела по настоящему изобретению. Пептиды-линкеры могут включать одну или несколько из следующих аминокислотных последовательностей, перечисленных в табл.1, а также другие случайным образом выбранные аминокислоты. Указанными пептидами-линкерами являются пептиды с аминокислотной последовательностью по меньшей мере из 5 аминокислот в длину, предпочтительно по меньшей мере из 10 аминокислот в длину, более предпочтительно из 10-50 аминокислот в длину. Предпочтительно указанные пептиды-линкеры по пункту б) являются пептидами с аминокислотной последовательностью, состоящей по меньшей мере из 10 аминокислот. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанным пептидом-линкером является (GxS)_n с G = глицином, S = серином (x=3 и n=3, 4, 5 или 6) или (x=4 и n=2, 3, 4 или 5), предпочтительно x=4 и n=2 или 3, более предпочтительно с x=4, n=2 ((G₄S)₂). К указанному пептиду-линкеру (GxS)_n могут быть добавлены также дополнительные G = глицины, например, GG или GGG.

Понятие «одноцепочечный линкер» в контексте настоящего изобретения означает пептид с аминокислотными последовательностями, который предпочтительно является синтетическим. Такие одноцепочечные линкеры по настоящему изобретению используют для связывания доменов VH и VL для формирования одноцепочечного фрагмента Fv. Предпочтительно указанный одноцепочечный линкер по пункту в) является пептидом с аминокислотной последовательностью длиной по меньшей мере 15 аминокислот, более предпочтительно длиной по меньшей мере 20 аминокислот. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанным одноцепочечным линкером является (GxS)_n с G = глицином, S = серином (x=3 и n=4, 5 или 6) или (x=4 и n=3, 4 или 5), предпочтительно с x=4, n=4 или 5, более предпочтительно с x=4, n=4.

Кроме того, указанные одноцепочечные (одноцепочечный Fv) антитела предпочтительно стабилизированы дисульфидом. Такая дополнительная стабилизация одноцепочечного антитела достигается внедрением дисульфидной связи между переменными доменами одноцепочечных антител и описана, например, в WO 94/029350, Rajagopal V. и др., Prot. Engin. 10(12), 1997, cc.1453-1459; Kobayashi H. и др., Nuclear Medicine & Biology 25, 1998, cc.387-393; или Schmidt M. и др., Oncogene 18, 1999, cc.1711-1721.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусмотрены стабилизированные дисульфидной связью одноцепочечные (одноцепочечные Fv) антитела, причем дисульфидная связь между переменными доменами одноцепочечного антитела, включенная в антитело по настоящему изобретению, независимо для каждого одноцепочечного антитела выбрана из:

i) положения 44 переменного домена тяжелой цепи по отношению к переменному домену легкой цепи в положении 100,

ii) положения 105 переменного домена тяжелой цепи по отношению к переменному домену легкой цепи в положении 43, или

iii) положения 101 переменного домена тяжелой цепи по отношению к переменному домену легкой цепи в положении 100.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения дисульфидная связь между переменными доменами одноцепочечных антител, включенных в антитело по настоящему изобретению, находится между переменным доменом тяжелой цепи в положении 44 и переменным доменом легкой цепи в положении 100.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения дисульфидная связь между переменными доменами одноцепочечных антител, включенных в антитело по

настоящему изобретению, находится между вариабельным доменом тяжелой цепи в положении 105 и вариабельным доменом легкой цепи в положении 43.

Структура такого четырехвалентного варианта биспецифического антитела по настоящему изобретению, специфически связывающегося с VEGF и ANG-2, в котором одним из антигенов А или Б является VEGF, а другим антигеном является ANG-2. Структура, основанная на антителе полной длины, специфически связывающаяся с антигеном А, с которым два (необязательно стабилизированных дисульфидной связью) одноцепочечных фрагмента Fv, специфически связывающихся с антигеном Б, связаны через пептидный линкер; структура приведена в качестве примера на схемах на фиг.1 и 2.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанные одноцепочечные (одноцепочечные Fv) антитела без указанной необязательной дисульфидной стабилизации между вариабельными доменами VH и VL одноцепочечного антитела (одноцепочечного Fv) являются предпочтительными.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанное четырехвалентное биспецифическое антитело отличается тем, что указанное моноспецифическое двухвалентное антитело по пункту а) специфически связывается с VEGF и указанные два одновалентных моноспецифических одноцепочечных антитела по пункту в) связываются с ANG-2.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанное четырехвалентное биспецифическое антитело отличается тем, что указанное моноспецифическое двухвалентное антитело по пункту а) специфически связывается с ANG-2 и указанные два одновалентных моноспецифических одноцепочечных антитела по пункту в) связываются с VEGF.

Понятие «одноцепочечный фрагмент Fab» (см. фиг.11) означает полипептид, состоящий из вариабельного домена тяжелой цепи антитела (VH), константного домена 1 антитела (CH1), вариабельного домена легкой цепи антитела (VL), константного домена легкой цепи антитела (CL) и линкера, причем указанные доменные антитела и указанный линкер собраны в одном из следующих порядков в направлении от N-конца к С-концу: а) VH-CH1-линкер-VL-CL, б) VL-линкер-VH-CH1, в) VH-CL-линкер-VL-CH1 или г) VL-CH1-линкер-VH-CL; и в котором указанный линкер является полипептидом, состоящим по меньшей мере из 30 аминокислот, предпочтительно из 30-50 аминокислот. Указанные одноцепочечные фрагменты Fab а) VH-CH1-линкер-VL-CL, б) VL-CL-линкер-VH-CH1, в) VH-CL-линкер-VL-CH1 и г) VL-CH1-линкер-VH-CL стабилизированы через природную дисульфидную связь между доменом CL и доменом CH1. Понятие «N-конец» означает последнюю аминокислоту с N-конца. Понятие «С-конец» означает последнюю аминокислоту с С-конца.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанные домены антитела и указанный линкер в указанном одноцепочечном фрагменте Fab имеют одну из следующих организаций в направлении от N-конца к С-концу:

а) VH-CH1-линкер-VL-CL, или б) VL-CL-линкер-VH-CH1, более предпочтительно VL-CL-линкер-VH-CH1.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанные домены антитела и указанный линкер в указанном одноцепочечном фрагменте Fab имеют одну из следующих организаций в направлении от N-конца к С-концу:

а) VH-CL-линкер-VL-CH1 или б) VL-CH1-линкер-VH-CL.

Понятие «пептидный коннектор» в контексте настоящего изобретения означает

пептид с аминокислотными последовательностями, которые предпочтительно являются синтетическими. Такие пептидные коннекторы по настоящему изобретению используют для гибридизации одноцепочечных фрагментов Fab с C- или N-конца антитела полной

5 Предпочтительно указанные пептидные коннекторы по пункту б) являются пептидами с аминокислотной последовательностью, составляющей в длину по меньшей мере 5 аминокислот, предпочтительно 5-100, более предпочтительно 10-50 аминокислот. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанным пептидом коннектором является $(GxS)_n$ или $(GxS)_nG_m$ с G = глицином, S = серином, ($x=3$ и $n=3$,
10 4, 5 и $m=0$, 1, 2 или 3) или ($x=4$ и $n=2$, 3, 4 или 5 и $m=0$, 1, 2 или 3), предпочтительно $x=4$ и $n=2$ или 3, более предпочтительно с $x=4$, $n=2$. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанным пептидным коннектором является $(G_4S)_2$.

Понятие «линкер» в контексте настоящего изобретения означает пептид, предпочтительно синтезированный. Пептиды по настоящему изобретению используют
15 для связывания а) VH-CH1 с VL-CL, б) VL-CL с VH-CH1, в) VH-CL с VL-CH1 или г) VL-CH1 с VH-CL для формирования следующих одноцепочечных фрагментов Fab по настоящему изобретению а) VH-CH1-линкер-VL-CL, б) VL-CL-линкер-VH-CH1, в) VH-CL-линкер-VL-CH1 или г) VL-CH1-линкер-VH-CL. Указанный линкер в составе одноцепочечных фрагментов Fab является пептидом с аминокислотной
20 последовательностью длиной по меньшей мере 30 аминокислот, предпочтительно длиной 32-50 аминокислот. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения указанным линкером является $(GxS)_n$ с G = глицином, S = серином, ($x=3$ и $n=8$, 9 или 10 и $m=0$, 1, 2 или 3) или ($x=4$ и $n=6$, 1 или 8 и $m=0$, 1, 2 или 3), предпочтительно с $x=4$, $n=6$ или 7 и $m=0$, 1, 2 или 3, более предпочтительно с $x=4$, $n=7$ и $m=2$. В одном из
25 вариантов осуществления настоящего изобретения указанным линкером является $(G_4S)_6G_2$.

Необязательно в указанном одноцепочечном фрагменте Fab помимо природной дисульфидной связи между CL-доменом и доменом CH1 вариабельный домен тяжелой цепи антитела (VH) и вариабельный домен легкой цепи антитела (VL) стабилизированы
30 дисульфидной связью путем внедрения дисульфидной связи между следующими положениями:

- i) положением 44 в вариабельном домене тяжелой цепи и положением 100 в вариабельном домене легкой цепи,
- ii) положением 105 в вариабельном домене тяжелой цепи и положением 43 в
35 вариабельном домене легкой цепи, или
- iii) положением 101 в вариабельном домене тяжелой цепи и положением 100 в вариабельном домене легкой цепи (нумерация всегда приводится по индексу EU по Kabat).

Такая дополнительная стабилизация дисульфидной связью одноцепочечных
40 фрагментов Fab достигается внедрением дисульфидной связи между вариабельными доменами VH и VL одноцепочечных фрагментов Fab. Методы внедрения неестественных дисульфидных мостиков для стабилизации одноцепочечного фрагмента Fv описаны, например, в WO 94/029350, Rajagopal V. и др., Prot. Engin. 1997, сс.1453-1459, Kobayashi H. и др, Nuclear Medicine & Biology, 25, 1998, сс.387-393, или Schmidt M. и др., Oncogene 18, 1999, сс.1711-1721. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения оптимальная дисульфидная связь между вариабельными доменами одноцепочечных
45 фрагментов Fab, включенная в антитело по настоящему изобретению, находится между положением 44 в вариабельном домене тяжелой цепи и положением 100 в вариабельном

доме легкой цепи. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения оптимальная дисульфидная связь между переменными доменами одноцепочечных фрагментов Fab, включенных в антитело по настоящему изобретению, находится между положением 105 в переменном домене тяжелой цепи и положением 43 в переменном домене легкой цепи (нумерация всегда приводится по индексу EU по Kabat).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения одноцепочечный фрагмент Fab без указанной оптимальной стабилизации дисульфидной связью между переменными доменами VH и VL одноцепочечных фрагментов Fab является предпочтительным.

Предпочтительно указанный второй вариант осуществления четырехвалентного биспецифического антитела по настоящему изобретению включает два идентичных одноцепочечных фрагмента Fab (предпочтительно VL-CL-линкер-VH-CH1), которые оба гибридизированы с двумя С-концами двух тяжелых цепей или с двумя С-концами двух легких цепей указанного антитела полной длины по пункту а). Такая гибридизация приводит к двум идентичным гибридным пептидам (или i) тяжелой цепи и одноцепочечного фрагмента Fab или ii) легкой цепи и одноцепочечного фрагмента Fab), которые совместно экспрессируются либо с i) легкой цепью или тяжелой цепью антитела полной длины для получения биспецифического антитела по настоящему изобретению.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанное биспецифическое антитело отличается тем, что константная область происходит от человека.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанное биспецифическое антитело отличается тем, что константная область биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет подкласс IgG1 человека или подкласс IgG1 человека с мутациями L234A и L235A.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанное биспецифическое антитело отличается тем, что константная область биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет подкласс IgG2 человека.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанное биспецифическое антитело отличается тем, что константная область биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет подкласс IgG3 человека.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанное биспецифическое антитело отличается тем, что константная область биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет подкласс IgG4 человека, или подкласс IgG4 с дополнительной мутацией S228P.

В настоящее время установлено, что биспецифические антитела против VEGF человека и ANG-2 человека по настоящему изобретению обладают улучшенными свойствами, например, биологическим или фармакологическим действием, фармакокинетическими свойствами или токсичностью. Они показывают повышенное *in vivo* действие по подавлению роста опухолей и/или по подавлению ангиогенеза опухолей по сравнению с моноспецифическими исходными антителами против VEGF и ANG-2 (см. примеры 16, 17 и 18: сравнение разных биспецифических антител <VEGF-ANG-2> бевацизумаба-ANG2i-LC06 с моноспецифическими антителами - только с авастинном (бевацизумабом), только с ANG2i-LC06, или с обоими в комбинации).

Кроме того, слабое проявление побочных токсических эффектов (которое выражается в улучшенной массе тела испытуемых животных, а также меньшая гибель испытуемых животных при применении *in vivo*) по сравнению с применением двух соответствующих отдельных моноспецифических антител против VEGF и ANG-2 в комбинации также

проявляет преимущество биспецифических антител по настоящему изобретению.

Кроме того, биспецифические антитела по настоящему изобретению могут предоставить преимущества, например, пониженную дозу и/или частоту введения и одновременно меньшую стоимость.

5 Понятие «константная область», используемое в настоящем изобретении, означает сумму доменов антитела, отличных от вариабельной области.

Константная область непосредственно не участвует в связывании антигена, но проявляет разные эффекторные функции. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей антитела делят на классы:
 10 IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно поделены на подклассы, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, IgA1 и IgA2. Константные области тяжелой цепи, соответствующие разным классам антител, называются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Константные области легкой цепи, обнаруженные во всех пяти классах антител, называются κ (каппа) и λ (лямбда).

15 Понятие «константная область, происходящая от человека», используемое в настоящем изобретении, означает константную область тяжелой цепи антитела человека из подклассов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 и/или константную область каппа или лямбда легкой цепи. Такие константные области известны в данной области и, например, описаны Kabat E.A. (см. например Johnson G. и Wu T.T., Nucleic Acids Res. 28, 2000, сс.214-
 20 218; Kabat E.A. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1975, сс.2785-2788).

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

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению обладает пониженным связыванием с FcR по сравнению с
 30 антителом IgG1 и моноспецифическим двухвалентным (полной длины) исходным антителом в отношении FcR связывания подкласса IgG4, или подкласса IgG1 или IgG2 с мутацией в S228, L234, L235 и/или D265, и/или содержит мутацию PVA236. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения мутациями в моноспецифическом двухвалентном (полной длины) исходном антителе являются в IgG4 S228P и в IgG1
 35 L234A и L235A. Константные области тяжелой цепи показаны в последовательностях SEQ ID NO:35 и 36. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения константная область тяжелой цепи моноспецифического двухвалентного (полной длины) исходного антитела является последовательность SEQ ID NO:35 с мутациями L234A и L235A. В другом варианте осуществления настоящего изобретения константная
 40 область тяжелой цепи моноспецифического двухвалентного (полной длины) исходного антитела является последовательность SEQ ID NO:36 с мутацией S228P. В другом варианте осуществления настоящего изобретения константная область легкой цепи моноспецифического двухвалентного (полной длины) исходного антитела является областью каппа легкой цепи последовательности SEQ ID NO:37 или областью лямбда легкой цепи последовательности SEQ ID NO:34. Предпочтительно константная область тяжелой цепи моноспецифического двухвалентного (полной длины) исходного антитела является последовательностью SEQ ID NO:35 или SEQ ID NO:36 с мутацией S228P.

Константная область антитела непосредственно участвует в ADCC (antibody-dependent

cell-mediated cytotoxicity - антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности) и CDC (complement-dependent cytotoxicity - комплемент-зависимой цитотоксичности). Активация комплемента (CDC) инициируется связыванием фактора C1q комплемента с константной областью антител большинства подклассов IgG.

5 Связывание C1q с антителом вызывается определенными межбелковыми взаимодействиями по так называемому сайту связывания. Такие сайты связывания константной области известны в данной области и описаны, например, Lukas T.J. и др., J. Immunol. 127, 1981, cc.2555-2560; Brunhouse R. и Cebra J.J., Mol. Immunol. 16, 1979, cc.907-917; Burton D.R. и др., Nature 288, 1980, cc.338-344; Thommesen J.E. и др., Mol. Immunol. 37, 2000, cc.995-1004; Idusogie E.E. и др., J. Immunol. 164, 2000, cc.4178-4184; Hezareh M. и др., J. Virol. 75, 2001, cc.12161-12168; Morgan A. и др., Immunology 86, 1995, cc.319-324; и EP 0 307 434. Такие сайты связывания константной области, например, отличаются аминокислотами L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация всегда приводится по индексу EU по Kabat).

15 Понятие «антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC)» относится к лизису клеток-мишеней человека антителом по настоящему изобретению в присутствии эффекторных клеток. ADCC измеряют предпочтительно путем обработки препарата CCR5 экспрессирующих клеток с антителом по настоящему изобретению в присутствии эффекторных клеток, например, свежевыделенных МКПК или очищенных эффекторных клеток из лейкоцитных пленок, например, моноцитов или природных клеток-киллеров (natural killer - NK) или линий постоянно растущих NK.

Понятие «комплемент-зависимая цитотоксичность - complement-dependent cytotoxicity (CDC)» означает процесс, инициированный связыванием фактора C1q комплемента с 25 частью Fc большинства подклассов IgG антител. Связывание C1q с антителом вызвано определенными межбелковыми взаимодействиями по так называемому сайту связывания. Такие сайты связывания части Fc известны в данной области (см. выше). Такие сайты связывания части Fc отличаются, например, аминокислотами L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация приводится по индексу EU по Kabat). Антитела 30 подклассов IgG1, IgG2 и IgG3 обычно проявляют активацию комплемента, включая связывание C1q и C3, а IgG4 не активирует систему комплемента и не связывается с C1q и/или C3.

Антитело по настоящему изобретению получают методами рекомбинации. Одним из объектов настоящего изобретения является нуклеиновая кислота, кодирующая 35 антитело по настоящему изобретению, а другим объектом - клетки, включающие указанную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело по настоящему изобретению. Получение антител методами рекомбинации известно в данной области и включает экспрессию белка в прокариотических и эукариотических клетках с последующим выделением антитела и обычно очисткой до фармацевтически приемлемой чистоты. 40 Для экспрессии антител, указанной выше в клетках-хозяевах, нуклеиновые кислоты, кодирующие соответствующим образом модифицированные легкие и тяжелые цепи, инсертированы в векторы экспрессии стандартными методами. Экспрессию проводят в соответствующих прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, например, клетках CHO, клетках NS0, клетках SP2/0, клетках HEK293, клетках COS, клетках PER.C6, в клетках дрожжей или E.coli, и антитело выделяют из клеток (супернатанта или клеток после лизиса). Основные методы рекомбинантного получения антител 45 известны в данной области и описаны, например, в обзорных статьях Makrides S.C., Protein Expr. Purif. 17, 1999, cc.183-202; Geisse S. и др., Protein Expr. Purif. 8, 1996, cc.271-

282; Kaufman R.J., *Mol. Biotechnol.* 16, 2000, сс.151-160; Werner R.G., *Drug Res.* 48, 1998, сс.870-880.

Биспецифические антитела соответствующим образом отделяют от культуральной среды с помощью обычных методов очистки иммуноглобулина, например, хроматографией на белке А-сефарозе, гидроксилапатите, гель-электрофорезом, диализом или аффинной хроматографией. ДНК и РНК, кодирующие моноклональные антитела, легко выделить и секвенировать с помощью обычных методов. Гибридомные клетки могут служить источником таких ДНК и РНК. После выделения ДНК может быть инсертирована в векторы экспрессии, которые затем трансфецируют в клетки-хозяева, например, клетки НЕК293, клетки СНО или клетки миеломы, которые в других обстоятельствах не вырабатывают белок иммуноглобулин, для синтеза рекомбинантных моноклональных антител в клетках-хозяевах.

Варианты (или мутанты) аминокислотных последовательностей биспецифического антитела получают путем интродукции соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК антитела или путем нуклеотидного синтеза. Такие модификации могут быть выполнены, однако в крайне ограниченном диапазоне, например, описанном выше. Например, модификации не изменяют указанные выше свойства антитела, например, изотип IgG и связывание антигена, но могут улучшить выход рекомбинантного продукта, стабильность белка или способствовать очистке.

Понятие «клетка-хозяин» в контексте настоящего изобретения означает какой-либо тип клеточной системы, который может быть сконструирован для выработки антител по настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения в качестве клеток-хозяев используют клетки НЕК293 и клетки СНО. В контексте настоящего изобретения понятия «клетки» и «линия клеток» используют взаимозаменяемо, а также включают последующие генерации этих клеток. Таким образом, понятия «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают первичные клетки субъекта и культуры, производные от них независимо от числа пересевов. Также следует учитывать, что все последующие генерации клеток могут быть полностью неидентичными по ДНК из-за тщательно спланированных или случайных мутаций. К этим понятиям также относятся варианты клеток следующей генерации, которые имеют то же биологическое действие или функцию, выявляемые при скрининге первоначально трансформированных клеток.

Экспрессию в клетках NS0 описывают, например, Barnes L.M. и др., *Cytotechnology* 32, 2000, сс.109-123; Barnes L.M. и др., *Biotech. Bioeng.* 73, 2001, сс.261-270.

Кратковременную экспрессию описывают, например, Durocher Y. и др., *Nucl. Acids. Res.* 30 E9, 2002. Клонирование вариабельных доменов описано Orlandi R. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1989, сс.3833-3837; Carter P. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1992, сс.4285-4289; Norderhaug L. и др., *J. Immunol. Methods* 204, 1997, сс.77-87.

Предпочтительная система кратковременной экспрессии (НЕК 293) описана Schlaeger E.-J. и Christensen K., *Cytotechnology* 30, 1999, сс.71-83, и Schlaeger E.-J., *J. Immunol. Methods* 194, 1996, сс.191-199.

Контрольные последовательности, применимые для прокариот, например, включают промотор, необязательно последовательности оператора и сайта связывания рибосомы. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, энхансеры и сигналы полиаденилирования.

Нуклеиновая кислота является «оперативно связанной», если она установлена в функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК предпоследовательности или секреторного лидера оперативно связана с ДНК

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

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

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

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело по настоящему изобретению предназначено для лечения рака.

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

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

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

В контексте настоящего изобретения понятие «фармацевтический носитель» включает

какой-либо или все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты задержки всасывания, а также другие физиологически совместимые агенты. Предпочтительно носитель применим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидурального введения (например, инъекцией или инфузией).

Композиция по настоящему изобретению может вводиться разными способами, известными в данной области. Специалистам известно, что способ применения и/или способ введения могут варьировать в зависимости от требуемого результата. Для введения соединения по настоящему изобретению определенными способами введения может потребоваться нанесение покрытия на соединение или совместное введение материала, предупреждающего инактивацию соединения. Например, соединение может вводиться субъекту на соответствующем носителе, например, в липосомах или растворителе. К фармацевтически приемлемым растворителям относятся физиологический раствор и водные буферные растворы. К фармацевтическим носителям относятся стерильные водные растворы или дисперсии, а также стерильные порошки для быстрого получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Применение таких сред и агентов для фармацевтически действующих веществ известно в данной области.

В контексте настоящего изобретения фразы «парентеральное введение» или «введенные парентерально» означают способы введения, отличающиеся от введения внутрь и местного введения, обычно осуществляемого путем инъекции, и означают, но ими не ограничиваются, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, интратекальное, интракапсулярное, внутриглазное, интракардиальное, внутрикожное, внутрибрюшинное, внутритрахеальное, подкожное, субкутикулярное, внутрисуставное, внутрикапсулярное, субарахноидально, эпидурально и надчревное введение инъекцией или инфузией.

Понятие «рак», используемое в настоящем изобретении, относится к пролиферативным заболеваниям, например, к лимфомам, лимфоцитарным лейкозам, раку легких, немелкоклеточному раку легких, бронхоальвеолярному раку легкого, раку костей, раку поджелудочной железы, раку кожи, раку головы и шеи, кожной и внутриглазной меланоме, раку матки, раку яичника, раку прямой кишки, раку анальной области, раку желудка, раку толстой кишки, раку груди, раку матки, карциноме фаллопиевых труб, карциноме эндометрия, карциноме шейки матки, карциноме влагалища, карциноме вульвы, ходжкинской лимфоме, раку пищевода, раку тонкого кишечника, раку эндокринной системы, раку щитовидки, раку паращитовидки, раку надпочечников, саркоме мягких тканей, раку уретры, раку пениса, раку простаты, раку мочевого пузыря, раку почки или мочеточника, светлоклеточному раку, карциноме почечной лоханки, мезотелиоме, гепатоклеточному раку, раку желчных путей, неоплазмам центральной нервной системы (ЦНС), раку позвоночника, глиоме ствола мозга, мультиформной глиоме, астроцитоме, шваннозу, эпендимоме, медуллобластоме, менингиоме, плоскоклеточной карциноме, питуитарной аденоме и саркоме Юинга, включая устойчивые версии какого-либо из указанных выше форм рака или комбинацию указанных выше одной или нескольких форм рака.

Другим объектом настоящего изобретения является биспецифическое антитело по настоящему изобретению или указанная фармацевтическая композиция в качестве антиангиогенного агента. Такой антиангиогенный агент может применяться для лечения рака, особенно солидных опухолей, и других сосудистых заболеваний.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения представлено

биспецифическое антитело по настоящему изобретению для лечения сосудистых заболеваний.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения представлена указанная фармацевтическая композиция для лечения сосудистых заболеваний.

5 Другим объектом по настоящему изобретению является применение антитела по настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения сосудистых заболеваний.

10 Другим объектом по настоящему изобретению является способ лечения пациента с сосудистыми заболеваниями путем введения антитела по настоящему изобретению пациенту, нуждающемуся в таком лечении.

К понятию «сосудистые заболевания» относятся рак, воспалительные заболевания, атеросклероз, ишемия, травмы, сепсис, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), астма, диабет, СДС, ретинопатия, удар, ожирение, острое повреждение легких, кровоизлияние, сосудистые истечения, например, индуцированное цитокином, аллергия, 15 болезнь Грейвса, аутоиммунный тиреоидит Хашимото, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, гигантоклеточный артериит, ревматоидный артрит, системная красная волчанка (СКВ), волчаночный нефрит, болезнь Крона, рассеянный склероз, язвенный колит, особенно солидные опухоли, внутриглазные сосудистые синдромы, например, пролиферативные ретинопатии или старческая дегенерация 20 сетчатки (СДС), ревматоидный артрит и псориаз (Folkman J. и др., J. Biol. Chem. 267, 1992, сс.10931-10934; Klagsbrun M. и др., Annu. Rev. Physiol. 53, 1991, сс.217-239; и Garner A. в кн.: «Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach»), 1994, под ред. Garner A. и Klintonworth G.K., 2-е изд., изд-во Marcel Dekker, Нью-Йорк, сс.1625-1710).

Эти композиции также могут содержать адъюванты, например, консерванты, 25 увлажняющие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Гарантированного предупреждения наличия микроорганизмов можно достичь и описанными выше процедурами стерилизации, и включением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и др. Может быть желательным включение в композиции 30 изотонических агентов, например, сахаров, натрия хлорида и других. Кроме того, пролонгированное всасывание инъекционной фармацевтической формы может быть достигнуто, например, включением агентов, которые отсрочивают всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Независимо от выбранного способа введения соединений по настоящему 35 изобретению, которые могут применяться в соответствующей гидратированной форме, и/или фармацевтических композиций по настоящему изобретению, соединения перерабатывают в фармацевтически приемлемые лекарственные формы путем обычных методов, известных специалистам в данной области.

Фактические уровни дозирования действующих ингредиентов в фармацевтических 40 композициях по настоящему изобретению могут варьировать таким образом, чтобы получить количество действующего ингредиента, эффективного для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозирования может зависеть от разных фармакокинетических факторов, включая действие определенных 45 композиций по настоящему изобретению, способа введения, времени введения, скорости экскреции определенного вводимого соединения, длительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации с определенными используемыми композициями, возраста, пола, массы тела, состояния,

общего состояния здоровья и истории болезни подвергаемого лечению пациента и других факторов, известных в медицине.

Композиция должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы композиция могла вводиться шприцом. Помимо воды носителем предпочтительно является

5 изотонический буферный солевой раствор.

Должная текучесть может поддерживаться, например, применением покровных материалов, например, лецитина, поддержанием требуемого размера частиц в случае дисперсии и использованием поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно включать в композиции изотонические агенты, например, сахара,

10 полиатомные спирты, например, маннит или сорбит и хлорид натрия.

В контексте настоящего изобретения понятия экспрессии «клеток», «клеточной линии» и «культуры клеток» используют взаимозаменяемо, и все эти обозначения также включают потомство указанных клеток. Таким образом, термины «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают первичные клетки субъекта и полученные

15 от него культуры клеток независимо от числа пересевов. Также следует учитывать, что все потомство может быть в точности неидентичным по содержанию ДНК из-за плановых или случайных мутаций. Варианты потомства клеток, которые имеют ту же функцию или биологическое действие, которые подвергали скринингу у исходных трансформированных клеток, также относятся к указанным терминам. Если

20 подразумеваются другие значения, это будет ясно из контекста.

Понятие «трансформация» в контексте настоящего изобретения относится к процессу переноса векторов/нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Если клетки без труднопреодолимых барьеров в виде клеточных стенок используют в качестве клеток-хозяев, трансфекцию проводят, например, методом осаждения фосфатом кальция,

25 описанным Graham F.L. и Van der Eb A.J., Virology 52, 1978, сс.546. Однако также могут применяться другие способы интродукции ДНК в клетки, например, инъекцией в ядро или гибридизацией протопластов. Если используют прокариотические клетки или клетки с прочным строением клеточной стенки, например, одним из методов трансфекции является обработка кальцием, использующая хлорид кальция согласно описанию Cohen

30 S.N. и др, PNAS. 69, 1972, сс.2110-2114.

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

35 кодируемые полипептиды в совокупности называются генным продуктом. Если полинуклеотид происходит от геномной ДНК, экспрессия в эукариотических клетках может включать сплайсинг иРНК.

Понятие «вектор» означает молекулу нуклеиновой кислоты, в частности самореплицирующуюся, которая переносит инсертированную молекулу нуклеиновой

40 кислоты в и/или между клетками-хозяевами. К этому понятию относятся векторы, которые действуют в основном для инсерции ДНК или РНК в клетку (например, интеграция в хромосому), репликации векторов, функция которых преимущественно заключается в репликации ДНК или РНК, и векторы экспрессии, которые действуют для транскрипции и/или трансляции ДНК или РНК. Также к этому понятию относятся

45 векторы, которые обеспечивают более одной из описанных функций.

