

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201691991** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2017.04.28

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.04.01

(54) **МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА**

(31) 14163165.5; 14179034.5

(32) 2014.04.02; 2014.07.30

(33) EP

(86) PCT/EP2015/057165

(87) WO 2015/150447 2015.10.08

(71) Заявитель:

Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(72) Изобретатель:

**Шефер Вольфганг (DE), Клайн
Кристиан (CH), Имхоф-Юнг Забине,
Клостерманн Штефан, Мольхой
Михаэль, Регула Йёрг Томас (DE)**

(74) Представитель:

**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Белоусов Ю.В.,
Каксис Р.А., Куликов А.В., Кузнецова
Е.В., Соколов Р.А., Кузнецова Т.В.
(RU)**

(57) В заявке описаны мультиспецифические антитела, их получение и применение.

A1

201691991

201691991

A1

5

10

15

Заявка № 201691991

Заявитель Ф.ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ,
СН

МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА

20

Настоящее изобретение относится к новым мультиспецифическим антителам, их получению и применению.

Предпосылки создания изобретения

В данной области известны сконструированные белки, такие как би- или мультиспецифические антитела, которые могут связываться с двумя или бóльшим количеством антигенов. Указанные мультиспецифические связывающие белки можно создавать с использованием методов клеточного слияния, химической конъюгации или рекомбинантной ДНК.

В последние годы создано широкое разнообразие форматов рекомбинантных мультиспецифических антител, например, четырехвалентные биспецифические антитела, полученные путем слияния, например, антитела IgG-формата и одноцепочечных доменов (см., например, Coloma M.J. и др., Nature

30

Biotech 15, 1997, сс. 159-163; WO 001/077342 и Morrison S.L., Nature Biotech 25, 2007, сс. 1233-1234).

Разработано также несколько других новых форматов, в которых уже не сохранялась основная структура антитела (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM), таких как димерные (диабоды), тримерные (триабоды) или тетрамерные (тетрабоды) антитела, миниантитела, несколько одноцепочечных форматов (scFv, бис-scFv), которые могут связываться с двумя или большим количеством антигенов (Holliger P. и др., Nature Biotech 23, 2005, сс. 1126-1136; Fischer N., Léger 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).

Во всех указанных форматах используют линкеры либо для слияния основной структуры антитела (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) с дополнительным связывающим белком (например, scFv), либо для слияния, например, двух Fab-фрагментов или scFv (Fischer N., Léger O., Pathobiology 74, 2007, сс. 3-14). Хотя очевидно, что линкеры дают преимущества при создании биспецифических антител, с ними могут быть связаны также проблемы терапевтического плана. Фактически эти чужеродные пептиды могут вызывать иммунный ответ против самого линкера или области стыка между белком и линкером. Кроме того, гибкая природа этих пептидов делает их более чувствительными к протеолитическому расщеплению, что может приводить к неудовлетворительной стабильности, агрегации и повышенной иммуногенности антитела. Кроме того, может существовать необходимость в поддержании эффекторных функций, таких, например, как комплементзависимая цитотоксичность (CDC) или антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC), которые опосредуются Fc-областью, путем сохранения высокой степени сходства с встречающимися в естественных условиях антителами.

Таким образом, в идеальном варианте необходимо создавать биспецифические антитела, структура которых очень сходна с общей структурой встречающихся в естественных условиях антител (типа IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) и имеет минимальное отклонение от человеческих последовательностей.

В соответствии с одним из подходов биспецифические антитела с высокой степенью сходства со встречающимися в естественных условиях антителами создавали с помощью технологии квадром (квадрогибридом) (см. Milstein S. и

Cuello A.C., Nature, 305, 1983, сс. 537-540) на основе соматического слияния двух различных клеточных линий гибридом, которые экспрессируют мышинные моноклональные антитела с требуемыми для биспецифического антитела специфичностями. В результате случайного спаривания тяжелых и легких цепей двух различных антител в образующейся линии клеток гибрида-гибридомы (или квадромы) получают вплоть до 10 различных видов антител, из которых только одно представляет собой требуемое функциональное биспецифическое антитело. Из-за присутствия полученных в результате ошибочного спаривания побочных продуктов и в значительной степени сниженного выхода продукта требуются более сложные процедуры очистки (см., например, Morrison S.L., Nature Biotech 25, 2007, сс. 1233-1234). В целом, эта же проблема, связанная с ошибочно спаренными побочными продуктами, сохраняется и при применении методов рекомбинантной экспрессии.

Подход, с помощью которого можно обойти проблему, связанную с полученными в результате ошибочных спариваний побочными продуктами, известный под названием технология «knobs-into-holes» (взаимодействие по типу «выступ-впадина»), направлен на усиление спаривания тяжелых цепей двух различных антител путем интродукции мутаций в СНЗ-домены для модификации поверхности раздела в области контакта. На одной цепи имеющие большие размеры аминокислоты заменяли на аминокислоты с короткими боковыми цепями для создания «впадины». И, наоборот, аминокислоты с более крупными боковыми цепями интродуцировали в другой СНЗ-домен, создавая «выступ». Путем совместной экспрессии этих двух тяжелых цепей (и двух идентичных легких цепей, которые должны соответствовать обоим тяжелым цепям) достигали высоких выходов гетеродимерной конструкции («выступ-впадина») относительно гомодимерной конструкции («впадина-впадина» или «выступ-выступ») (Ridgway J. B. и др., Protein Eng. 9, 1996, сс. 617-621; и WO 1996/027011). Процентное содержание гетеродимера можно дополнительно повышать путем ремоделирования поверхностей раздела двух СНЗ-доменов с помощью технологии фагового дисплея и интродукции дисульфидного мостика с целью стабилизации гетеродимеров (Merchant A.M. и др., Nature Biotech 16, 1998, сс. 677-681; Atwell S., Ridgway J.B., Wells J.A., Carter P., J Mol Biol 270, 1997, сс. 26-35). Новые подходы к технологии «knobs-into-holes» описаны,

например, в EP 1870459A1. Хотя указанный формат, по-видимому, является очень привлекательным, в настоящее время отсутствуют данные о его усовершенствовании в направлении клинического применения. Одним из важных ограничений этой стратегии является то, что легкие цепи двух
5 родительских антител должны быть идентичными для предупреждения ошибочного спаривания и формирования неактивных молекул. Таким образом, эта технология не пригодна в качестве основы для более легкого создания рекомбинантных три- или тетраспецифических антител к трем или четырем антигенам с использованием в качестве исходных двух антител к первому и
10 второму антигену, поскольку сначала должны быть оптимизированы или тяжелые цепи этих антител, и/или идентичные легкие цепи, а затем добавлены дополнительные антигенсвязывающие пептиды против третьего и четвертого антигена.

В WO 2006/093794 описаны композиции гетеродимерных связывающих
15 белков. В WO 99/37791 описаны многоцелевые производные антител. У Morrison и др., J. Immunolog, 160, 1998, сс. 2802-2808 описано влияние замены переменных областей на функциональные свойства IgG.

В WO 2013/02362 описаны гетеродимеризованные полипептиды. В WO 2013/12733 описаны полипептиды, которые содержат гетеродимерные Fc-
20 области. В WO 2012/131555 описаны сконструированные гетеродимерные иммуноглобулины. В EP 2647707 описаны сконструированные гетеродимерные иммуноглобулины.

В WO 2013/026835 описаны биспецифические не содержащие Fc-области антитела с кроссовером доменов. В WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO
25 2009/080253, WO 2009/080254 и у Schaefer W. и др., PNAS, 108, 2011, сс. 11187-11191 описаны биспецифические антитела IgG-типа с кроссовером доменов.

Установлено, что для мультиспецифических антител с заменой/обменом VH/VL в одной связывающей области для предупреждения ошибочного спаривания легких цепей (CrossMab^{VH-VL}), которые описаны в WO 2009/080252
30 (см. также Schaefer W. и др., PNAS, 108, 2011, сс. 11187-11191), характерно выраженное снижение содержания побочных продуктов, полученных в результате ошибочного спаривания легких цепей антитела к первому антигену с «неправильной» тяжелой цепью антитела ко второму антигену (по сравнению с

подходами, в которых не использовали указанный обмен доменов). Однако их получение не полностью исключает образование побочных продуктов. Основной побочный продукт является результатом взаимодействия бенс-джонсовского типа – см. также Schaefer W. и др., PNAS, 108, 2011, сс. 11187-1191; на фиг. S11 (дополнения).

Таким образом, все еще существует потребность в дополнительном снижении указанных побочных продуктов с целью повышения, например, выхода указанных биспецифических антител.

Краткое изложение сущности изобретения

Изобретение относится к мультиспецифическому антителу, которое содержит:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном, и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга; и

в котором

I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)), и в котором в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); или

II) в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)), и в котором в константном домене CH1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении

213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Следующим вариантом осуществления изобретения является способ получения мультиспецифического антитела, предлагаемого в изобретении, заключающийся в том, что осуществляют стадии, на которых

А) трансформируют клетку-хозяина векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном, в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга; и

в котором

И) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)), и в котором в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); или

II) в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)), и в котором в константном домене CH1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

Б) культивируют клетку-хозяина в условиях, обеспечивающих синтез указанной молекулы антитела; и

В) выделяют указанную молекулу антитела из указанной культуры.

Следующим вариантом осуществления изобретения является нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотные последовательности мультиспецифического антитела, предлагаемого в изобретении.

5 Следующим вариантом осуществления изобретения являются экспрессионные векторы, которые содержат нуклеиновую кислоту, предлагаемую в изобретении, обладающие способностью экспрессировать указанную нуклеиновую кислоту в клетке-хозяине.

Следующим вариантом осуществления изобретения является клетка-хозяин, которая содержит вектор, предлагаемый в изобретении.

10 Следующим вариантом осуществления изобретения является композиция, например, фармацевтическая или диагностическая композиция, антитела, предлагаемого в изобретении.

Следующим вариантом осуществления изобретения является фармацевтическая композиция, которая содержит антитело, предлагаемое в изобретении, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

Следующим вариантом осуществления изобретения является способ лечения пациента, который нуждается в терапии, отличающийся тем, что вводят пациенту в терапевтически эффективном количестве антитело, предлагаемое в изобретении.

Согласно изобретению соотношение требуемого мультиспецифического антитела и нежелательного основного побочного продукта, образовавшегося в результате взаимодействия бенс-джонсовского типа, можно повышать путем интродукции замен заряженных аминокислот на аминокислоты с противоположными зарядами в специфических аминокислотных положениях в СН1- и СL-доменах.

Описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 – некоторые примеры мультиспецифических антител, предлагаемых в изобретении, с обменом VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфическими мутациями в одной поверхности раздела СН1/СL-доменов:

по меньшей мере аминокислота в положении 124 CL-домена заменена независимо на лизин (K) , аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и

5 по меньшей мере аминокислота в положении 147 CH1-домена или аминокислота в положении 213 CH1-домена заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

10 на фиг. 1А - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела CH1/CL-доменов в другом связывающем плече антитела;

на фиг. 1Б - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела CH1/CL-доменов в этом же связывающем плече антитела;

15 на фиг. 1В - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела CH1/CL-доменов в другом связывающем плече антитела и модификации поверхности раздела CH3/CH3-доменов для усиления гетеродимеризации тяжелых цепей (например, с применением технологии типа «knobs-into-holes» или в альтернативном варианте технологий гетеродимеризации типа, например, замены заряженных

20 аминокислот на соответствующие аминокислоты с противоположным зарядом);

на фиг. 2А - пример мультиспецифического антитела с обменом VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и без специфических мутаций ни в одной из поверхностей раздела CH1/CL-доменов (слева) и основного

25 побочного продукта указанного мультиспецифического антитела (образовавшегося в результате взаимодействия бенс-джонсовского типа доменов VL-VL) – других возможных вариантов в качестве побочных продуктов не выявлено ни непосредственно с помощью масс-спектрометрии, ни с помощью масс-спектрометрии после расщепления плазмином или LysC путем анализа их Fab-фрагментов;

30 на фиг. 2Б - отличительная структура основного побочного продукта мультиспецифического антитела с заменой VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и без специфических мутаций ни в одной из

поверхностей раздела CH1/CL-доменов (образовавшегося в результате взаимодействия бенс-джонсовского типа доменов VL-VL);

на фиг. 3:

на фиг.3А – аминокислотные последовательности дикого типа (wt) CH1-домена (приведены два изотипа IgG), в которых подчеркнуты и выделены аминокислотные положения 147 и 213 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

на фиг. 3Б – аминокислотные последовательности дикого типа (wt) CL-домена каппа-изотипа, в которых подчеркнуты и выделены аминокислотные положения 124 и 123 (нумерация согласно Кэботу);

на фиг. 3В – аминокислотные последовательности дикого типа (wt) CL-домена лямбда-изотипа, в которых подчеркнуты и выделены аминокислотные положения 124 и 123 (нумерация согласно Кэботу);

на фиг. 4:

на фиг. 4А – данные о снижении содержания основного побочного продукта, образовавшегося в результате взаимодействия бенс-джонсовского типа, с помощью единичных замен заряженных аминокислот, предлагаемых в изобретении, в поверхности раздела CH1/CL.

Примеры мультиспецифических антител к *Ang2-VEGF*, предлагаемых в изобретении, с заменой/обменом VH/VL-доменов (*CrossMAb^{Vh-VL}*).

Сравнение дикого типа (wt) и различных комбинаций единичных замен заряженных аминокислот

1) мультиспецифическое антитело дикого типа (wt) к *Ang2-VEGF* типа *CrossMAb^{Vh-VL}* без специфических аминокислотных замен в поверхности раздела CH1/CL,

2) мультиспецифические антитела к *Ang2-VEGF*, предлагаемые в изобретении, I) с заменами в положении 124 CL-домена и в положении 147 CH1-домена (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) или II) с заменами в положении 124 CL-домена и в положении 213 CH1-домена (нумерация согласно EU-индексу Кэбота),

3) другие мультиспецифические антитела к *Ang2-VEGF* типа *CrossMAb^{Vh-VL}* с заменами в различных положениях;

на фиг. 4Б - последовательности (SEQ ID NO:) мультиспецифических антител, результаты для которых представлены на фиг. 4А;

на фиг. 5:

на фиг. 5А – данные о снижении содержания основного побочного продукта, образовавшегося в результате взаимодействия бенс-джонсовского типа, с помощью различных замен заряженных аминокислот, предлагаемых в изобретении, в поверхности раздела CH1/CL.

Примеры мультиспецифических антител к *Ang2-VEGF*, предлагаемых в изобретении, с заменой/обменом VH/VL-доменов (*CrossMab^{Vh-VL}*).

Сравнение дикого типа (wt) и различных комбинаций замен заряженных аминокислот;

на фиг. 5Б- последовательности (SEQ ID NO:) мультиспецифических антител, результаты для которых представлены на фиг. 5А;

на фиг. 6:

на фиг. 6А – данные о снижении содержания основного побочного продукта, образовавшегося в результате взаимодействия бенс-джонсовского типа, с помощью различных замен заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL.

Примеры мультиспецифических антител к *IL-17/TWEAK*, предлагаемых в изобретении, с заменой/обменом VH/VL-доменов (*CrossMab^{Vh-VL}*).

Сравнение дикого типа (wt) и различных комбинаций замен заряженных аминокислот;

на фиг. 6Б - последовательности (SEQ ID NO:) мультиспецифических антител, результаты для которых представлены на фиг. 6А;

на фиг. 7 - некоторые примеры двухвалентных мультиспецифических антител, предлагаемых в изобретении, с обменом VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфическими мутациями в одной поверхности раздела CH1/CL-доменов, в приведенных в качестве примера мультиспецифических антителах отсутствует Fc-фрагмент (формат Fab-CrossFab^{VH-VL} и CrossFab^{VH-VL}-Fab):

по меньшей мере одна аминокислота в положении 124 CL-домена заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и

по меньшей мере аминокислота в положении 147 CH1-домена или аминокислота в положении 213 CH1-домена заменена независимо на

глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

на фиг. 7А - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела CH1/CL-доменов в другом связывающем плече антитела;

на фиг. 7Б - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела CH1/CL-доменов в этом же связывающем плече антитела;

на фиг. 7В - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела CH1/CL-доменов в этом же связывающем плече антитела; и дополнительные специфические мутации в поверхности раздела CH1/CL-доменов в другом связывающем плече антитела;

на фиг. 7Г - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела CH1/CL-доменов в другом связывающем плече антитела;

на фиг. 8 - некоторые примеры трехвалентных мультиспецифических антител, предлагаемых в изобретении, с обменом VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфическими мутациями в одной поверхности раздела CH1/CL-доменов, в приведенных в качестве примера мультиспецифических антителах отсутствует Fc-фрагмент (формат Fab-Fab-CrossFab^{VH-VL}):

по меньшей мере аминокислота в положении 124 CL-домена заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и

по меньшей мере аминокислота в положении 147 CH1-домена или аминокислота в положении 213 CH1-домена заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

на фиг. 8А, Б, В - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела CH1/CL-доменов в других связывающих плечах антитела;

на фиг. 8Г - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела CH1/CL-доменов в этом же связывающем плече антитела;

5 на фиг. 8Д - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела CH1/CL-доменов в этом же связывающем плече антитела; и дополнительные специфические мутации в поверхности раздела CH1/CL-доменов в других связывающих плечах антитела;

10 на фиг. 9 - некоторые примеры четырехвалентных мультиспецифических антител, предлагаемых в изобретении, с обменом VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфическими мутациями в одной поверхности раздела CH1/CL-доменов, в приведенных в качестве примера мультиспецифических антителах отсутствует Fc-фрагмент (формат (Fab-Fab-CrossFab^{VH-VL}):

15 по меньшей мере аминокислота в положении 124 CL-домена заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и

20 по меньшей мере аминокислота в положении 147 CH1-домена или аминокислота в положении 213 CH1-домена заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

на фиг. 9А - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела CH1/CL-доменов в других связывающих плечах антитела;

25 на фиг. 9Б - обмен VH/VL-доменов в одном из связывающих плечей антитела и специфические мутации в поверхности раздела CH1/CL-доменов в этом же связывающем плече антитела.

Подробное описание изобретения

30 Мультиспецифические антитела с обменом/заменой доменов в одном связывающем плече (CrossMab^{VH-VL}) подробно описаны в WO 2009/080252 и у Schaefer W. и др., PNAS, 108, 2011, сс.11187-1191 (которые включены в настоящее описание в качестве ссылки). Для них четко установлено снижение содержания побочных продуктов, полученных в результате ошибочного

спаривания легких цепей антитела к первому антигену с «неправильной» тяжелой цепью антитела ко второму антигену (по сравнению с подходами, в которых не использовали указанный обмен доменов). Однако их получение не полностью исключает образование побочных продуктов. Основной побочный продукт является результатом взаимодействия бенс-джонсовского типа – см. также Schaefer W. и др., PNAS, 108, 2011, сс. 11187-11191; на фиг. S11 (дополнения).

Таким образом, при создании изобретения разработан новый подход для дополнительного снижения содержания указанных побочных продуктов для повышения выхода указанных мультиспецифических антител (т.е. мультиспецифических антител, которые содержат обмен/замену VH/VL-доменов только в связывающем(их) плече(ах) одной антигенной специфичности, в то время как связывающее(ие) плечо(и) другой антигенной специфичности не содержат обмен/замену VH/VL-доменов, но обычно имеют соответствующее дикому типу строение доменов, указанное на фиг. 1, в результате интродукции замен заряженных аминокислот на аминокислоты с противоположным зарядом в специфические аминокислотные положения в CH1- и CL-доменах.

Таким образом, изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном, и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела замены друг на друга; и
в котором

1) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 (нумерация согласно Кэботу) заменена на положительно заряженную аминокислоту и в котором в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) заменена на отрицательно заряженную аминокислоту; или

II) в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 (нумерация согласно Кэботу) заменена на положительно заряженную аминокислоту и в котором в константном домене СН1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) заменена на отрицательно заряженную аминокислоту.

Согласно концепции изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит только одну из модификаций, указанных в подпунктах I) и II) выше и ниже. Таким образом, мультиспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, содержит либо

I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), замену аминокислоты в положении 124 (нумерация согласно Кэботу) на положительно заряженную аминокислоту и в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), замену аминокислоты в положении 147 или аминокислоты в положении 213 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) на отрицательно заряженную аминокислоту;

либо

II) в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), замену аминокислоты в положении 124 (нумерация согласно Кэботу) на положительно заряженную аминокислоту и в константном домене СН1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), замену аминокислоты в положении 147 или аминокислоты в положении 213 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) на отрицательно заряженную аминокислоту,

при условии, что мультиспецифическое антитело не содержит обе модификации, указанные в подпунктах I) и II).

Таким образом, изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном, и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга; и

в котором

5 I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); или

10 II) в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в котором в константном домене СН1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Кроме того, изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему:

20 а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном, и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга; и

в котором

30 I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 (нумерация согласно Кэботу) заменена на положительно заряженную аминокислоту и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) заменена на отрицательно заряженную аминокислоту.

Кроме того, изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

5 б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном, и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга; и

в котором

10 I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)), и в котором в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в
15 подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Таким образом, указанное второе антитело, специфически связывающееся со вторым антигеном, которое входит в состав мультиспецифического антитела,
20 предлагаемого в изобретения, удовлетворяет следующим условиям:

- в легкой цепи переменный домен легкой цепи VL заменен на переменный домен тяжелой цепи VH указанного антитела и

- в тяжелой цепи переменный домен тяжелой цепи VH заменен на переменный домен легкой цепи VL указанного антитела, и

25 - константные домены CL и CH1 во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела не заменены друг на друга (остаются не обменёнными).

Таким образом, указанное антитело, специфически связывающееся с первым антигеном, которое входит в состав мультиспецифического антитела, предлагаемого в изобретения, удовлетворяет следующим условиям:

30 - в указанной первой легкой цепи, происходящей из указанного первого антитела, последовательное расположение доменов легкой цепи (CL-VL) остается неизменным и

- в указанной первой тяжелой цепи, происходящей из указанного первого антитела, последовательное расположение доменов тяжелой цепи (например, CH1-VH или CH3-CH2-CH1-VH) остается неизменным (таким образом, указанное антитело, которое специфически связывается с первым антителом, не включает обмен доменов, прежде всего обмен VH/VL).

Другими словами, указанное антитело, специфически связывающееся с первым антигеном, которое входит в состав мультиспецифического антитела, предлагаемого в изобретения, содержит:

- первую легкую цепь, происходящую из указанного первого антитела, которая содержит последовательное расположение доменов легкой цепи VL-CL (в направлении от N-конца к C-концу); и

- первую тяжелую цепь, происходящую из указанного первого антитела, которая содержит последовательное расположение доменов тяжелой цепи CH1-VH (в направлении от N-конца к C-концу) (в одном из вариантов осуществления изобретения первая тяжелая цепь содержит последовательное расположение доменов тяжелой цепи CH3-CH2-CH1-VH в направлении от N-конца к C-концу).

В контексте настоящего описания «легкая цепь антитела» означает полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу переменный домен легкой цепи (VL) и константный домен легкой цепи (CL) антитела, сокращенно VL-CL.

В контексте настоящего описания «тяжелая цепь антитела» означает полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу переменный домен тяжелой цепи (VH) антитела и константный домен 1 тяжелой цепи (CH1) антитела.

В одном из вариантов осуществления изобретения тяжелая цепь мультиспецифического антитела включает в направлении от N-конца к C-концу переменный домен тяжелой цепи (VH) антитела и константный домен 1 тяжелой цепи (CH1) антитела и в нем отсутствуют константные домены CH2 и CH3, поэтому его сокращенно обозначают как VH-CH1. В одном из вариантов осуществления изобретения мультиспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, содержит по меньшей мере два Fab-фрагмента, при этом первый Fab-фрагмент содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт, специфический для первого антигена, а второй Fab-фрагмент содержит по

меньшей мере один антигенсвязывающий сайт, специфический для второго антигена, в котором во втором Fab-фрагменте переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи заменены друг на друга; и у мультиспецифического антитела отсутствует Fc-домен; и в котором

5 I) в константном домене CL легкой цепи первого Fab-фрагмента аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)), и в котором в константном домене CH1 тяжелой цепи первого Fab-
10 фрагмента аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); или

II) в константном домене CL легкой цепи второго Fab-фрагмента аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)), и в котором в константном домене CH1 тяжелой цепи второго Fab-
фрагмента аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213
20 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В другом варианте осуществления изобретения мультиспецифические антитела, предлагаемые в изобретении, содержат по меньшей мере два Fab-фрагмента, при этом первый Fab-фрагмент содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий центр, специфический для первого антигена, а второй Fab-
25 фрагмент содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий центр, специфический для второго антигена, в котором во втором Fab-фрагменте переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи заменены друг на друга; и где у мультиспецифического антитела отсутствует Fc-домен; и в котором

30 I) в константном домене CL легкой цепи первого Fab-фрагмента аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин

(R)), и в котором в константном домене СН1 тяжелой цепи первого Fab-фрагмента аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

5 В контексте настоящего описания понятие «Fab-фрагмент» относится к фрагменту антитела, который содержит фрагмент легкой цепи, содержащий переменный VL-домен и константный домен легкой цепи (CL), и переменный VH-домен и первый константный домен тяжелой цепи (СН1). Согласно этому варианту осуществления изобретения мультиспецифические антитела содержат по меньшей мере два Fab-фрагмента, при этом переменные области тяжелой и легкой цепи второго Fab-фрагмента обменены. Из-за обмена переменных областей указанный второй Fab-фрагмент обозначают также как «кросс-Fab-фрагмент» или «хFab-фрагмент» или «кроссовер-Fab-фрагмент». В указанном втором Fab-фрагменте, в котором переменные области тяжелой и легкой цепи Fab обменены, молекула кроссовер-Fab содержит модифицированную тяжелую цепь, состоящую из переменной области легкой цепи (VL) и константной области тяжелой цепи (СН1), и модифицированную легкую цепь, состоящую из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области легкой цепи (CL). Указанную молекулу кроссовер-Fab обозначают также как CrossFab^{VH/VL}.

В контексте настоящего описания понятие «Fc-домен» применяют для определения C-концевой области тяжелой цепи антитела, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Например, во встречающихся в естественных условиях антителах Fc-домен состоит из двух идентичных белковых фрагментов, происходящих из второго и третьего константных доменов двух тяжелых цепей антитела изотипов IgG, IgA и IgD; Fc-домены IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (СН-домены 2–4) в каждой полипептидной цепи. В контексте настоящего описания «отсутствует Fc-домен» означает, что биспецифические антитела, предлагаемые в изобретении, не содержат СН2-, СН3- и СН4-домены; т.е. константная тяжелая цепь состоит только из одного или нескольких СН1-доменов.

В одном из вариантов осуществления изобретения первый и второй Fab-фрагменты соединены через пептидный линкер. В контексте настоящего

описания «пептидный линкер» обозначает пептид с аминокислотными последовательностями, которые предпочтительно имеют синтетическое происхождение. В одном из вариантов осуществления изобретения пептидный линкер применяют для соединения одного из Fab-фрагментов с С- или N-концом другого Fab-фрагмента для получения мультиспецифического антитела, предлагаемого в изобретении. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения указанный пептидный линкер представляет собой пептид с аминокислотной последовательностью, состоящей по меньшей мере из 5 аминокислот, в одном из вариантов осуществления состоящей из 5-100, еще в одном варианте осуществления изобретения из 10-50 аминокислот. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный пептидный линкер представляет собой $(G_xS)_n$ или $(G_xS)_nG_m$, где G обозначает глицин, S обозначает серин и $(x = 3, n = 3, 4, 5$ или 6 и $m = 0, 1, 2$ или $3)$ или $(x = 4, n = 2, 3, 4$ или 5 и $m = 0, 1, 2$ или $3)$, в одном из вариантов осуществления изобретения $x=4$ и $n=2$ или 3 , в другом варианте осуществления изобретения $x=4$ и $n=2$. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный пептидный линкер представляет собой $(G_4S)_2$. Пептидный линкер применяют для соединения первого и второго Fab-фрагментов. В одном из вариантов осуществления изобретения первый Fab-фрагмент соединяют с С- или N-концом второго Fab-фрагмента.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения тяжелая цепь антитела содержит в направлении от N-конца к С-концу переменный домен тяжелой цепи (VH) антитела, константный домен 1 тяжелой цепи (CH1) антитела, константный домен 2 тяжелой цепи (CH2) и константный домен 3 тяжелой цепи (CH3), сокращенно VH-CH1-CH2-CH3.