Понятие «вектор экспрессии» означает полинуклеотид, который при внедрении в определенные клетки-хозяева, может быть транскрибирован и транслирован в полипептид. Понятие «система экспрессии» обычно относится к соответствующим

клеткам-хозяевам, включающим вектор экспрессии, который может функционировать для получения экспрессируемого продукта.

Описание аминокислотных последовательностей

5	SEQ ID NO:1	CDR3 тяжелой цепи, <VEGF> бевацизумаб
	SEQ ID NO:2	CDR2 тяжелой цепи, <VEGF> бевацизумаб
	SEQ ID NO:3	CDR1 тяжелой цепи, <VEGF> бевацизумаб
	SEQ ID NO:4	CDR3 легкой цепи, <VEGF> бевацизумаб
	SEQ ID NO:5	CDR2 легкой цепи, <VEGF> бевацизумаб
	SEQ ID NO:6	CDR1 легкой цепи, <VEGF> бевацизумаб
10	SEQ ID NO:7	Вариабельный домен тяжелой цепи, <VEGF> бевацизумаб
	SEQ ID NO:8	Вариабельный домен легкой цепи, <VEGF> бевацизумаб
	SEQ ID NO:9	CDR3 тяжелой цепи, <VEGF> ранибизумаб
	SEQ ID NO:10	CDR2 тяжелой цепи, <VEGF> ранибизумаб
	SEQ ID NO:11	CDR1 тяжелой цепи, <VEGF> ранибизумаб
	SEQ ID NO:12	CDR3 легкой цепи, <VEGF> ранибизумаб
15	SEQ ID NO:13	CDR2 легкой цепи, <VEGF> ранибизумаб
	SEQ ID NO:14	CDR1 легкой цепи, <VEGF> ранибизумаб
	SEQ ID NO:15	Вариабельный домен тяжелой цепи, <VEGF> ранибизумаб
	SEQ ID NO:16	Вариабельный домен легкой цепи, <VEGF> ранибизумаб
	SEQ ID NO:17	CDR3 тяжелой цепи, <VEGF> HuMab G6-31
20	SEQ ID NO:18	CDR2 тяжелой цепи, <VEGF> HuMab G6-31
	SEQ ID NO:19	CDR1 тяжелой цепи, <VEGF> HuMab G6-31
	SEQ ID NO:20	CDR3 легкой цепи, <VEGF> HuMab G6-31
	SEQ ID NO:21	CDR2 легкой цепи, <VEGF> HuMab G6-31
	SEQ ID NO:22	CDR1 легкой цепи, <VEGF> HuMab G6-31
	SEQ ID NO:23	Вариабельный домен тяжелой цепи, <VEGF> HuMab G6-31
25	SEQ ID NO:24	Вариабельный домен легкой цепи, <VEGF> HuMab G6-31
	SEQ ID NO:25	CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Mab 536
	SEQ ID NO:26	CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Mab 536
	SEQ ID NO:27	CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Mab 536
	SEQ ID NO:28	CDR3 легкой цепи, <ANG-2> Mab 536
	SEQ ID NO:29	CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Mab 536
30	SEQ ID NO:30	CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Mab 536
	SEQ ID NO:31	Вариабельный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Mab 536
	SEQ ID NO:32	Вариабельный домен легкой цепи, <ANG-2> Mab 536
	SEQ ID NO:33	(G4S) ₄ линкер
	SEQ ID NO:34	Константная область легкой цепи лямбда
	SEQ ID NO:35	Константная область тяжелой цепи человека, производная от IgG1
35	SEQ ID NO:36	Константная область тяжелой цепи человека, производная от IgG4
	SEQ ID NO:37	Константная область легкой цепи каппа
	SEQ ID NO:38	CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
	SEQ ID NO:39	CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
	SEQ ID NO:40	CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
	SEQ ID NO:41	CDR3 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
40	SEQ ID NO:42	CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
	SEQ ID NO:43	CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
	SEQ ID NO:44	Вариабельный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
	SEQ ID NO:45	Вариабельный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
	SEQ ID NO:46	CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC06
	SEQ ID NO:47	CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC06
45	SEQ ID NO:48	CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC06
	SEQ ID NO:49	CDR3 легкой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC06
	SEQ ID NO:50	CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC06
	SEQ ID NO:51	CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC06
	SEQ ID NO:52	Вариабельный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC06

5	SEQ ID NO:53	Вариабельный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC06
	SEQ ID NO:54	CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC07
	SEQ ID NO:55	CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC07
	SEQ ID NO:56	CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC07
	SEQ ID NO:57	CDR3 легкой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC07
	SEQ ID NO:58	CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC07
	SEQ ID NO:59	CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC07
	SEQ ID NO:60	Вариабельный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC07
	SEQ ID NO:61	Вариабельный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC07
	SEQ ID NO:62	CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC08
10	SEQ ID NO:63	CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC08
	SEQ ID NO:64	CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC08
	SEQ ID NO:65	CDR3 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC08
15	SEQ ID NO:66	CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC08
	SEQ ID NO:67	CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC08
	SEQ ID NO:68	Вариабельный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC08
	SEQ ID NO:69	Вариабельный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC08
	SEQ ID NO:70	CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09
	SEQ ID NO:71	CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09
	SEQ ID NO:72	CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09
	SEQ ID NO:73	CDR3 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09
	SEQ ID NO:74	CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09
	SEQ ID NO:75	CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09
20	SEQ ID NO:76	Вариабельный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09
	SEQ ID NO:77	Вариабельный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09
	SEQ ID NO:78	CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10
	SEQ ID NO:79	CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10
	SEQ ID NO:80	CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10
	SEQ ID NO:81	CDR3 легкой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10
	SEQ ID NO:82	CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10
	SEQ ID NO:83	CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10
	SEQ ID NO:84	Вариабельный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10
	SEQ ID NO:85	Вариабельный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10
30	SEQ ID NO:86	CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC1 1
	SEQ ID NO:87	CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC1 1
	SEQ ID NO:88	CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC1 1
	SEQ ID NO:89	CDR3 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC1 1
35	SEQ ID NO:90	CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11
	SEQ ID NO:91	CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11
	SEQ ID NO:92	Вариабельный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11
	SEQ ID NO:93	Вариабельный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11
	SEQ ID NO:94	CDR3 тяжелой цепи, <VEGF> B20-4.1
	SEQ ID NO:95	CDR2 тяжелой цепи, <VEGF> B20-4.1
	SEQ ID NO:96	CDR1 тяжелой цепи, <VEGF> B20-4.1
	SEQ ID NO:98	CDR2 легкой цепи, <VEGF> B20-4.1
	SEQ ID NO:99	CDR1 легкой цепи, <VEGF> B20-4.1
	SEQ ID NO:100	Вариабельный домен тяжелой цепи, <VEGF> B20-4.1
45	SEQ ID NO:101	Вариабельный домен легкой цепи, <VEGF> B20-4.1
	SEQ ID NO:102	Гибридный пептид тяжелой цепи бевацизумаба Ang2i_LC06 scFv антитела <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-бевацизумаб-LC06
	SEQ ID NO:103	Гибридный пептид тяжелой цепи бевацизумаба Ang2i_LC08 scFv антитела <VEGF-ANG-2> TyAb-2441-бевацизумаб-LC08
	SEQ ID NO:104	Легкая цепь бевацизумаба
	SEQ ID NO:105	Фактор роста сосудистого эндотелия человека (human vascular endothelial growth factor - (VEGF))

5	SEQ ID NO: 106	Ангиопозтин-2 человека (ANG-2)
	SEQ ID NO: 107	Ангиопозтин-1 человека (ANG-1)
	SEQ ID NO: 108	Рецептор Tie-2 человека
	SEQ ID NO: 109	Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического четырехвалентного одноцепочечного Fab <VEGF-ANG-2> антитела scFab-авастин-LC06-2620
	SEQ ID NO: 110	Легкая цепь молекулы биспецифического четырехвалентного одноцепочечного Fab <VEGF-ANG-2> антитела scFab-авастин-LC06-2620
10	SEQ ID NO: 111	Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического четырехвалентного одноцепочечного Fab <VEGF-ANG-2> антитела scFab-авастин-Ang2i-LC06-2640
	SEQ ID NO: 112	Легкая цепь молекулы биспецифического четырехвалентного одноцепочечного Fab <VEGF-ANG-2> антитела scFab-Авастин-Ang2i-LC06-2640
15	SEQ ID NO: 113	Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического четырехвалентного одноцепочечного Fab <VEGF-ANG-2> антитела scFab-Авастин-Ang2i-LC06-2641
	SEQ ID NO: 114	Легкая цепь молекулы биспецифического четырехвалентного одноцепочечного Fab <VEGF-ANG-2> антитела scFab-Авастин-Ang2i-LC06-2641
	SEQ ID NO: 115	Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического трехвалентного одноцепочечного Fab <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-KiH-C-scFab
	SEQ ID NO: 116	Тяжелая цепь 2 молекулы биспецифического трехвалентного одноцепочечного Fab <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-KiH-C-scFab
	SEQ ID NO: 117	Легкая цепь молекулы биспецифического трехвалентного <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-KiH-C-scFab
20	SEQ ID NO: 118	Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического трехвалентного <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-C-Fab-6CSS
	SEQ ID NO: 119	Тяжелая цепь 2 молекулы биспецифического трехвалентного <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-C-Fab-6CSS
	SEQ ID NO: 120	Легкая цепь молекулы биспецифического трехвалентного <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-C-Fab-6CSS
25	SEQ ID NO: 121	Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического двухвалентного с замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-CH1-CL
	SEQ ID NO: 122	Тяжелая цепь 2 молекулы биспецифического двухвалентного с замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-CH1-CL
	SEQ ID NO: 123	Легкая цепь 1 молекулы биспецифического двухвалентного с замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-CH1-CL
	SEQ ID NO: 124	Легкая цепь 2 молекулы биспецифического двухвалентного с замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-CH1-CL
30	SEQ ID NO: 125	Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического двухвалентного с замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-VH-VL
	SEQ ID NO: 126	Тяжелая цепь 2 молекулы биспецифического двухвалентного с замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-VH-VL
	SEQ ID NO: 127	Легкая цепь 1 молекулы биспецифического двухвалентного с замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-VH-VL
	SEQ ID NO: 128	Легкая цепь 2 молекулы биспецифического двухвалентного с замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-VH-VL
35	SEQ ID NO: 129	Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического двухвалентного с замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-VH-VL-SS
	SEQ ID NO: 130	Тяжелая цепь 2 молекулы биспецифического двухвалентного с замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-VH-VL-SS
40	SEQ ID NO: 131	Легкая цепь 1 молекулы биспецифического двухвалентного с замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-VH-VL-SS
	SEQ ID NO: 132	Легкая цепь 2 молекулы биспецифического двухвалентного с замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-VH-VL-SS
	SEQ ID NO: 133	Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического двухвалентного ScFab-Fc гибрида <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-N-scFab
	SEQ ID NO: 134	Тяжелая цепь 2 молекулы биспецифического двухвалентного ScFab-Fc гибрида <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-N-scFab
	SEQ ID NO: 135	Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического двухвалентного ScFab-Fc гибрида <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-N-scFabSS
45	SEQ ID NO: 136	Тяжелая цепь 2 молекулы биспецифического двухвалентного ScFab-Fc гибридного <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-N-scFabSS

Приводимые ниже примеры, перечни последовательностей и фигуры предусмотрены для лучшего понимания настоящего изобретения, область охвата которого ограничена формулой настоящего изобретения. Следует учитывать, что модификации могут быть

получены в указанных ниже методах без отклонения от духа настоящего изобретения.

Описание фигур

Фиг.1А. Схематическое изображение одного из вариантов четырехвалентного биспецифического антитела по настоящему изобретению, связывающегося с VEGF и ANG-2, в котором одним из антигенов А или Б является VEGF, а другим антигеном является ANG-2. Структура основана на антителе полной длины, связывающемся с антигеном А, к которому два (необязательно стабилизированных дисульфидной связью) одноцепочечных фрагмента Fv, связывающихся с антигеном Б, присоединены через пептидный линкер.

Фиг.1Б. Схематическое изображение полученных биспецифических четырехвалентных антител с использованием номенклатуры TvAb (см. примеры) - либо без стабилизации дисульфидной связью, либо со стабилизацией дисульфидной связью фрагмента scFv.

Фиг.2А. Схематическое изображение стабилизированного дисульфидной связью <VEGF-ANG-2> биспецифического четырехвалентного антитела (= <VEGF-ANG-2>

TvAb6; No. 2331, см. табл.3).

Фиг.2Б. Плазмидные карты модифицированных векторов тяжелой и легкой цепи, применяемых для экспрессии стабилизированного дисульфидной связью антитела <VEGF-ANG-2> TvAb6.

Фиг.3. SDS-PAGE очищенного стабилизированного дисульфидной связью <VEGF-ANG-2> TvAb6 в сравнении со «стандартным» IgG1 антителом человека G6-31 (<VEGF> HuMab G6-31) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

Фиг.4. Эксклюзионная хроматография очищенного стабилизированного дисульфидной связью <VEGF-ANG-2> TvAb6 в сравнении со «стандартным» IgG1 антителом человека G6-31 показывает, что стабилизированное дисульфидной связью TvAb6 не формирует заново агрегаты при очистке.

Фиг.5. Схематическое изображение и результаты анализа связывания VEGF методом ELISA. Стабилизированное дисульфидной связью <VEGF-ANG-2> TvAb6 связывается с VEGF сопоставимо с <VEGF> G6-31. <ANG-2> Mab536 не связывается с VEGF.

Фиг.6А. Схематическое изображение и результаты анализа по связыванию ANG-2 методом ELISA. Стабилизированное дисульфидной связью <VEGF-ANG-2> TvAb6 связывается с ANG-2 сопоставимо со связыванием <ANG-2> Mab536. <VEGF> G6-31 не связывается с ANG-2.

Фиг.6Б. Схематическое изображение и результаты анализа по связыванию ANG-2 методом поверхностного плазмонного резонанса (фирма Biacore). Стабилизированное дисульфидной связью антитело <VEGF-ANG-2> TvAb6 связывается с ANG-2 со сродством, сопоставимым со сродством антитела <ANG-2> Mab536.

Фиг.7. Схематическое изображение и результаты связывания VEGF-ANG-2 методом ELISA. Стабилизированное дисульфидной связью <VEGF-ANG-2> TvAb6 связывают одновременно с VEGF и ANG-2, хотя <VEGF> G6-31 и <ANG-2> Mab536 не могут одновременно связываться с VEGF и ANG-2.

Фиг.8А. Эффективность стабилизированного дисульфидной связью <VEGF-ANG-2> TvAb6 в сравнении с <ANG-2> Mab536, <VEGF> G6-31 и комбинацией Mab536 и G6-31 в ступенчатой подкожной модели ксенотрансплантата Colo205 у бежевых мышей линии Scid (исследование ANG2_Pz_Colo205_003).

Фиг.8Б. Эффективность стабилизированного дисульфидной связью <VEGF-ANG-2> TvAb6 в сравнении с <ANG-2> Mab536, <VEGF> G6-31 и комбинацией Mab536 и G6-31 в ступенчатой подкожной модели ксенотрансплантата Colo205 у бежевых мышей линии Scid (исследование ANG2_Pz_Colo205_005).

Фиг.9. Результаты блокирования индуцированного VEGF формирования трубок биспецифическим четырехвалентным антителом <VEGF-ANG-2> TvAb6.

Фиг.10А+Б. Количественный анализ блокирования индуцированного VEGF формирования трубок с помощью стабилизированного дисульфидной связью антитела <VEGF-ANG-2> TvAb6.

Фиг.11. Схематическое изображение анализа связывания VEGF методом поверхностного плазмонного резонанса (фирма Biacore).

Фиг.12. Кинетические характеристики двух <VEGF> антител <VEGF-Ang-2> TvAb6 и <VEGF> G6-31 на плоте Ka-Kd.

Фиг.13. Схематическое изображение анализа методом поверхностного плазмонного резонанса (фирма Biacore) по выявлению одновременного связывания ANGPT2 и VEGF биспецифическими антителами.

Фиг.14. Результаты экспериментов методом поверхностного плазмонного резонанса (фирма Biacore), показывающие, что TvAb6 связывает одновременно ANGPT2 и VEGF.

Фиг.15А+Б. А) Схематическое изображение анализа методом Biacore биспецифического и одновременного связывания биспецифических антител <VEGF-ANG-2>. Б) Результаты анализа методом Biacore, показывающие одновременное связывание ANG-2 и VEGF с TvAb-2441-бевацизумаб-LC06.

Фиг.16А+Б. Фосфорилирование Tie2 биспецифических антител <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-бевацизумаб-LC06 и <VEGF-ANG-2> TvAb-2441 в сравнении с анти-Ang2 антителами <ANG-2> Ang2i_LC06 и <ANG-2> Ang2k_LC08.

Фиг.17. Схематическое изображение взаимодействия ангиопоэтина человека методом ELISA.

Фиг.18. VEGF-индуцированная пролиферация HUVEC клеток <VEGF-ANG-2>TvAb-2441-бевацизумаб-LC06 и <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-бевацизумаб-LC08 и бевацизумаб.

Фиг.19. In vivo анти-ангиогенная эффективность биспецифического антитела <VEGF-ANG-2> бевацизумаб-LC06 антитела в сравнении с <ANG-2> ANG2i-LC06 и комбинацией <ANG-2> ANG2i-LC06 и авастина (бевацизумаба) в модели трансплантации Calu3, подвергнутая мониторингу через меченое анти-CD31 антитело и относительное изменение сигнала CD31 на протяжении лечения.

Экспериментальная часть

Примеры

Материалы и основные методы

Общая информация, касающаяся нуклеотидных последовательностей легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов человека, приведена в кн.: Kabat E.A. и др. «Sequences of Proteins of Immunological Interest»), 1991, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Мэриленд. Аминокислоты цепей антитела нумеруют и указывают по нумерации EU (Edelman G.M. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 1969, сс.78-85; и др. ((Sequences of Proteins of Immunological Interest)), 1991, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Мэриленд).

Методы рекомбинации ДНК

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

Синтез генов

Требуемые генные сегменты создают из олигонуклеотидов, полученных химическим синтезом. Генные сегменты, фланкированные единственными сайтами расщепления

эндонуклеазами рестрикции, собирают путем отжига и лигирования олигонуклеотидов, включая ПЦР амплификацию, и затем клонируют через указанные сайты рестрикции, например KpnI/ SacI или AscI/PacI, в векторе pPCRScripT (фирма Stratagene), основанном на векторе клонирования pGA4. Последовательности ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждают сиквенсом ДНК. Синтез генных фрагментов располагают в определенном порядке по данным техническим условиям фирмы Geneart (Regensburg, Германия). Все генные сегменты, кодирующие легкую и тяжелую цепи биспецифических антител Ang-2/VEGF, синтезируют с 5'-конца ДНК кодирующий лидерный пептид (MGWSCIILFLVATATGVHS), который нацеливает белки для секреции в эукариотических клетках, и 5'-BamHI и 3'-XbaI сайты рестрикции. Последовательности ДНК, несущие стабилизированные дисульфидом «выступ-во-впадину» модифицированные тяжелые цепи, были сконструированы с мутациями S354C и T366W в «выступе» тяжелой цепи и с мутациями Y349C, T366S, L368A и Y407V во «впадине» тяжелой цепи.

Определение последовательности ДНК

Последовательности ДНК определяют двухцепочечным сиквенсом, выполненным на фирме MediGenomix GmbH (Martinsried, Германия) или Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Германия).

Анализ последовательностей ДНК и белка и применение данных по последовательностям

Программное обеспечение фирмы GCG (фирма Genetics Computer Group, Мэдисон, Висконсин), версия 10.2, и версию 8.0 фирмы Infomax's Vector NT1 Advance используют для создания последовательностей, картирования, анализа, аннотации и иллюстрации.

Векторы экспрессии (для примера 1)

Для экспрессии описываемых антител применяют варианты экспрессирующих плазмид для временной экспрессии (например, в клетках НЕК293 EBNA или НЕК293-F) или для стабильной экспрессии (например, в клетках CHO), основанных или на организации кДНК с промотором CMV-интрон А, или на геномной организации с промотором CMV (например, фиг.2Б). Рядом с кассетой экспрессии антитела векторы содержат: Репликатор, который допускает репликацию этой плазмиды в E.coli, и ген В-лактамазы, который обуславливает устойчивость к ампициллину у E.coli.

Единица транскрипции гена антитела состоит из следующих элементов: уникального сайта (сайтов) рестрикции с 5' конца

прямого раннего энхансера и промотора от цитомегаловируса человека, с расположенной за ним последовательностью интрона А в случае организации кДНК,

5'-нетранслируемую область гена антитела человека, сигнальную последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина, цепь антитела (тяжелую цепь, модифицированную тяжелую цепь или легкую цепь) или в качестве кДНК, или в качестве геномной организации с организацией экзона-интрона иммуноглобулина,

3'-нетранслируемую область с сигнальной последовательностью полиаденилирования и уникальный сайт (сайты) рестрикции с 3' конца.

Гибридные гены, включающие последовательности тяжелой цепи выбранного антитела и С-концевой гибрид scFv согласно описанному ниже, получены с помощью ПЦР и/или генным синтезом и собраны с помощью методов рекомбинации путем соединения соответствующих сегментов нуклеиновой кислоты, например, используя уникальные сайты NsiI и EcoRI в геномных векторах тяжелой цепи. Субклонированные последовательности нуклеиновой кислоты контролируют сиквенсом ДНК. Для временной и для постоянной трансфекции повышенные количества плазмид получают

путем создания плазмид из трансформированных культур *E. coli* (фирма Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Векторы экспрессии (например, 10-14)

Используют вектор экспрессии, который состоит из следующих элементов:

селективного маркера гена устойчивости к гигромицину, репликон oriP вируса Эпштейна-Барра (Epstein-Barr virus - EBV), репликон из вектора pUC18, который допускает репликацию этой плазмиды в *E. coli*, ген бета-лактамазы, который обуславливает устойчивость к ампициллину у *E. coli*, прямой ранний энхансер и промотор из цитомегаловируса человека (human cytomegalovirus - HCMV), сигнальная последовательность полиаденилирования («поли-А») 1-иммуноглобулина человека и уникальные сайты рестрикции BamHI и XbaI.

Гибридные гены иммуноглобулина, включающие конструкции тяжелой и легкой цепей, а также конструкции «выступ-во-впадину» с С-концевыми доменами VH и VL, получают генным синтезом и клонируют в плаزمиды pGA18 (ampR) согласно описанному. Плазмиды pG18 (ampR), несущие синтезированные сегменты ДНК, и вектор экспрессии Roche расщепляют ферментами рестрикции BamHI и XbaI (фирма Roche Molecular Biochemicals) и подвергают агарозному гель-электрофорезу. Очищенные сегменты ДНК, кодирующие тяжелую и легкую цепи, затем лигируют с выделенным фрагментом вектора экспрессии BamHI/XbaI фирмы Roche, получая в итоге векторы экспрессии. Полученные в итоге векторы экспрессии трансформируют в клетки *E. coli*, ДНК экспрессирующей плазмиды выделяют (фирма Miniprep) и подвергают анализу ферментами рестрикции и секвенсу ДНК. Соответствующие клоны выращивают в 150 мл среды LB-Amp, опять выделяют плазмидную ДНК (фирма Maxiprep) и целостность последовательности подтверждают секвенсом ДНК.

Методы работы с культурами клеток

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

Временная экспрессия в системе НЕК293F (для примера 1)

Биспецифические антитела получают путем кратковременной трансформации двух плазмид, кодирующих тяжелую и модифицированную тяжелую цепь, соответственно, и соответствующую легкую цепь, используя систему НЕК293-F (фирма Invitrogen) по инструкции производителя. Вкратце, клетки НЕК293-F (фирма Invitrogen), растущие в суспензии, или в качалочной колбе, или в ферментере с мешалкой в среде для экспрессии FreeStyle 293 без сыворотки (фирма Invitrogen), трансфецируют смесью двух соответствующих экспрессирующих плазмид и 293фектина или фектина (фирма Invitrogen). Например, в качалочные колбы объемом 2 л (фирма Corning) клетки НЕК293-F засевают с плотностью $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в 600 мл и инкубируют при 120 об/мин, 8% CO₂. Через сутки после трансфекции клеток при плотности клеток примерно $1,5 \times 10^6$ клеток/мл примерно с 42 мл смеси А) 20 мл Opti-MEM (фирма Invitrogen) с 600 мкг суммарной плазмидной ДНК (1 мкг/мл), кодирующей тяжелую или модифицированную тяжелую цепь, соответственно, и соответствующую легкую цепь в эквимольном соотношении, и Б) 20 мл Opti-MEM+1,2 мл 293фектина или фектина (2 мкл/мл). Исходя из потребления глюкозы, раствор глюкозы добавляют на протяжении курса ферментации. Супернатант, содержащий секретированное антитело, собирают через 5-10 суток, и антитела или непосредственно очищают из супернатанта, или супернатант замораживают и хранят.

Временные трансфекции системы НЕК293-F (например 10-14)

Рекомбинантные варианты иммуноглобулина экспрессируют путем временной трансфекции эмбриональных почечных клеток человека 293-F, используя систему экспрессии FreeStyle™ 293 по инструкции производителя (фирма Invitrogen, USA).

5 Вкратце, суспензию FreeStyle™ 293-F клеток культивируют в среде для экспрессии FreeStyle™ 293 при 37***С в атмосфере 8% CO₂, и клетки высевают в свежую среду с плотностью 1-2*10⁶ жизнеспособных клеток/мл в день трансфекции. Комплексы ДНК-293Гесип™ получают в среде Opti-MEM I (фирма Invitrogen, США), используя 325 мкл продукта 293fectin™ (фирма Invitrogen, Германия) и 250 мкг плазмидной ДНК тяжелой
10 и легкой цепей в мольном соотношении 1:1 до конечного объема для трансфекции 250 мл. ДНК «выступ-во-впадину»-293фектин комплексы с двумя тяжелыми цепями и одной легкой цепью получают в среде Opti-MEM I (фирма Invitrogen, США), используя 325 мкл продукта 293fectin™ (фирма Invitrogen, Германия) и 250 мкг плазмидной ДНК «выступ-во-впадину» тяжелой цепи 1 и 2 и легкой цепи в мольном соотношении 1:1:2
15 до конечного объема для трансфекции 250 мл. ДНК «выступ-во-впадину»-293фектин комплексы с двумя тяжелыми цепями получают в среде Opti-MEM I (фирма Invitrogen, США), используя 325 мкл продукта 293fectin™ (фирма Invitrogen, Германия) и 250 мкг ДНК «выступ-во-впадину» тяжелой цепи 1 и 2 в мольном соотношении 1:1 до конечного объема для трансфекции 250 мл. Комплексы CrossMab ДНК-293фектин получают в
20 среде Opti-MEM I (фирма Invitrogen, США), используя 325 мкл продукта 293fectin™ (фирма Invitrogen, Германия) и 250 мкг плазмидной ДНК «выступ-во-впадину» тяжелой цепи 1 и 2 и легкой цепи в мольном соотношении 1:1:1:1 до конечного объема для трансфекции 250 мл. Содержащие антитело супернатанты культур клеток собирают через 7 суток после трансфекции путем центрифугирования в режиме 14000 g в течение
25 30 мин и фильтруют через стерильный фильтр (0,22 мкм). Супернатанты хранят при -20°C до очистки.

Определение белка

Белковую концентрацию очищенного антитела и его производных определяют по оптической плотности (ОП) при 280 нм, используя коэффициент мольной экстинкции,
30 рассчитанный на основе аминокислотной последовательности по Pace C.N. и др., Protein Science, 4, 1995, сс.2411-1423.

Определение концентрации антитела в супернатантах

Концентрацию антител и их производных в супернатантах культур клеток измеряют методом иммунопреципитации с применением агарозных гранул с белком А (фирма
35 Roche). 60 мкл агарозных гранул с белком А трижды промывают в TBS-NP40 (50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40). Затем 1-15 мл супернатанта культуры клеток наносят на агарозные гранулы с белком А, предварительно уравновешенные в TBS-NP40. После инкубирования в течение 1 ч при комнатной температуре гранулы
40 отмывают на колонке Ultrafree-MC-filter (фирма Amicon) один раз с 0,5 мл TBS-NP40, дважды 0,5 мл 2х фосфатно-солевого буфера (2хфСБ, фирма Roche) и быстро четыре раза 0,5 мл 100 mM Na цитрата pH 5,0. Связанное антитело элюируют добавлением 35 мкл буфера для образца NuPAGE® LDS (фирма Invitrogen). Половину образцов комбинируют с агентом восстановления образца NuPAGE® или оставляют
45 невосстановленными, соответственно, и нагревают в течение 10 мин при 70°C. Затем 20 мкл наносят на 4-12% NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE (фирма Invitrogen) (с буфером MOPS для метода SDS-PAGE в отсутствие восстановителя и с буфером MES с добавлением антиоксидантного подвижного буфера (фирма Invitrogen) для метода SDS-PAGE в присутствии восстановителя) и окрашивают кумасси синим.

Концентрацию антител и их производных в супернатантах культур клеток измеряют белок А-ВЭЖХ хроматографией. Вкратце, супернатанты культур клеток, содержащие антитела и их производные, связывающиеся с белком А, вносят в колонку HiTrap белок А (фирма GE Healthcare) в 50 мМ K₂HPO₄, 300 мМ NaCl, pH 7,3 и элюируют с матрицы 550 мМ уксусной кислотой, pH 2,5 в системе Dionex HPLC-System. Элюированный белок подсчитывают по поглощению в УФ и объединяют области пиков. Очищенное стандартное IgG1 антитело является стандартом.

В другом варианте концентрацию антител и их производных в супернатантах культур клеток измеряют методом сэндвич-IgG-ELISA. Вкратце, планшеты А-96 для микротитрований StreptaWell High Bind Streptavidin (фирма Roche) покрывают 100 мкл/лунку биотинилированной захваченной молекулы антитела против IgG человека F(ab')₂ <hFcγ₁> BI (фирма Dianova) в количестве 0,1 мкг/мл в течение 1 ч при комнатной температуре или в другом варианте в течение ночи при 4°C и затем трижды промывают 200 мкл/лунку ФСБ, 0,05% Tween (ФСБТ, фирма Sigma). По 100 мкл/лунку серийных разведений в ФСБ (фирма Sigma) супернатантов культур клеток, содержащих соответствующее антитело, добавляют в лунки и инкубируют в течение 1-2 ч на встряхивателе для микропланшетов для титрования при комнатной температуре. Лунки промывают трижды 200 мкл/лунку ФСБТ и связанное антитело обнаруживают с помощью 100 мкл F(ab')₂ <hFcγ₁> POD (фирма Dianova) в концентрации 0,1 мкг/мл в качестве выявляемого антитела в течение 1-2 ч на встряхивателе для микропланшетов для титрования при комнатной температуре. Несвязанное выявляемое антитело трижды промывают 200 мкл/лунку ФСБТ и связанное выявляемое антитело обнаруживают добавлением 100 мкл ABTS/лунку. Поглощение определяют на спектрофотометре Tecan Fluor при волне измерения 405 нм (контрольная длина волны 492 нм).