В случае мультиспецифического антитела, которое содержит домены VH-CH1-CH2-CH3 в каждой тяжелой цепи, еще одним объектом изобретения является то, что можно дополнительно повышать соотношение между требуемым мультиспецифическим антителом и нежелательными побочными продуктами путем модификаций первого и второго CH3-доменов указанного мультиспецифического антитела для усиления гетеродимеризации обеих тяжелых цепей, содержащих указанные первые и второй CH3-домены.

Известно несколько подходов для CH3-модификаций, направленных на усиление гетеродимеризации, которые описаны, например, в WO 96/27011, WO

98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO

2013/157954, WO 2013/096291. Как правило, при осуществлении всех указанных подходов первый СНЗ-домен и второй СНЗ-домен оба конструируют

5 комплементарным образом так, чтобы каждый СНЗ-домен (или содержащая его тяжелая цепь) не обладал больше способностью к самогомомеризации, но обладал усиленной способностью к гетеродимеризации с комплементарным сконструированным другим СНЗ-доменом (в результате чего происходит гетеродимеризация первого и второго СНЗ-доменов и не образуются

10 гомодимеры между двумя первыми или двумя вторыми СНЗ-доменами).

Указанные различные подходы повышения гетеродимеризации тяжелых цепей рассматриваются в качестве различных альтернатив в комбинации с модификациями тяжелых-легких цепей (обмен/замена VH и VL в одном связывающем плече и интродукция замен заряженных аминокислот на

15 аминокислоты с противоположными зарядами в поверхность раздела CH1/CL) в мультиспецифических антителах, предлагаемых в изобретении, которые снижают ошибочное спаривание легких цепей и содержание побочных продуктов, образовавшихся в результате взаимодействия бенс-джонсовского типа.

20 В одном из вариантов осуществления изобретения (в случае мультиспецифического антитела, которое содержит СНЗ-домены в тяжелых цепях) СНЗ-домены указанного мультиспецифического антитела, предлагаемого в изобретении, изменяют для поддержания гетеродимеризации путем

- замены по меньшей мере одной аминокислоты СНЗ-домена первой

25 тяжелой цепи и

- замены по меньшей мере одной аминокислоты СНЗ-домена второй тяжелой цепи, где указанная аминокислота контактирует по меньшей мере с одной аминокислотой СНЗ-домена первой тяжелой цепи в третичной структуре мультиспецифического антитела,

30 при этом соответствующие аминокислоты в СНЗ-доменах первой и второй тяжелой цепи соответственно либо

- заменяют таким образом, что аминокислоты с противоположными зарядами боковых цепей интродуцируют в противоположные тяжелые цепи, либо

5 - заменяют таким образом, что аминокислоты с большими или малыми объемами боковых цепей интродуцируют в противоположные тяжелые цепи, создавая тем самым выпуклость с помощью аминокислоты с большим объемом боковой цепи в одном СНЗ-домене, которая может помещаться в полость, образованную в другом СНЗ-домене, при этом полость создают с помощью аминокислоты с малым объемом боковой цепи.

10 В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения (в случае мультиспецифического антитела, содержащего СНЗ-домены в тяжелых цепях) СНЗ-домены указанного мультиспецифического антитела, предлагаемого в изобретении, изменяют с помощью технологии «knob-into-hole», которая
15 подробно описана на некоторых примерах, например, в WO 96/027011, у Ridgway J.V. и др., Protein Eng 9, 1996, сс. 617–621; и у Merchant A.M. и др., Nat Biotechnol 16, 1998, сс. 677–681, и в WO 98/050431. При использовании этого метода взаимодействующие поверхности двух СНЗ-доменов изменяют с целью
20 повышения уровня гетеродимеризации обеих тяжелых цепей, содержащих эти два СНЗ-домена. Каждый из двух СНЗ-доменов (двух тяжелых цепей) может представлять собой «выступ», а другой представлять собой «впадину». Введение дисульфидного мостика дополнительно стабилизирует гетеродимеры (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 повышает выход продукта.

25 Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения указанное мультиспецифическое антитело (которое содержит СНЗ-домен в каждой тяжелой цепи) дополнительно отличается тем, что

первый СНЗ-домен первой тяжелой цепи антитела, указанной в подпункте а), и второй СНЗ-домен в одной тяжелой цепи антитела, указанной в подпункте б), каждый соприкасается друг с другом на поверхности раздела, которая
30 представляет собой исходную поверхность раздела между СНЗ-доменами антитела,

при этом указанная поверхность раздела изменена для стимулирования формирования мультиспецифического антитела, где изменение отличается тем, что:

I) СНЗ-домен одной тяжелой цепи изменен

5 так, что на исходной поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи в мультиспецифическом антителе,

аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет бóльшую по объему боковую цепь, с образованием в результате этого выпуклости на поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая может помещаться в полость в поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи,

и

II) СНЗ-домен другой тяжелой цепи изменен

15 так, что на исходной поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи в мультиспецифическом антителе,

аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, с образованием в результате этого полости в поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи, в которую может помещаться выпуклость на поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи.

В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотный остаток, который имеет бóльшую по объему боковую цепь, выбирают из группы, включающей аргинин (R), фенилаланин (F), тирозин (Y) и триптофан (W).

В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, выбирают из группы, включающей аланин (A), серин (S), треонин (T) и валин (V).

Согласно одному из объектов изобретения оба СНЗ-домена дополнительно изменяют путем интродукции цистеина (C) в качестве аминокислоты в соответствующие положения каждого СНЗ-домена таким образом, чтобы мог образоваться дисульфидный мостик между обоими СНЗ-доменами. Таким образом, согласно указанному объекту изобретения СНЗ-домен одной тяжелой

цепи дополнительно изменяют так, чтобы в исходной поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи в мультиспецифическом антителе, аминокислотный остаток был заменен на остаток цистеина (С), а СНЗ-домен другой тяжелой цепи дополнительно изменяют так, чтобы в исходной поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи в мультиспецифическом антителе, аминокислотный остаток был заменен на остаток цистеина (С) таким образом, чтобы в результате интродукции остатков цистеина мог образоваться дисульфидный мостик между обоими СНЗ-доменами.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения указанное мультиспецифическое антитело содержит аминокислотную мутацию Т366W в СНЗ-домеи «выступ» цепи и аминокислотные мутации Т366S, L368A, Y407V в СНЗ-домеи «впадину» цепи. Можно применять также дополнительный связывающий цепи дисульфидный мостик между СНЗ-домеи (Merchant A.M. и др., Nature Biotech. 16, 1998, сс. 677-681), например, путем интродукции аминокислотной мутации Y349C в СНЗ-домеи «впадину» цепи и аминокислотной мутации E356C или аминокислотной мутации S354C в СНЗ-домеи «выступы» цепи.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения указанное мультиспецифическое антитело (которое содержит СНЗ-домеи в каждой тяжелой цепи) содержит аминокислотные мутации S354C и Т366W в одном СНЗ-домеи и аминокислотные мутации Y349C, Т366S, L368A и Y407V в другом из двух СНЗ-домеи (с дополнительной аминокислотной мутацией S354C в одном СНЗ-домеи и дополнительной аминокислотной мутацией Y349C в другом СНЗ-домеи, что приводит к образованию дисульфидного мостика между цепями) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Другие методики СНЗ-модификаций, предназначенные для усиления гетеродимеризации, рассматриваются в качестве альтернативных вариантов осуществления изобретения, и они описаны, например, в WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 и WO 2013/096291.

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в EP 1870459A1. Этот подход базируется на интродукции замен/мутаций заряженных аминокислот на аминокислоты с противоположным зарядом в конкретные аминокислотные положения в поверхности раздела СНЗ/СНЗ-доменов между двумя тяжелыми цепями. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения в указанных мультиспецифических антителах присутствуют аминокислотные мутации R409D и K370E в СНЗ-доме одной тяжелой цепи и аминокислотные мутации D399K и E357K в СНЗ-доме другой тяжелой цепи (нумерации согласно EU-индексу Кэботу).

В другом варианте осуществления изобретения указанное мультиспецифическое антитело содержит аминокислотную мутацию T366W в СНЗ-доме «цепи с выступами» и аминокислотные мутации T366S, L368A, Y407V в СНЗ-доме «цепи с впадиной» и дополнительно аминокислотные мутации R409D и K370E в СНЗ-доме «цепи с выступами» и аминокислотные мутации D399K и E357K в СНЗ-доме «цепи с впадиной».

В другом варианте осуществления изобретения указанное мультиспецифическое антитело содержит аминокислотные мутации S354C и T366W в СНЗ-доме одной тяжелой цепи и аминокислотные мутации Y349C, T366S, L368A и Y407V в СНЗ-доме другой тяжелой цепи; или указанное мультиспецифическое антитело содержит аминокислотные мутации Y349C и T366W в СНЗ-доме одной тяжелой цепи и аминокислотные мутации S354C, T366S, L368A и Y407V в СНЗ-доме другой тяжелой цепи и дополнительно содержит аминокислотные мутации R409D и K370E в СНЗ-доме цепи с «выступами» и аминокислотные мутации D399K и E357K в СНЗ-доме цепи с «впадиной».

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2013/157953. В одном из вариантов осуществления изобретения СНЗ-домен одной тяжелой цепи содержит аминокислотную мутацию T366K, а СНЗ-домен другой тяжелой цепи содержит аминокислотную мутацию L351D. В следующем варианте осуществления изобретения СНЗ-домен одной тяжелой цепи содержит дополнительную аминокислотную мутацию L351K. В другом варианте

осуществления изобретения СНЗ-домен второй тяжелой цепи содержит дополнительную аминокислотную мутацию, выбранную из Y349E, Y349D и L368E (в одном из вариантов осуществления изобретения L368E).

5 В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2012/058768. В одном из вариантов осуществления изобретения СНЗ-домен одной тяжелой цепи содержит аминокислотные мутации L351Y и Y407A, а СНЗ-домен другой тяжелой цепи содержит аминокислотные мутации T366A и K409F. В следующем варианте осуществления изобретения СНЗ-домен другой тяжелой

10 цепи содержит дополнительную аминокислотную мутацию в положении T411, D399, S400, F405, N390 или K392. В одном из вариантов осуществления изобретения указанную аминокислотную мутацию выбирают из группы, состоящей из

- а) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E и T411W,
- 15 б) D399R, D399W, D399Y и D399K,
- в) S400E, S400D, S400R и S400K,
- г) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V и F405W,
- д) N390R, N390K и N390D,
- е) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F и K392E.

20 В следующем варианте осуществления изобретения СНЗ-домен одной тяжелой цепи содержит аминокислотные мутации L351Y и Y407A, а СНЗ-домен другой тяжелой цепи содержит аминокислотные мутации T366V и K409F. В дополнительном варианте осуществления изобретения СНЗ-домен одной тяжелой цепи содержит аминокислотную мутацию Y407A, а СНЗ-домен другой

25 тяжелой цепи содержит аминокислотные мутации T366A и K409F. В дополнительном варианте осуществления изобретения СНЗ-домен другой тяжелой цепи содержит дополнительно аминокислотные мутации K392E, T411E, D399R и S400R.

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы

30 можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2011/143545. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотную модификацию, описанную в WO 2011/143545, интродуцируют в СНЗ-домен тяжелой цепи в положение, выбранное из группы, состоящей из 368 и 409.

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы можно использовать также подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2011/090762, в котором применяют описанную выше технологию «knob-into-hole». В одном из вариантов осуществления изобретения СНЗ-домен одной тяжелой цепи содержит аминокислотную мутацию T366W, а СНЗ-домен другой тяжелой цепи содержит аминокислотную мутацию Y407A. В одном из вариантов осуществления изобретения СНЗ-домен одной тяжелой цепи содержит аминокислотную мутацию T366Y, а СНЗ-домен другой тяжелой цепи содержит аминокислотную мутацию Y407T.

10 В одном из вариантов осуществления изобретения мультиспецифическое антитело имеет IgG2-изотип и в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2010/129304.

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2009/089004. В одном из вариантов осуществления изобретения СНЗ-домен одной тяжелой цепи содержит аминокислотную замену K392 или N392 на отрицательно заряженную аминокислоту (в одном из вариантов осуществления изобретения глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), в дополнительном варианте осуществления изобретения мутацию K392D или N392D), а СНЗ-домен другой тяжелой цепи содержит аминокислотную замену D399, E356, D356 или E357 на положительно заряженную аминокислоту (в одном из вариантов осуществления изобретения например, лизин (K) или аргинин (R), в дополнительном варианте осуществления изобретения замену D399K, E356K, D356K или E357K, и в следующем варианте осуществления изобретения мутацию D399K или E356K). В другом варианте осуществления изобретения СНЗ-домен одной тяжелой цепи содержит также аминокислотную замену K409 или R409 на отрицательно заряженную аминокислоту (в одном из вариантов осуществления изобретения глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), в дополнительном варианте осуществления изобретения мутацию K409D или R409D). В следующем варианте осуществления изобретения СНЗ-домен одной тяжелой цепи в дополнительном или альтернативном варианте содержит аминокислотную замену K439 и/или K370 на отрицательно заряженную аминокислоту (в одном из вариантов

осуществления изобретения глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D)).

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2007/147901. В одном из вариантов осуществления изобретения СНЗ-домен одной тяжелой цепи содержит аминокислотные мутации K253E, D282K и K322D, а СНЗ-домен другой тяжелой цепи содержит аминокислотные мутации D239K, E240K и K292D.

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2007/110205.

В контексте настоящего описания понятия «сайт связывания» или «антигенсвязывающий центр» обозначают область(и) молекулы антитела, с которой(ыми) фактически связывается лиганд (например, антиген или фрагмент антигена) и который происходит из антитела. Антигенсвязывающий центр включает переменные домены тяжелой цепи антитела (VH) и/или переменный домен легкой цепи антитела (VL) или пары VH/VL.

Антигенсвязывающие центры, обладающие способностью специфически связываться с требуемым антигеном, можно получать из а) известных антител к антигену или б) новых антител или фрагментов антител, полученных *de novo* с помощью методов иммунизации с использованием, среди прочего, либо антигенного белка, либо нуклеиновой кислоты или их фрагментов, или с помощью метода фагового дисплея.

Антигенсвязывающий центр антитела, предлагаемого в изобретении, может содержать шесть гиперпеременных участков (CDR), которые вносят различный вклад в аффинность сайта связывания с антигеном. Они представляют собой три переменных домена (CDR-участки) тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2 и CDRH3) и три переменных домена (CDR-участки) легкой цепи (CDRL1, CDRL2 и CDRL3). Размер CDR и каркасных участков (FR) определяют путем сравнения с компилированной базой данных аминокислотных последовательностей, в которых такие участки были определены на основе изменчивости последовательностей. Под объем изобретения подпадают также функциональные антигенсвязывающие центры, включающие меньшее количество CDR (т.е. когда

специфичность связывания определяется тремя, четырьмя или пятью CDR). Например, для связывания может быть достаточно меньшего количества CDR, чем полный набор из 6 CDR. В некоторых случаях может быть достаточно VH- или VL-домена.

5 Специфичность антитела характеризует избирательное распознавание антителом конкретного эпитопа антигена. Например, встречающиеся в естественных условиях антитела являются моноспецифическими. В контексте настоящего описания понятие «моноспецифическое» антитело обозначает антитело, которое имеет один или несколько сайтов связывания, каждый из
10 которых связывается с одним и тем же эпитопом одного и того же антигена.

 Мультиспецифические антитела представляют собой биспецифические, три- или тетраспецифические антитела. Биспецифические антитела представляют собой антитела, которые имеют две различные антигенсвязывающие специфичности. Соответственно триспецифические
15 антитела представляют собой антитела, которые имеют три различные антигенсвязывающие специфичности. Тетраспецифические антитела представляют собой антитела, которые имеют четыре различные антигенсвязывающие специфичности. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения мультиспецифическое антитело представляет собой
20 биспецифическое антитело.

 Если антитело имеет более одной специфичности, то распознаваемые эпитопы могут быть ассоциированы с одним антигеном или с несколькими антигенами.

 В контексте настоящего описания понятие «валентность» означает наличие
25 определенного количества сайтов связывания в молекуле антитела. Например, встречающееся в естественных условиях антитело имеет два сайта связывания и является двухвалентным. Соответственно понятие «трехвалентный» означает наличие трех сайтов связывания в молекуле антитела.

 В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения
30 антитела, предлагаемые в изобретении, содержат константные области иммуноглобулина из одного или нескольких классов иммуноглобулинов. Классы иммуноглобулинов включают изотипы IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, а в случае IgG и IgA, также их подтипы. В одном из предпочтительных вариантов осуществления

изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, имеет структуру константного домена, которая соответствует структуре антитела IgG-типа.

В контексте настоящего описания понятия «моноклональное антитело» или «композиция моноклонального антитела» относятся к препарату молекул антитела одинакового аминокислотного состава.

Понятие «химерное антитело» относится к антителу, содержащему переменную область, т.е. связывающую область, полученную из одного и того же источника или вида, и по меньшей мере часть константной области, полученную из другого источника или вида, и его, как правило, получают с использованием методов рекомбинантной ДНК. Предпочтительными являются химерные антитела, которые содержат мышиную переменную область и человеческую константную область. Другими предпочтительными формами «химерных антител», подпадающих под объем настоящего изобретения, являются антитела, константная область которых модифицирована или изменена по сравнению с исходным антителом с целью получения свойств, предлагаемых в изобретении, прежде всего касательно связывания C1q и/или связывания Fc-рецептора (FcR). Такие химерные антитела обозначают также как «антитела переключенного класса». Химерные антитела являются продуктом экспрессии генов иммуноглобулинов, содержащих сегменты ДНК, которые кодируют переменные области иммуноглобулинов, и сегменты ДНК, которые кодируют константные области иммуноглобулинов. Методы получения химерных антител включают обычные методы рекомбинантной ДНК и генной трансфекции, которые хорошо известны в данной области (см., например, Morrison S.L. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, сс. 6851-6855; US 5202238 и US 5204244).

Понятие «гуманизованное антитело» относится к антителам, в которых каркасные или «гипервариабельные участки» (CDR) модифицированы так, что они содержат CDR иммуноглобулина другой специфичности по сравнению со специфичностью родительского иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления изобретения для получения «гуманизованного антитела» мышиный CDR трансплантируют в каркасный участок человеческого 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). Другими формами «гуманизованных антител», подпадающих под объем настоящего изобретения,

являются антитела, константная область которых дополнительно модифицирована или изменена по сравнению с исходным антителом с целью получения свойств, предлагаемых в изобретении, прежде всего касательно связывания C1q и/или связывания Fc-рецептора (FcR).

5 Понятие «человеческое антитело» в контексте настоящего описания относится к антителам, переменные и константные области которых получены из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие антитела хорошо известны в данной области (van Dijk M.A. и van de Winkel J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 2001, сс. 368-374). Человеческие
10 антитела можно получать также в трансгенных животных (например, мышах), которые в результате иммунизации могут продуцировать полный спектр или определенную часть человеческих антител при отсутствии производства эндогенного иммуноглобулина. Перенос набора генов иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии в такую мутантную мышиную зародышевую
15 линию должен приводить к производству человеческих антител после антигенной стимуляции (см., например, Jakobovits A., и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, сс. 2551-2555; Jakobovits A. и др., *Nature* 362, 1993, сс. 255-258; Bruggemann M. и др., *Year Immunol.* 7, 1993, сс. 33-40). Человеческие антитела можно получать также с помощью фаговых дисплейных библиотек (Hoogenboom
20 H.R. и Winter G., *J. Mol. Biol.* 227, 1992, сс. 381-388; Marks J.D. и др., *J. Mol. Biol.* 222, 1991, сс. 581-597). Для получения человеческих моноклональных антител можно использовать также методы, разработанные Cole с соавторами и Voerner с соавторами (Cole и др., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, под ред. Alan R. Liss, 1985, с. 77; и Voerner P. и др., *J. Immunol.* 147, 1991, сс. 86-95).
25 Как уже было отмечено для химерных и гуманизированных антител, предлагаемых в изобретении, понятие «человеческое антитело» включает также такие антитела, константная область которых модифицирована с целью получения свойств, предлагаемых в изобретении, прежде всего касательно связывания C1q и/или связывания FcR, например, путем «переключения класса»,
30 т.е. замены или мутации Fc-областей (например, IgG1 на IgG4 и/или IgG1/IgG4-мутация).

Понятие «рекомбинантное человеческое антитело» в контексте настоящего описания относится ко всем человеческим антителам, которые получают,

экспрессируют, создают или выделяют с помощью методов рекомбинации, например, к антителам, выделенным из клетки-хозяина, такой как NS0- или СНО-клетка, или из животного (например, мыши), которое является трансгенным из-за присутствия человеческих генов иммуноглобулинов или антител, экспрессируемых с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, которым трансфектирована клетка-хозяин. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменную и константную области, которые находятся в преобразованной форме. Рекомбинантные человеческие антитела, предлагаемые в изобретении, подвергаются соматической гипермутации *in vivo*. Таким образом, аминокислотные последовательности VH- и VL-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и выведены из последовательностей VH и VL человеческой зародышевой линии и родственных им линий, могут не существовать в естественных условиях в спектре зародышевой линии человеческих антител *in vivo*.

Понятие «переменный домен» (переменный домен легкой цепи (VL), переменный домен тяжелой цепи (VH)) в контексте настоящего описания относится к областям каждой из пары легких и тяжелых цепей, которые участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном. Домены переменных человеческих легких и тяжелых цепей имеют одинаковую общую структуру, и каждый домен содержит четыре каркасных участка (FR), последовательности которых являются весьма консервативными, связанных тремя «гиперпеременными участками» (или определяющими комплементарность участками, CDR). Каркасные участки адаптированы к β -складчатой конформации, а CDR могут образовывать петли, соединяющие β -складчатую структуру. CDR в каждой цепи сохраняют их трехмерную структуру с помощью каркасных участков и образуют вместе с CDR из других цепей антигенсвязывающий центр. CDR3-участки тяжелых и легких цепей антитела играют особенно важную роль в специфичности связывания/аффинности антител, предлагаемых в изобретении, и поэтому являются дополнительным объектом изобретения.

Понятия «гиперпеременный участок» или «антигенсвязывающий центр антитела» в контексте настоящего описания относятся к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывания антигена.

Гипервариабельный участок содержит аминокислотные остатки из «определяющих комплементарность участков» или «CDR». «Каркасные» или «FR»-участки представляют собой участки вариабельной области, отличные от указанных в настоящем описании остатков гипервариабельного участка. Таким образом, легкие и тяжелые цепи антитела содержат в направлении от N- к C-концу участки FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR каждой цепи разделены аминокислотами указанного каркасного участка. В частности, CDR3 тяжелой цепи представляют собой участок, который вносит наибольший вклад в связывание с антигеном. CDR- и FR-участки определяют с помощью стандартной номенклатуры Кэбота (Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

В контексте настоящего описания понятия «связывание», «который специфически связывается с» или «специфическое связывание» относятся к связыванию антитела с эпитопом антигена, что определяют путем анализа *in vitro*, предпочтительно с помощью анализа резонанса поверхностного плазмона (BIAcore®, фирма GE-Healthcare, Уппсала, Швеция) с использованием очищенного антигена дикого типа. Аффинность связывания характеризуют с помощью понятий k_a (константа скорости ассоциации антитела при формировании комплекса антитело/антиген), k_D (константа диссоциации) и K_D (k_D/k_a). Наличие «связывания» или «специфического связывания с» означает, что аффинность связывания (K_D) составляет 10^{-8} моля/л или менее, в одном из вариантов осуществления изобретения от 10^{-8} М до 10^{-13} моля/л. Так, мультиспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, специфически связывается с каждым антигеном, в отношении которого оно обладает специфичностью, что характеризуется аффинностью связывания (K_D), составляющей 10^{-8} моля/л или менее, в одном из вариантов осуществления изобретения характеризуется аффинностью связывания (K_D), составляющей от 10^{-8} до 10^{-13} моля/л. В одном из вариантов осуществления изобретения мультиспецифическое антитело специфически связывается с его антигеном, что характеризуется аффинностью связывания (K_D), составляющей от 10^{-9} до 10^{-13} моля/л.

Связывание антитела с FcγRIII можно оценивать с помощью ВІАсоге®-анализа (фирма GE-Healthcare, Уппсала, Швеция). Аффинность связывания определяют с помощью понятий k_a (константа скорости ассоциации антитела при формировании комплекса антитело/антиген), k_D (константа диссоциации) и K_D (k_D/k_a).

Понятие «эпитоп» включает любую полипептидную детерминанту, обладающую способностью специфически связываться с антителом. В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитопная детерминанта включает химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорил или сульфонил, и в некоторых вариантах осуществления изобретения они могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические характеристики заряда. Эпитоп представляет собой область антигена, с которой связывается антитело.

В некоторых вариантах осуществления изобретения считается, что антитело специфически связывается с антигеном, когда оно преимущественно распознает свой антиген-мишень в сложной смеси белков и/или макромолекул.

В другом варианте осуществления изобретения мультиспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, отличается тем, что указанное антитело относится к подклассу человеческого IgG1 или подклассу человеческого IgG1 с мутациями L234A и L235A (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В другом варианте осуществления изобретения мультиспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, отличается тем, что указанное антитело относится к подклассу человеческого IgG2.

В другом варианте осуществления изобретения мультиспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, отличается тем, что указанное антитело относится к подклассу человеческого IgG3.

В другом варианте осуществления изобретения мультиспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, отличается тем, что указанное антитело относится к подклассу человеческого IgG4 или подклассу человеческого IgG4 с дополнительной мутацией S228P (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В другом варианте осуществления изобретения мультиспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, отличается тем, что оно относится к подклассу человеческого IgG1 или человеческому подклассу IgG4 subclass.

5 В другом варианте осуществления изобретения мультиспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, отличается тем, что оно относится к подклассу человеческого IgG1 с мутациями L234A и L235A (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

10 В другом варианте осуществления изобретения мультиспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, отличается тем, что оно относится к подклассу человеческого IgG1 с мутациями L234A, L235A и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

15 В другом варианте осуществления изобретения мультиспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, отличается тем, что оно относится к подклассу человеческого IgG4 с мутациями S228P и L235E (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В другом варианте осуществления изобретения мультиспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, отличается тем, что оно относится к подклассу человеческого IgG4 с мутациями S228P, L235E и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

20 При создании настоящего изобретения было установлено, что мультиспецифические антитела, предлагаемые в изобретении, обладают улучшенными характеристиками, такими как биологическая или фармакологическая активность, фармакокинетические свойства или токсичность. Их можно применять, например, для лечения заболеваний, таких как рак.

25 В контексте настоящего описания понятие «константная область» обозначает совокупность доменов антитела, отличных от переменной области. Константная область не принимает непосредственного участия в связывании с антигеном, но она обладает различными эффекторными функциями. Антитела подразделяют в зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей на классы: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а 30 некоторые из них можно дополнительно подразделять на подклассы, такие как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, IgA1 и IgA2. Константные области тяжелой цепи,

соответствующие различным классам антител, обозначают символами α , β , ϵ , γ и μ соответственно. Константные области легкой цепи (CL), которые могут присутствовать во всех пяти классах антител, обозначают символами κ (каппа) и λ (лямбда). В контексте настоящего описания понятие «константная область»,
5 полученная из человеческого источника обозначает константную область тяжелой цепи человеческого антитела подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 и/или константную область легкой каппа- или лямбда-цепи. Такие константные области хорошо известны в данной области, и они описаны, например, у Kabat Kabat и др., , Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во,
10 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

В контексте настоящего описания аминокислотные положения всех константных областей и доменов тяжелой и легкой цепи нумеруют согласно системе нумерации по Кэботу, описанной у Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National
15 Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, и обозначают в контексте настоящего описания как «нумерация согласно Кэботу». В частности систему нумерации по Кэботу (см. сс. 647-660), которая описана у Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, применяют для константного домена легкой цепи
20 CL каппа- и лямбда-изотипа и систему нумерации на основе EU-индекса Кэбота (см. сс. 661-723) применяют для константных доменов тяжелой цепи (CH1, шарнир, CH2 и CH3, которую в контексте настоящего описания для большей ясности обозначают в этом случае как «нумерация согласно EU-индексу Кэбота»).