Очистка белка

Антитела очищают от фильтратов супернатантов культуры клеток по стандартным протоколам. Вкратце, антитела вносят в колонку с белком А-Sepharose (фирма GE Healthcare) и промывают в ФСБ. Элюцию антител проводят при кислой величине pH с последующей немедленной нейтрализацией образца. Агрегированный белок отделяют от мономерных антител эксклюзионной хроматографией (Superdex 200, фирма GE Healthcare) в 20 мМ гистидине, 140 мМ NaCl pH 6,0. Фракции мономерных антител объединяют, концентрируют при необходимости с помощью центрифугирующего устройства Amicon Ultra (MWCO: 30 К, фирма Millipore) и хранят при -80°C. Мономерные фракции антитела объединяют, быстро замораживают и хранят при -80°C. Часть образцов используют для последующего анализа белка и аналитического описания, например, методом SDS-PAGE, эксклюзионной хроматографии, масс-спектрометрии и определением эндотоксина (см. фиг.3 и 4).

SDS-PAGE

Гель-систему NuPAGE® Pre-Cast (фирма Invitrogen) применяют по инструкции производителя. В частности, применяют гели 4-20% NuPAGE® Novex® TRIS-Glycine Pre-Cast и подвижный буфер Novex® TRIS-глицин SDS (см., например, фиг.3). Восстановление образцов производят добавлением восстанавливающего агента NuPAGE® перед осуществлением движения в геле.

Аналитическая эксклюзионная хроматография

Эксклюзионную хроматографию для определения агрегирования и олигомерного состояния антител проводят с помощью ВЭЖХ. Вкратце, очищенные на белке А антитела вносят в колонку Tosoh TSKgel G3000SW в 300 мМ NaCl, 50 мМ KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,5 в системе ВЭЖХ Agilent HPLC 1100 или колонку Superdex 200

(фирма GE Healthcare) в 2 * ФСБ в системе ВЭЖХ Dionex HPLC-System. Элюированный белок подсчитывают по поглощению УФ и по интеграции площадей пиков. Стандартом служит BioRad Gel Filtration Standard 151-1901. (См., например, фиг.4).

Масс-спектрометрия

5 Общую дегликозилированную массу перекрестных антител определяют и подтверждают масс-спектрометрией с электроспреем (electrospray ionization mass spectrometry - ESI-MS). Вкратце, 100 мкг очищенных антител дегликозилируют с помощью 50 МЕД N-гликозидазы F (PNGaseF, ProZyme) в 100 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7, при 37°C в течение 12-24 ч при концентрации белка до 2 мг/мл и затем мягко обессоливают с 10 помощью ВЭЖХ на колонке Sephadex G25 (фирма GE Healthcare). Массу соответствующих тяжелой и легкой цепей определяют методом ESI-MS после дегликозилирования и восстановления. Вкратце, 50 мкг антитела в 115 мкл инкубируют с 60 мкл 1М ТСЕР и 50 мкл 8 М гуанидин гидрохлорида затем обессоливают. Общую 15 массу и массу восстановленных тяжелой и легкой цепей определяют с помощью ESI-MS в системе Q-Star Elite MS, оборудованной источником NanoMate.

Связывание VEGF методом ELISA

Связывающие свойства четырехвалентных антител (TvAb) оценивают методом ELISA с белком полной длины VEGF165-His (фирма R&D Systems) (фиг.5). Для этого улучшенные прозрачные планшеты для микротитрований из полистерола Falcon 20 покрывают 100 мкл 2 мкг/мл рекомбинантного VEGF 165 человека (фирма R&D Systems) в ФСБ в течение 2 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C. Лунки промывают трижды 300 мкл ФСБТ (0,2% Tween 20) и блокируют 200 мкл 2% БСА 0,1% Tween 20 в течение 30 мин при комнатной температуре и затем промывают трижды 300 мкл ФСБТ. 100 мкл/лунку серийных разведений (40 пМ -0,01 пМ) очищенного <VEGF- 25 ANG-2> TvAb и в качестве контроля анти-ANG-2 антитела <ANG-2> антитела MaB536 человека (Oliner и др., Cancer Cell, 6(5), 2004, сс.507-516, US 2006/0122370) и анти-VEGF антитела <VEGF> антитело G6-31 (Liang и др., J Biol Chem, 281(2), 2006, сс.951-961; US 2007/0141065) в ФСБ (фирма Sigma) вносят в лунки и инкубируют в течение 1 ч на встряхивателе для микропланшетов для титрования при комнатной температуре. Лунки 30 промывают трижды 300 мкл ФСБТ (0,2% Tween 20) и связанное антитело обнаруживают с помощью 100 мкл/лунку 0,1 мкг/мл F(ab') <hFcgamma> POD (фирма Immuno research) в 2% БСА 0,1% Tween 20 в качестве выявляемого антитела в течение 1 ч на встряхивателе для микропланшетов для титрования при комнатной температуре. Несвязанное выявляемое антитело отмывают трижды 300 мкл/лунку ФСБТ и связанное выявляемое 35 антитело определяют добавлением 100 мкл АВТС/лунку. Определение поглощения проводят на спектрофотометре Tecan Fluor при измеряемой длине волны 405 нм (контрольная длина волны 492 нм).

Связывание VEGF: кинетические параметры связывания VEGF при 37°C, определенные методом поверхностного плазмонного резонанса (фирма Biacore")

40 Для дополнительного подтверждения данных ELISA связывание <VEGF> антител G6-31, или авастина и <VEGF-Ang-2> TvAb6, или TvAb-2441-бевацизумаб-EC06, или TvAb-2441-бевацизумаб-LC08 с VEGF анализируют количественно, используя метод поверхностного плазмонного резонанса на приборе Biacore T100 по приводимому протоколу, и исследуют, используя пакет программ T100: вкратце, <VEGF> антитела 45 захватываются CM5-чипом через связывание с козьим антителом против IgG человека (JIR 109-005-098). Захваченное антитело иммобилизуют связыванием через аминокислотные группы, используя следующее стандартное связывание через аминокислотные группы: буфер HBS-N используют в качестве подвижного буфера, активирование проводят путем

смешивания EDC/NHS для достижения плотности лиганда 700 KE. Захваченное антитело разводят в связывающем буфере Na ацетате, pH 5,0, c=2 мкг/мл, в итоге активированные карбоксильные группы блокируют инъекцией 1 М этаноламина. Захват Mab <VEGF> антител проводят при скорости тока 5 мкл/мин и c(Mabs <VEGF>)=10 нМ, разводят подвижным буфером +1 мг/мл БСА; должен был достигнут уровень захвата примерно 30 KE. Антитело rhVEGF (rhVEGF, фирма R&D-Systems, номер в каталоге 293-VE) используют в качестве исследуемого соединения. Кинетические свойства связывания VEGF с антителами <VEGF> проводят при 37°C в ФСБ+0,005 об.% Tween20 в качестве подвижного буфера. Образец вводят инъекцией при скорости тока 50 мкл/мин, времени ассоциации 80 с и времени диссоциации 1200 с при серийных концентрациях rhVEGF от 300 до 0,29 нМ. Поверхность, свободную от захваченного антитела, регенерируют 10 мМ глицином, pH 1,5, при времени контакта 60 с после каждого аналитического цикла. Кинетические контакты подсчитывают, используя двойной эталонный метод (контроль: связывание rhVEGF с молекулой-ловушкой козым антителом против IgG человека, контрольные пробы по измерению проточных кювет, концентрация rhVEGF «0», модель: связывание Лэнгмюра 1:1, (Rmax устанавливают на месте из-за связывания захваченной молекулы). Фиг.11 схематически показывает анализ Biacore.

Связывание ANG-2 методом ELISA

Связывающие свойства четырехвалентных антител (TvAb) оценивают методом ELISA с белком полной длины ангиопэтин-2-His (фирма R&D Systems) (фиг.6а), улучшенные прозрачные планшеты для микротитрований из полистерола Falcon покрывают 100 мкл 1 мкг/мл рекомбинантного ангиопэтина-2 человека (фирма R&D Systems, без носителя) в ФСБ на 2 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C. Лунки промывают трижды 300 мкл ФСБТ (0,2% Tween 20) и блокируют 200 мкл 2% БСА 0,1% Tween 20 в течение 30 мин при комнатной температуре и затем промывают трижды 300 мкл ФСБТ. По 100 мкл/лунку серийных разведений (от 40 пМ до 0,01 пМ) очищенного <VEGF-ANG-2> TvAb и в качестве контроля <ANG-2> антитело Mab536 и VEGF> антитело G6-31 в ФСБ (фирма Sigma) вносят в лунки и инкубируют в течение 1 ч на встряхивателе для микропланшетов для титрования при комнатной температуре. Лунки трижды промывают 300 мкл ФСБТ (0,2% Tween 20) и связанное антитело выявляют с помощью 100 мкл/лунку 0,1 мкг/мл F(ab') <hk> POD (фирма Biozol, номер в каталоге 206005) в 2% БСА 0,1% Tween 20 в качестве выявляемого антитела в течение 1 ч на встряхивателе для микропланшетов для титрования при комнатной температуре. Несвязанное выявляемое антитело трижды промывают 300 мкл/лунку ФСБТ и связанное выявляемое антитело обнаруживают добавлением 100 мкл АВТС/лунку. Поглощение определяют на спектрофотометре Tecan Fluor при волне измерения 405 нм (контрольная длина волны 492 нм).

Сравнительное связывание с ANG-1 и ANG-2 (связывание ANG-1 и ANG-2 методом ELISA)

Связывающие свойства антител оценивают методом ELISA с белком полной длины ангиопэтин-2-His (фирма R&D Systems, номер в каталоге 623-AN/CF, или материал получают собственными силами) или ангиопэтин-1-His (фирма R&D systems, номер в каталоге 923-AN). Для этого 96-луночные планшеты (улучшенные прозрачные планшеты для микротитрований из полистерола Falcon или Nunc Maxisorb) покрывают 100 мкл рекомбинантного ангиопэтина-1 или ангиопэтина-2 человека (без носителя) в концентрации 1 мкг/мл в ФСБ (фирма Sigma) в течение 2 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C. Лунки трижды промывают 300 мкл ФСБТ (0,2% Tween 20) и блокируют 200 мкл 2% БСА 0,1% Tween 20 в течение 30 мин при комнатной

температуре, затем промывают трижды 300 мкл ФСБТ. По 100 мкл/лунку серийных разведений (от 40 пМ до 0,01 пМ) очищенного исследуемого антитела в ФСБ добавляют в лунки и инкубируют в течение 1 ч на встряхивателе для микропланшетов для титрования при комнатной температуре. Лунки промывают трижды 300 мкл ФСБТ (0,2% Tween 20) и связанное антитело выявляют с помощью 100 мкл/лунку 0,1 мкг/мл F(ab') <hk> POD (фирма Biozol, номер в каталоге 206005) в 2% БСА 0,1% Tween 20 в качестве выявляемого антитела в течение 1 ч на встряхивателе для микропланшетов для титрования при комнатной температуре. Несвязанное выявляемое антитело трижды промывают 300 мкл/лунку ФСБТ и связанное выявляемое антитело обнаруживают добавлением 100 мкл ABTS/лунку. Поглощение определяют на спектрофотометре Tecan Fluog при волне измерения 405 нм (контрольная длина волны 492 нм).

Связывание ANG-2 методом BIACORE

Связывание антител с антигеном, например, ANG-2 человека исследуют с помощью поверхностного плазмонного резонанса, используя прибор BIACORE T100 (фирма GE Healthcare Biosciences AB, Упсала, Швеция). Вкратце, для измерения сродства козы <hIgG-Fcgamma> поликлональные антитела иммобилизуют на чипе CM5 через аминную связь для презентации антител против ANG-2 человека (фиг.6Б). Связывание измеряют в буфере HBS (HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% Tween 20, ph 7,4), 25°C.

Очищенный антиген ANG-2-His (фирма R&D systems или очистка произведена

собственными силами) добавляют в раствор в разных концентрациях - от 6,25 нМ до 200. Ассоциацию измеряют закачиванием ANG-2 в течение 3 мин; диссоциацию измеряют промыванием поверхности чипа буфером HBS в течение 3 мин и величину KD оценивают, используя модель связывания Лэнгмюра 1:1. Из-за гетерогенности препарата ANG-2 нельзя наблюдать связывание 1:1; таким образом, величины KD представляют только примерные оценки. Данные по отрицательному контролю (например, кривые буфера) вычитают из кривых образцов для коррекции смещения системного исходного уровня и для уменьшения шума сигнала. Для анализа сенсограмм и для подсчета сродства применяют программное обеспечение Biacore T100 Evaluation Software, версия 1.1.1. В другом варианте антиген Ang-2 может быть захвачен с уровнем захвата 2000-1700 KE через PentaHis антитело (PentaHis-Ab без БСА, фирма Qiagen, номер в каталоге 34660), которое иммобилизуют на чипе CM5 через аминную связь (без БСА) (см. ниже).

Подавление связывания huANG-2 с Tie-2 (ELISA)

Взаимодействие методом ELISA проводят в 384-луночных планшетах для микротитрований (фирма MicroCoat, DE, номер в каталоге 464718) при комнатной температуре. После каждой стадии инкубирования планшеты промывают трижды буфером ФСБТ. Планшеты ELISA покрывают 0,5 мкг/мл белка Tie-2 (фирма R&D Systems, Великобритания, номер в каталоге 313-TI) в течение по меньшей мере 2 ч. Затем лунки блокируют ФСБ, обогащенным 0,2% Tween-20 и 2% БСА (фирма Roche Diagnostics GmbH, DE) в течение 1 ч. Разведения очищенных антител в ФСБ инкубируют вместе с 0,2 мкг/мл ангиопоэтином-2 человека (фирма R&D Systems, Великобритания, номер в каталоге 623-AN) в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывания смесь 0,5 мкг/мл биотинилированного анти-ангиопоэтин-2 клона ВАМ0981 (фирма R&D Systems, Великобритания) и разведенного 1:3000 стрептавидина HRP (фирма Roche Diagnostics GmbH, Делавэр, номер в каталоге 11089153001) добавляют на 1 ч. Затем планшеты промывают 6 раз с помощью ФСБТ. Планшеты обрабатывают свежеприготовленным реагентом ABTS (фирма Roche Diagnostics GmbH, Делавэр, буфер #204 530 001, таблетки #11112422001) в течение 30 мин при комнатной температуре. Поглощение измеряют при 405 нм. Связывание ANG-2-VEGF методом ELISA

Связывающие свойства четырехвалентных антител (TvAb) оценивают методом ELISA с иммобилизованным полной длины белком VEGF165-His (фирма R&D Systems) и белком ANG-2-His человека (фирма R&D Systems) для выявления связанного биспецифического антитела (фиг.7). Только биспецифическое антитело <VEGF-ANG-2> TvAb способно
 5 одновременно связываться с VEGF и ANG-2 и таким образом связывает два антигена, хотя моноспецифические «стандартные» IgG1 антитела не могут одновременно связываться с VEGF и ANG-2 (фиг.7).

Для этого улучшенные прозрачные планшеты для микротитрований из полистерола Falcon покрывают 100 мкл 2 мкг/мл рекомбинантного VEGF 165 человека (фирма R&D
 10 Systems) в ФСБ в течение 2 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C. Лунки промывают трижды 300 мкл ФСБТ (0,2% Tween 20) и блокируют 200 мкл 2% БСА 0,1% Tween 20 в течение 30 мин при комнатной температуре и затем промывают трижды 300 мкл ФСБТ. По 100 мкл/лунку серийных разведений (40 пМ - 0,01 пМ) очищенного <VEGF-ANG-2> TvAb и в качестве контроля <ANG-2> антитела Mab536 и
 15 VEGF> антитела G6-31 в ФСБ (фирма Sigma) вносят в лунки и инкубируют в течение 1 ч на встряхивателе для микропланшетов для титрования при комнатной температуре. Лунки промывают трижды 300 мкл ФСБТ (0,2% Tween 20) и связанное антитело выявляют добавлением 100 мкл 0,5 мкг/мл ANG-2-His человека (фирма R&D Systems) в ФСБ. Лунки промывают трижды 300 мкл ФСБТ (0,2% Tween 20) и связанный ANG-2
 20 выявляют 100 мкл 0,5 мкг/мл <ANG-2> mIgG1-биотин антителом (BAM0981, фирма R&D Systems) в течение 1 ч при комнатной температуре. Несвязанное выявляемое антитело отмывают трижды с помощью 300 мкл ФСБТ (0,2% Tween 20) и связанное антитело выявляют добавлением 100 мкл 1:2000 конъюгата стрептавидин-POD (фирма Roche Diagnostics GmbH, номер в каталоге 11089153), разведенного 1:4 в блокирующем
 25 буфере в течение 1 ч при комнатной температуре. Несвязанный конъюгат стрептавидин-POD промывают три-шесть раз 300 мкл/лунку ФСБТ (0,2% Tween 20) и связанный конъюгат стрептавидин-POD обнаруживают добавлением 100 мкл ABTS/лунку. Поглощение определяют на спектрофотометре Tecan Fluor при волне измерения 405 нм (контрольная длина волны 492 нм).

30 Демонстрация одновременного связывания биспецифического четырехвалентного антитела <VEGF-Ang-2> TvAb6 с VEGF-A и Ang-2 с помощью Biacore

Для дальнейшего подтверждения результатов, полученных от связывания методом ELISA, проводят дополнительное исследование для подтверждения одновременного связывания с VEGF и Ang-2, используя метод поверхностного плазмонного резонанса
 35 на приборе Biacore T100 по приводимому ниже протоколу, и исследуют, используя программное обеспечение T100 (T100 Control, версия 2.01, T100 Evaluation, версия 2.01, T100 Kinetics Summary, версия 1.01): происходит захват Ang-2 при уровне захвата 2000-1700 KE в ФСБ, 0,005 об.% Tween20 подвижном буфере через PentaHis антитело (PentaHis-Ab без БСА, фирма Qiagen, номер в каталоге 34660), которое может быть
 40 иммобилизовано на чипе CM5 соединением через аминную связь (без БСА). Буфер HBS-N является подвижным буфером при соединении, активацию проводят путем смешивания EDC/NHS. Захваченное антитело PentaHis-Ab без БСА разводят в соединяющем буфере Na ацетате, pH 4,5, c=30 мкг/мл, в итоге остающиеся активированными карбоксильные группы блокируют инъекцией 1 М этаноламина;
 45 исследуют плотности лиганда 5000 и 17000 KE. Ang-2 в концентрации 500 нМ захватывают антителом PentaHis-Ab при скорости тока 5 мкл/мин разводят подвижным буфером+1 мг/мл БСА. Затем <Ang-2, VEGF> биспецифическое антитело, связывающееся с Ang-2 и с VEGF, проявляют путем инкубирования с rhVEGF и формирования комплекса

сэндвич. Для этого биспецифическое антитело <VEGF-Ang-2> TvAb6 связывают с Ang-2 при скорости тока 50 мкл/мин и концентрации 100 нМ, разводят подвижным буфером +1 мг/мл БСА и выявляют одновременное связывание путем инкубирования с VEGF (rhVEGF, фирма R&D-Systems, номер в каталоге 293-VE) в ФСБ+0,005 об.% Tween20

5 подвижном буфере при скорости тока 50 мкл/мин и концентрации VEGF 150 нМ. Время ассоциации 120 с, время диссоциации 1200 с. Регенерацию проводят после каждого цикла при скорости тока 50 мкл/мин с 2 * 10 мМ глицина Н 2,0 и времени контакта 60 с. Сенсограммы корректируют, используя обычный двойной контроль (контроль: связывание биспецифического антитела и rhVEGF для захвата молекулы PentaHisAb).

10 Контрольную пробу для каждого Ab измеряют при концентрации rhVEGF «0». Схема анализа Biacore показана на фиг.13. Другой формат анализа Biacore показан на фиг.15.

Получение линии клеток HEK293-Tie2

Для определения интерференции антител против ангиопоэтина-2 с ANGPT2 стимулирует фосфорилирование Tie2 и связывание ANGPT2 с Tie2 на клетках получают

15 рекомбинантную линию клеток HEK293-Tie. Вкратце, плаزمид на основе pcDNA3 (RB22-pcDNA3 Торо hTie2), кодирующая Tie2 человека полной длины (SEQ ID 108) под контролем промотора CMV и маркер устойчивости к неомицину, трансфецируют, используя Eugene (фирма Roche Applied Science) в качестве реагента трансфекции в клетки HEK293 (ATCC), и устойчивые клетки отбирают на среде DMEM 10% ФСТ, 500

20 мкг/мл G418. Отдельные клоны выделяют с помощью цилиндра для клонирования и затем анализируют на наличие экспрессии Tie2 методом FACS. Клон 22 идентифицируют в качестве клона с высокой и стабильной экспрессией Tie2 при отсутствии G418 (HEK293-Tie2 клон 22). HEK293-Tie2 клон 22 затем используют для клеточных исследований: исследования индуцированного ANGPT2 фосфорилирования Tie2 и исследования

25 связывания клеточного лиганда ANGPT2.

Исследование индуцированного ANGPT2 фосфорилирования Tie2

Подавление индуцированного ANGPT2 фосфорилирования Tie2 антителами ANGPT2 измеряют следующим образом. HEK293-Tie2 клон 22 стимулируют с применением

30 ANGPT2 в течение 5 мин при отсутствии или наличии ANGPT2 антитела и P-Tie2 подсчитывают методом сэндвич ELISA. Вкратце, 2×10⁵ клеток HEK293-Tie2 клон 22 на лунку выращивают в течение ночи в 96-луночных планшетах для микротитрования, покрытых поли-О-лизином в 100 мкл DMEM, 10% ФСТ, 500 мкг/мл генетицина. На следующий день ряд титрования антител ANGPT2 получают в планшете для

35 микротитрования (4-кратное концентрирование, конечный объем 75 мкл/лунку, повторы) и перемешивают с 75 мкл ANGPT2 (фирма R&D systems, номер в каталоге 623-AN) разведения (3,2 мкг/мл в качестве раствора 4-х кратной концентрации). Антитела и ANGPT2 предварительно инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре. 100 мкл вносят к HEK293-Tie2 клон 22 клетки (предварительно инкубированные в

40 течение 5 мин с 1 мМ NaV304, фирма Sigma, номер в каталоге S6508) и инкубируют в течение 5 мин при 37***С. Затем клетки промывают 200 мкл ледяного ФСБ+1 мМ NaV304 на лунку и лизируют добавлением 120 мкл лизирующего буфера (20 мМ Tris, рН 8,0, 137 мМ NaCl, 1% NP-40, 10% глицерин, 2 мМ EDTA, 1 мМ NaV304, 1 мМ PMSF и 10 мкг/мл аprotинина) на лунку на лед. Клетки лизируют в течение 30 мин при 4***С

45 на встряхивателе для микропланшетов для титрования при комнатной температуре и 100 мкл лизата переносят непосредственно в планшет для микротитрования р-Tie2 ELISA (фирма R&D Systems, R&D #DY990) без предварительного центрифугирования и без определения суммарного белка. Количества P-Tie2 подсчитывают по инструкциям производителя и величины IC50 по подавлению определяют, используя подключение

XLfit4 анализа для Excel (один участок доза-ответ, модель 205). Величины IC50 могут сопоставляться в рамках эксперимента, но могут варьировать от эксперимента к эксперименту.

Анализ пролиферации клеток HUVEC, индуцированной VEGF

- 5 Выбирают пролиферацию индуцированных VEGF клеток HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, фирма Promocell, номер в каталоге C-12200) для измерения клеточной функции антител против VEGF. Вкратце, 5000 клеток HUVEC (клетки получены не более чем в пятом пересеве) на лунку 96-луночного планшета инкубируют в 100 мкл голодной среды EBM-2 (эндотелиальной основной среды 2 - Endothelial basal medium 2, фирма Promocell, номер в каталоге C-22211, 0,5% ФСТ, пенициллин/ стрептомицин) в 96-луночном планшете для микротитрований с покрытием коллагеном I BD Bioscoat Collagen I (BD, номер в каталоге 354407 / 35640) в течение ночи. Варьирующие концентрации антитела смешивают с rhVEGF (30 нг/мл конечная концентрация, BD # 354107) и предварительно инкубируют в течение 15 мин при 15 комнатной температуре. Затем смесь добавляют к клеткам HUVEC и инкубируют в течение 72 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. В день проведения анализа планшет выравнивают до комнатной температуры в течение 30 мин и выживаемость клеток/ пролиферацию определяют, используя набор для анализа выживаемости клеток по люминесценции CellTiter-Glo™ по рекомендации производителя (фирма Promega, номер 20 в каталоге G7571/2/3). Люминесценцию определяют на спектрофотометре.

Конструирование четырехвалентных биспецифических и четырехвалентных моноспецифических антител

- Биспецифические антитела, связывающие VEGF (VEGF-A) и ANG-2 (ангиопоэтин-2) по настоящему изобретению, включают первый сайт связывания антигена, который 25 связывается с VEGF, и второй сайт связывания антигена, который связывается с ANG-2. Могут применять в качестве первого сайта связывания антигена, связывающегося с VEGF, например, вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:23, и вариабельные домены легкой цепи последовательности SEQ ID NO:24, которые оба происходят от полученного фаговым дисплеем анти-VEGF антитела человека G6-31, подробно 30 описанного Liang W.C. и др., J Biol Chem. 281(2), 2006, сс.951-961, и в US 2007/0141065. В другом варианте, например, второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает вариабельные домены тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:100, и вариабельные домены легкой цепи последовательности SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:101 от анти-VEGF антител <VEGF> 35 бевацизумаб и <VEGF> B20-4.1., предпочтительно от <VEGF> бевацизумаб.

- Могут применяться в качестве второго сайта связывания антигена представленные вариабельные домены тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:31 и вариабельные домены легкой цепи последовательности SEQ ID NO:32 или SEQ ID NO:32 с мутациями T92L, H93Q и W94T (нумерация по Kabat), которые все происходят от анти-ANG-2 40 антитела человека <ANG-2> Mab536, подробно описанного Oliner J. и др., Cancer Cell. 6(5), 2004, сс.507-516, и в US 2006/0122370. В другом варианте, например, второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает вариабельные домены тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:84 или SEQ ID NO:92, и вариабельные домены 45 легкой цепи последовательностей 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 от aHTH-ANG-2 антител <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 или <ANG-2> Ang2k_LC11, предпочтительно

от <ANG-2> Ang2i_LC06 или <ANG-2> Ang2k_LC08.

Для получения агентов, сочетающих свойства обоих антител, конструируют новые белки, производные от четырехвалентного биспецифического антитела. В этих молекулах рекомбинантные одноцепочечные связывающие молекулы одного антитела соединены методами гибридизации через рекомбинантный белок с другим антителом, которое сохраняется в формате IgG1 полной длины. Это второе антитело является носителем требуемой второй связывающей специфичности.

Методами молекулярной биологии по генному синтезу и по рекомбинации молекул переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) соответствующего антитела связаны глицином-серином (G4S)₃ или (G4S)₄ одноцепочечным линкером для получения одноцепочечного фрагмента Fv (single chain Fv - scFv), который присоединяют к С-концу тяжелой цепи другого антитела, используя (G)₆- или (G4S)₃-линкер.

Кроме того, остатки цистеина интродуцируют в VH (включая положение 44 по Kabat) и VL (включая положение 100 по Kabat) домен фрагмента scFv, связывающийся с ANG-2 или VEGF согласно описанному ранее (например WO 94/029350; Reiter, Y. и др., Nature biotechnology, 1996, стр.1239-1245; Young N.M. и др., FEBS Letters, 1995, стр.135-139; Rajagopal V. и др., Protein Engineering, 1997, стр.1453-1459).

Все эти молекулы получают рекомбинацией, очищают и описывают и оценивают экспрессию белка, стабильность и биологическое действие.

Краткое описание конструкций биспецифических антител, используемых для получения четырехвалентных биспецифических <VEGF-ANG-2>, <ANG-2-VEGF> антител и четырехвалентных моноспецифических <ANG-2> антител, приводят в табл.3. В настоящем изобретении используют обозначение «TvAb» для описания различных четырехвалентных белков.

Для получения биспецифических четырехвалентных антител <VEGF-ANG-2> TvAb5 и TvAb6 одноцепочечный фрагмент Fv (scFv), связывающийся с ангиопоэтином-2, который является производным от переменного домена тяжелой цепи (VH) последовательности SEQ ID NO:31, и переменный домен легкой цепи (VL) последовательности SEQ ID NO:32 с мутациями T92L, H93Q и W94T, который является производным от aHTH-ANG-2 антитела человека <ANG-2> Mab536, гибридизируют с последовательностью, соответствующей С-концу вектора тяжелой цепи анта-VEGF антитела человека <VEGF> G6-31 последовательности SEQ ID NO:23 и совместно экспрессируют с соответствующим вектором экспрессии легкой цепи, основанным на последовательности SEQ ID NO:24. Созданные конструкции представлены на фиг.1Б и перечислены в табл.3.

Для получения биспецифических четырехвалентных антител TvAb9 и TvAb 15 одноцепочечный фрагмент Fv (scFv), связывающийся с VEGF, который является производным от переменного домена тяжелой цепи (VH) последовательности SEQ ID NO:23, и переменный домен легкой цепи (VL) последовательности SEQ ID NO:24, который является производным от анти-VEGF антитела человека <VEGF> G6-31, гибридизируют с С-концом вектора тяжелой цепи aHTH-ANG-2 антитела человека <ANG-2> Mab536 последовательности SEQ ID NO:31 и совместно экспрессируют с соответствующим вектором экспрессии легкой цепи, основанным на последовательности SEQ ID NO:32. Созданные конструкции представлены на фиг.1Б и перечислены в табл.3.

Таблица 3

Разные форматы биспецифических четырехвалентных антител с присоединениями по С-концу scFv и соответствующие номенклатуры TvAb. Обозначение «-» в таблице означает «данные не представлены».

Название молекул (TvAb-номенклатура для биспецифических антител)	Каркас антитела, производный от:	scFv, производный от:	Вариабельные домены VH и VL: SEQ ID NO:	Положение scFv, присоединенного к антителу	Одноцепочечный линкер	Пептидный линкер	scFv, стабилизированный дисульфидной связью VH44/VL100
G6-31 (1000)	<VEGF> G6-31	-	23+24	-	-	-	-
Mab536 (1000)	<ANG-2> Mab536	-	31+32	-	-	-	-
бевацизумаб	<VEGF> бевацизумаб	-	23+24	-	-	-	-
Ang2i LC06 (LC06)	<ANG-2> Ang2i LC06	-	52+53	-	-	-	-
Ang2k LC06 (LC08)	<ANG-2> Ang2k LC08	-	68+69	-	-	-	-
TvAb5 (2310)	<VEGF> G6-31	<ANG-2> Mab536	23+24, 31+32 с мутациями T92L, H93Q и W94T	С - конец HC	(G4S)3	(G)6	-
TvAb6 (2331)	<VEGF> G6-31	<ANG-2> Mab536	23+24, 31+32 с мутациями T92L, H93Q и W94T	С - конец HC	(G4S)3	(G4S)3	scFv, стабилизированный дисульфидной связью VH44/VL100
TvAb9 (2330)	<ANG-2> Mab536	<VEGF> G6-31	31+32, и 23+24	С - конец HC	(G4S)3	(G4S)3	-
TvAb15 (2431)	<ANG-2> Mab536	<VEGF> G6-31	31+32, и 23+24	С - конец HC	(G4S)4	(G4S)3	scFv, стабилизированный дисульфидной связью VH44/VL100
TvAb-2441-бевацизумаб-LC06	бевацизумаб	LC06	7+8 и 52+53	С - конец HC	(G4S)4	(G4S)4	scFv, стабилизированный дисульфидной связью VH44/VL100
TvAb-2441-бевацизумаб-LC08	бевацизумаб	LC08	7+8 и 68+69	С - конец HC	(G4S)4	(G4S)4	scFv, стабилизированный дисульфидной связью VH44/VL100
TvAb-3421_бевацизумаб LC06	бевацизумаб	LC06	7+8 и 52+53	N - конец HC	(G4S)4	(G4S)2	scFv, стабилизированный дисульфидной связью VH44/VL100
TvAb-4421_бевацизумаб LC06	бевацизумаб	LC06	7+8 и 52+53	С - конец LC	(G4S)4	(G4S)2	scFv, стабилизированный дисульфидной связью VH44/VL100
TvAb-4461_бевацизумаб LC06	бевацизумаб	LC06	7+8 и 52+53	С - конец LC	(G4S)4	(G4S)6	scFv, стабилизированный дисульфидной связью VH44/VL100

Конструкции TvAb основаны, например, на:

а) аа) анти-VEGF антителе человека <VEGF> G6-31 и аб) двух одноцепочечных фрагментах Fv (scFv), связывающихся с ангиопоэтином-2, которые являются производными от вариабельного домена тяжелой цепи (VH) последовательности SEQ ID NO:31 и вариабельного домена легкой цепи (VL) последовательности SEQ ID NO:32 с мутациями T92L, H93Q и W94T, которые связаны с С-концом тяжелой цепи анти-VEGF антитела <VEGF> G6-31 (SEQ ID NO:23); или

б) ба) аНТН-ANG-2 антителе человека <ANG-2> Mab536 и бб) двух одноцепочечных фрагментах Fv (scFv), связывающихся с VEGF, которые являются производными от вариабельного домена тяжелой цепи (VH) последовательности SEQ ID NO:23 и вариабельного домена легкой цепи (VL) последовательности SEQ ID NO:24, которые связаны с С-концом тяжелой цепи аНТН-ANG-2 антитела <ANG-2> Mab536 (SEQ ID NO:31); или двух одноцепочечных фрагментах Fv (scFv), связывающихся с ангиопоэтином-2, которые являются производными от вариабельного домена тяжелой

цепи (VH) последовательности SEQ ID NO:52 или последовательности SEQ ID NO:68, и вариабельного домена легкой цепи (VL) последовательности SEQ ID NO:53 или последовательности SEQ ID NO:69, которые связаны с С-концом тяжелой цепи анти-VEGF антитела <VEGF> бевацизумаба (авастина) (последовательностями получаемого гибридного пептида являются последовательности SEQ ID NO:102 или SEQ ID NO:103, которые совместно экспрессируются с легкой цепью бевацизумаба последовательности SEQ ID NO:104. (В другом варианте два одноцепочечных фрагмента Fv (scFv), связывающихся с ангиопоэтином-2, также могут быть связаны с С-концом легкой цепи или N-концом тяжелой цепи).

В другом варианте наряду с двумя одноцепочечными фрагментами Fv (scFv) также используют одноцепочечные фрагменты Fab согласно описанному выше (используя пептидные коннекторы для гибридизации с С- или N-концом), в патентной заявке EP Appl. No 09004909.9 и в примере 10.

Пример 1. Экспрессия и очистка биспецифических четырехвалентных антител <VEGF-ANG-2>, а именно TvAb5, TvAb6, TuAb-2441-бевацизумаб-LC06 и TvAb-2441-бевацизумаб-LC08

Легкие и тяжелые цепи соответствующих четырехвалентных биспецифических антител TvAb5 и TvAb6 конструируют в геномных векторах экспрессии, согласно описанному выше. Плазмиды амплифицируют в *E.coli*, очищают и затем трансфецируют для временной экспрессии рекомбинантных белков в клетках HEK293-F (используя систему FreeStyle 293 фирмы Invitrogen). Через 7 суток супернатанты клеток HEK 293-F собирают, фильтруют и очищают биспецифические антитела с помощью белка А и эксклюзионной хроматографии. Гомогенность всех конструкций биспецифических антител подтверждают методом SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях и с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии. В условиях восстановления (фиг.3) полипептидные тяжелые цепи антитела <VEGF-ANG-2> TvAb6, несущие С-концевой гибрид scFv, четко показывают методом SDS-PAGE размеры молекул примерно 75 кДа, близкие к расчетным молекулярным массам. Масс-спектрометрия подтверждает идентичность очищенных конструкций антител. Уровни экспрессии всех конструкций, проанализированные ВЭЖХ с белком А, сходны с выходами продуктов экспрессии «стандартных» IgG. Уровни продуктивности белка составляют до 150 мг TvAb6 <VEGF-ANG-2> на литр супернатанта культуры клеток согласно определению методом ВЭЖХ с белком А.

Анализ методом эксклюзионной хроматографии очищенной, не стабилизированной дисульфидом конструкции TvAb5 с С-концевым гибридизированным фрагментом scFv к тяжелой цепи при сравнении со «стандартными» IgG показывает повышенную тенденцию к дополнительному агрегированию после очистки мономерного антитела путем эксклюзионной хроматографии (феномен так называемой «гирляндной цепи»). Эти данные подтверждают другие примеры (Rajagopal V. и др., Prot. Engin., 1997, сс.1453-1459; Kobayashi H. и др, Nucl Med Biol., 1998, сс.387-393, или Schmidt M. и др, Oncogene 18,1999, сс.1711-1721), показывающие, что молекулы, которые содержат scFvs, не стабилизированные внутрицепочечными дисульфидными связями между VH и VL, проявляют повышенную тенденцию к агрегированию и пониженную продуктивность. Чтобы принять меры в связи с агрегированием таких биспецифических антител, используют стабилизированные дисульфидной связью части молекулы scFv. Для этого внедряют одноцепочечные замещения цистеина в VH и VL фрагмента scFv по определенным положениям (положения VH44/VL100 по схеме нумерации Kabat). Эти мутации способны формировать стабильные внутрицепочечные дисульфидные связи

между VH и VL, которые в свою очередь стабилизируют получаемый модуль scFv, стабилизированный дисульфидной связью. Интродукция дисульфидов VH44/VL100 в scFv по С-концу Fv в антителе TvAb6 <VEGF-ANG-2> приводит к стабильному четырехвалентному антителу, которое не проявляет больше тенденции к агрегированию после очистки и остается в мономерном состоянии (фиг.4). Кроме того, TvAb6 <VEGF-ANG-2> не показывает повышения тенденции к агрегированию при повторяющихся циклах замораживания-оттаивания, например, при концентрации, применяемой *in vitro* и *in vivo* 3 мг/кг.

Все другие молекулы TvAb, описанные в табл.3 (например, TvAb-2441-бевацизумаб-LC06 и TyAb-2441-бевацизумаб-LC08), получают и описывают аналитически, аналогично описанной процедуре.

Пример 2. Одновременное связывание биспецифического четырехвалентного антитела <VEGF-ANG-2> TvAb6, TvAb-2441-бевацизумаб-LC06 и TyAb-2441-бевацизумаб-LC08 с VEGF-A и ANG-2

Связывание модулей scFv и фрагментов Fv, сохраняемых в IgG-модуле разных форматов биспецифических антител, сравнивают со связыванием IgG «дикого типа», от которых связывающие модули и биспецифические антитела являются производными. Исследования проводят в эквимольных концентрациях путем проведения биохимических связываний ELISA и методом поверхностного плазмонного резонанса (фирма Biacore).

Для <VEGF-ANG-2> TvAb6 показано, что путем связывания VEGF методом ELISA, согласно описанному выше, что оно связывается с VEGF сопоставимо с его исходным антителом G6-31 при эквимольной концентрации 0,625 пМ (фиг.5). Этот результат можно было предвидеть, поскольку область Fv антитела TvAb идентична соответствующей области у антитела G6-31. Небольшое отличие между <VEGF-ANG-2> TvAb6 и <VEGF> G6-31 имеется из-за небольших различий в концентрации белка и небольшой стерической интерференции С-концевого scFv со связыванием выявляемого <hFc> -POD антитела и может быть преодолено путем применения <hk> POD (фирма Biozol, номер в каталоге 206005) выявляемого антитела, используемого для связывания ANG-2 методом ELISA.

С помощью Biacore подтверждают эти данные, используя классические серийные разведения при 37°C (фиг.11). Эти данные показывают быстрые Кон-скорости $k(a)$, составляющие $4,7-4,8 \times 10^6$ 1/(мс), насыщение достигается при наивысших концентрациях VEGF. Koff-скорости достигают пределов технического описания (т.е. 5×10^6 (с/с), вероятно, из-за двухвалентного связывания (эффекта авидности) в данных условиях в качестве результата димерного исследуемого соединения rhVEGF, хотя используют очень низкую плотность лиганда, приводящую в итоге к VEGF-ответу 10-15 KE. Тем не менее, кинетические константы разных <VEGF> антител могут быть сопоставлены этим методом и в пределах ошибки метода нет существенной разницы в кинетических константах выявляемого четырехвалентного биспецифического антитела <VEGF-Ang-2> TvAb6 и исходного антитела <VEGF> G6-31. Кинетические константы <VEGF-Ang-2> TvAb6 и <VEGF> G6-31 в этих условиях были практически идентичными по этому методу. Таким образом, можно сделать вывод, что TvAb6 полностью сохраняет способность связывать VEGF. Табл.4 показывает соответствующие кинетические константы и фиг.12 показывает кинетические признаки двух <VEGF> антител <VEGF-Ang-2> TvAb6 и <VEGF> G6-31 на плоте Ka-Kd.

Таблица 4

Кинетические свойства антител <VEGF-Ang-2> TvAb6 и <VEGF> G6-31				
Измерение при 37°C	Ka	kd	t1/2	KD
Антитела	[1/(мсек)]	Г1/сек1	[мин]	[М]
<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

В другом эксперименте было показано связывание ANG-2 методом ELISA, используя <hk> - POD выявляемое антитело (фирма Biozol, номер в каталоге 206005), согласно описанному выше, что антитело <VEGF-ANG-2> TvAb6 связывает ANG-2 таким способом, который сопоставим со связыванием Mab536 в эквимоллярной концентрации 0,039 пМ (фиг.6А). Из этого следует, что модуль scFv антитела TvAb6 сохраняет связывающие свойства в конструкции TvAb.

Для дальнейшего подтверждения этих результатов антитела <ANG-2> Mab536 и <VEGF-ANG-2> TvAb6 иммобилизуют вторичным антителом на чипе Biacore CM5 и определяют кинетику связывания с ANG-2 человека. Из-за гетерогенности препарата ANG-2 нельзя наблюдать связывания 1:1; величины KD, таким образом, определяют только относительно. Анализ Biacore показывает, что антитело <VEGF-ANG-2> TvAb6 обладает определенной величиной KD 4,4 нМ для ANG-2. При сравнении Mab536 обладает определенной величиной KD 1,6 нМ. В рамках погрешности метода нет видимых отличий в типе связывания и сродстве между <ANG-2> Mab536 и <VEGF-ANG-2> TvAb6 (фиг.6Б). Таким образом, может быть сделан вывод, что модуль scFv в TvAb6 полностью сохраняет свои связывающие свойства в конструкции TvAb.

Чтобы подтвердить, что антитело <VEGF-ANG-2> TvAb6 способно одновременно связывать VEGF и ANG-2, используют анализы связывания ELISA Biacore, описанные выше.

С помощью анализа связывания VEGF-ANG-2 методом ELISA, описанного выше, показано, что только антитело <VEGF-ANG-2> TvAb6 способно связывать одновременно VEGF и ANG-2 при эквимоллярной концентрации 0,625 пМ, а моноспецифические «стандартные» антитела IgG1 <ANG-2> Mab536 и <VEGF> G6-31 не могут одновременно связывать VEGF и ANG-2 (фиг.7).

Фиг.14 показывает соответствующие данные, полученные методом Biacore. Одновременное связывание обоих антигенов, Ang-2 и VEGF, может быть показано для четырехвалентного биспецифического антитела <VEGF-Ang-2> TvAb6. Отрицательные контроли соответствуют ожидаемым: моноспецифическое антитело <Ang-2> Mab536 проявляет только связывание с Ang-2, не связывание с VEGF. Моноспецифическое антитело <VEGF> G6-31 проявляет связывание с VEGF, но совсем не связывается с Ang-2 (данные не представлены). По величинам относительного ответа четырехвалентного биспецифического антитела <VEGF-Ang-2> TvAb6, связывающегося с покрытой Ang-2 поверхностью, и последующего связывания с димерным VEGF связыванием стехиометрия может быть вычислена в диапазоне от 1:1 до 1:1,4. Взятые вместе применяемые исследования описанными методами ELISA и Biacore показали, что только антитело <VEGF-Ang-2> TvAb6 способно связываться одновременно с VEGF и Ang-2, причем моноспецифические «стандартные» IgG1 антитела <Ang-2> Mab536 и <VEGF> G6-31 не могут одновременно связывать VEGF и Ang-2 (фиг.15).

Схожие результаты, полученные с конструкциями TvAb-2441-бевацизумаб-LC06 и TuAb-2441-бевацизумаб-EC08 в аналогичном исследовании Biacore, показаны на фиг.15А. Связывание антител с антигеном, например ANG-2 и VEGF человека, исследуют поверхностным плазмонным резонансом, используя прибор BIACORE T100 (фирма GE Healthcare Biosciences AB, Упсала, Швеция). Вкратце, для измерений сродства козыги <hIgG-FcD> поликлональные антитела иммобилизуют на чипе CM4 через соединение

с амином для презентации биспецифических антител против ANG-2 и VEGF человека. Связывание измеряют в буфере HBS (HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% Tween 20, pH 7,4), 25°C. Очищенный ANG-2-His (фирма R&D systems или очищенный самостоятельно) вносят в разных концентрациях, от 6,25 нМ до 200 нМ, в раствор.

5 Ассоциацию измеряют путем ANG-2-инъекции в течение 3 мин; диссоциацию измеряют путем промывания поверхности чипа буфером HBS в течение 3 мин и величину KD оценивают, используя модель связывание Лэнгмюра 1:1. Из-за гетерогенности препарата ANG-2 не наблюдают связывания 1:1; таким образом, величины KD определены только примерно.

10 VEGF (фирмы R&D systems) вносят в разных концентрациях от 6,25 нМ до 200 нМ в раствор. Ассоциацию измеряют путем VEGF -инъекции в течение 3 мин; диссоциацию измеряют путем промывания поверхности чипа буфером HBS в течение 3 мин и величину KD оценивают, используя модель связывание Лэнгмюра 1:1.

15 Порядок инъекции связывающих компонентов может быть изменен, сначала VEGF и затем Ang2, или наоборот.

Данные по отрицательному контролю (например, кривые буфера) вычитают из кривых образцов для коррекции смещения системного исходного уровня и для уменьшения шума сигнала. Используют Biacore T100 Evaluation Software version 1.1.1 для анализа сенсограмм и для подсчета данных по средству.

20

Антитело	Сродство hAng-2	Сродство hVEGF
TvAb-2441-бевацизумаб-LC06	2,3 нМ	0,35 нМ
TvAb-2441-бевацизумаб-LC08	0,7 нМ	0,34 нМ
G6-31	-	<0,1 нМ
MAb536	3 нМ	-
бевацизумаб	-	0,59 нМ

25

В итоге одновременное связывание TvAb-2441-бевацизумаб-LC06 и TvAb-2441-бевацизумаб-LC08 может быть показано путем последовательной инкубации с ANGPT2 и VEGF. На фиг.15Б показано, что ANGPT2 и VEGF могут быть одновременно связаны биспецифическими антителами.

30

Пример 3. In vivo эффективность стабилизированного дисульфидной связью биспецифического четырехвалентного антитела <VEGF-ANG-2> TvAb6 в сравнении с <ANG-2> Mab536 <VEGF> G6-31 и комбинацией Mab536 и G6-31 на ступенчатой подкожной модели подкожной ксенотрансплантации Colo205 бежевых мышей линии Scid

35

Очищенное стабилизированное дисульфидной связью антитело <VEGF-ANG-2> TvAb6 (п00,2331 см. табл.3) сравнивают с антителами <ANG-2> Mab536, <VEGF> G6-31 и комбинацией антител <ANG-2> Mab536 и <VEGF> G6-31 в двухстадийных исследованиях на модели подкожной ксенотрансплантации Colo205

40

(Ang2_PZ_Colo205_003 и Ang2_PZ_Colo205_005) самок бежевых мышей линии Scid в разных дозах.

Антитела: <ANG-2> Mab536 получают в виде замороженного исходного раствора (с=4,5 мг/мл), <VEGF> G6-31 получают в виде замороженного раствора (с=0,6 мг/мл) и <VEGF-ANG-2> TvAb6 получают в виде замороженного исходного раствора (с=0,5 мг/мл) в 20 mM гистидине, 140 mM NaCl, pH 6,0. Раствор антитела разводят соответствующим образом в ФСБ из исходного раствора при необходимости перед инъекцией, а ФСБ используют в качестве растворителя.

45

Линии клеток и условия культивирования: клетки колоректального рака человека

первоначально получают из коллекции АТСС и затем депонируют во внутреннем банке клеток фирмы Roche Penzberg. Линию раковых клеток обычным образом культивируют в среде RPMI-1640 (PAA, Laboratories, Австрия), обогащенной 10% фетальной сывороткой теленка (PAA Laboratories, Австрия) и 2 мМ L-глутамином, при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Пассажи со 2 по 5 используют для трансплантации.

Животные

Самок бежевых мышей линии SCID; возраст 4-5 недель на момент поставки (фирма Charles River, Германия) поддерживают в специфических условиях, исключающих наличие патогенов, при суточных циклах 12 ч света/12 ч темноты по установленным правилам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол исследования рассматривает и утверждает местный орган власти. После поставки животных содержат в условиях карантина в течение одной недели, чтобы они привыкли к новым условиям содержания и для наблюдения за ними. Постоянный мониторинг состояния здоровья животных проводят на регулярной основе. Диетическое питание (Provimi Kliba 3337) и воду (закисленную до pH 2,5-3) предоставляют по потребности. Возраст мышей в начале исследования составляет примерно 10 недель.

Мониторинг

У животных ежедневно осматривают проявление клинических симптомов и выявляют побочные эффекты. На протяжении мониторинга массу тела животных записывают и измеряют циркулем объем опухоли после определения стадии заболевания.

Инъекция опухолевых клеток

В день инъектирования клетки Colo205 центрифугируют, однократно промывают и ресуспендируют в ФСБ. После дополнительного промывания в ФСБ определяют концентрацию клеток и размер клеток, используя счетчик клеток и систему анализа (Vi-CELL, фирма Beckman Coulter). Для инъекции клеток Colo205 конечный титр доводят до $5,0 \times 10^7$ клеток/мл, выживаемость примерно 90%. Затем 100 мкл такой суспензии, соответствующей $2,5 \times 10^6$ клеток на животное, вводят инъекцией подкожно в правый бок мыши.

Лечение животных начинают в день рандомизации, через 16 суток после трансплантации клеток (исследование Ang2_PZ_Colo205_003) и через 14 суток после трансплантации клеток (исследование Ang2_PZ_Colo205_005) при среднем объеме опухоли 100 мм или 150 мм соответственно.

Схема дозирования до 74 суток (см. фиг.8А) исследования Ang2_PZ_Colo205_003:

Группа	Число животных	Соединение	Доза (мг/кг)	Способ введения	Число обработок	Кумулятивные дозы (мг/кг)
1	10	Растворитель		Внутрибрюшинно раз в неделю	4	
2	10	<VEGF> G6-31	6 мг/кг	Внутрибрюшинно раз в неделю	8	48
3	10	<ANG-2> Mab536*	6 мг/кг	Внутрибрюшинно раз в неделю	8	48
4	10	<VEGF> G6-31+ <ANG-2> Mab536	5 мг/кг + 6 мг/кг	Внутрибрюшинно раз в неделю Внутрибрюшинно раз в неделю	8 8	40 48
5	10	<VEGF-ANG-2> TvAb6	7 мг/кг	Внутрибрюшинно раз в неделю	8	56

В исследовании Ang2_PZ_Colo205_003 антитело <VEGF-ANG-2> TvAb6 по ошибке было взято в меньшей дозе, чем требовалось для эквимольного соотношения. Дозу антитела <VEGF-ANG-2> TvAb6 вывели в исследовании Ang2_PZ_Colo205_005 таким

образом, что животные получили в эквимольном соотношении антитело <VEGF-ANG-2> TvAb6, связывающее сайты ANG-2 и VEGF, и комбинацию антител <VEGF> G6-31 и <ANG-2> Mab536.

Подавление роста опухоли на 74 сутки (см. фиг.8А) в исследовании Ane2 PZ Colo205 003:

Антитело <VEGF-ANG-2> TvAb6 в дозе 7 мг/кг проявляет эффективность, сопоставимую с эффективностью комбинации <VEGF> G6-31 в количестве 5 мг/кг и <ANG-2> Mab536 в количестве 6 мг/кг и <VEGF> G6-31 в качестве отдельного агента в дозе 6 мг/кг (фиг.8А), а также превосходит отдельный агент <ANG-2> Mab536 в дозе 6 мг/кг. Поскольку модель Colo205 подкожного введения высоко чувствительна к <VEGF> G6-31 антителу, которое блокирует VEGF и человека, и мыши, что приводит почти к полному подавлению роста опухоли, антитело <VEGF-ANG-2> TvAb6 таким образом не может быть отличимо от G6-31 в качестве единственного агента (6 мг/кг) в выбранных условиях эксперимента, хотя антитело <VEGF-ANG-2> TvAb6 проявляет сопоставимое ингибирование с ингибированием комбинацией <ANG-2> Mab536 и <VEGF> G6-31 в очевидно меньшей кумулятивной дозе (<VEGF-ANG-2> TvAb6=56 мг/кг антитело по сравнению с комбинацией <ANG-2> Mab536 и <VEGF> G6-31=40+48=88 мг/кг антитело).

Схема дозирования на 63 сутки в исследовании Ang2_PZ_Colo205_005:

Группа	Число животных	Соединение	Доза (мг/кг)	Способ введения	Число обработок	Кумулятивная доза
1	10	Растворитель		Внутрибрюшинно раз в неделю	6	
2	10	<VEGF> G6-31	3	Внутрибрюшинно раз в неделю	7	21 мг/кг
3	10	<VEGF> G6-31+ <ANG-2>	3	Внутрибрюшинно раз в неделю	7	21 мг/кг 21 мг/кг
		Mab536	3	Внутрибрюшинно раз в неделю	7	
4	10	<ANG-2> Mab536	3	Внутрибрюшинно раз в неделю	7	21 мг/кг
5	10	<VEGF-ANG-2> TvAb6	4	Внутрибрюшинно раз в неделю	7	28 мг/кг

Подавление роста опухоли на 63 сутки в исследовании Ang2 PZ Colo205 005:

Антитело <VEGF-ANG-2> TvAb6 в дозе 4 мг/кг проявляет эффективность, сопоставимую с эффективностью комбинации антител <VEGF> G6-31 и <ANG-2> Mab536 в количестве 3 мг/кг каждого (фиг.8Б). Это первый пример, показывающий, что в меньшей дозе (относительно суммарной концентрации антитела - кумулятивная доза комбинации составляет 21+21=42 мг/кг против 28 мг/кг биспецифического антитела TvAb6) биспецифическое антитело, нацеливающееся на VEGF и ANG-2, может привести к более сильному противоопухолевому эффекту по сравнению с комбинацией соответствующих отдельных агентов, блокирующих VEGF и ANG-2, и превосходит каждый отдельный агент.

Пример 4. Блокирование формирования трубок, индуцированного VEGF

Для подтверждения, что действия, связанные с анти-VEGF, сохраняются у биспецифического четырехвалентного антитела <VEGF-ANG-2> TvAb6, в анализе индуцированного VEGF формирования трубок AngioKit TCS CellWorks (фирма CellSystems) показано, что антитело <VEGF-ANG-2> TvAb6, опосредующее доза-зависимое подавление формирования трубок, сопоставимо с моноспецифическим антителом <VEGF> G6-31. Исследование AngioKit TCS CellWorks проводят по следующей процедуре: клетки стимулируют каждый раз с помощью 2 нг/мл VEGF до лечения антителами на 1, 4, 7 и 9 сутки. Сосудистые трубки визуализируют окрашиванием

эндотелиальных клеток, используя антитело CD31-PE (фирма BD Pharmingen, номер в каталоге 555446) на 11 сутки.

Изображения получают с 4-х кратным увеличением по длине трубок и число точек ветвления подсчитывают, используя модуль Angiogenesis Tube Formation Application в программе MetaMorph (фирма Molecular Devices). Величины и стандартные отклонения подсчитывают с помощью дублетов и анализа 4 изображений на образец. Фиг.9 показывает соответствующие результаты, а на фиг.10А и 10Б представлен количественный анализ. Ангиопоэтин-2 не влияет на формирование трубок, и, таким образом, в этом исследовании не рассматривают подавление ANG-2. Эти данные показывают, что биспецифическое антитело <VEGF-ANG-2> TvAb6 и моноспецифическое антитело <VEGF> G6-31 равно эффективны в подавлении формирования трубок, индуцированного VEGF.

Пример 5. Фосфорилирование Tie2

Для подтверждения, что активности, связанные с aHra-ANGPT2, сохраняются у биспецифических четырехвалентных <VEGF-ANGPT2> антител TuAb-2441-бевацизумаб-LC06 и TuAb-2441-бевацизумаб-LC08, было показано, что TuAb-2441-бевацизумаб-LC06 и TuAb-2441-бевацизумаб-LC08 взаимодействуют со стимулируемым ANGPT2 фосфорилированием Tie2 наподобие материнских клонов LC06 и LC08 в исследовании стимулированного ANGPT2 фосфорилирования Tie2 согласно описанному выше.

В первом эксперименте оба биспецифических антитела, TvAb-2441-бевацизумаб-LC06 и TuAb-2441-бевацизумаб-LC08, показывают доза-зависимую интерференцию со стимулируемым ANGPT2 фосфорилированием Tie2 с величинами IC50, сопоставимыми с соответствующими величинами материнских клонов LC06 и LC08, согласно представленному на фиг.16А. Антитело TvAb-2441-бевацизумаб-LC06 интерферирует со стимулируемым ANGPT2 фосфорилированием Tie2 с величиной IC50 примерно 721 нг/мл, хотя LC06 интерферирует со стимулируемым ANGPT2 фосфорилированием Tie2 с величиной IC50 примерно 508 нг/мл. Антитело TuAb-2441-бевацизумаб-LC08 интерферирует со стимулируемым ANGPT2 фосфорилированием Tie2 с величиной IC50 примерно 364 нг/мл, хотя LC08 интерферирует со стимулируемым ANGPT2 фосфорилированием Tie2 с величиной IC50 примерно 499 нг/мл.

Во втором эксперименте оба биспецифических антитела TvAb-2441-бевацизумаб-LC06 и TuAb-2441-бевацизумаб-LC08 показывают доза-зависимую интерференцию со стимулируемым ANGPT2 фосфорилированием Tie2 с величинами IC50, сопоставимыми с соответствующими величинами материнских клонов LC06 и LC08, согласно представленному на фиг.16Б. Антитело TvAb-2441-бевацизумаб-LC06 интерферирует со стимулируемым ANGPT2 фосфорилированием Tie2 с величиной IC50 примерно 488 нг/мл, хотя LC06 интерферирует со стимулируемым ANGPT2 фосфорилированием Tie2 с величиной IC50 примерно 424 нг/мл. Антитело TuAb-2441-бевацизумаб-LC08 интерферирует со стимулируемым ANGPT2 фосфорилированием Tie2 с величиной IC50 примерно 490 нг/мл, хотя LC08 интерферирует со стимулируемым ANGPT2 фосфорилированием Tie2 с величиной IC50 примерно 399 нг/мл.

Вместе эти данные показывают, что биспецифические четырехвалентные <VEGF-ANGPT2> антитела TvAb-2441-бевацизумаб-LC06 и TuAb-2441-бевацизумаб-LC08 интерферируют со стимулируемым ANGPT2 фосфорилированием Tie2 подобно их материнским клонам LC06 и LC08 в пределах ошибки этого клеточного исследования.