25 В то время как антитела подкласса IgG4 обладают небольшой способностью к связыванию с Fc-рецептором (Fc γ RIIIa), антитела других подклассов IgG характеризуются выраженной способностью к связыванию. Однако изменение таких остатков, как Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (утрата углевода Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288,
30 Thr307, Gln311, Asn434 и His435 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота), также приводит к снижению способности к связыванию с Fc-рецептором (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 изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, обладает более низкой способностью к связыванию с FcR по сравнению с антителом подкласса IgG1. Таким образом, родительское антитело с точки зрения связывания с FcR относится к подклассу IgG4 или подклассу IgG1 или IgG2, имеющему мутацию в S228, L234, L235 и/или D265, и/или содержащему мутацию PVA236 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В одном из вариантов осуществления изобретения мутации в родительском антителе представляют собой S228P, L234A, L235A, L235E и/или PVA236 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В другом варианте осуществления изобретения мутации в родительском антителе представляют собой S228P в случае IgG4 и L234A и L235A в случае IgG1 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Константная область антитела принимает непосредственное участие в ADCC (антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность) и CDC (комплементзависимая цитотоксичность). Активация комплемента (CDC) инициируется в результате связывания фактора C1q системы комплемента с константной областью антител большинства из подклассов IgG. Связывание C1q с антителом происходит в результате определенных белок-белковых взаимодействий в так называемом сайте связывания. Такие сайты связывания константных областей известны в данной области, и они описаны, например, у Lukas T.J. и др., J. Immunol. 127, 1981, сс. 2555-2560; Bunkhouse R. и Cobra J.J., Mol. Immunol. 16, 1979, сс. 907-917; Burton D.R. и др., Nature 288, 1980, сс. 338-344; Thomason J.E. и др., Mol. Immunol. 37, 2000, сс. 995-1004; Idiocies E.E. и др., J. Immunol. 164, 2000, сс. 4178-4184; Hearer M. и др., J. Virol. 75, 2001, сс. 12161-12168; Morgan A. и др., Immunology 86, 1995, сс. 319-324; и в EP 0307434. Такими сайтами связывания константной области являются, например, сайты, в которых присутствуют аминокислоты L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Понятие «антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC)» относится к лизису человеческих клеток-мишеней, опосредованному антигенсвязывающим белком, предлагаемым в изобретении, в присутствии эффекторных клеток. Уровень ADCC оценивают предпочтительно путем обработки препарата экспрессирующих антиген клеток антигенсвязывающим

белком, предлагаемым в изобретении, в присутствии эффекторных клеток, таких как свежeweделенные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) или очищенные эффекторные клетки из лейкоцитарных пленок, типа моноцитов или естественных клеток-киллеров (NK) или постоянно выращиваемой линии NK-клеток.

Понятие «комплементзависимая цитотоксичность (CDC)» обозначает процесс, инициируемый связыванием фактора C1q системы комплемента с Fc-фрагментом большинства подклассов антител IgG-изотипа. Связывание C1q с антителом происходит в результате определенных белок-белковых взаимодействий в так называемом сайте связывания. Такие сайты связывания Fc-фрагмента известны в данной области (см. выше). Такие сайты связывания Fc-фрагмента представляют собой сайты, в которых присутствуют аминокислоты L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация EU-индексу Кэбота). Антитела подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, как правило, обладают способностью к активации комплемента, включая связывание с C1q и C3, в то время как IgG4 не активирует систему комплемента и не связывается с C1q и/или C3.

Клеточно-опосредованные эффекторные функции моноклональных антител можно усиливать путем конструирования его олигосахаридного компонента, как это описано у Umana P. и др., *Nature Biotechnol.* 17, 1999, сс. 176-180 и в US 6602684. Антитела IgG1-типа, которые являются наиболее широко применяемыми терапевтическими антителами, представляют собой гликопротеины, которые имеют консервативный N-сцепленный сайт гликозилирования на Asn297 в каждом из доменов CH2. Два сложных биантенных олигосахарида, присоединенные к Asn297, расположены между CH2-доменами, формируя протяженные области контакта с полипептидным каркасом, и их присутствие является важным для опосредуемых антителом эффекторных функций, таких как антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC) (Lifely M. R. и др., *Glycobiology* 5, 1995, сс. 813-822; Jefferis R. и др., *Immunol. Rev.* 163, 1998, сс. 59-76; Wright A. и Morrison S.L., *Trends Biotechnol.* 15, 1997, сс. 26-32). В статье Umana P. и др., *Nature Biotechnol.* 17, 1999, сс. 176-180 и в WO 99/54342 продемонстрировано, что сверхэкспрессия в клетках яичника китайского хомячка (CHO) $\beta(1,4)$ -N-

ацетилглюкозаминилтрансферазы III («GnTIII»), которая представляет собой гликозилтрансферазу, катализирующую образование разветвленных олигосахаридов, существенно повышает ADCC-активность антител *in vitro*.

Изменения состава присоединенного к Asn297 углевода или его элиминация оказывает влияние также на связывание с FcγR и C1q (Umana P. и др., Nature Biotechnol. 17, 1999, сс. 176-180; Davies J. и др., Biotechnol. Bioeng. 74, 2001, сс. 288-294; Mimura Y. и др., J. Biol. Chem. 276, 2001, сс. 45539-45547; Radaev S. и др., J. Biol. Chem. 276, 2001, сс. 16478-16483; Shields R.L. и др., J. Biol. Chem. 276, 2001, сс. 6591-6604; Shields R.L. и др., J. Biol. Chem. 277, 2002, сс. 26733-26740; Simmons L.C. и др., J. Immunol. Methods 263, 2002, сс. 133-147).

Методы усиления клеточно-опосредуемых эффекторных функций моноклональных антител описаны, например, в WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO 2004/065540, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 1997/028267, US 2006/0134709, US 2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/035835, WO 2000/061739.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения мультиспецифическое антитело является гликозилированным (если оно содержит Fc-фрагмент антитела подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, предпочтительно подкласса IgG1 или IgG3) с сахарной цепью на Asn297, при этом количество фукозных остатков в указанной сахарной цепи составляет 65% или менее (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В другом варианте осуществления изобретения количество фукозных остатков в указанной сахарной цепи составляет от 5 до 65%, предпочтительно от 20 до 40%. В контексте настоящего описания «Asn297» обозначает аминокислоту аспарагин, присутствующую примерно в положении 297 в Fc-фрагменте. Вследствие минорных вариаций последовательности антител Asn297 может располагаться также на несколько аминокислот (как правило, не более чем на ± 3 аминокислоты) дальше или ближе в направлении к С-концу по отношению к положению 297, т.е. между положениями 294 и 300. В одном из вариантов осуществления изобретения предлагаемое в изобретении гликозилированное антитело подкласса IgG представляет собой человеческое антитело подкласса IgG1, человеческое антитело подкласса IgG1, имеющее мутации L234A и L235A, или антитело подкласса IgG3. В другом варианте осуществления изобретения

количество в указанной сахарной цепи остатков N-гликолилнейраминовой кислоты (NGNA) составляет 1% или менее и/или количество остатков N-концевой альфа-1,3-галактозы составляет 1% или менее. Предпочтительно сахарная цепь обладает характеристиками N-сцепленных гликанов, присоединенных к Asn297 антитела, которое рекомбинантно экспрессируется в CHO-клетке.

Выражение «сахарная цепь обладает характеристиками N-сцепленных гликанов, присоединенных к Asn297 антитела, которое рекомбинантно экспрессируется в CHO-клетке» означает, что сахарная цепь на Asn297 родительского антитела, предлагаемого в изобретении, имеет такую же структуру и последовательность сахарных остатков за исключением фукозного остатка, что и антитело, экспрессируемое в немодифицированных CHO-клетках, например, как описано в WO 2006/103100.

В контексте настоящего описания понятие «NGNA» обозначает сахарный остаток N-гликолилнейраминовой кислоты.

Гликозилирование человеческого IgG1 или IgG3 имеет место на Asn297 в виде гликозилирования, осуществляемого с помощью сложного биантенного олигосахаридов с коровым фукозилированием, на концах которого располагаются вплоть до 2 остатков Gal. Константные области человеческих тяжелых цепей подклассов IgG1 или IgG3 подробно описаны у Kabat E.A. и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 и у Brüggemann M. и др., *J. Exp. Med.* 166, 1987, сс. 1351-1361; Love T.W. и др., *Methods Enzymol.* 178, 1989, сс. 515-527. Эти структуры обозначают как гликановые остатки G0, G1 (α 1,6 или α 1,3) или G2 в зависимости от количества концевых остатков Gal (Raju T.S., *BioProcess Int.* 1, 2003, сс. 44-53). CHO-тип гликозилирования Fc-фрагментов антитела описан, например, у Routier F.H., *Glycoconjugate J.* 14, 1997, сс. 201-207. Антитела, которые рекомбинантно экспрессируются в CHO-клетках-хозяевах с немодифицированной схемой гликозилирования, как правило, являются фукозилированными на Asn297 по меньшей мере на 85%. Модифицированные олигосахариды в антителе могут быть гибридными или комплексными. Предпочтительно разветвленные восстановленные/нефукозилированные олигосахариды являются гибридными. В другом варианте осуществления

изобретения разветвленные восстановленные/нефукозилированные олигосахариды являются комплексными.

В контексте изобретения понятие «количество фукозы» означает количество указанного сахара в сахарной цепи на Asn297 по отношению к сумме
5 всех гликоструктур, присоединенных к Asn 297 (например, комплексных, гибридных структур и структур с высоким содержанием маннозы), которое измеряют с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии и рассчитывают в виде среднего значения. Относительное количество фукозы выражают в виде процента содержащих фукозу структур относительно всех гликоструктур,
10 идентифицированных с помощью MALDI-TOF в обработанном N-гликозидазой F образце (например, комплексных, гибридных структур, олиго-структур и структур с высоким содержанием маннозы соответственно).

Антитела, предлагаемые в изобретении, могут связываться с различными антигенами. В одном из вариантов осуществления изобретения ни первый
15 антиген, ни второй антиген не представляет собой активирующий T-клетку антиген. В одном из вариантов осуществления изобретения ни первый антиген, ни второй антиген не представляет собой CD3. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело не связывается специфически с активирующим T-клетку антигеном. В одном из вариантов осуществления
20 изобретения антитело не связывается специфически с CD3.

В одном из вариантов осуществления изобретения первый или второй антиген представляет собой человеческий TWEAK. В одном из вариантов осуществления изобретения первый или второй антиген представляет собой
25 человеческий IL17. В одном из вариантов осуществления изобретения первый антиген представляет собой человеческий TWEAK, а второй антиген представляет собой человеческий IL17. В одном из вариантов осуществления изобретения первый антиген представляет собой человеческий IL17, а второй антиген представляет собой человеческий TWEAK.

Человеческий TWEAK (UniProtKB O43508, TNF-подобный слабый
30 индуктор апоптоза) представляет собой ассоциированный с клеточной поверхностью трансмембранный белок типа II. TWEAK описан у Chicheportiche Y. и др., J. Biol. Chem. 272, 1997, сс. 32401-32410; Marsters S.A. и др., Curr. Biol. 8, 1998, сс. 525-528; Lynch C.N. и др., J. Biol. Chem. 274, 1999, сс. 8455-8459.

Активная форма TWEAK представляет собой растворимый гомотример.

Установлено, что последовательности связывающихся с рецептором доменов человеческого и мышиноного TWEAK идентичны на 93%. TWEAK-рецептор Fn14 (индуцируемый фактором роста фибробластов белок, 14 кДа) представляет собой состоящий из 129 аминокислот (ак) трансмембранный белок типа I, лигандсвязывающий домен которого состоит из одного индивидуального богатого цистеином домена. Передача сигналов TWEAK происходит посредством активации пути NF- κ B. мРНК TWEAK экспрессируется в различных тканях, и она обнаружена в большинстве основных органов типа сердца, головного мозга, скелетной мышцы и поджелудочной железы, в тканях, связанных с иммунной системой, типа селезенки, лимфатических узлов и тимуса. мРНК Fn14 обнаружена в сердце, головном мозге, легком, плаценте, эпителиальных клетках (ЭК) сосудов и гладкомышечных клетках. Мыши, у которых «выключен» TWEAK (TWEAK-нуль) и Fn14 (Fn14-нуль), являются жизнеспособными, здоровыми и фертильными, у них выше содержание естественных клеток-киллеров и для них характерен повышенный врожденный воспалительный ответ. TWEAK принимает участие в апоптозе, пролиферации, ангиогенезе, он присутствует в области «ишемической полутени», обнаружен при церебральном отеке, рассеянном склерозе.

Человеческий IL-17 (другое название IL-17A; CTLA-8, Swiss Prot Q16552, IL17) представляет собой провоспалительный цитокин, который продуцируется субпопуляцией Т-клеток-хелперов (которые обозначают как Th17), участвующий в патогенезе рассеянного склероза (РС). IL-17A играет роль в индукции других провоспалительных цитокинов, хемокинов и молекул адгезии. Обработка животных нейтрализующими IL-17A антителами снижала коэффициент заболеваемости и серьезность аутоиммунного энцефаломиелита (Komiyama Y. и др., J. Immunol. 177, 2006, сс. 566-573). Обнаружена сверхэкспрессия IL-17A в спинномозговой жидкости страдающих РС пациентов (Hellings P.W. и др., Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 28, 2003, сс. 42-50; Matusевич D. и др., Multiple Sclerosis 5, 1999, сс. 101-104; WO 2005/051422). Кроме того, нейтрализующие IL-17A антитела снижают серьезность и коэффициент заболеваемости ревматоидным артритом (РА) на мышинной модели индуцированного коллагеном артрита, а высокие уровни IL-17A можно обнаружить в синовиальной жидкости

воспаленных суставов у страдающих РА пациентов (Ziolkowska M и др., J. Immunol. 164, 2000, сс. 2832-2838; Kotake S. и др., J. Clin. Invest. 103, 1999, сс. 1345-1352; Hellings P.W. и др., Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 28, 2003, сс. 42-50).