Пример 6. Ингибирование связывания huANG-2 с Tie-2 (метод ELISA)

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

температуре. После каждой стадии инкубирования планшеты промывают 3 раза с помощью ФСБТ. Планшеты ELISA покрывают 0,5 мкг/мл белка Tie-2 (фирма R&D Systems, Великобритания, номер в каталоге 313-ТI) в течение по меньшей мере 2 ч. Затем лунки блокируют ФСБ, обогащенным 0,2% Tween-20 и 2% БСА (фирма Roche Diagnostics GmbH, Делавэр) в течение 1 ч. Разведения очищенных антител в ФСБ инкубируют вместе с 0,2 мкг/мл ангиопоэтина-2 человека (фирма R&D Systems, Великобритания, номер в каталоге 623-AN) в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки смесь 0,5 мкг/мл биотинилированного анти-ангиопоэтин-2 клон ВАМ0981 антитела (фирма R&D Systems, Великобритания) и разведенного 1:3000 стрептавидина HRP (фирма Roche Diagnostics GmbH, Делавэр, Cat.No.11089153001) добавляют на 1 ч. Затем планшеты промывают 6 раз ФСБТ. Планшеты обрабатывают свежеприготовленным реагентом ABTS (фирма Roche Diagnostics GmbH, Делавэр, буфер 204530001, таблетки 11112422001) в течение 30 мин при комнатной температуре. Поглощение измеряют при 405 нм. Сводка данных по взаимодействию с Ang2 (метод ELISA)

<VEGF-ANG-2> биспецифическое антитело (или моноспецифические исходные антитела)	AVG IC50 (нг/мл)	STDEV
	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 бевацизумаб LC06	44	8
TvAb-2441 бевацизумаб LC08	42	11
<ANG-2>Mab 536	15	8
<VEGF>бевацизумаб	>20000	
TvAb-3421 бевацизумаб_LC06	31	1
TyAb-4421_бевацизумаб_LC06	35	17
TyAb-4461_бевацизумаб_LC06	46	10

Пример 7. Подавление связывания hVEGF с рецептором hVEGF (метод ELISA)

Анализ проводят в 384-луночных планшетах для микротитрований (фирма MicroCoat, Делавэр, номер в каталоге 464718) при комнатной температуре. После каждой стадии инкубирования планшеты промывают трижды буфером ФСБТ. Сначала планшеты покрывают 0,5 мкг/мл белка hVEGF-R (фирма R&D Systems, Великобритания, номер в каталоге 321-FL) в течение по меньшей мере 2 ч. Затем лунки блокируют в ФСБ, обогащенном 0,2% Tween-20 и 2% БСА (фирма Roche Diagnostics GmbH, Делавэр) в течение 1 ч. Разведения очищенных антител в ФСБ инкубируют вместе с 0,15 мкг/мл huVEGF121 (фирма R&D Systems, Великобритания, номер в каталоге 298-VS) в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки добавляют на 1 ч смесь 0,5 мкг/мл анти-VEGF клон Mab923 (фирма R&D Systems, Великобритания) и 1:2000 пероксидазы хрена (HRP), конъюгированной с F(ab')₂ антимышиного IgG (фирма GE Healthcare, Великобритания, номер в каталоге NA9310V). Затем планшеты 6 раз промывают ФСБТ. Планшеты обрабатывают свежеприготовленным реагентом ABTS (фирма Roche Diagnostics GmbH, Делавэр, буфер 204530001, таблетки 11112422001) в течение 30 мин при комнатной температуре. Поглощение измеряют при 405 нм.

Сводка данных по взаимодействию с VEGF (метод ELISA)

<VEGF-ANG-2> биспецифическое антитело	AVG IC50 (нг/мл)	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_бевацизумаб_LC06	2831	503
TvAb-2441_бевацизумаб_EC08	2305	972
TvAb-<ANG-2>Mab 536	>20000	
TvAb-<VEGF>бевацизумаб	1584	357
TyAb-3421_бевацизумаб_LC06	2660	284
TvAb-4421_бевацизумаб_LC06	1980	1319
TvAb-4461_бевацизумаб_LC06	1677	394

Пример 8

Пролиферация HUVEC

Для подтверждения, что активности, связанные с анти-VEGF, сохраняются у биспецифических четырехвалентных <VEGF-ANG2> антител TvAb-2441-бевацизумаб-LC06 и TvAb-2441-бевацизумаб-LC08, было показано, что TvAb-2441-бевацизумаб-LC06 и TyAb-2441-бевацизумаб-LC08 интерферируют с индуцируемой VEGF пролиферацией клеток HUVEC наподобие материнских клонов LC06 и LC08 в исследовании индуцируемой VEGF пролиферацией клеток HUVEC согласно описанному выше.

Фиг.18 показывает, что, действительно, TvAb-2441-бевацизумаб-LC06 и TvAb-2441-бевацизумаб-LC08 интерферируют зависящим от концентрации образом с индуцируемой VEGF пролиферацией клеток HUVEC сопоставимо с исходным антителом бевацизумабом.

Пример 9. Исследование методом ELISA связывания с ANG-1 человека и с ANG-2 человека

Связывание исходных <ANG-2> антител Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 и Ang2k-LC08 с ANG-1 человека и ANG-2 человека определяют связыванием ANG-1 или ANG-2 по методу ELISA согласно описанному выше (см. сравнение связывания с ANG-1 и ANG-2 (ANG-1 и ANG-2 связывание ELISA)). Вкратце, исследование типа ELISA основано на иммобилизации ангиопоэтина-1 или -2 дикого типа человека в планшете для микротитрования. Связывание антитела, направленного против иммобилизованного ANG-1 или ANG-2, измеряют через <Fc человека> (анти-IgG) антитело с конъюгатом POD. Серийные разведения антитела <ANG-2> позволяют определить концентрацию EC50. В качестве контроля используют анти-ANG-2 антитело человека <ANG-2> антитело Mab536 (Oliner и др., Cancer Cell. 6(5), 2004, сс.507-516, US 2006/0122370). Определенные концентрации EC50 суммированы в таблице внизу.

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

Все антитела специфически связываются с ANG-2. Антитела Mab536 и Ang2k-LC08 также показывают специфическое связывание с ANG-1, хотя Ang2i-LC06 и Ang2i-LC07 не связываются специфически с ANG-1, поскольку у них величина EC50 составляет примерно 8000 нг/мл (предел обнаружения).

Пример 10. Экспрессия и очистка молекул биспецифических, четырехвалентных с одноцепочечными Fab <VEGF-ANG-2> антител scFab-авастин-LC06-2620, scFab-авастин-Ang2i-LC06-2640 и scFab-авастин-Ang2i-LC06-2641

Подобно процедурам, описанным в примере 1, и в разделе материалов и методов, приведенном выше, все три молекулы биспецифических, четырехвалентных с одноцепочечными Fab <VEGF-ANG-2> антител - scFab-авастин-LC06-2620, scFab-авастин-LC06-2640 и scFab-авастин-LC06-2641, основанные на <VEGF> бевацизумабе и <ANG-2> Ang2i-LC06, экспрессируют и очищают. Связывающее средство и другие свойства

определяют согласно описанному выше в примерах. Значимые (со временем модифицированные) аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепей таких биспецифических антител представлены в последовательностях SEQ ID NO:109-110 (scFab-авастин-LC06-2620), в последовательностях SEQ ID NO:111-112 (scFab-авастин-LC06-2640) и в последовательностях SEQ ID NO:113-114 (scFab-авастин-LC06-2641).

Основные данные	scFab-авастин-LC06-2620	scFab-авастин-Ang2i-LC06-2640	scFab-авастин-LC06-Ang2i-2641
Экспрессия (продуктивность)	29 мкг/мл	27 мкг/мл	18 мкг/мл
Очистка (выход, очистка до гомогенного состояния с помощью белка А)	21 мг, 57%	19 мг, 86%	12 мг, 90%
Гомогенность после препаративной высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (ВЭЭХ)	98%	98%	99%
Функция			
Сродство hANG-2 (фирма Biacore)	1,9 E-9 М	1,8 E-9М	1,9 E-9 М
Сродство hVEGF (фирма Biacore)	1 E-10 М	1E-10 М	1E-10 М

Пример 11. Экспрессия и очистка молекул биспецифического, трехвалентного с одноцепочечным Fab <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-KiH-C-scFab

Подобно процедурам, описанным в примере 1 и в разделе материалов и методов, приведенном выше, молекулы биспецифического, трехвалентного с одноцепочечным Fab <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-KiH-C-scFab, основанного на <VEGF> бевацизумабе и <ANG-2> Ang2i-LC06, экспрессируют и очищают. Связывающее сродство и другие свойства определяют согласно описанному выше в примерах. Значимые (со временем модифицированные) аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепей таких биспецифических антител представлены в последовательности SEQ ID NO: 115-117 (авастин-LC06-KiH-C-scFab).

Основные данные	Авастин-LC06-KiH-C-scFab
Экспрессия (продуктивность)	15 мкг/мл
Очистка (выход, очистка до гомогенного состояния с помощью белка А)	4,8 мг, 91%
Гомогенность после препаративной высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (ВЭЭХ)	97%
Функция	
Сродство hANG-2 (фирма Biacore)	4,4 E-9 М

Основные данные	Авастин-LC06-KiH-C-scFab
Сродство hVEGF (фирма Biacore)	1E-10М

Пример 12. Экспрессия и очистка молекул биспецифического трехвалентного <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-C-Fab-6CSS

Подобно процедурам, описанным в примере 1 и в разделе материалов и методов, приведенном выше, молекулы биспецифического, трехвалентного <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-C-Fab-6CSS, основанного на <VEGF> бевацизумабе и <ANG-2> Ang2i-LC06, экспрессируют и очищают. Связывающее сродство и другие свойства определяют согласно описанному выше в примерах. Биспецифические, трехвалентные молекулы антитела этого формата в общем описаны в патентной заявке EP Appl. No 09005108.7. Значимые (со временем модифицированные) аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепей таких биспецифического <VEGF-ANG-2> антитела представлены в последовательности SEQ ID NO:118-120 (авастин-LC06-C-Fab-

6CSS).

Основные данные	scFab-авастин-LC06-2620	scFab-авастин-LC06-2640	scFab-авастин-LC06-2641
Экспрессия (продуктивность)	29 мкг/мл	27 мкг/мл	18 мкг/мл
Очистка (выход, очистка до гомогенного состояния с помощью белка А)	21 мг, 57%	19 мг, 86%	12 мг, 90%
Гомогенность после препаративной высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (ВЭЭХ)	98%	98%	99%
Функция			
Сродство hANG-2 (фирма Biacore)	1,9E-9M	1,8E-9M	1,9E-9M
Сродство hVEGF (фирма Biacore)	1E-10M	1E-10M	1E-10M

Пример 13. Экспрессия и очистка молекул биспецифических, трехвалентных с замещенным доменом <VEGF-ANG-2> антител авастин-LC06-CH1-CL, авастин-LC06-VH-VL и авастин-LC06-VH-VL-SS

Подобно процедурам, описанным в примере 1 и в разделе материалов и методов, приведенном выше, молекулы биспецифических, двухвалентных с замещенным доменом <VEGF-ANG-2> антител авастин-LC06-CH1-CL (CH-CL замещены согласно описанию в WO 2009/080253), авастин-LC06-VH-VL (VH-VL замещены согласно описанию в WO 2009/080252) и авастин-LC06-VH-VL-SS (VH-VL замещены согласно описанию в WO 2009/080252 и дополнительно интродуцирован дисульфидный мостик VH44 VL100), основанные на <VEGF> бевацизумабе и <ANG-2> Ang2i-LC06, экспрессируют и очищают. Связывающее сродство и другие свойства определяют согласно описанному выше в примерах. Значимые (со временем модифицированные) аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепей таких биспецифических антител представлены в последовательностях SEQ ID NO:121-124 (авастин-LC06-CH1-CL), в последовательностях SEQ ID NO:125-128 (авастин-LC06-VH-VL) и в последовательностях SEQ ID NO:129-132 (авастин-LC06-VH-VL-SS).

Основные данные	авастин-LC06-CM-CH1-CL	авастин-LC06-CM-VH-VL	авастин-LC06-VH-VL-SS
Экспрессия (продуктивность)	87 мкг/мл	44 мкг/мл	65 мкг/мл
Очистка (выход, очистка до гомогенного состояния с помощью белка А)	50 мг, 62%	22 мг, 95%	91 мг, 74%
Гомогенность после препаративной высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (ВЭЭХ)	84%	>99%	95%
Функция			
Сродство hANG-2 (фирма Biacore)	1,3E-9M	2,1E-9M	1,46E-9M
Сродство hVEGF (фирма Biacore)	1E-10M	1E-10M	1E-10M

Пример 14. Экспрессия и очистка молекул биспецифических двухвалентных ScFab-Fc гибридных <VEGF-ANG-2> антител авастин-LC06-N-scFab и авастин-LC06-N-scFabSS

Подобно процедурам, описанным в примере 1 и в разделе материалов и методов, приведенном выше, молекулы биспецифического, двухвалентного ScFab-Fc гибридного <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-N-scFab и авастин-LC06-N-scFabSS, основанного на <VEGF> бевацизумабе и <ANG-2> Ang2i-LC06, экспрессируют и очищают. Связывающее сродство и другие свойства определяют согласно описанному выше в примерах. Значимые модифицированные аминокислотные последовательности тяжелой цепи таких биспецифических антител представлены в последовательностях SEQ ID NO: 133-134 (Авастин-LC06-N-scFab) и в последовательностях SEQ ID NO:135 -136 (Авастин-LC06-N-scFabSS).

Основные данные	авастин-LC06-N-scFab	авастин-LC06-K-scFabSS
Экспрессия (продуктивность)		62 мкг/мл
Очистка (выход, очистка до гомогенного состояния с помощью белка А)		43%
Функция		
Сродство hANG-2 (фирма Biacore)		1 нМ
Сродство hVEGF (фирма Biacore)		1 нМ

Пример 15. Подавление связывания hVEGF с рецептором hVEGF (ELISA), блокирование VEGF-индуцированного формирования трубок, подавление связывания huANG-2 с Tie-2 (ELISA), фосфорилирование Tie-2 и пролиферация HUVEC молекул биспецифического <VEGF-ANG-2> антитела из примеров 10-14

Подавление связывания hVEGF с рецептором hVEGF (ELISA), блокирование VEGF-индуцированного формирования трубок, подавление связывания huANG-2 с Tie-2 (ELISA), фосфорилирование Tie2 и пролиферация HUVEC молекул биспецифического <VEGF-ANG-2> антитела из примеров 10-14 могут быть определены подобно процедурам, описанным в разделе материалов и методов и в примерах 4-9, приведенных выше.

Пример 16. Эффективность in vivo биспецифического антитела <VEGF-ANG-2> в сравнении с <ANG-2> ANG2J-LC06 и комбинацией <ANG-2> ANG2i-LC06 и авастина в неподдающейся лечению модели ксенотрансплантата Colo205 бежевых мышей линии Scid (после устойчивости к лечению бевацизумабом (авастином))

Линии клеток и условия культивирования:

Клетки колоректального рака человека Colo205, первоначально полученные из коллекции ATCC и затем размноженные, депонируют во внутреннем банке клеток Roche Penzberg. Линию раковых клеток культивируют обычным способом в среде RPMI 1640 (PAA, Laboratories, Австрия), обогащенной 10% фетальной сыворотки теленка (PAA, Laboratories, Австрия) и 2 мМ L-глутамин, при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Для трансплантации используют 2-5 пассажи.

Животные

Самок бежевых мышей линии SCID, возраст 4-5 недель на момент поставки (фирма Charles River, Германия), поддерживают в специфических условиях, исключающих наличие патогенов, при суточных циклах 12 ч света/12 ч темноты по установленным правилам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол исследования рассматривает и утверждает местный орган власти. После поставки животных содержат в условиях карантина в течение одной недели, чтобы они привыкли к новым условиям содержания и для наблюдения за ними. Постоянный мониторинг состояния здоровья проводят на регулярной основе. Диетическое питание (Provimi Kliba 3337) и воду (закисленную до pH 2,5-3) предоставляют по потребности. Возраст мышей в начале исследования составляет примерно 10 недель.

Инъекция опухолевых клеток

В день инъектирования опухолевые клетки собирают (трипсин-EDTA) из флаконов для культивирования (фирма Greiner) переносят в 50 мл культуральной среды, один раз промывают и ресуспендируют в ФСБ. После дополнительной стадии промывания в ФСБ и фильтрации (клеточный фильтр; Falcon 0100 мкм) конечный титр клеток доводят до $2,5 \times 10^7$ / мл. Суспензию опухолевых клеток тщательно перемешивают пипеткой, чтобы избежать агрегирования. Затем суспензией заполняют туберкулиновый фильтр объемом 1,0 мл (фирма Braun Melsungen), используя широкую иглу (1,10 x 40 мм); для инъекции размер иглы меняют (0,45 x 25 мм) и для каждой инъекции используют новую иглу. Анестезию проводят, используя ингалятор Stephens для мелких животных в камере

предварительного содержания (из плексиглаза), индивидуальные носовые маски для мышей (из силикона) и невоспламеняющееся и невзрывоопасное соединение Isoflurane (фирма cr-pharma) в закрытой системе циркуляции. За двое суток до инъекции у животных сбывают шерсть; при инъекции клеток у анестезированных животных анатомическим пинцетом аккуратно оттягивают кожу и по 100 мкл клеточной суспензии ($=2,5 \times 10^6$ клеток) вводят животным инъекцией под кожу в правый бок.

Лечение животных

Предварительная обработка:

Лечение животных начинают с 14 суток после трансплантации клеток (исследование Ang2_PZ_Colo205_008) при среднем объеме опухоли 100 мм³ до 150 мм³ соответственно. Мышей обрабатывают раз в неделю авастинем (10 мг/кг) в течение периода длительностью 5 недель.

Вторичная обработка:

Затем мышей рандомизируют для второй обработки и разделяют на четыре группы по 10 мышей в каждой. Объем опухоли в начале второй обработки на 51 сутки находится в диапазоне 336-341 мм³. Мышам раз в неделю внутрибрюшинно вводят разные соединения согласно указанному в приводимой ниже таблице.

Группа	Число животных	Соединение	Доза (мг/кг) (нМ/кг)	Способ введения	Число обработок	Кумулятивная доза (мг/кг)
1	10	Авастин	10 мг/кг (68 нМ/кг)	Внутрибрюшинно раз в неделю	11	110
2	10	ANG2i-LC06	10 мг/кг (68 нМ/кг)	Внутрибрюшинно раз в неделю	6	60
3	10	ANG2i-LC06+ Авастин	10 мг/кг (68 нМ/кг)+10 мг/кг (68 нМ/кг)	Внутрибрюшинно раз в неделю Внутрибрюшинно раз в неделю	11	110
4	10	TvAb-2441-6е-вадизумаб-LC06	13 мг/кг (64 нМ/кг)	Внутрибрюшинно раз в неделю	6	78

Мониторинг:

Состояние здоровья у животных оценивают дважды в неделю. Массу тела определяют дважды в неделю после инъекции клеток. Размеры опухоли измеряют циркулем, начиная в день постановки эксперимента и затем дважды в неделю на протяжении всего периода лечения. Объем опухоли рассчитывают по протоколу NCI (массы опухоли= $1/2ab^2$, где «а» и «б» означают длинный и короткий диаметры опухоли соответственно). Критериями прекращения исследования являются критическая масса опухоли (до 1,7 г или $\varnothing > 1,5$ см), потеря массы тела более чем на 20% от исходного уровня, изъязвление опухоли или плохое общее состояние животных.

Результаты: ингибирование роста опухоли (ИРО) на 91 сутки, основанное на средних величинах (%)

	ИРО
ANG2i-LC06 10 мг/кг (68 нМ/кг) внутривнутрино; авастин 10 мг/кг (68 нМ/кг) внутривнутрино	45,3
ANG2i-LC06 10 мг/кг внутривнутрино (68 нМ/кг)	44,4
TvAb-2441-бевацизумаб-LC06_13 мг/кг внутривнутрино (64 нМ/кг)	60,4

Результаты показывают, что биспецифическое <VEGF-ANG-2> антитело TvAb-2441-бевацизумаб-LC06 проявляет повышенное подавление роста опухоли (в пониженных дозах) в бевацизумаб(авастин)-устойчивых ксенотрансплантанных опухолях модели Colo205 у бежевых мышей Scid по сравнению с лечением моноспецифическим антителом ANG2i-LC06, отдельно или в комбинации ANG2i-LC06 и авастина.

Пример 17. In vivo подавление опухолевого ангиогенеза при подкожном ксенотрансплантате Calu-3 НМКРЛ

Выявление через неинвазивную визуализацию in vivo ангиогенеза, используя анти-CP31 метку

Линии клеток и условия культивирования

Линия клеток аденокарциномы легких человека происходит от мужчины европеоидной расы с раком легких. Клетки получают от фирмы Roche, Kamakura и пассируют самостоятельно для используемого в работе банка клеток. Раковые клетки культивируют обычным образом в среде RPMI1640 (фирма PAN Biotech, Германия), обогащенной 10% фетальной сывороткой теленка (фирма PAN Biotech, Германия) и 2 мМ L-глутамином (фирма PAN Biotech, Германия) при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Пассаж культуры проводят с трипсином/ EDTA 1x(PAN), проводя расщепление один раз в неделю.

Животные

Самок голых мышей линии BALB/c, возраст 4-5 недель на момент поставки (фирма Charles River, Германия), поддерживают в специфических условиях, исключаящих наличие патогенов, при суточных циклах 12 ч света/12 ч темноты по установленным правилам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол исследования рассматривает и утверждает местный орган власти. После поставки животных содержат в условиях карантина в течение одной недели, чтобы они привыкли к новым условиям содержания и для наблюдения за ними. Постоянный мониторинг состояния здоровья проводят на регулярной основе. Диетическое питание (Provimi Kliba 3337) и воду (закисленную до pH 2,5-3) предоставляют по потребности. Возраст мышей в начале исследования составляет примерно 10 недель.

Инъекция опухолевых клеток

В день проведения инъекций раковые клетки собирают (трипсином-EDTA) во флаконах для культивирования (фирма Greiner) и переносят в 50 мл культуральной среды, промывают один раз и ресуспендируют в ФСБ. После стадии дополнительного промывания ФСБ и фильтрации (клеточный фильтр; Falcon 0100 мкм) итоговый титр клеток подводят до $5,0 \times 10^7$ /мл. Суспензию раковых клеток тщательно перемешивают пипеткой, чтобы избежать агрегирования клеток. Затем суспензию клеток помещают в туберкулиновый шприц объемом 1,0 мл (фирма Braun Melsungen), используя толстую иглу (1,10x40 мм); для инъекции берут другую иглу (0,45x25 мм) и для каждой инъекции используют новую иглу. Анестезию проводят, используя ингалятор Stephens для мелких животных в камере предварительного содержания (из плексиглаза), индивидуальные носовые маски для мышей (из силикона) и невоспламеняющееся и невзрывоопасное соединение Isoflurane (фирма cp-pharma) в закрытой системе циркуляции. За двое суток до инъекции у животных сбривают шерсть; при инъекции клеток у анестезированных животных анатомическим пинцетом аккуратно оттягивают кожу и по 100 мкл клеточной

суспензии ($=5 \times 10^6$ клеток) вводят животным инъекцией под кожу в правый бок.

Лечение животных

На 35 сутки исследования мышей рандомизируют на группы статистического распределения в зависимости от массы тела и размера опухоли. Для лечения терапевтическими антителами в каждой группе, состоящей из 10 мышей, лечение терапевтическими антителами проводят раз в неделю внутрибрюшинным введением в течение 6 недель (см. фиг.19).

Группа 1: растворитель (Xolair) 10 мг/кг

Группа 2: авастин 10 мг/кг

Группа 3: комбинация моноспецифического антитела <VEGF> авастин 10 мг/кг + моноспецифическое антитело <ANG-2> Ang2i-LC06 10 мг/кг (=Авастин / Ang2i-LC06)

Группа 4: Биспецифическое <VEGF-ANG-2> антитело 2441-авастин-scFv-LC06 13,3 мг/кг

Мониторинг

Состояние здоровья у животных оценивают дважды в неделю. Массу тела определяют дважды в неделю после инъекции клеток. Размеры опухоли измеряют циркулем, начиная в день постановки эксперимента и затем дважды в неделю на протяжении всего периода лечения. Объем опухоли рассчитывают по протоколу NCI (массы опухоли $=1/2ab^2$, где «а» и «б» означают длинный и короткий диаметры опухоли соответственно). Критериями прекращения исследования являются критическая масса опухоли (до 1,7 г или $\varnothing > 1,5$ см), потеря массы тела более чем на 20% от исходного уровня, изъязвление опухоли или плохое общее состояние животных.

Мониторинг кровеносных сосудов и ангиогенеза с меченым анти-CP31 антителом

Предварительные исследования показывают, что анти-CP3 1 антитело является наилучшим агентом для визуализации кровеносной сети опухоли. Этот агент нацеливает рецепторы эндотелия мыши CD31 и визуализирует отдельные кровеносные сосуды с низким соотношением сигнала к фону. Соответственно, визуализация для анти-CP31 антитела представляет реальную возможность визуализации сосудистой сети опухоли. По три мыши из каждой группы лечения выбирают и животным инъецируют внутривенно 50 мкг/мышь анти-CP3 антитела, меченного ковалентно органическим флюорофором Alexa610 на 35, 49 и 79 сутки. Визуализацию в ближней инфракрасной части спектра проводят через 24 ч после каждого применения меченого антитела при анестезии путем ингаляции. Повышение и снижение сосудистой сети опухоли визуализируют применением системы MAESTRO для сравнения изображений. При лечении контрольным Mab Xolair и терапевтическим антителом авестином наблюдают повышение кровеносных сосудов опухоли с 35 по 79 сутки.

Напротив, комбинированное лечение авестином+Ang2i-LC06 и 2441-авастин-scFv-LC06 демонстрирует снижение сосудистой сети опухоли (фиг.19).

Площадь опухолевых областей подсчитывают вручную и определяют интенсивность сигнала (общий сигнал/время экспозиции). Средние изменения сигналов CD31 с 35 по 49 сутки и с 49 по 79 сутки наносят на фиг.19. Во всех группах наблюдают повышение сосудистой сети опухоли с 35 по 49 сутки. Хотя сигналы опухоли CD31 неуклонно повышались в группе 1 (продукт Xolair) и в группе 2 (авастин), сосудистая сеть опухоли существенно снижалась в группе 3 (комбинация авастина плюс <ANG-2> Ang2i-LC06) и в группе 4 (биспецифическое <VEGF-ANG-2> антитело 2441-авастин-scFv-LC06), причем в группе 4 четко проявляется наиболее выраженный антиангиогенный эффект (фиг.19).

Сразу после последнего визуального исследования in vivo опухоли удаляют (на 79

сутки), фиксируют в формалине и погружают в парафин для исследований *ex vivo*. Флуоресцентная микроскопия показывает многочисленные хорошо выраженные капилляры в опухолях, обработанных контрольным Mab Xolair. Некоторое количество кровеносных сосудов в опухоли наблюдают у мышей, обработанных авастином.

- 5 Напротив, в группах лечения 3 и 4 существенно меньше кровеносных сосудов и они менее выражены в опухолях по сравнению с группами лечения 1 и 2, а в группе 4 наблюдают наиболее выраженный эффект. В группе 4 наблюдают меньшую плотность микрососудов, капилляры обычно меньше в размере и неструктурированные и слабее проявляются анти-СБ31 флуоресцентные сигналы по сравнению с группами 1, 2 и 3.
- 10 Гистохимическое НЕ-окрашивание показывает некротические области внутри опухолей, занимающие до 90% во всех образцах в группе лечения биспецифическим антителом группы 4, которое очевидно превышает эффективность лечения для всех других групп лечения.

- Пример 18. Эффективность *in vivo* биспецифических антител <VEGF-ANG-2> и сравнение с исходными моноспецифическими антителами (отдельно или в комбинации) в постадийной модели подкожного ксенотрансплантата Colo205 у бежевых мышей линии Scid

Линии клеток и условия культивирования

- Клетки колоректального рака человека Colo205, первоначально полученные из коллекции ATCC и затем размноженные, депонируют во внутреннем банке клеток Roche Penzberg. Линию раковых клеток культивируют обычным способом в среде RPMI 1640 (PAA, Laboratories, Австрия), обогащенной 10% фетальной сыворотки теленка (PAA, Laboratories, Австрия) и 2 mM L-глутамин, при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Для трансплантации используют 2-5 пассажи.

- 25 Животные

- Самки бежевых мышей линии SCID, возраст 4-5 недель на момент поставки (фирма Charles River, Германия), поддерживают в специфических условиях, исключающих наличие патогенов, при суточных циклах 12 ч света/12 ч темноты по установленным правилам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол исследования рассматривает и утверждает местный орган власти. После поставки животных содержат в условиях карантина в течение одной недели, чтобы они привыкли к новым условиям содержания и для наблюдения за ними. Постоянный мониторинг состояния здоровья проводят на регулярной основе. Диетическое питание (Provimi Kliba 3337) и воду (закисленную до pH 2,5-3) предоставляют по потребности. Возраст мышей в начале исследования составляет примерно 10 недель.

Инъекция опухолевых клеток

- В день инъекции клетки Colo205 центрифугируют, однократно промывают и ресуспендируют в ФСБ. После дополнительного промывания ФСБ определяют концентрацию клеток и размер клеток, используя счетчик клеток и систему анализа (Vi-CELL, Beckman Coulter). Для инъекции клеток Colo205 итоговый титр доводят до $5,0 \times 10^7$ клеток/мл, выживаемость примерно составляет 90%. Затем 100 мкл этой суспензии, соответствующей $2,5 \times 10^6$ клеток на животное, вносят подкожной инъекцией мышам в правый бок.

- 45 Лечение животных начинают в день рандомизации на 16 сутки после трансплантации клеток (исследование Ang2_PZ_Colo205_009) при среднем объеме опухоли 100 мм³ соответственно.

Схема дозирования в исследовании Ang2_PZ_Colo205_009:

Число животных	Соединение	Доза (мг/кг)	Способ введения
10	Растворитель Xolair	10	Внутрибрюшинно раз в неделю
10	<VEGF> авастин	10	Внутрибрюшинно раз в неделю
10	<ANG-2> Ang2i-LC06	10	Внутрибрюшинно раз в неделю
10	Ang2i-LC06+авастин	10	Внутрибрюшинно раз в неделю
10	<VEGF-ANG-2> TvAb-2441-бевацизумаб-LC06	13,3	Внутрибрюшинно раз в неделю
10	<VEGF-ANG-2> авастин-LC06-CH1-CL	20	Внутрибрюшинно раз в неделю
10	<VEGF-ANG-2> scFab-авастин-LC06-2620	16,6	Внутрибрюшинно раз в неделю

Мониторинг:

Состояние здоровья у животных оценивают дважды в неделю. Массу тела определяют дважды в неделю после инъекции клеток. Размеры опухоли измеряют циркулем, начиная в день постановки эксперимента и затем дважды в неделю на протяжении всего периода лечения. Объем опухоли рассчитывают по протоколу NCI (массы опухоли= $1/2ab^2$, где «а» и «б» означают длинный и короткий диаметры опухоли соответственно). Критериями прекращения исследования являются критическая масса опухоли (до 1,7 г или $\varnothing > 1,5$ см), потеря массы тела более чем на 20% от исходного уровня, изъязвление опухоли или плохое общее состояние животных.

Результаты:

Ингибирование роста опухоли (ИРО) на 61 сутки, основанное на средних величинах (%)

	ИРО
<VEGF> авастин	66
<ANG-2> Ang2i-LC06	47
Ang2i-LC06+авастин	78
	ИРО
<VEGF-ANG-2> TvAb-2441-бевацизумаб-LC06	87
<VEGF-ANG-2> авастин-LC06-CH1-CL	92
<VEGF-ANG-2> scFab-авастин-LC06-2620	86

Результаты показывают, что все три биспецифических <VEGF-ANG-2> авастин (бевацизумаб)-ANG2i-LC06 антитела (все основаны на последовательностях бевацизумаба SEQ ID NO:7 и 8 и на ANG2i-LC06 последовательностях SEQ ID NO:52 и 53) проявляют повышенное подавление роста опухоли на модели трансплантата Colo205 у бежевых мышей Scid по сравнению с лечением моноспецифическими антителами ANG2i-LC06 и только одним авастинном или комбинацией ANG2i-LC06 и авастина.

Пример 19. Экспрессия, очистка и свойства молекул биспецифических антител <VEGF-ANG-2>, а именно scFab-авастин-LC 10-2620, scFab-авастин-LC10-2640 и scFab-авастин-LC 10-2641, авастин-LC10-KiH-C-scFab, авастин-LC10-C-Fab-6CSS, авастин-LC10-CH1-CL, авастин-LC10-VH-VL и авастин-LC10-VH-VL-SS, авастин-LC10-N-scFab и авастин-LC10-N-scFabSS

Путем замещения доменов VH и VL антитела Ang2i-LC06 (SEQ ID NO:52 и 53) соответствующими доменами VH и VL антитела Ang2i-LC10 (SEQ ID NO:84 и 85) и используя (кроме такого замещения) аналогичные процедуры и последовательности, описанные в примерах 10-14, молекулы биспецифических антител <VEGF-ANG-2>, а именно scFab-авастин-LC10-2620, scFab-авастин-LC10-2640 и scFab-авастин-LC 10-2641, авастин-LC10-KiH-C-scFab, авастин-LC10-C-Fab-6CSS, авастин-LC10-CH1-CL, авастин-LC10-VH-VL и авастин-LC10-VH-VL-SS, авастин-LC10-N-scFab и авастин-LC10-N-scFabSS, все основанные на <VEGF> бевацизумабе и <ANG-2> Ang2i-LC10, экспрессированы и очищены.

Связывающее сродство и другие свойства определяют *in vitro* согласно описанию в примерах выше.

Пример 20. *In vivo* эффективность молекул биспецифического антитела <VEGF-ANG-2>, а именно scFab-авастин-LC10-2620, scFab-авастин-LC10-2640 и scFab-авастин-LC10-2641, авастин-LC10-KiH-C-scFab, авастин-LC10-C-Fab-6CSS, авастин-LC10-CHI-CL, авастин-LC10-VH-VL и авастин-LC10-VH-VL-SS, авастин-LC10-N-scFab и авастин-LC10-N-scFabSS

In vivo эффективность молекул биспецифического антитела <VEGF-ANG 2>, а именно scFab-авастин-LC 10-2620, scFab-авастин-LC10-2640 и scFab-авастин-LC 10-2641, авастин-LC 10-KiH-C-scFab, авастин-LC 10-C-Fab-6CSS, авастин-LC10-CHI-CL, авастин-LC 10-VH-VL и авастин-LC 10-VH-VL-SS, авастин-LC 10-N-scFab и авастин-LC 10-N-scFabSS, определяют подобно описанному выше в соответствующих примерах.

Формула изобретения

1. Биспецифическое антитело, специфически связывающееся с фактором роста сосудистого эндотелия человека VEGF и ангиопоэтином-2 человека (ANG-2), включающее первый сайт связывания антигена, который специфически связывается с VEGF человека, и второй сайт связывания антигена, который специфически связывается с ANG-2 человека, отличающееся тем, что

i) каждый из указанных сайтов связывания антигена представляет пару переменного домена тяжелой цепи антитела и переменного домена легкой цепи антитела;

ii) указанный первый сайт связывания антигена, специфически связывающийся с VEGF, включает переменный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:1, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:2 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:3, и переменный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:4, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:5 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:6; и

iii) указанный второй сайт связывания антигена, специфически связывающийся с ANG-2, включает переменный домен тяжелой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:46, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:47 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:48, и переменный домен легкой цепи область CDR3 последовательности SEQ ID NO:49, область CDR2 последовательности SEQ ID NO:50 и область CDR1 последовательности SEQ ID NO:51.

2. Биспецифическое антитело по п.1, отличающееся тем, что второй сайт связывания антигена, который специфически связывается с ANG-2 человека, не связывается специфически с ангиопоэтином 1 человека (ANG-1).

3. Биспецифическое антитело по п.1 или 2, отличающееся тем, что соотношение величин связывающегося сродства KD сайта связывания антигена, специфичного в отношении VEGF/KD сайта связывания антигена, специфичного в отношении ANG-2, составляет 1,0-10,0.

4. Биспецифическое антитело по одному из пп.1-3, отличающееся тем, что указанное антитело является двухвалентным.

5. Фармацевтическая композиция для лечения рака и/или сосудистых заболеваний, включающая антитело по одному из пп.1-4.

6. Фармацевтическая композиция по п.5 для лечения рака.

7. Фармацевтическая композиция по п.5 для лечения сосудистых заболеваний.

8. Биспецифическое антитело по одному из пп.1-4 для лечения рака.

9. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-4 для лечения сосудистых заболеваний.

10. Нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифическое антитело по одному из пп.1-4.

5 11. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.10, способный экспрессировать указанную нуклеиновую кислоту в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах.

12. Прокариотическая или эукариотическая клетка-хозяин, предназначенная для получения биспецифического антитела по пп.1-4 и включающая вектор по п.11.

10 13. Способ получения биспецифического антитела по одному из пп.1-4, отличающийся экспрессией нуклеиновой кислоты по п.10 в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах и выделением указанного биспецифического антитела из указанных клеток или супернатанта культуры клеток.

15

20

25

30

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Ф.Хоффманн-Ля Рош АГ

<120> Биспецифические анти-VEGF/анти-ANG-2 антитела

<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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR3 тяжелой цепи, <VEGF>бевацизумаб

<400> 1

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

<210> 2

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR2 тяжелой цепи, <VEGF>бевацизумаб

<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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR1 тяжелой цепи, <VEGF>бевацизумаб

<400> 3

Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR3 легкой цепи, <VEGF>бевацизумаб

<400> 4

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 5

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR2 легкой цепи, <VEGF>бевацизумаб

<400> 5

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 6

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR1 легкой цепи, <VEGF>бевацизумаб

<400> 6

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

<210> 7

<211> 123

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> переменный домен тяжелой цепи, <VEGF>бевацизумаб

<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 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
115 120

<210> 8
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> вариабельный домен тяжелой цепи, <VEGF>бевацизумаб
<400> 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

<210> 9
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> область CDR3 тяжелой цепи, <VEGF>ранибизумаб
<400> 9

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

<210> 10
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> область CDR2 тяжелой цепи, <VEGF>ранибизумаб
<400> 10

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

Arg

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

<220>
 <223> область CDR1 тяжелой цепи, <VEGF>ранибизумаб

<400> 11

His Tyr Gly Met Asn
 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR3 легкой цепи, <VEGF>ранибизумаб

<400> 12

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
 1 5

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

<220>
 <223> область CDR2 легкой цепи, <VEGF>ранибизумаб

<400> 13

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
 1 5

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

<220>
 <223> область CDR1 легкой цепи, <VEGF>ранибизумаб

<400> 14

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

<210> 15
 <211> 123
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> вариабельный домен тяжелой цепи, <VEGF>ранибизумаб

<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

Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

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

<210> 16

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> вариабельный домен легкой цепи, <VEGF>ранибизумаб

<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> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> область CDR3 тяжелой цепи, <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> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> область CDR2 тяжелой цепи, <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

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

<220>
<223> область CDR1 тяжелой цепи, <VEGF>HuMab G6-31
<400> 19

Asp Tyr Trp Ile His
1 5

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

<220>
<223> область CDR3 легкой цепи, <VEGF>HuMab G6-31
<400> 20

Gln Gln Gly Tyr Gly Asn Pro Phe Thr
1 5

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

<220>

<223> область CDR2 легкой цепи, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 21

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 22

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR1 легкой цепи, <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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> переменный домен тяжелой цепи, <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
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 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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> вариабельный домен легкой цепи, <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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Mab 536

<400> 25

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

<210> 26

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR2 тяжелой цепи, <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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Mab 536

<400> 27

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Mab 536

<400> 28

Met Gln Gly Thr His Trp Pro Pro Thr
1 5

<210> 29

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Mab 536

<400> 29

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 30

<211> 16

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR1 легкой цепи, <ANG-2> 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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> переменный домен тяжелой цепи, <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> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> вариабельный домен легкой цепи, <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 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

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

<220>
<223> (G4S)4 линкер

<400> 33

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

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 34
<211> 104
<212> БЕЛОК
<213> 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 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> БЕЛОК
<213> 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 36
 <211> 327
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 36

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

275 280 285

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 37
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> 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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 38

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val
 1 5

<210> 39
 <211> 19
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR2 тяжелой цепи, <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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 40

Asn Ala Trp Met Ser
1 5

<210> 41

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR3 легкой цепи, <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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 42

His Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

<210> 43

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR1 легкой цепи, <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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> вариабельный домен тяжелой цепи, <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

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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> вариабельный домен легкой цепи, <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> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> область CDR3 тяжелой цепи, <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> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> область CDR2 тяжелой цепи, <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> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> область CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 48

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 49
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> область CDR3 легкой цепи, <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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR2 легкой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 50

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 1 5

<210> 51
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR1 легкой цепи, <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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> переменный домен тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC06

<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 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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> вариабельный домен легкой цепи, <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

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR3 тяжелой цепи, <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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR2 тяжелой цепи, <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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 56

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 57

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR3 легкой цепи, <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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR2 легкой цепи, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 58

Asp Asp Ser Glu Arg Pro Ser
1 5

<210> 59

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR1 легкой цепи, <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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> переменный домен тяжелой цепи, <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 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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> переменный домен легкой цепи, <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
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> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> область CDR3 тяжелой цепи, <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> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> область CDR2 тяжелой цепи, <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> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> область CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 64

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 65
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> область CDR3 легкой цепи, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 65

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

<210> 66
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR2 легкой цепи, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 66

Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 67
 <211> 13
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR1 легкой цепи, <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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> переменный домен тяжелой цепи, <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
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> вариабельный домен легкой цепи, <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 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

<210> 70
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 70

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val
 1 5

<210> 71
 <211> 19
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR2 тяжелой цепи, <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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 72

Asn Ala Trp Met Ser
 1 5

<210> 73
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR3 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 73

Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro
 1 5

<210> 74
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 74

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 75
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR1 легкой цепи, <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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> переменный домен тяжелой цепи, <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
 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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> вариабельный домен легкой цепи, <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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 78

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> 79

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR2 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 79

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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 80

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 81

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR3 легкой цепи, <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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 82

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 83
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> область CDR1 легкой цепи, <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> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> переменный домен тяжелой цепи, <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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 85
<211> 105
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> переменный домен легкой цепи, <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 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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR3 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 86

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

<210> 87

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR2 тяжелой цепи, <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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR1 тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 88

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 89

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR3 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 89

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

<210> 90

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR2 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 90

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 91

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> область CDR1 легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 91

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

<210> 92

<211> 124

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> переменный домен тяжелой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 92

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> 93
<211> 106
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> вариабельный домен легкой цепи, <ANG-2> Ang2k_LC11

<220>
<221> прочие признаки
<222> (98)..(98)
<223> Хаа может быть какой-либо природной аминокислотой
<220>
<221> прочие признаки
<222> (102)..(102)
<223> Хаа может быть какой-либо природной аминокислотой
<400> 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

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

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

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

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

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

<210> 94

<211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR3 тяжелой цепи, <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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR2 тяжелой цепи, <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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR1 тяжелой цепи, <VEGF>B20-4.1

<400> 96

Phe Ser Ile Asn Gly Ser Trp Ile
 1 5

<210> 97
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR3 легкой цепи, <VEGF>B20-4.1

<400> 97

Gln Gln Ser Asn Thr Ser Pro Leu Thr
 1 5

<210> 98
 <211> 8
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR2 легкой цепи, <VEGF>B20-4.1

<400> 98

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 99
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> область CDR1 легкой цепи, <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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> переменный домен тяжелой цепи, <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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> переменный домен легкой цепи, <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> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> гибридный пептид тяжелой цепи бевацизумаба Ang2i_LC06 scFv
антитела
      <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-бевацизумаб-LC06

<400> 102

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
 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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
	450				455				460						
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	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	Gly	Ser	Gly
	595				600				605						
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	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

<210> 103

<211> 727

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> Гибридный пептид тяжелой цепи бевацизумаба Ang2i_LC08 scFv
антитела <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-бевацизумаб-LC08

<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
 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 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly 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

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 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly 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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> легкая цепь бевацизумаба

<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

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> БЕЛОК
 <213> 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 Ми дпа Glu Gly
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly
130 135 140

Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr
145 150 155 160

Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
165 170 175

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
180 185 190

<210> 106

<211> 504

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

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

<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
 210 215 220

Ser Ile Ile Glu Glu Leu Glu Lys Lys Ile Val Thr Ala Thr Val Asn
 225 230 235 240

Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln His Asp Leu Met Glu Thr Val Asn
 245 250 255

Asn Leu Leu Thr Met Met Ser Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asp Pro Thr
 260 265 270

Val Ala Lys Glu Glu Gln Ile Ser Phe Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe
 275 280 285

Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn
 290 295 300

Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly Gly
 305 310 315 320

Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln
325 330 335

Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu
340 345 350

Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg
355 360 365

Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr
370 375 380

Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg
385 390 395 400

Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile
405 410 415

Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys
420 425 430

Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp
435 440 445

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

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

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

Ser Gly His His His His His His
500

<210> 107

<211> 506

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> ангиопоэтин-1 человека (ANG-12) с лидерной последовательностью и His-меткой

<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
 Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp
 275 280 285
 Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile
 290 295 300
 Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn
 305 310 315 320
 Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp

325 330 335
 Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser
 340 345 350
 Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln
 355 360 365
 Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg
 370 375 380
 Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn
 385 390 395 400
 Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser
 405 410 415
 Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn
 420 425 430
 Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp
 435 440 445
 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> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

 <400> 108
 Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Leu
 1 5 10 15

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

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

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

Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg
 65 70 75 80
 Glu Trp Ala Lys Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile
 85 90 95
 Asn Gly Ala Tyr Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg
 100 105 110
 Ile Arg Thr Met Lys Met Arg Gln Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr
 115 120 125
 Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn Ile Ser Phe Lys
 130 135 140
 Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser
 145 150 155 160
 Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val
 165 170 175
 His Leu Pro His Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg
 180 185 190
 Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val
 195 200 205
 Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn His Leu Cys
 210 215 220
 Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys
 225 230 235 240
 Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu
 245 250 255
 Leu His Thr Phe Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu
 260 265 270
 Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser
 275 280 285
 Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys His Pro
 290 295 300
 Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly
 305 310 315 320
 Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln
 325 330 335
 Gly Leu Gln Cys Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Thr Pro Lys Ile
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Glu Leu Cys Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly Gly Glu Gly
 515 520 525

His Pro Gly Pro Val Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro
 530 535 540

Pro Pro Arg Gly Leu Asn Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Thr Leu Asn
 545 550 555 560

Leu Thr Trp Gln Pro Ile Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Val
 565 570 575

Glu Val Glu Arg Arg Ser Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys
 580 585 590

Val Pro Gly Asn Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu His Pro Arg
 595 600 605

Glu Gln Tyr Val Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu
 610 615 620

Trp Ser Glu Asp Leu Thr Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro
 625 630 635 640
 Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val
 645 650 655
 Ile Ser Trp Thr Ile Leu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Thr Ile
 660 665 670
 Arg Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Val Asp Val Lys
 675 680 685
 Ile Lys Asn Ala Thr Ile Thr Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro
 690 695 700
 Glu Thr Ala Tyr Gln Val Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser
 705 710 715 720
 Ser Asn Pro Ala Phe Ser His Glu Leu Val Thr Leu Pro Glu Ser Gln
 725 730 735
 Ala Pro Ala Asp Leu Gly Gly Gly Lys Met Leu Leu Ile Ala Ile Leu
 740 745 750
 Gly Ser Ala Gly Met Thr Cys Leu Thr Val Leu Leu Ala Phe Leu Ile
 755 760 765
 Ile Leu Gln Leu Lys Arg Ala Asn Val Gln Arg Arg Ми дпа 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
 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 Ми дпа 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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ
 <220>
 <223> Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического четырехвалентного
 одноцепочечного Fab <VEGF-ANG-2> антитела scFab-авастин-LC06-2620
 <400> 109
 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												
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 Gly Gly Ser Gly 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
 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	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser				
	675			680			685												
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	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	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> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> Легкая цепь молекулы биспецифического четырехвалентного
одноцепочечного Fab <VEGF-ANG-2> антитела scFab-авастин-LC06-2620

<400> 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

<210> 111

<211> 956

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического четырехвалентного
одноцепочечного Fab <VEGF-ANG-2> антитела scFab-авастин-Ang2i-LC06-
2640

<400> 111

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

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 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460
 Gly Gly Gly Ser Gly 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
 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 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 690 695 700
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly 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 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
 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> 112

<211> 214

<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> Легкая цепь молекулы биспецифического четырехвалентного
одноцепочечного Fab <VEGF-ANG-2> антитела scFab-Авастин-Ang2i-LC06-
2640

<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
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического четырехвалентного
одноцепочечного Fab <VEGF-ANG-2> антитела scFab-Авастин-Ang2i-LC06-
2641

<400> 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

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 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly 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
 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 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 690 695 700
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly 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 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 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

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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> Легкая цепь молекулы биспецифического четырехвалентного
одноцепочечного Fab <VEGF-ANG-2> антитела scFab-Авастин-Ang2i-LC06-
2641

<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

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> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического трехвалентного
одноцепочечного Fab <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-KiH-C-scFab

<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
 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	Gly	Gly	Ser	Gly	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												
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 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 675 680 685

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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 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> 116
<211> 453
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> Тяжелая цепь 2 молекулы биспецифического трехвалентного
одноцепочечного Fab <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-KiH-C-scFab

<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

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
 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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ
 <220>

<223> Леркая цепь молекулы биспецифического трехвалентного <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-KiH-C-scFab

<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

<211> 698

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического трехвалентного <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-C-Fab-6CSS

<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 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 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 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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
 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 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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

 <220>
 <223> Тяжелая цепь 2 молекулы биспецифического трехвалентного <VEGF-
 ANG-2> антитела авастин-LC06-C-Fab-6CSS

 <400> 119
 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												
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

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 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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

$\langle 210 \rangle$ 120

<211> 214

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> Легкая цепь молекулы биспецифического трехвалентного <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-C-Fab-6CSS

<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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического двухвалентного с
 замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-CH1-CL

<400> 121

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser 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
 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> 122

<211> 457

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> Тяжелая цепь 2 молекулы биспецифического двухвалентного с замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-CH1-CL

<400> 122

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 Cys Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 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

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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> Легкая цепь 1 молекулы биспецифического двухвалентного с
замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-CH1-CL

<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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 124
<211> 212
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> Легкая цепь 2 молекулы биспецифического двухвалентного с
замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-CH1-CL

<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 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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического двухвалентного с замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-VH-VL

<400> 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

20	25	30																	
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met				
35				40		45													
Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe				
50			55			60													
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr				
65			70		75			80											
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
	85				90			95											
Ala	Arg	Ser	Pro	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Tyr				
	100				105			110											
Pro	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser				
	115			120			125												
Ser	Ala	Ser	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
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> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> Тяжелая цепь 2 молекулы биспецифического двухвалентного с
замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-VH-VL

<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

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
 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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ
 <220>
 <223> Легкая цепь 1 молекулы биспецифического двухвалентного с
 замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06- VH-VL
 <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

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> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> Легкая цепь 2 молекулы биспецифического двухвалентного с
замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06- VH-VL

<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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 129

<211> 459

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического двухвалентного с
 замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-VH-VL-SS

<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				
		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> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
 <223> Тяжелая цепь 2 молекулы биспецифического двухвалентного с
 замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-VH-VL-SS

<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

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

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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> Легкая цепь 1 молекулы биспецифического двухвалентного с замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06- VH-VL-SS

<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

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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> Легкая цепь 2 молекулы биспецифического двухвалентного с
 замененным доменом <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-VH-VL-SS

<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
 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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического двухвалентного ScFab-Fc
 гибрида <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-N-scFab

<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 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240
 Gly 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	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												
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> 134
<211> 699
<212> БЕЛОК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>
<223> Тяжелая цепь 2 молекулы биспецифического двухвалентного ScFab-Fc
гибрида <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-N-scFab

<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

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 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 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

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

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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> Тяжелая цепь 1 молекулы биспецифического двухвалентного ScFab-Fc гибрида <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-N-scFabSS

<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 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

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	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
210				215			220								
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
225				230			235			240					
Gly	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	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
 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> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> Тяжелая цепь 2 молекулы биспецифического двухвалентного ScFab-Fc гибридного <VEGF-ANG-2> антитела авастин-LC06-N-scFabSS

<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

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

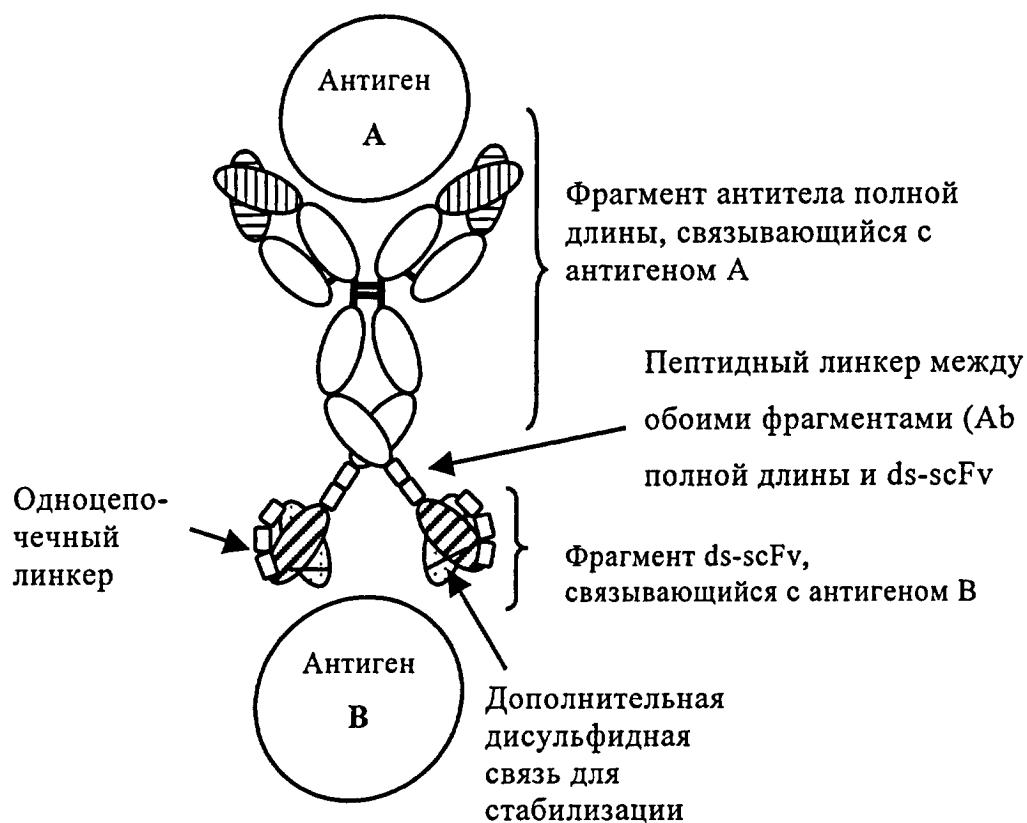
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220

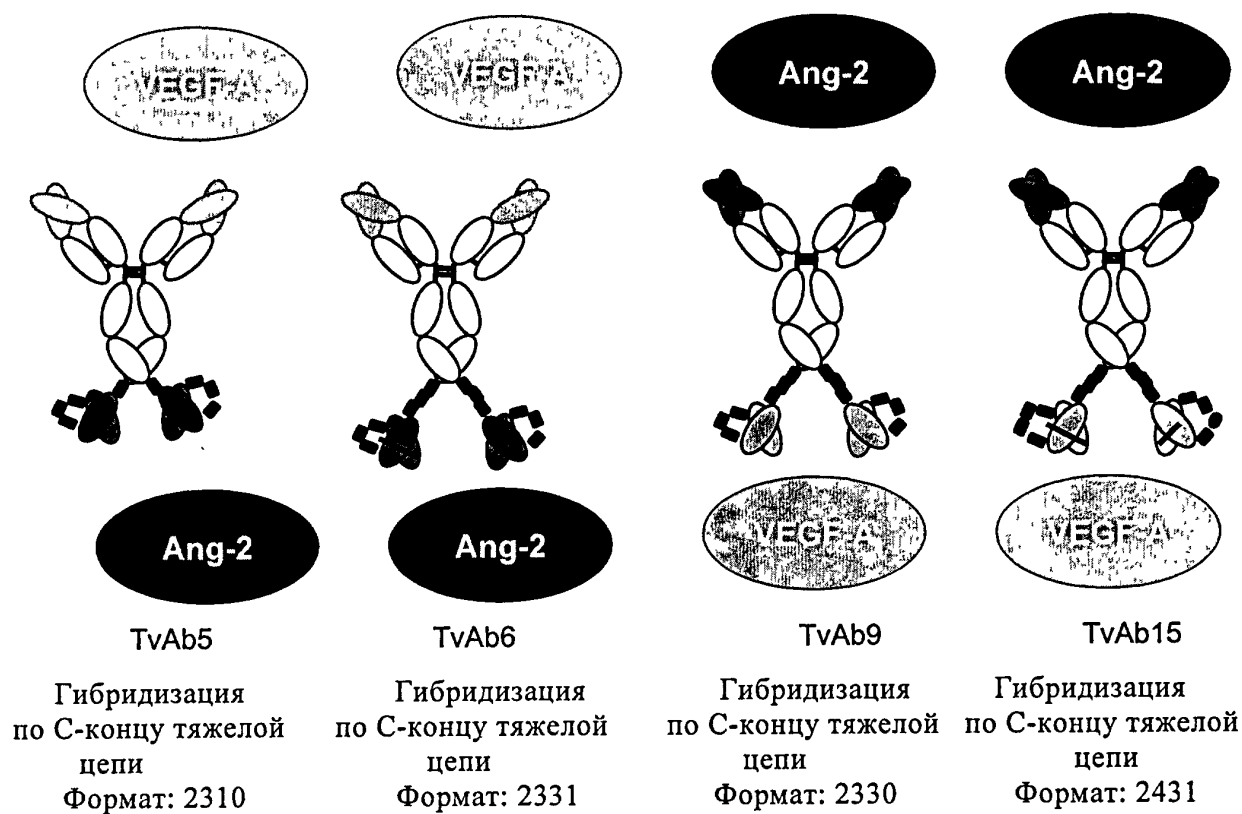
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 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
 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

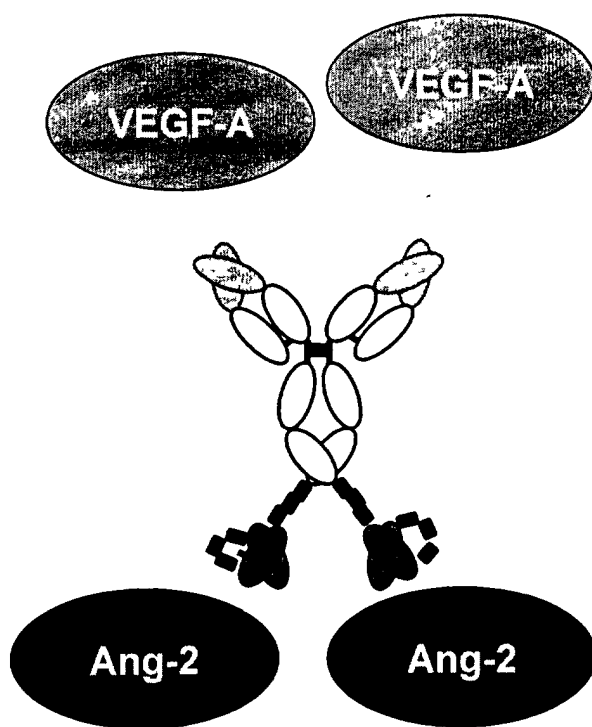
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
530			535			540									
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
545			550			555			560						
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
		565			570			575							
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	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								
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
690			695												