Антитело, предлагаемое в изобретении, получают методами рекомбинации.

5 Таким образом, один из объектов настоящего изобретения относится к нуклеиновой кислоте, которая кодирует антитело, предлагаемое в изобретении, а другой объект относится к клетке, содержащей указанную нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело, предлагаемое в изобретении. Методы рекомбинантного получения хорошо известны в данной области, и они
10 включают осуществление экспрессии белка в прокариотических и эукариотических клетках и последующее выделение антитела и, как правило, очистку до достижения фармацевтически приемлемой степени чистоты. Для осуществления экспрессии указанных выше антител в клетке-хозяине нуклеиновые кислоты, кодирующие соответствующие модифицированные
15 легкие и тяжелые цепи, встраивают в экспрессионные векторы с помощью стандартных методов. Экспрессию осуществляют в соответствующих прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, таких как CHO-клетки, NS0-клетки, SP2/0-клетки, НЕК293-клетки, COS-клетки, PER.C6-клетки, клетки дрожжей или клетки *E. coli*, и антитело выделяют из клеток (из
20 супернатанта или клеток после лизиса). Общие методы рекомбинантного получения антител хорошо известны из существующего уровня техники, и они описаны, например, в обзорных статьях Makrides S.C., Protein Expr. Purif. 17, 1999, сс. 183-202; Geisse S. и др., Protein Expr. Purif. 8, 1996, сс. 271-282; Kaufman R.J., Mol. Biotechnol. 16, 2000, сс. 151-161; Werner R.G., Drug Res. 48,
25 1998, сс. 870-880.

Антитела, продуцируемые клетками-хозяевами, можно подвергать пост-трансляционному отщеплению одной или нескольких, прежде всего одной или двух аминокислот от С-конца тяжелой цепи. Таким образом, антитело, продуцируемое клеткой-хозяином путем экспрессии молекулы специфической
30 нуклеиновой кислоты, которая кодирует полноразмерную тяжелую цепь, может включать полноразмерную тяжелую цепь, или оно может включать расщепленный вариант полноразмерной тяжелой цепи (который обозначают также как расщепленный вариант тяжелой цепи). Это может иметь место в

случае, когда две последние С-концевые аминокислоты тяжелой цепи представляют собой глицин (G446) и лизин (K447, нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

5 Таким образом, в контексте настоящего изобретения подразумевается, что аминокислотные последовательности тяжелых цепей, включающих СНЗ-домены, не имеют С-концевого дипептида глицин-лизин, если не указано иное.

10 В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, которое содержит тяжелую цепь, включающую СНЗ-домен, указанный в настоящем описании, содержит дополнительный С-концевой дипептид глицин-лизин (G446 и K447, нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, которое содержит тяжелую цепь, включающую СНЗ-домен, указанный в настоящем описании, содержит дополнительный С-концевой остаток глицина (G446, нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

15 Композиции, предлагаемые в изобретении, такие как фармацевтические композиции, указанные в настоящем описании, содержат популяцию антител, предлагаемых в изобретении. Популяция антител может содержать антитела, имеющие полноразмерную тяжелую цепь, и антитела, имеющие расщепленный вариант тяжелой цепи. Популяция антител может состоять из смеси антител, 20 которые имеют полноразмерную тяжелую цепь, и антител, которые имеют расщепленный вариант тяжелой цепи, в которой по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% приходится на долю антител, имеющих расщепленный вариант тяжелой цепи.

25 В одном из вариантов осуществления изобретения композиция, которая содержит популяцию антител, предлагаемых в изобретении, содержит антитело, которое содержит тяжелую цепь, включающую СНЗ-домен, указанный в настоящем описании, с дополнительным С-концевым дипептидом глицин-лизин (G446 и K447, нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В одном из вариантов 30 осуществления изобретения композиция, которая содержит популяцию антител, предлагаемых в изобретении, содержит антитело, которое содержит тяжелую цепь, включающую СНЗ-домен, указанный в настоящем описании, с

дополнительным С-концевым остатком глицина (G446, нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция содержит популяцию антител, которая содержит антитела, содержащие тяжелую цепь, которая включает СНЗ-домен, указанный в настоящем описании; антитела, содержащие тяжелую цепь, которая включает СНЗ-домен, указанный в настоящем описании, с дополнительным С-концевым остатком глицина (G446, нумерация согласно EU-индексу Кэбота); и антитела, содержащие тяжелую цепь, которая включает СНЗ-домен, указанный в настоящем описании, с дополнительным С-концевым дипептидом глицин-лизин (G446 и K447, нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Мультиспецифические антитела, предлагаемые в изобретении, можно отделять от культуральной среды с помощью общепринятых методов очистки иммуноглобулинов, таких, например, как, хроматография на белок А-сефарозе, хроматография на гидроксилпатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография. ДНК и РНК, которые кодируют моноклональные антитела, можно легко выделять и секвенировать с помощью общепринятых методов. Клетки гибридом могут служить источником таких ДНК и РНК. После выделения ДНК можно встраивать в экспрессионные векторы, которыми затем трансфектируют клетки-хозяева, такие как НЕК293-клетки, СНО-клетки или клетки миеломы, которые в ином случае не могут продуцировать белок иммуноглобулина, для обеспечения синтеза рекомбинантных моноклональных антител в клетках-хозяевах.

Варианты (или мутанты) аминокислотной последовательности мультиспецифического антитела создают путем внесения соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК антитела или с помощью нуклеотидного синтеза. Однако такие модификации можно осуществлять лишь в очень ограниченном масштабе, например, как указано выше. Например, модификации не должны приводить к изменению указанных выше характеристик антитела, таких как изотип IgG и способность связываться с антигеном, но они могут повышать выход рекомбинантного продукта, стабильность белка или облегчать процесс очистки. Некоторыми вариантами осуществления изобретения являются

варианты антител, которые имеют одну или несколько консервативных аминокислотных замен.

Аминокислоты можно группировать на основе общих свойств боковых цепей следующим образом:

- 5 (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
 (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
 (3) кислотные: Asp, Glu;
 (4) основные: His, Lys, Arg;
 (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;
 10 (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Таблица 1 – Специфические свойства аминокислот

Аминокислота	3-буквенный код	1-буквенный код	Полярность боковой цепи	Заряд боковой цепи (pH 7,4)
аланин	Ala	A	неполярная	нейтральный
аргинин	Arg	R	основная полярная	положительный
аспарагин	Asn	N	полярная	нейтральный
аспарагиновая кислота	Asp	D	кислотная полярная	отрицательный
цистеин	Cys	C	неполярная	нейтральный
глутаминовая кислота	Glu	E	кислотная полярная	отрицательный
глутамин	Gln	Q	полярная	нейтральный
глицин	Gly	G	неполярная	нейтральный
гистидин	His	H	основная полярная	положительный (10%) нейтральный (90%)
изолейцин	Ile	I	неполярная	нейтральный
лейцин	Leu	L	неполярная	нейтральный
лизин	Lys	K	основная полярная	положительный
метионин	Met	M	неполярная	нейтральный
фенилаланин	Phe	F	неполярная	нейтральный
пролин	Pro	P	неполярная	нейтральный
серин	Ser	S	полярная	нейтральный
треонин	Thr	T	полярная	нейтральный
триптофан	Trp	W	неполярная	нейтральный
тирозин	Tyr	Y	полярная	нейтральный
валин	Val	V	неполярная	нейтральный

15 В контексте настоящего описания понятие «клетка-хозяин» относится к клеточной системе любого типа, которую можно сконструировать так, чтобы она продуцировала антитела, предлагаемые в настоящем изобретении. В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве клеток-хозяев применяют НЕК293-клетки и СНО-клетки. В контексте настоящего описания понятия «клетка», «клеточная линия» и «клеточная культура» используются

взаимозаменяемо, и все определения, в которые входят эти понятия, включают потомство. Так, выражения «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают, прежде всего первичные рассматриваемые клетки, а также культуры, происходящие из них, независимо от количества переносов. Следует также
5 иметь в виду, что все потомство может не быть строго идентичным касательно содержания ДНК вследствие случайных или неумышленных мутаций. Эти понятия включают варианты потомства, которые обладают такой же функцией или биологической активностью, что и отобранная путем скрининга исходная трансформированная клетка. Если употребляются другие обозначения, то они
10 должны быть ясны из контекста.

Экспрессия в NS0-клетках описана, например, у Barnes L.M. и др., *Cytotechnology* 32, 2000, сс. 109-123; Barnes L.M. и др., *Biotech. Bioeng.* 73, 2001, сс. 261-270. Кратковременная экспрессия описана, например, у Durocher Y. и др., *Nucl. Acids. Res.* 30, 2002, с. E9. Клонирование переменных доменов описано у
15 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; и Norderhaug L. и др., *J. Immunol. Methods* 204, 1997, сс. 77-87. Предпочтительная система для кратковременной экспрессии (HEK293) описана Schlaeger E.-J. и Christensen K. в *Cytotechnology* 30, 1999, сс. 71-83 и у Schlaeger E.-J., *J. Immunol. Methods* 194,
20 1996, сс. 191-199.

Контролирующие последовательности, которые можно применять для прокариотических организмов, представляют собой, например, промоторную последовательность, необязательно операторную последовательность и сайт связывания рибосом. Известно, что для эукариотических клеток применяют
25 промоторы, энхансеры и сигналы полиаденилирования.

Нуклеиновая кислота «функционально связана», когда она находится в функциональной связи с другой нуклеотидной последовательностью. Например, ДНК предпоследовательности или лидерной секреторной последовательности функционально связана с ДНК полипептида, если при ее экспрессии образуется
30 предбелок, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он оказывает воздействие на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он

расположен так, что облегчает трансляцию. Как правило, понятие «функционально связаны» означает, что последовательности ДНК, будучи связаны, являются смежными, а в случае лидерной секреторной последовательности являются смежными и находятся в рамке считывания.

5 Однако для энхансеров не является необходимым, чтобы они были смежными. Связывание осуществляют путем лигирования в соответствующих сайтах рестрикции. Если такие сайты не существуют, то в соответствии с принятой практикой применяют синтетические олигонуклеотидные адапторы или линкеры.

10 Очистку антител для удаления других клеточных компонентов или других примесей, например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков, осуществляют с помощью стандартных методов, включая обработку щелочью/ДСН, CsCl-бэндинг, хроматографию на колонках, электрофорез в агарозном геле и другие методы, хорошо известные в данной области (см. в
15 Current Protocols in Molecular Biology, под ред. Ausubel F. и др., изд-во Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987). Для очистки белков разработаны и нашли широкое распространение различные методы, такие как аффинная хроматография с использованием белков микроорганизмов (например, аффинная хроматография на белке А или белке G), ионообменная
20 хроматография (например, катионообменная (с использованием карбоксиметилловых смол), анионообменная (с использованием аминоэтиловых смол) хроматография и хроматография со смешанной формой разделения), тиофильная адсорбция (например, с использованием бета-меркаптоэтанола и других SH-лигандов), хроматография на основе гидрофобного взаимодействия или адсорбционная хроматография ароматических соединений (например, с
25 использованием фенил-сефарозы, аза-аренофильных смол или *мета*-аминофенилбороновой кислоты), металлхелатирующая аффинная хроматография (например, с использованием материала, обладающего аффинностью к Ni(II) и Cu(II)), гель-фильтрация и электрофоретические методы (такие как гель-
30 электрофорез, капиллярный электрофорез) (Vijayalakshmi M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75, 1998, сс. 93-102).

Одним из объектов изобретения является фармацевтическая композиция, которая содержит антитело, предлагаемое в изобретении. Другим объектом

изобретения является применение антитела, предлагаемого в изобретении, для приготовления фармацевтической композиции. Следующим объектом изобретения является способ приготовления фармацевтической композиции, которая содержит антитело, предлагаемое в изобретении. Еще одним объектом настоящего изобретения является композиция, например, фармацевтическая композиция, которая содержит антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, включенное в состав препаративной формы в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

Одним из вариантов осуществления изобретения является мультиспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, предназначенное для применения для лечения рака.

Другим вариантом осуществления изобретения является указанная фармацевтическая композиция, предназначенная для лечения рака.

Следующим объектом изобретения является применение антитела, предлагаемого в изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения рака.

Другим объектом изобретения является способ лечения пациента, страдающего раком, который заключается в том, что вводят антитело, предлагаемое в изобретении, пациенту, который нуждается в таком лечении.

Одним из вариантов осуществления изобретения является мультиспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, предназначенное для лечения воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, ревматоидного артрита, псориатического артрита, мышечных болезней, например, мышечной дистрофии, рассеянного склероза, хронических заболеваний почек, болезней костной ткани, например, дегенерации кости при множественной миеломе, системной красной волчанки, волчаночного нефрита и сосудистых повреждений.

Другим объектом изобретения является указанная фармацевтическая композиция, предназначенная для применения для лечения воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, ревматоидного артрита, псориатического артрита, мышечных болезней, например, мышечной дистрофии, рассеянного склероза, хронических заболеваний почек, болезней костной ткани,

например, дегенерации кости при множественной миеломе, системной красной волчанки, волчаночного нефрита и сосудистых повреждений.

Другим объектом изобретения является применение антитела, предлагаемого в изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, ревматоидного артрита, псориатического артрита, мышечных болезней, например, мышечной дистрофии, рассеянного склероза, хронических заболеваний почек, болезней костной ткани, например, дегенерации кости при множественной миеломе, системной красной волчанки, волчаночного нефрита и сосудистых повреждений.

Следующим объектом изобретения является способ лечения пациента, страдающего воспалительными заболеваниями, аутоиммунными заболеваниями, ревматоидным артритом, псориатическим артритом, мышечными болезнями, например, мышечной дистрофией, рассеянным склерозом, хроническими заболеваниями почек, болезнями костной ткани, например, дегенерацией кости при множественной миеломе, системной красной волчанкой, волчаночным нефритом и сосудистыми повреждениями, заключающийся в том, что вводят антитело, предлагаемое в изобретении, пациенту, который нуждается в таком лечении.