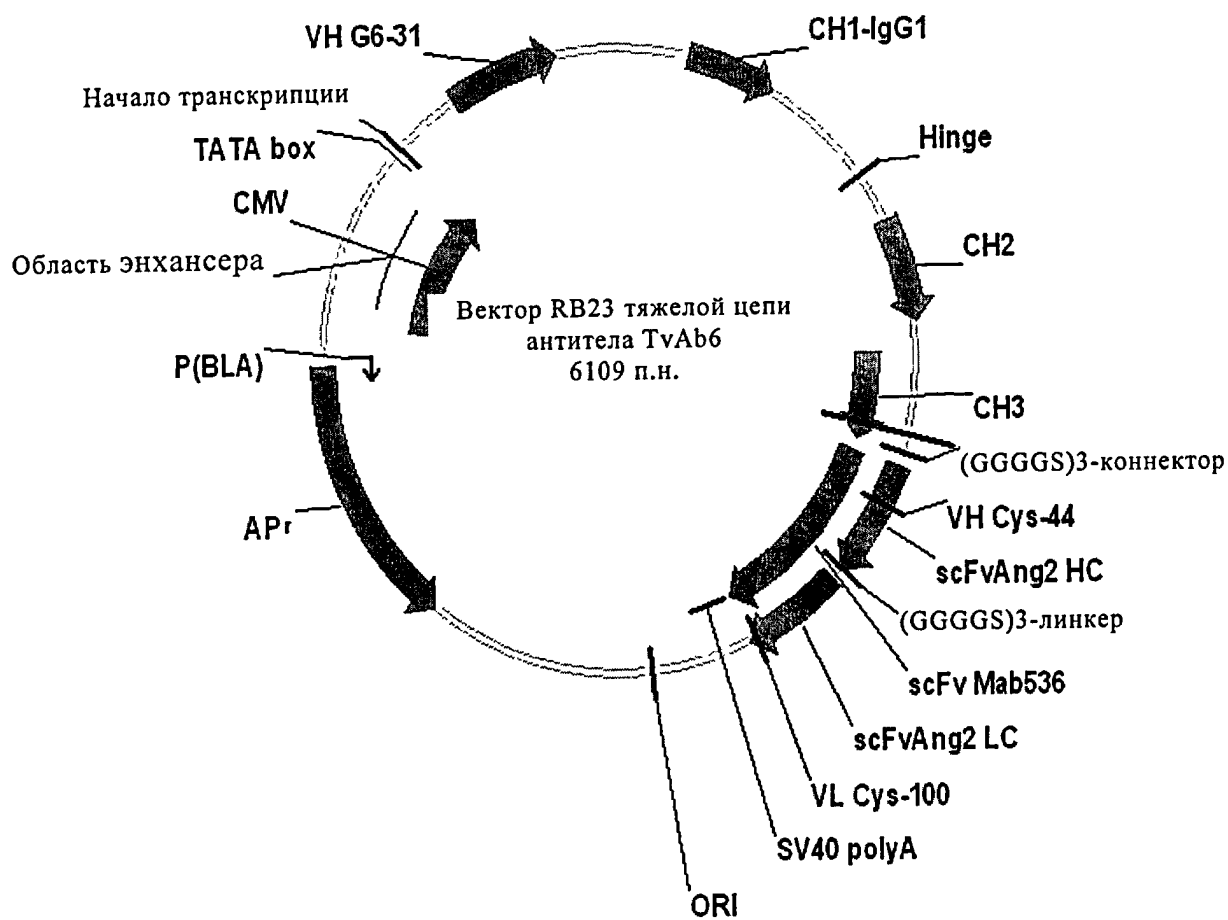
Фиг. 1А



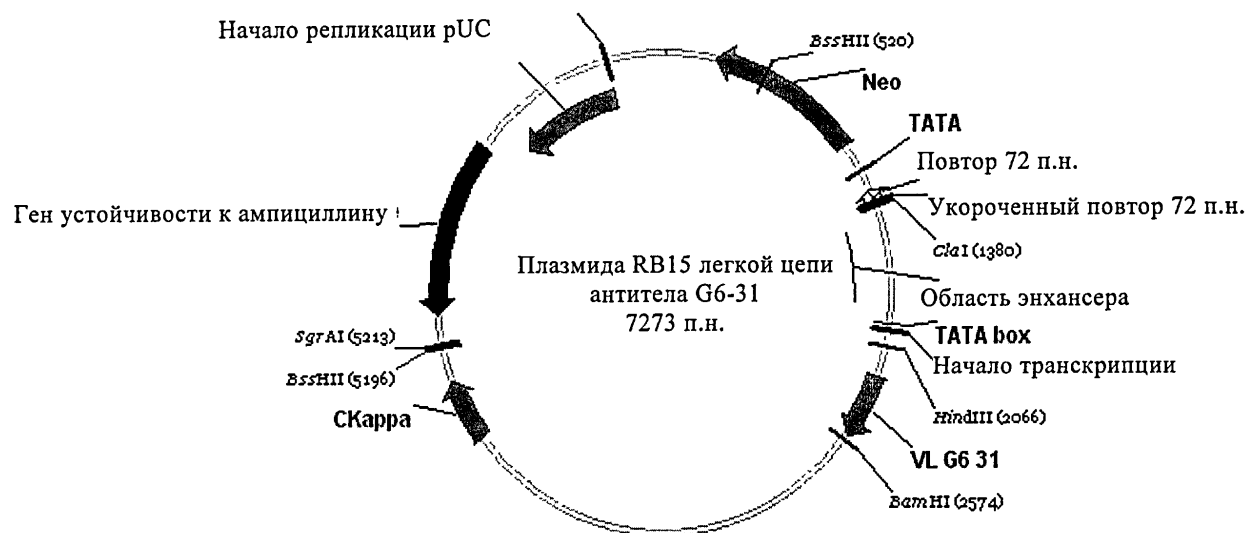
Фиг. 1Б



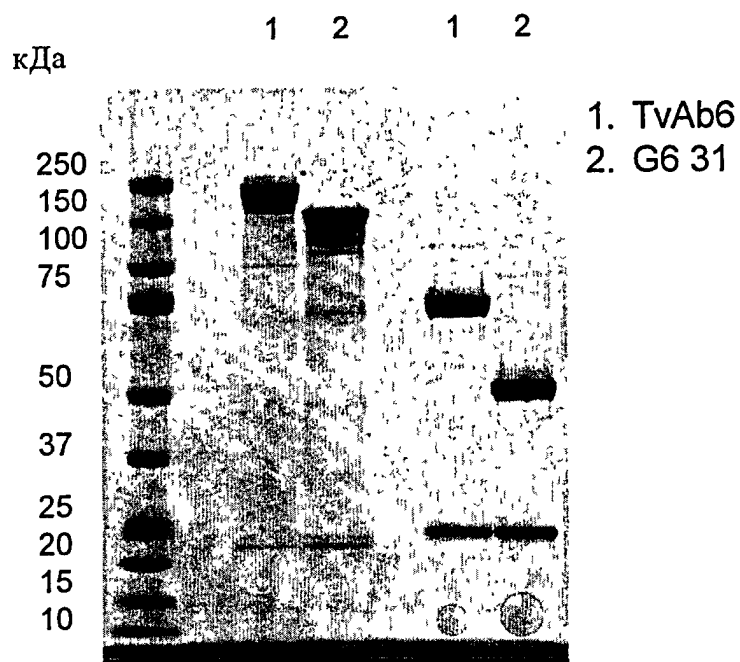
Фиг. 2А



Фиг. 2Б (часть 1)



Фиг. 2Б (часть 2)

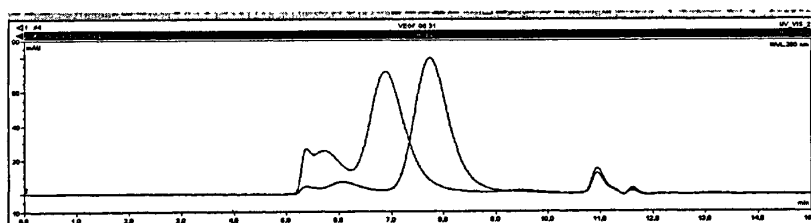


Без восстановления - С восстановлением

Фиг. 3

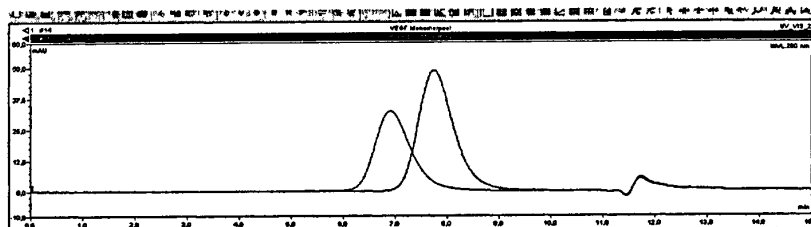
1. Очистка с белком А

G6-31: 10% агрегатов
TvAb6: 25% агрегатов



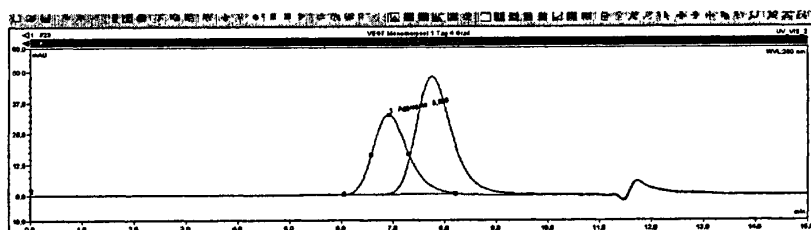
2. Эксклюзионная хроматография после очистки

G6-31: > 99% мономеров
TvAb6: > 99% мономеров



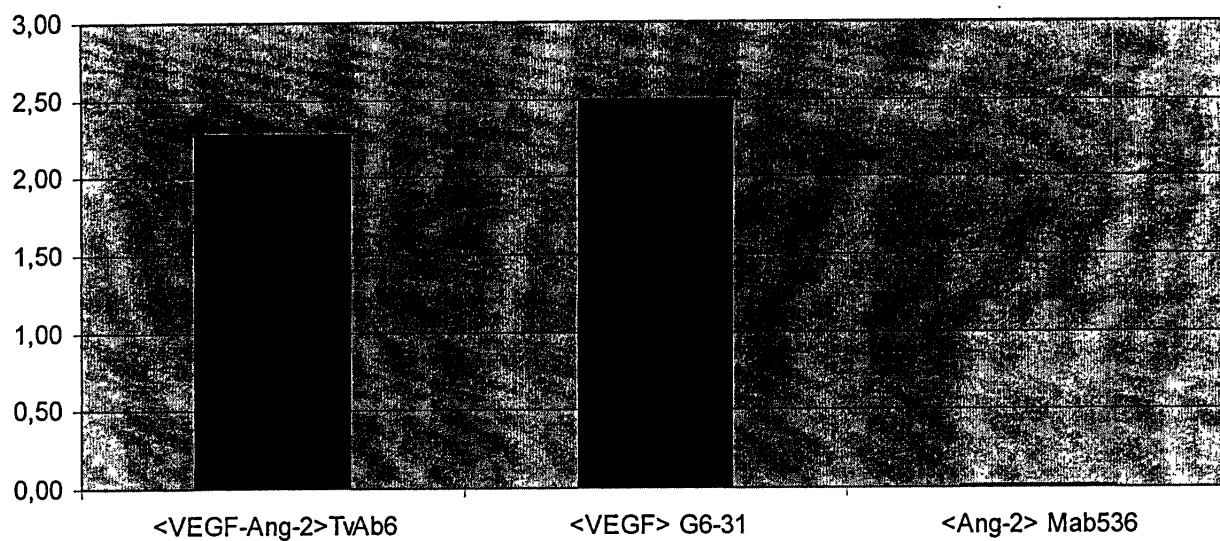
3. Эксклюзионная хроматография через 24 ч при 4°C

G6-31: > 99% мономеров
TvAb6: > 99% мономеров

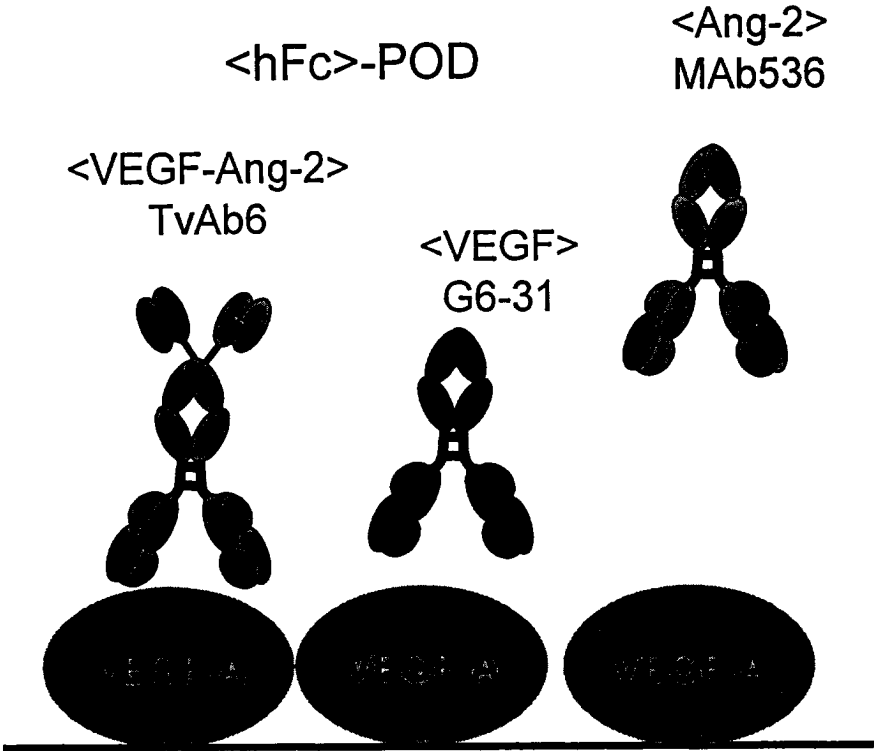


Фиг. 4

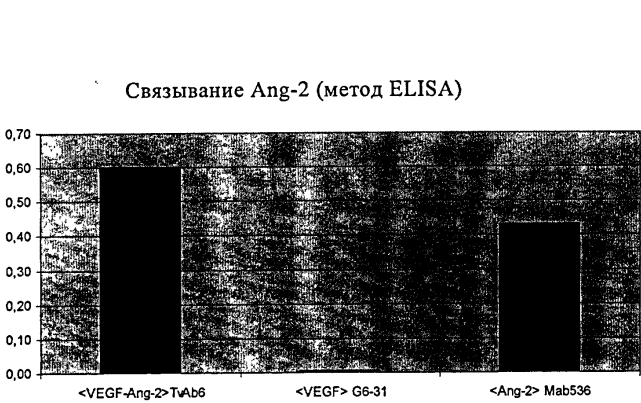
Связывание VEGF (метод ELISA)



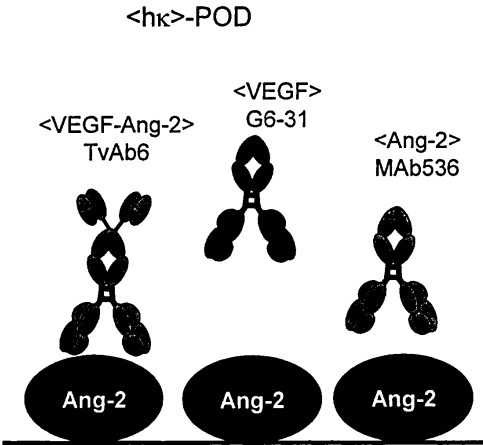
Фиг. 5 (часть 1)



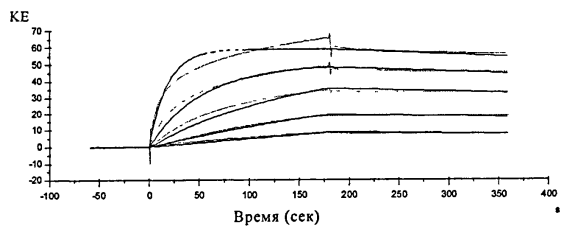
Фиг. 5 (часть 2)



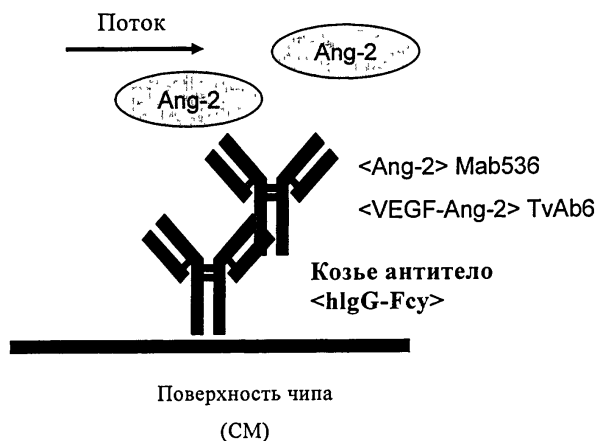
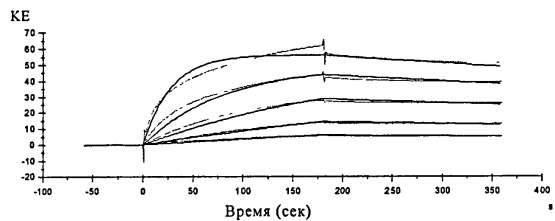
Фиг. 6А



Связывание hAng-2 с <Ang-2> Mab536 (1:1 модель связывания Лэнгмиура)

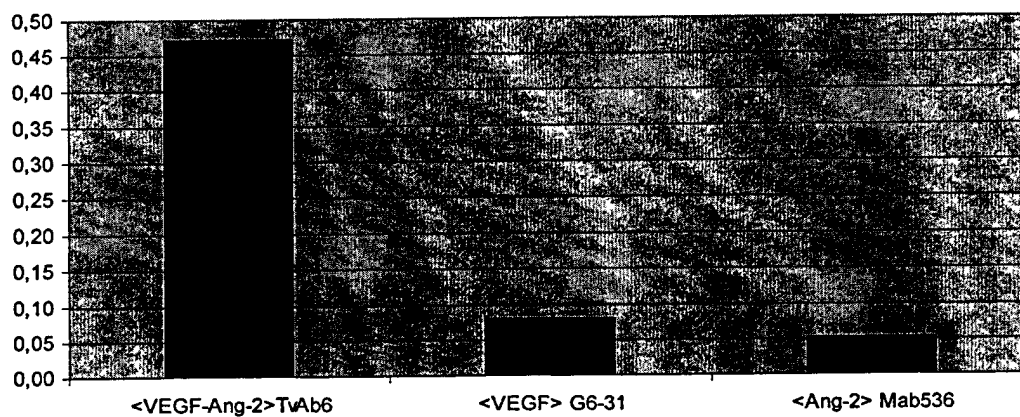


Связывание hAng-2 с <VEGF-Ang-2> TvAb6

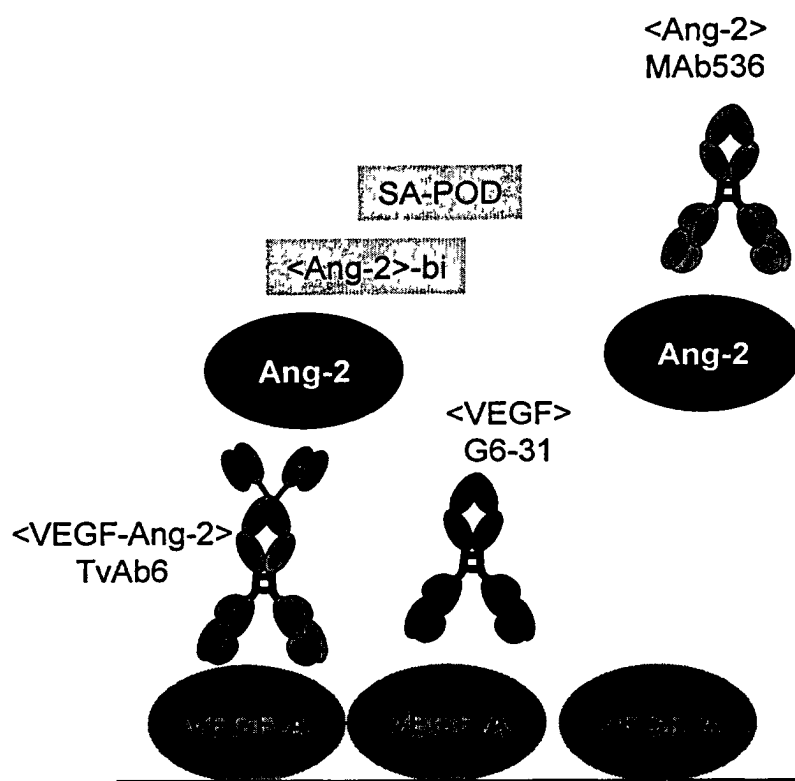


Фиг. 6Б

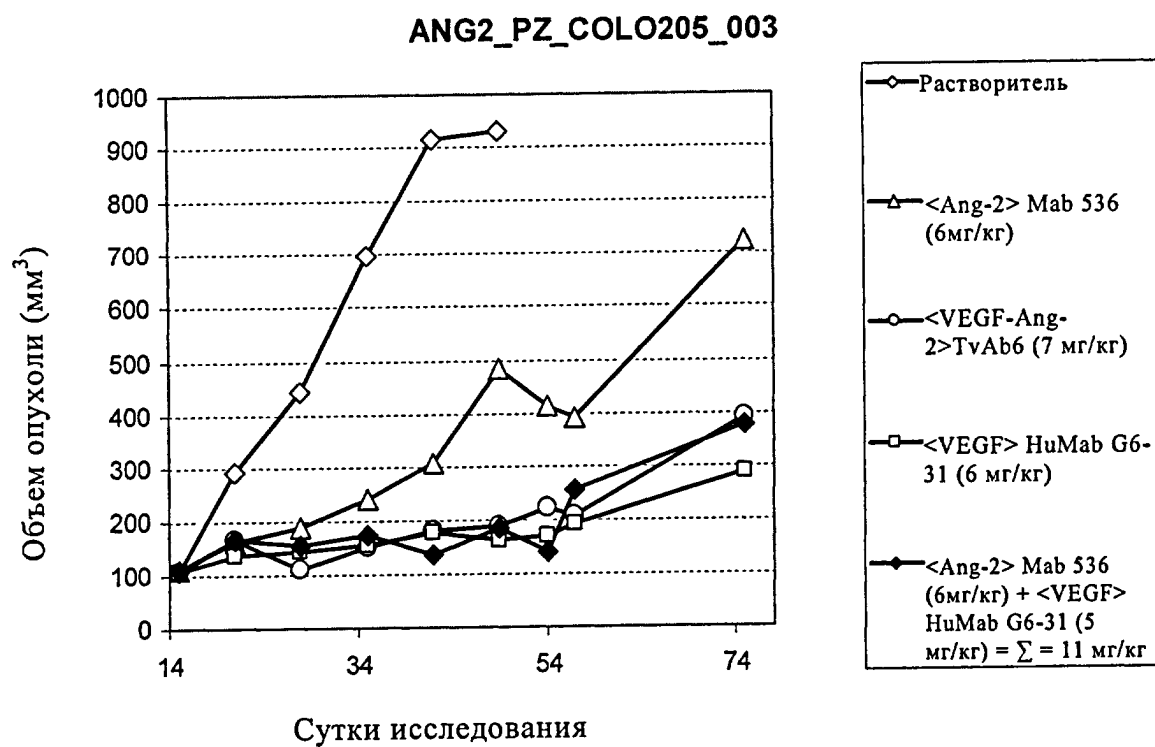
Связывание VEGF-Ang-2 (метод ELISA)



Фиг. 7 (часть 1)

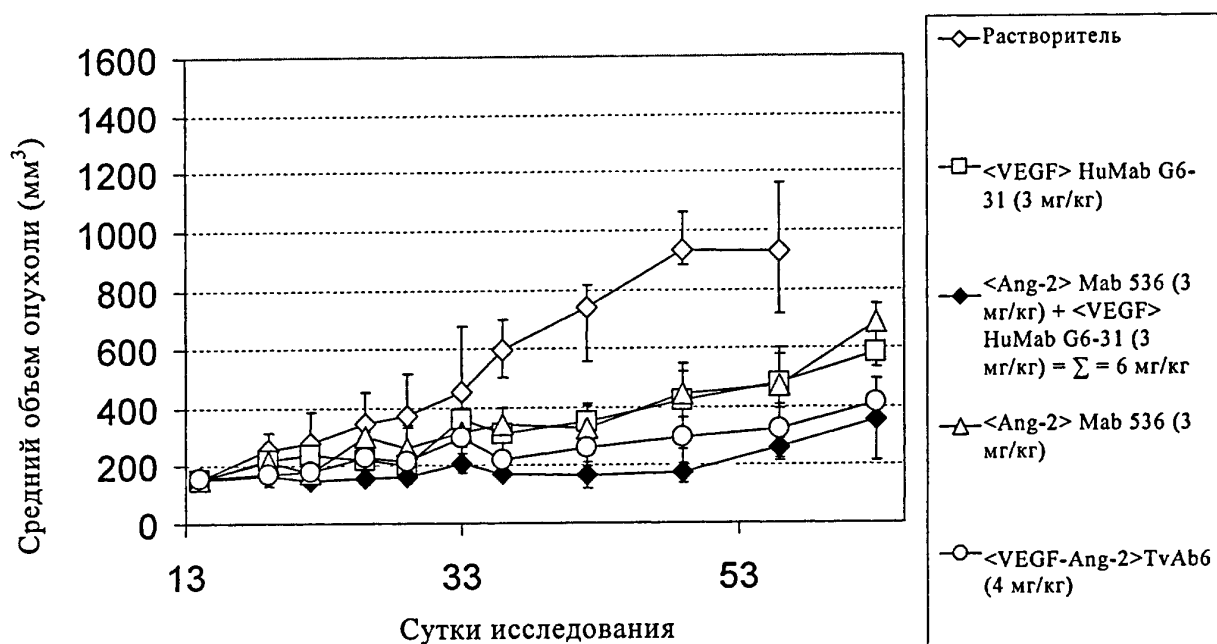


Фиг. 7 (часть 2)

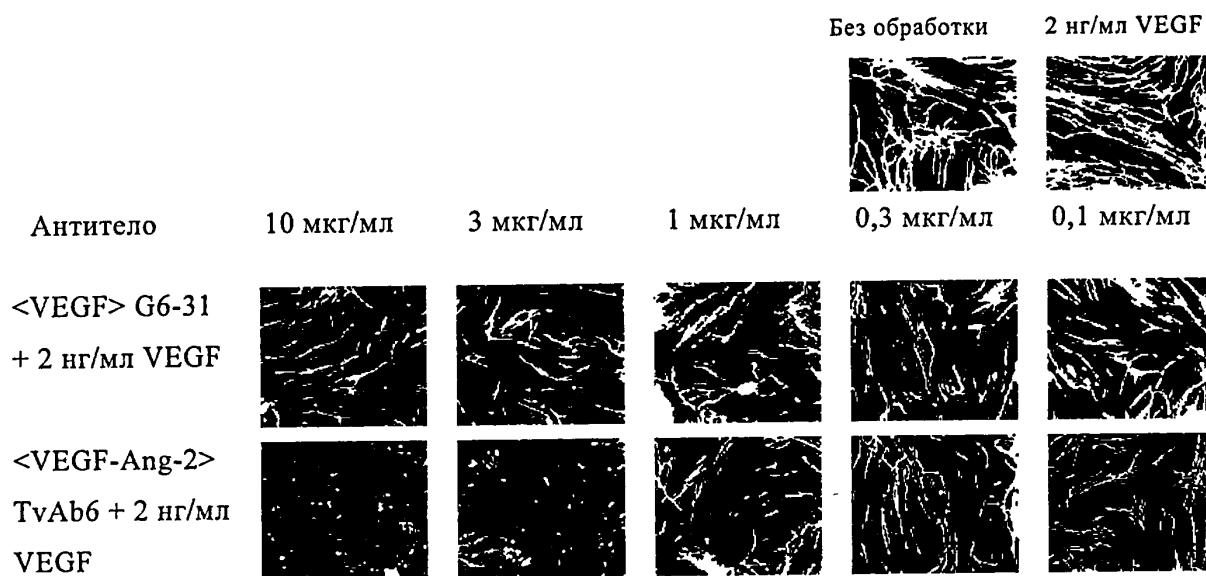


Фиг. 8А

ANG2_PZ_COLO205_005

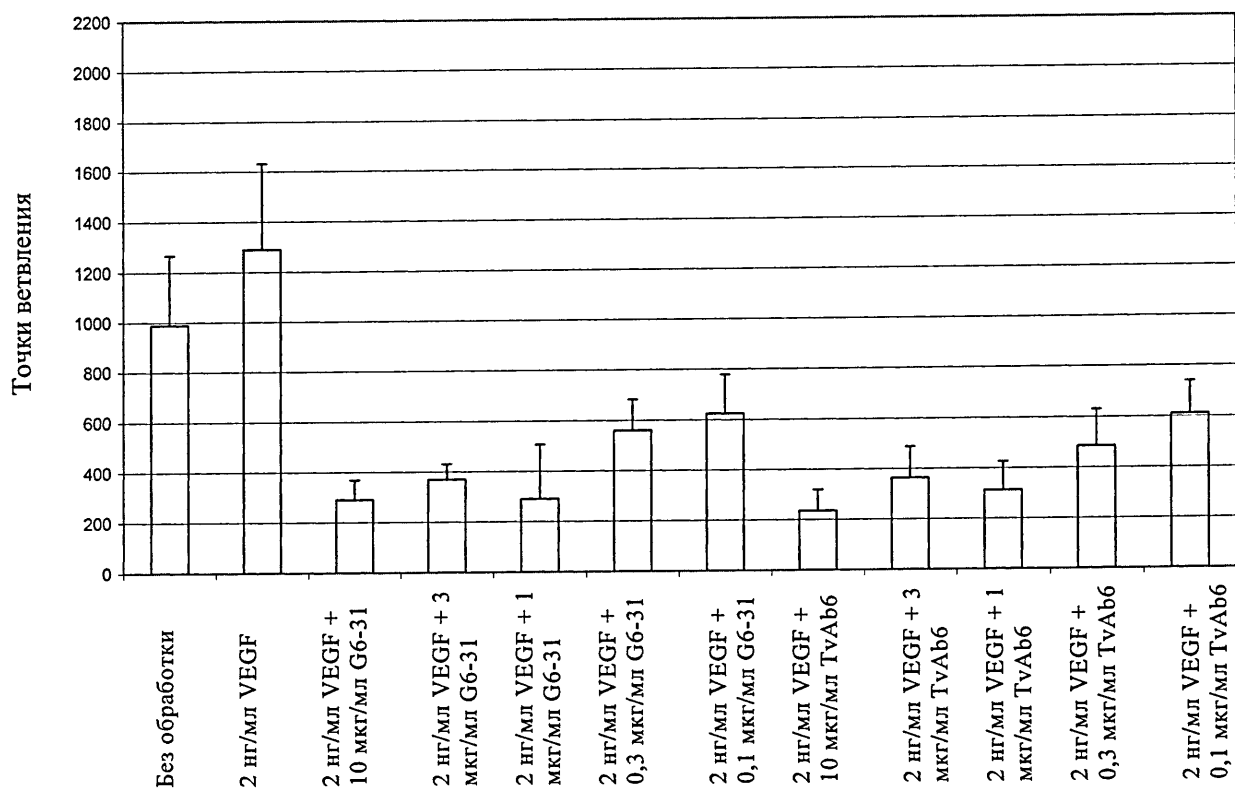


Фиг. 8Б



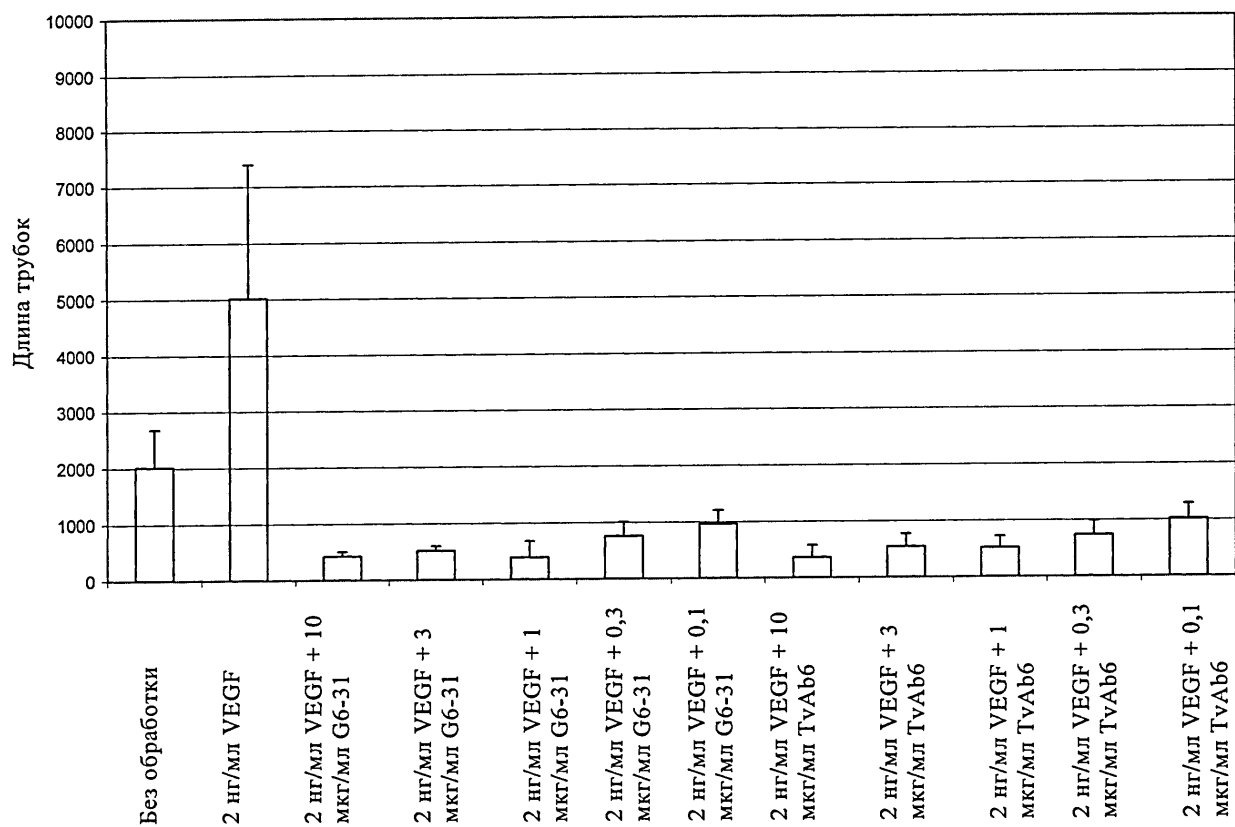
Фиг. 9

Точки ветвления



Фиг. 10А

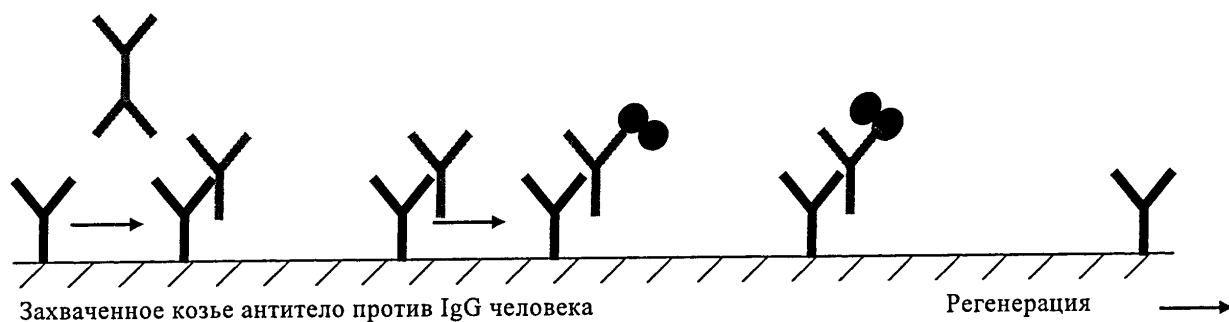
Длина трубок на комплект



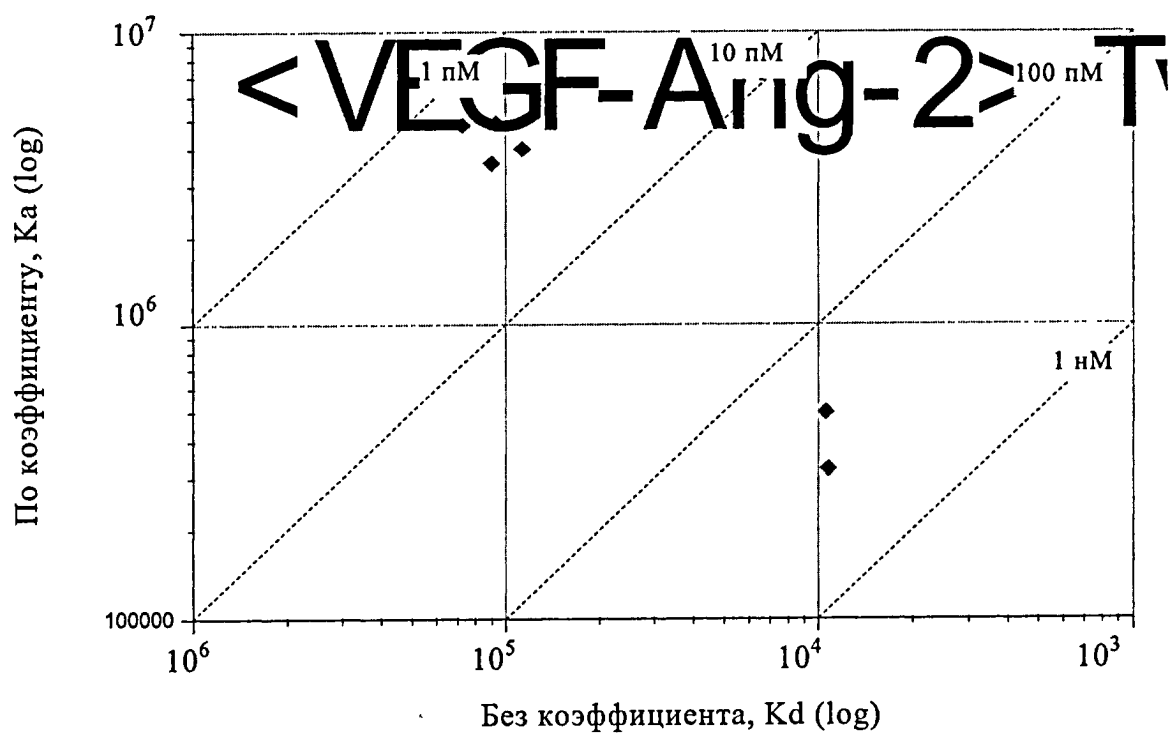
Фиг. 10Б

<VEGF>G6-31 или
<VEGF-Ang-2> TvAb6

Инъекция hVEGF (фирма R&D)



Фиг. 11

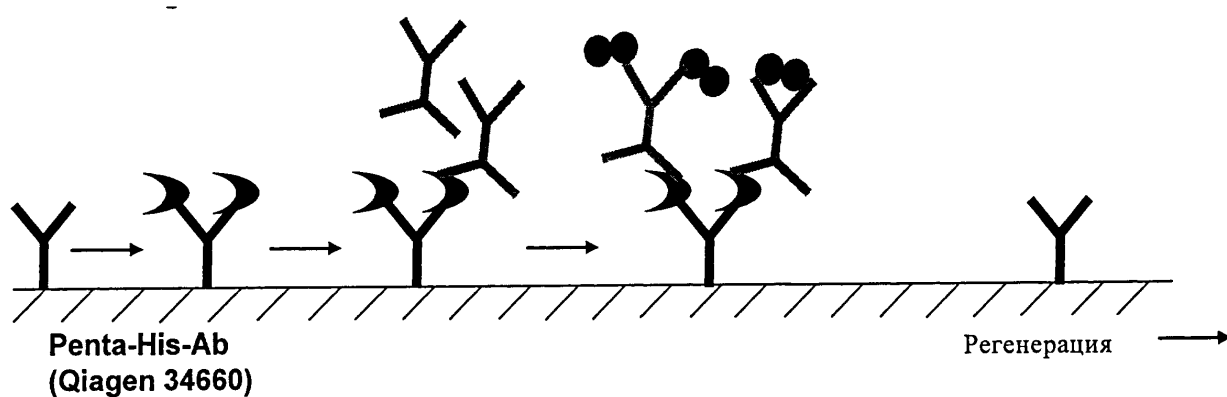


Фиг. 12

Захват hAng-2-His

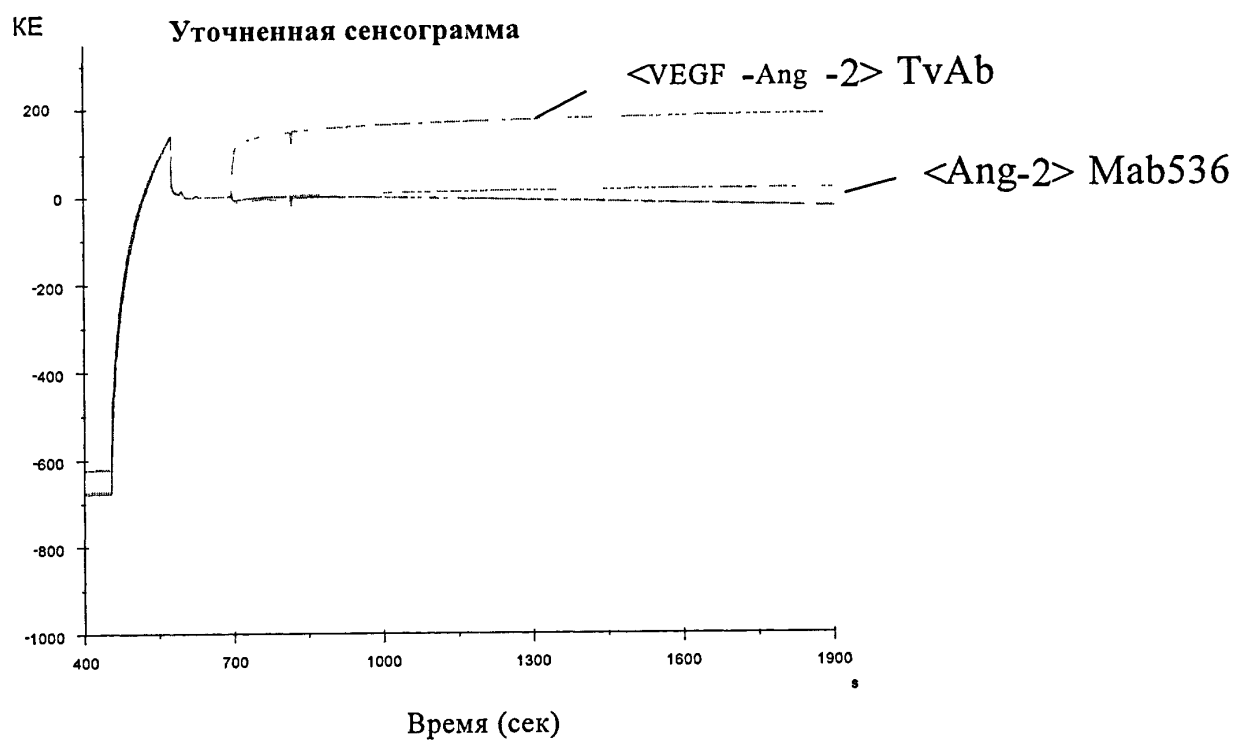
1. Инъекция TvAb

2. Инъекция hVEGF (фирма R&D)

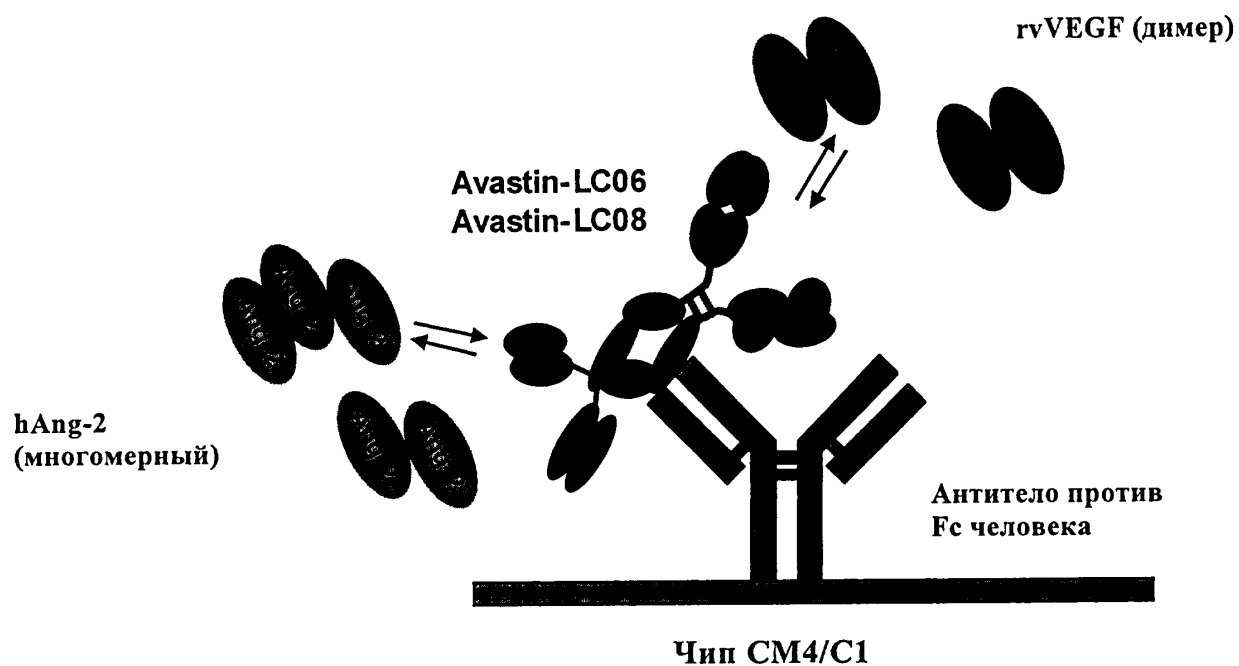


Чип CM5

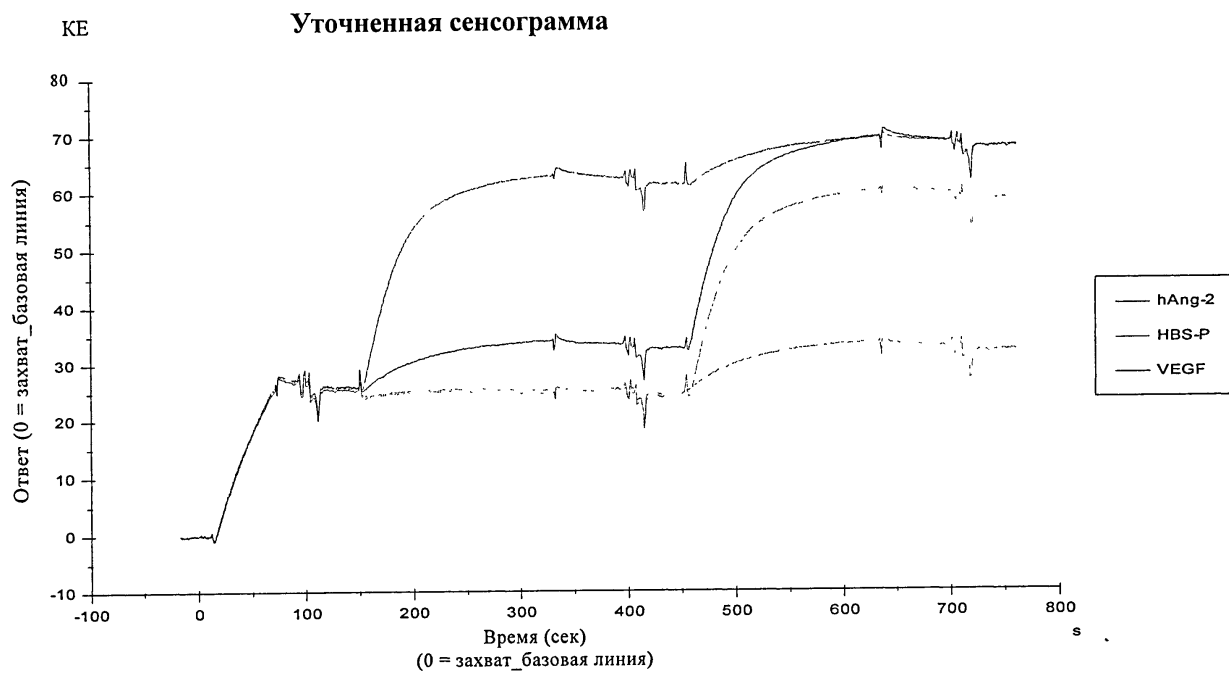
Фиг. 13



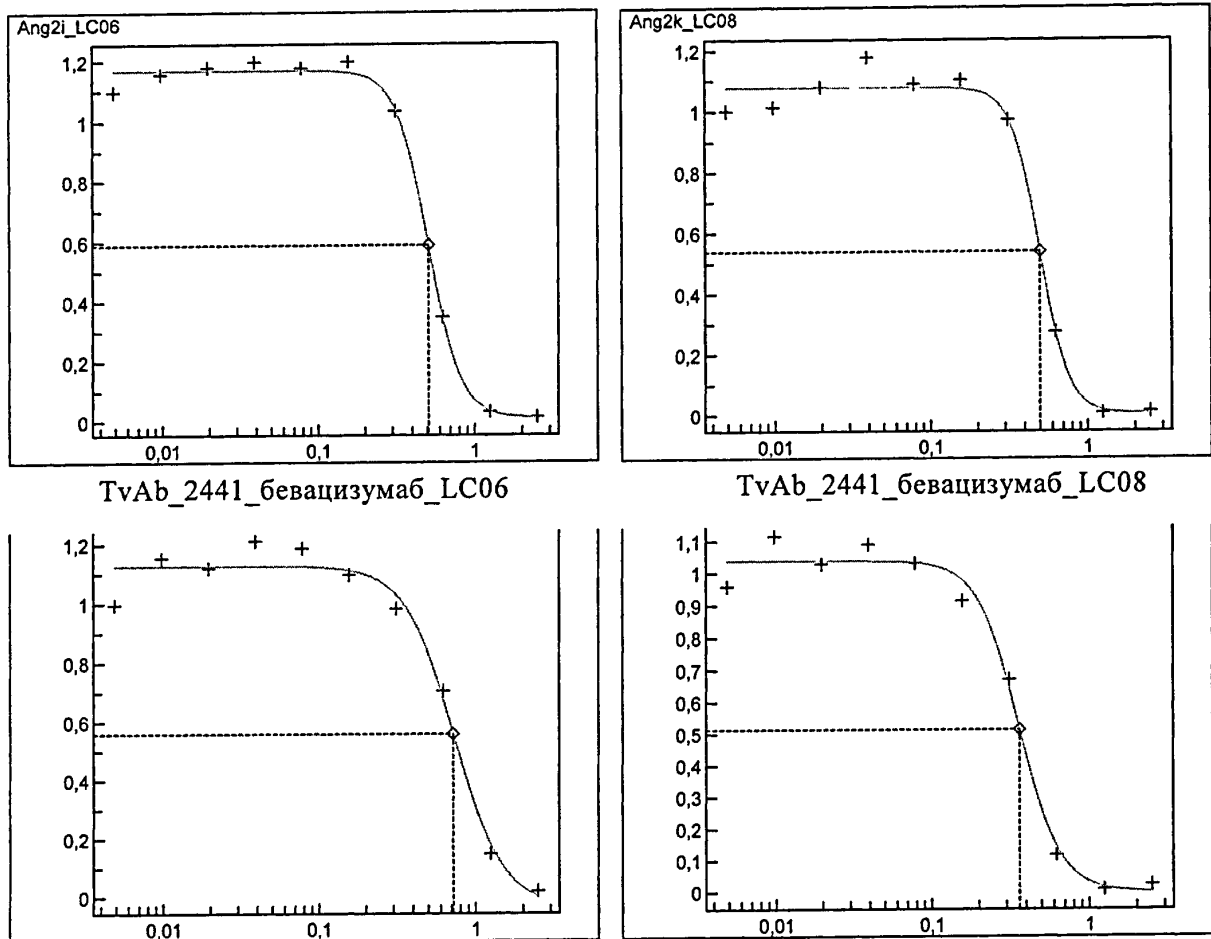
Фиг. 14



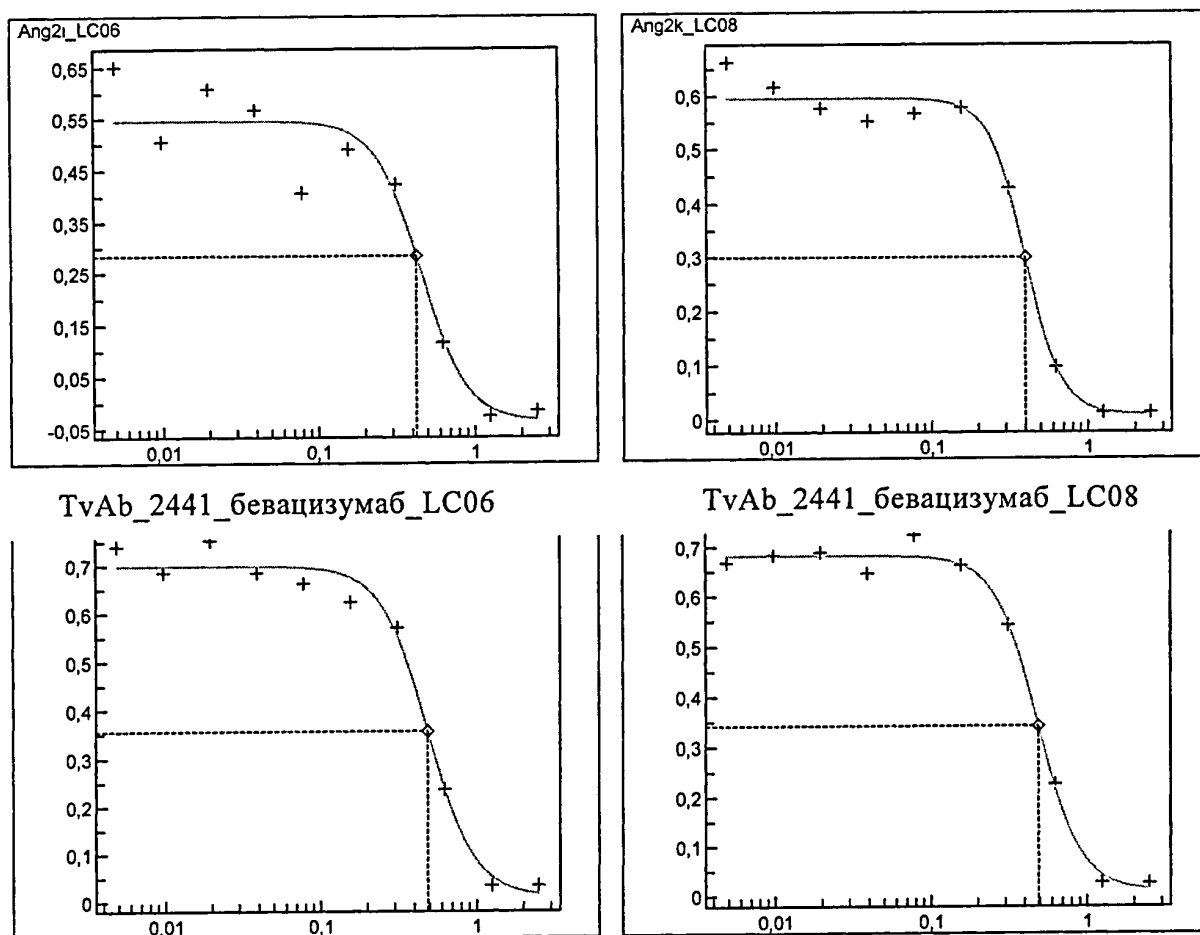
Фиг. 15А



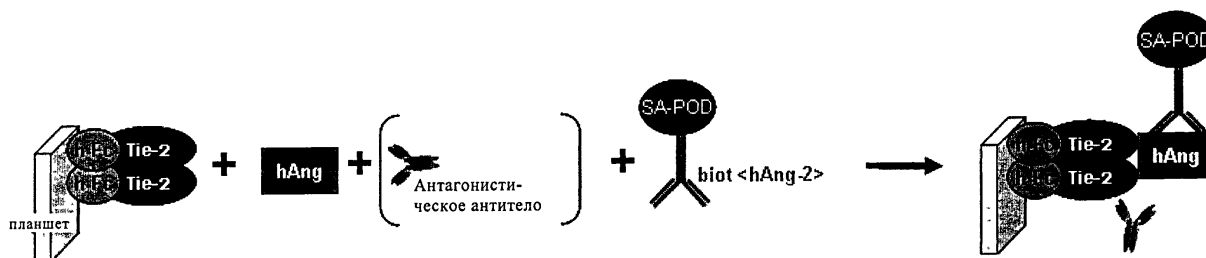
Фиг. 15Б



Фиг. 16А

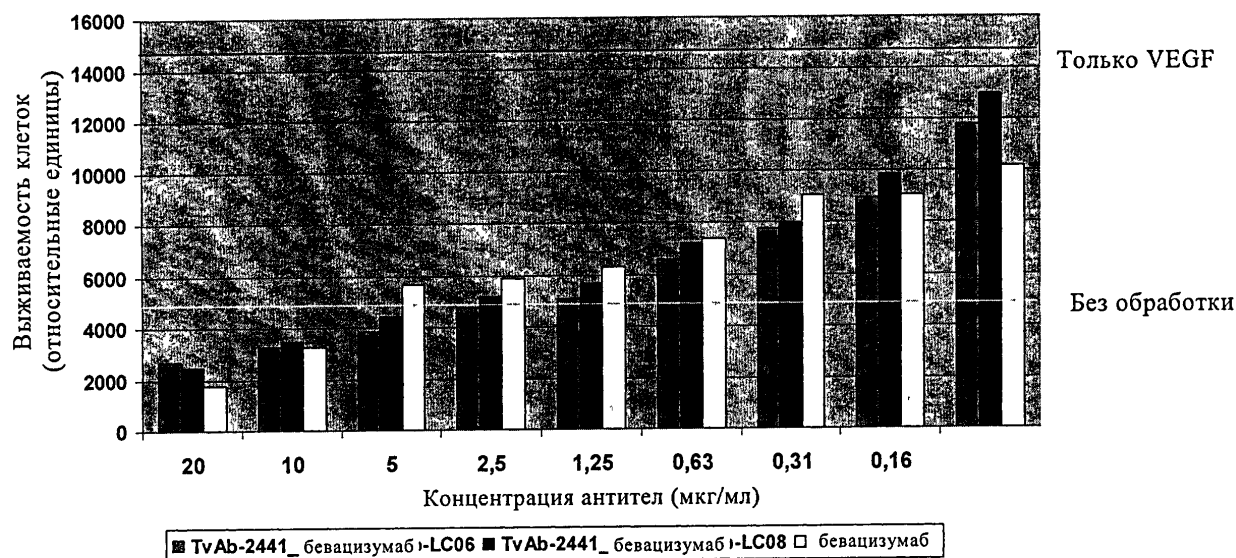


Фиг. 16Б



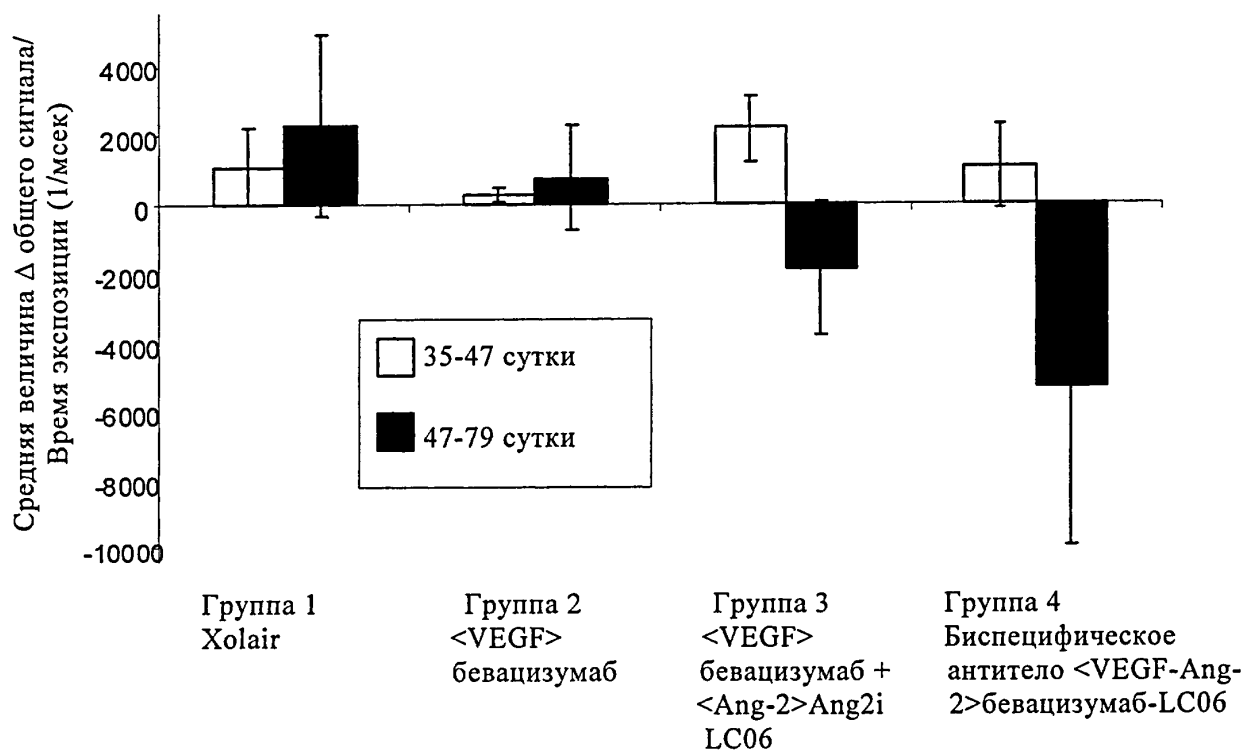
Фиг. 17

Подавление пролиферации клеток HUVEC, индуцированной VEGF



Фиг. 18

Относительное изменение сигнала во время лечения



Фиг. 19