В контексте настоящего описания понятие «фармацевтический носитель» включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, придающие изотоничность и замедляющие абсорбцию агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель можно применять для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии).

Композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно вводить с помощью различных методов, известных в данной области. Как должно быть очевидно специалисту в данной области, путь и/или форму введения можно варьировать в зависимости от требуемых результатов. Для применения соединения, предлагаемого в изобретении, с помощью определенных путей введения может оказаться необходимым наносить на соединение покрытие из материала, препятствующего его инактивации, или осуществлять введение

соединения совместно с таким материалом. Например, соединение можно вводить индивидууму в соответствующем носителе, например, в липосомах или в разбавителе. К фармацевтически приемлемым разбавителям относятся физиологический раствор и водные забуферивающие растворы. К

5 фармацевтическим носителям относятся стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий непосредственно перед введением. Применение таких сред и агентов для обладающих фармацевтической активностью субстанций известно в данной области.

10 В контексте настоящего описания понятия «парентеральное введение» и «введение парентеральным путем» означают пути введения, отличные от энтерального введения и местного применения, как правило, они относятся к введению путем инъекции и включают (но не ограничиваясь только ими) внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, внутриболоочечную,
15 внутрикапсульную, внутриглазную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию.

В контексте настоящего описания понятие «рак» относится к
20 пролиферативным заболеваниям, таким как лимфомы, лимфолейкозы, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (NSCL), альвеолярно-клеточный рак легкого, рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожная или внутриглазная меланома, рак матки, рак яичника, ректальный рак, рак анальной области, рак желудка, гастриальный рак, рак ободочной кишки, рак
25 молочной железы, карцинома фаллопиевых труб, карцинома эндометрия, карцинома шейки матки, карцинома влагалища, карцинома вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркома мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак пениса, рак предстательной
30 железы, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточная карцинома, карцинома почечной лоханки, мезотелиома, печеночно-клеточный рак, билиарный рак, неоплазмы центральной нервной системы (ЦНС), опухоли позвоночника, глиома ствола головного мозга, мультиформная глиобластома,

астроцитомы, шванномы, эпендимомы, медуллобластомы, менингиомы, плоскоклеточные карциномы, аденома гипофиза и саркома Юинга, включая рефрактерные варианты любого из указанных выше видов рака и комбинации одного или нескольких видов рака.

5 Указанные композиции могут содержать также адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Отсутствие микроорганизмов можно обеспечивать как с помощью процедур стерилизации (см. выше), так и путем включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, таких, например, как парабен, хлорбутанол, фенол,
10 сорбиновая кислота и т.п. Может оказаться целесообразным включать в композиции агенты для придания изотоничности, такие как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, можно пролонгировать абсорбцию инъекционной фармацевтической формы путем включения веществ, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

15 Вне зависимости от выбранного пути введения соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, которые можно применять в пригодной гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, приготавливают в виде фармацевтически приемлемых форм лекарственного средства с помощью общепринятых методов, известных
20 специалистам в данной области.

 Фактические уровни доз действующих веществ в фармацевтических композициях, предлагаемых в настоящем изобретении, можно варьировать для получения количества действующего вещества, которое является эффективным для достижения требуемого терапевтического ответа у конкретного пациента
25 при использовании конкретной композиции и пути введения, но не является токсичным для пациента. Выбранный уровень доз должен зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая активность конкретных применяемых композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, путь введения, время введения, скорость экскреции конкретного применяемого соединения,
30 продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, которые используют в сочетании с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и

предшествующая история болезни пациента, подлежащего лечению, и другие подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

Композиция должна быть стерильной и текучей в той степени, чтобы композицию можно было вводить с помощью шприца. Помимо воды
5 предпочтительным носителем является изотонический забуференный физиологический раствор.

Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных
10 веществ. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию агенты для придания изотоничности, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит или сорбит, и хлорид натрия.

В контексте настоящего описания понятие «трансформация» относится к процессу переноса векторов/нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Если в
15 качестве клеток-хозяев применяют клетки, оболочки которых не представляют собой труднопреодолимые барьеры, то трансфекцию осуществляют, например, методом, основанным на осаждении фосфатом кальция, который описан у Graham и Van der Eh, *Virology* 52, 1978, с. 546 и далее. Однако можно применять также и другие методы интродукции ДНК в клетки, такие как инъекция в ядра
20 или слияние протопластов. Если используют прокариотические клетки или клетки, имеющие значительные клеточные оболочки, то в качестве метода трансфекции можно применять обработку кальцием с использованием хлорида кальция, описанную у Cohen F.N. и др., *PNAS* 69, 1972, сс. 7110 и далее.

В контексте настоящего описания понятие «экспрессия» относится к
25 процессу, посредством которого осуществляется транскрипция нуклеиновой кислоты в мРНК, и/или к процессу, посредством которого транскрибированная мРНК (которую называют также транскриптом) впоследствии транслируется с образованием пептидов, полипептидов или белков. Транскрипты и кодируемые полипептиды в целом называют генным продуктом. Если полинуклеотид
30 происходит из геномной ДНК, то экспрессия в эукариотической клетке может включать сплайсинг мРНК.

«Вектор» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, в частности самореплицирующуюся, которая переносит встроенную молекулу нуклеиновой

кислоты в клетки-хозяева и/или между клетками-хозяевами. Понятие включает векторы, функция которых состоит прежде всего во встраивании ДНК или РНК в клетку (например, хромосомная интеграция), в репликационные векторы, функция которых прежде всего состоит в репликации ДНК или РНК, и экспрессионные векторы, функция которых состоит прежде всего в транскрипции и/или трансляции ДНК или РНК. Под понятие подпадают также векторы, которые обладают несколькими указанными функциями.

«Экспрессионный вектор» представляет собой полинуклеотид, который при интродукции в соответствующую клетку-хозяина может транскрибироваться и транслироваться в полипептид. Понятие «экспрессионная система» относится, как правило, к приемлемой клетке-хозяину, содержащей экспрессионный вектор, функцией которой может быть выход требуемого продукта экспрессии.

Ниже описаны конкретные варианты осуществления изобретения:

1. Мультиспецифическое антитело, содержащее:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается с вторым антигеном, и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга; и

в котором

I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в котором в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); или

II) в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R))

и в котором в константном домене СН1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно ЕU-индексу Кэбота).

5 2. Мультиспецифическое антитело, содержащее:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

10 б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается с вторым антигеном, и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга; и

в котором

15 I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно ЕU-индексу Кэбота).

20 3. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 1 или 2,

25 в котором в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно ЕU-индексу Кэбота).

30 4. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 1 или 2,

в котором в константном домене СL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а),
5 аминокислота в положении 147 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно ЕU-индексу Кэбота).

5. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 4,

10 в котором в константном домене СL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и аминокислота в положении 123 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу), и в
15 в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно ЕU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно
20 ЕU-индексу Кэбота).

6. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 1 или 2,

25 в котором в константном домене СL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K) или аргинин (R) (нумерация согласно Кэботу) и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно ЕU-индексу Кэбота).

7. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 30 1 или 2,

в котором в константном домене СL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном

предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (К) или аргинин (R)) и в котором в константном домене СН1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

8. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 1 или 2,

в котором в константном домене СL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (К), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (К) или аргинин (R)) и в котором в константном домене СН1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

9. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 8,

в котором в константном домене СL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (К), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (К) или аргинин (R)) и аминокислота в положении 123 заменена независимо на лизин (К), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу), и в котором в константном домене СН1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

10. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 1 или 2,

в котором в константном домене СL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (К),

аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в котором в константном домене СН1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

5 11. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 5,

в котором в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена на лизин (K) (нумерация согласно Кэботу) и аминокислота в положении 123 заменена на лизин (K)

10 (нумерация согласно Кэботу),

и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-

15 индексу Кэбота).

12. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 9,

в котором в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена на лизин (K) (нумерация

20 согласно Кэботу) и аминокислота в положении 123 заменена на лизин (K)

(нумерация согласно Кэботу),

и в котором в константном домене СН1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в

25 положении 213 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

13. Мультиспецифическое антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, в котором константные домены CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), и второй легкой цепи, указанной в подпункте б),

30 имеют каппа-изотип.

14. Мультиспецифическое антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-12, в котором константный домен CL первой легкой цепи,

указанной в подпункте а), имеет лямбда-изотип, а константный домен СL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), имеет каппа-изотип.

15. Мультиспецифическое антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-12, в котором константные домены СL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), и второй легкой цепи, указанной в подпункте б), имеют лямбда-изотип.

16. Мультиспецифическое антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, в котором в константном домене СL либо первой легкой цепи, указанной в подпункте а), либо второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 не заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H), и которое имеет каппа-изотипа, аминокислота в положении 124 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения на глутаминовую кислоту (E)) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

17. Мультиспецифическое антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, отличающееся тем, что

первый СНЗ-домен первой тяжелой цепи антитела, указанной в подпункте а), и второй СНЗ-домен тяжелой цепи антитела, указанной в подпункте б), каждый соприкасается друг с другом на поверхности раздела, которая представляет собой исходную поверхность раздела между СНЗ-доменами антитела,

при этом указанная поверхность раздела изменена для стимулирования формирования мультиспецифического антитела, где изменение отличается тем, что:

I) СНЗ-домен одной тяжелой цепи изменен

так, что на исходной поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи в мультиспецифическом антителе,

аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет бо́льшую по объему боковую цепь, с образованием в результате этого выпуклости на поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая

может помещаться в полость в поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи,

и

II) СНЗ-домен другой тяжелой цепи изменен

5 так, что на исходной поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи в мультиспецифическом антителе,

аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, с образованием в результате этого 10 полости в поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи, в которую может помещаться выпуклость на поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи.

18. Антитело по варианту осуществления изобретения 17, отличающееся тем, что

15 указанный аминокислотный остаток, имеющий больший объем боковой цепи, выбран из группы, состоящей из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y) и триптофана (W), а указанный аминокислотный остаток, имеющий меньший объем боковой цепи, выбран из группы, состоящей из аланина (A), серина (S), треонина (T) и валина (V).

20 19. Антитело по вариантам осуществления изобретения 17 или 18, отличающееся тем, что оба СНЗ-домена дополнительно изменены путем интродукции цистеина (C) в качестве аминокислоты в соответствующие положения каждого СНЗ-домена таким образом, чтобы мог образоваться дисульфидный мостик между обоими СНЗ-доменами.

25 20. Мультиспецифическое антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, где антитело является биспецифическим.

21. Мультиспецифическое антитело по одному из предыдущих вариантов осуществления изобретения, которое специфически связывается с человеческим TWEAK и которое специфически связывается с человеческим IL17, где

30 А) мультиспецифическое антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий SEQ ID NO:24, и переменный домен легкой цепи (VL), имеющий SEQ ID NO:25; и

Б) мультиспецифическое антитело содержит

вариабельный домен тяжелой цепи (VH), имеющий SEQ ID NO:26, и
вариабельный домен легкой цепи (VL), имеющий SEQ ID NO:27.

22. Биспецифическое антитело, которое содержит

5 а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое
специфически связывается с человеческим TWEAK, которое содержит
вариабельный домен тяжелой цепи (VH), имеющий SEQ ID NO:24, и
вариабельный домен легкой цепи (VL), имеющий SEQ ID NO:25; и

10 б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое
специфически связывается в человеческим IL-17, которое содержит
вариабельный домен тяжелой цепи (VH), имеющий SEQ ID NO:26, и
вариабельный домен легкой цепи (VL), имеющий SEQ ID NO:27; где
вариабельные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи
второго антитела заменены друг на друга, и

в котором

15 I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а),
аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K) или аргинин
(R) и в котором в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в
подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении
213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую
20 кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

23. Биспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 21,
в котором

25 в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а),
аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K) или аргинин
(R) (нумерация согласно Кэботу) (в одном из предпочтительных вариантов
осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)), и
аминокислота в положении 123 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R)
или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу);

30 и в котором в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в
подпункте а), аминокислота в положении 147 заменена независимо на
глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно
EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена независимо на

глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

24. Антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 21-23, предназначенное для применения для лечения рака или воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, ревматоидного артрита, псориатического артрита, мышечных болезней, например, мышечной дистрофии, рассеянного склероза, хронических заболеваний почек, болезней костной ткани, например, дегенерации кости при множественной миеломе, системной красной волчанки, волчаночного нефрита и сосудистых повреждений.

25. Применение антитела по одному из вариантов осуществления изобретения 21-23 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения рака или воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, ревматоидного артрита, псориатического артрита, мышечных болезней, например, мышечной дистрофии, рассеянного склероза, хронических заболеваний почек, болезней костной ткани, например, дегенерации кости при множественной миеломе, системной красной волчанки, волчаночного нефрита и сосудистых повреждений.

26. Мультиспецифическое антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-23, отличающееся тем, что оно относится к человеческому подклассу IgG1 или человеческому подклассу IgG4.

27. Мультиспецифическое антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-23 и 26, отличающееся тем, что оно относится к человеческому подклассу IgG1 с мутациями L234A и L235A (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

28. Мультиспецифическое антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-23 и 26-27, отличающееся тем, что оно относится к человеческому подклассу IgG1 с мутациями L234A, L235A и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

29. Мультиспецифическое антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-23 и 26, отличающееся тем, что оно относится к человеческому подклассу IgG4 с мутациями S228P и L235E (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

30. Мультиспецифическое антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-23 и 26-29, отличающееся тем, что оно относится к человеческому подклассу IgG4 с мутациями S228P, L235E и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

5 31. Способ получения мультиспецифического антитела по одному из вариантов осуществления изобретения 1-23 и 26-30, заключающийся в том осуществляют стадии, на которых

А) трансформируют клетку-хозяина векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют

10 а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается с вторым антигеном, и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела
15 заменены друг на друга; и

в котором

И) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном
20 варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в котором в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); или

25 II) в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в котором в константном домене CH1 второй тяжелой цепи, указанной в
30 подпункте б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

Б) культивируют клетку-хозяина в условиях, обеспечивающих синтез указанной молекулы антитела; и

В) выделяют указанную молекулу антитела из указанной культуры.

5 32. Нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотные последовательности мультиспецифического антитела по одному из вариантов осуществления изобретения 1-23 и 26-30.

33. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту осуществления изобретения 32, который обладает способностью экспрессировать указанную нуклеиновую кислоту в клетке-хозяине.

10 34. Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления изобретения 33.

35. Композиция, содержащая антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-23 и 26-30.

15 36. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-23 и 26-30 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

37. Способ лечения пациента, который нуждается в терапии, отличающийся тем, что вводят пациенту в терапевтически эффективном количестве антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-23 и 26-30.

20 38. Способ снижения содержания побочных продуктов мультиспецифических антител,

закрывающийся в том осуществляют стадии, на которых

А) трансформируют клетку-хозяина векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют

25 а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается с вторым антигеном, и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга; и

30 в котором следующие замены включают для снижения содержания побочных продуктов мультиспецифического антитела:

I) в константном домене СL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислоту в положении 124 заменяют независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R))
5 и в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислоту в положении 147 или аминокислоту в положении 213 заменяют независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); или

10 II) в константном домене СL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислоту в положении 124 заменяют независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R))
и в константном домене СН1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б),
15 аминокислоту в положении 147 или аминокислоту в положении 213 заменяют независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

Б) культивируют клетку-хозяина в условиях, обеспечивающих синтез указанной молекулы антитела; и

В) выделяют из указанной культуры указанную молекулу антитела.

20 39. Способ снижения содержания побочных продуктов мультиспецифических антител,

закрывающийся в том осуществляют стадии, на которых

А) трансформируют клетку-хозяина векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют

25 а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается с вторым антигеном, и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела
30 заменены друг на друга; и

в котором включают следующие замены:

I) в константном домене СL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислоту в положении 124 заменяют независимо на лизин (K), аргинин (R)

или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислоту в положении 147 или аминокислоту в положении 213 заменяют независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); или

II) в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислоту в положении 124 заменяют независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в константном домене СН1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислоту в положении 147 или аминокислоту в положении 213 заменяют независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

Б) культивируют клетку-хозяина в условиях, обеспечивающих синтез указанной молекулы антитела; и

В) выделяют из указанной культуры указанную молекулу антитела с пониженным профилем побочных продуктов.

40. Способ снижения содержания побочных продуктов

мультиспецифических антител,

закрывающийся в том осуществляют стадии, на которых

А) трансформируют клетку-хозяина векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается с вторым антигеном, и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга; и

в котором включают следующие замены:

I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислоту в положении 124 заменяют независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном

варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислоту в положении 147 или аминокислоту в положении 213 заменяют независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота),

Б) культивируют клетку-хозяина в условиях, обеспечивающих синтез указанной молекулы антитела; и

В) выделяют из указанной культуры указанную молекулу антитела с пониженным профилем побочных продуктов.

41. Применение указанных ниже замен для снижения образования побочных продуктов (или для снижения профиля побочных продуктов) мультиспецифического антитела:

И) в константном домене СL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислоту в положении 124 заменяют независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислоту в положении 147 или аминокислоту в положении 213 заменяют независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); или

II) в константном домене СL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислоту в положении 124 заменяют независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в константном домене СН1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислоту в положении 147 или аминокислоту в положении 213 заменяют независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

где мультиспецифическое антитело содержит

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается с вторым антигеном, и в котором переменные

домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга.

42. Применение следующих замен для снижения образования побочных продуктов (или для снижения профиля побочных продуктов)

5 мультиспецифического антитела:

И) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислоту в положении 124 заменяют независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R))
10 и в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислоту в положении 147 или аминокислоту в положении 213 заменяют независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

где мультиспецифическое антитело содержит

15 а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается с вторым антигеном, и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела
20 заменены друг на друга.

43. Мультиспецифическое антитело по одному из вариантов осуществления изобретения 1-16 и 20-23, где антитело содержит по меньшей мере два Fab-фрагмента, где первый Fab-фрагмент содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий центр, специфический для первого антигена; а второй Fab-фрагмент содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий центр, специфический для второго антигена, где во втором Fab-фрагменте переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи заменены друг на друга; и где у мультиспецифического антитела отсутствует Fc-домен.

30 44. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 43, где антитело содержит 2-4 Fab-фрагмента.

45. Мультиспецифическое антитело по варианту осуществления изобретения 43 или 44, где антитело специфически связывается с человеческим Ang-2 и VEGF.

5 46. Способ получения антитела, заключающийся в том, что культивируют клетку-хозяина по варианту осуществления изобретения 34 так, чтобы получать антитело.

47. Способ по варианту осуществления изобретения 46, дополнительно заключающийся в том, что выделяют антитело из клетки-хозяина.

10 Следующие примеры, перечень последовательностей и чертежи даны с целью лучшего понимания настоящего изобретения, полный объем которого представлен в приведенной ниже формуле изобретения. Очевидно, что могут быть сделаны модификации в изложенных процедурах без отклонения от сути изобретения.

Описание аминокислотных последовательностей

- 15 SEQ ID NO: 1 - легкая цепь (LC) <Ang-2> дикого типа (wt),
SEQ ID NO: 2 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> дикого типа (wt),
SEQ ID NO: 3 - тяжелая цепь (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt),
SEQ ID NO: 4 – легкая цепь (LC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа
20 (wt),
SEQ ID NO: 5 - легкая цепь (LC) <Ang-2> с заменой Q124K,
SEQ ID NO: 6 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с заменой K147E,
SEQ ID NO: 7 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с заменой K213E,
SEQ ID NO: 8 – легкая цепь (LC) <Ang-2> с заменой E123K,
25 SEQ ID NO: 9 - легкая цепь (LC) <Ang-2> с заменой Q124K и заменой E123K,
SEQ ID NO: 10 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с заменой K147E и заменой K213E,
SEQ ID NO: 11 - легкая цепь (LC) <Ang-2> с заменой Q124R и заменой
30 E123K,
SEQ ID NO: 12 - легкая цепь (LC) <VEGF> с заменой Q124E,
SEQ ID NO: 13 - легкая цепь (LC) <Ang-2> с заменой E124K и заменой E123K,

- SEQ ID NO: 14 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с заменой K147E и заменой K213D,
- SEQ ID NO: 15 - легкая цепь (LC) <IL-17> дикого типа (wt),
- SEQ ID NO: 16 - тяжелая цепь (HC) <IL-17> дикого типа (wt),
- 5 SEQ ID NO: 17 - тяжелая цепь (HC) <TWEEK> с VH-VL-обменом дикого типа (wt),
- SEQ ID NO: 18 - легкая цепь (LC) <TWEEK> с VH-VL-обменом дикого типа (wt),
- SEQ ID NO: 19 - легкая цепь (LC) <IL-17> с заменой Q124K и заменой
- 10 E123R,
- SEQ ID NO: 20 - тяжелая цепь (HC) <IL-17> с заменой K147E и заменой K213E,
- SEQ ID NO: 21 - легкая цепь (LC) <TWEEK> с заменой Q124E,
- SEQ ID NO: 22 - тяжелая цепь (HC) <IL-17> с заменой K147E и заменой
- 15 K213D,
- SEQ ID NO: 23 - легкая цепь (LC) <IL-17> с заменой Q124K и заменой E123K
- SEQ ID NO: 24 - переменный домен тяжелой цепи VH <TWEEK > 305- HC4,
- 20 SEQ ID NO: 25 - переменный домен легкой цепи VL <TWEEK>305-LC2,
- SEQ ID NO: 26 - переменный домен тяжелой цепи VH <IL-17> HC136,
- SEQ ID NO: 27 – переменный домен легкой цепи VL <IL-17> LC136,
- SEQ ID NO: 28 - тяжелая цепь (HC) <TWEEK> с VH-VL-обменом дикого типа (wt) (содержащая концевой дипептид GK),
- 25 SEQ ID NO: 29 - тяжелая цепь (HC) <IL-17> с заменой K147E и заменой K213E (содержащая концевой дипептид GK),
- SEQ ID NO: 30 - тяжелая цепь (HC) <IL-17> с заменой K147E и заменой K213D (содержащая концевой дипептид GK),
- SEQ ID NO: 31 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> дикого типа (wt) (содержащая
- 30 концевой дипептид GK),
- SEQ ID NO: 32 - тяжелая цепь (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt) (содержащая концевой дипептид GK),

SEQ ID NO: 33 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с заменой K147E (содержащая концевой дипептид GK),

SEQ ID NO: 34 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с заменой K213E (содержащая концевой дипептид GK),

5 SEQ ID NO: 35 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с заменой K147E и заменой K213E (содержащая концевой дипептид GK),

SEQ ID NO: 36 - тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с заменой K147E и заменой K213D (содержащая концевой дипептид GK),

10 SEQ ID NO: 37 - тяжелая цепь (HC) <IL-17> дикого типа (wt) (содержащая концевой дипептид GK),

SEQ ID NO: 38 - тяжелая цепь (HC) Fab₂-CrossFab, включающая две тяжелые цепи (HC) <Ang-2> дикого типа (wt), сцепленные с одной тяжелой цепью (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt) через глицин-сериновые линкеры,

15 SEQ ID NO: 39 - тяжелая цепь (HC) Fab₂-CrossFab, включающая две тяжелые цепи (HC) <Ang-2> с заменами K147E и K213E-, сцепленные с одной тяжелой цепью (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt) через глицин-сериновые линкеры,

20 SEQ ID NO: 40 - тяжелая цепь (HC) CrossFab-Fab, включающая одну тяжелую цепь (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt), сцепленную с одной тяжелой цепью (HC) <Ang-2> с заменами K147E и K213E через глицин-сериновые линкеры,

25 SEQ ID NO: 41 - тяжелая цепь (HC) CrossFab-Fab, включающая одну тяжелую цепь (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt), сцепленную с одной тяжелой цепью (HC) <Ang-2> с заменами K147E и K213E через глицин-сериновые линкеры,

30 SEQ ID NO: 42 - тяжелая цепь (HC) CrossFab₂-Fab, включающая две тяжелые цепи (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt), сцепленные с одной тяжелой цепью (HC) <Ang-2> дикого типа (wt) через глицин-сериновые линкеры,

SEQ ID NO: 43 - тяжелая цепь (HC) CrossFab₂-Fab, включающая две тяжелые цепи (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt), сцепленные с

одной тяжелой цепью (HC) <Ang-2> с заменами K147E и K231E через глицин-сериновые линкеры,

SEQ ID NO: 44 - тяжелая цепь (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом с заменой K147E,

5 SEQ ID NO: 45 - легкая цепь (LC) <VEGF> с VH-VL-обменом с заменой Q124K,

SEQ ID NO: 46 - тяжелая цепь (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом с заменами K147E и K213E,

10 SEQ ID NO: 47 - легкая цепь (LC) <VEGF> с VH-VL-обменом с E123K и заменой Q124K.

Примеры

Материалы и общие методы

Общая информация, касающаяся нуклеотидных последовательностей легких и тяжелых цепей человеческого иммуноглобулина, представлена у: Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Аминокислоты цепей антител пронумерованы и на них сделаны ссылки согласно системам нумерации, предложенным Кэботом (Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991), описанным выше.

Методы рекомбинантной ДНК

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., Molecular cloning: A laboratory manual; изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии использовали согласно инструкциям производителей.

Синтез генов

Требуемые сегменты генов получали из олигонуклеотидов, созданных путем химического синтеза. Генные сегменты длиной 600-1800 пар оснований, которые фланкированы единичными сайтами, распознаваемыми рестриктазами, собирали путем отжига и лигирования олигонуклеотидов, включая ПЦР-амплификацию и последующее клонирование через указанные сайты рестрикции, например, KpnI/SacI или AscI/PacI в клонирующем векторе pGA4, основой которого является плаزمида pPCRScrip (фирма Stratagene).

Последовательности ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждали путем секвенирования ДНК. Синтез генных фрагментов заказывали в соответствии с настоящей спецификацией на фирме Geneart (Регенсбург, Германия).

5 Определение последовательностей ДНК

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования двух цепей на фирме MediGenomix GmbH (Мартинсрид, Германия) или фирме Sequiserve GmbH (Фатерштеттен, Германия).

10 Анализ последовательностей ДНК и белков и обработка данных о последовательностях

Применяли пакет программ фирмы GCG (Genetics Computer Group, Мэдисон, шт. Висконсин), версия 10.2 и Infomax's Vector NT1 Advance suite, версия 8.0 для создания, картирования, анализа, аннотирования и иллюстрации последовательностей.

15 Экспрессионные векторы

Для экспрессии описанных антител применяли варианты экспрессионных плазмид, предназначенных для кратковременной экспрессии (например, в клетках НЕК293 EBNA или НЕК293-F), основанные либо на кДНК-организации промотора CMV с интроном А или без него, либо на геномной организации с промотором CMV.

Помимо кассеты экспрессии антитела векторы включали:

- сайт инициации репликации, который обеспечивает репликацию этого вектора в *E. coli*,

- ген β-лактамазы, который придает устойчивость *E. coli* к ампициллину.

25 Транскрипционная единица гена антитела состояла из следующих элементов:

- уникальный(ые) сайт(ы) рестрикции на 5'-конце,

- немедленно-ранний энхансер и промотор из человеческого цитомегаловируса,

30 - расположенная за ней последовательность интрона А в случае конструкции на основе кДНК,

- 5'-нетранслируемая область гена человеческого антитела,

- сигнальная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина,

- цепь человеческого антитела (дикого типа или с обменом доменов) либо в виде кДНК, либо в виде геномной организации с иммуноглобулиновой экзон-интронной организацией,

5 - 3'-нетранслируемая область с сигнальной последовательностью полиаденилирования и

- уникальный(ые) сайт(ы) рестрикции на 3'-конце.

Слияния генов, содержащих описанные цепи антитела, как указано ниже, осуществляли с помощью ПЦР и/или синтеза генов и сборки с использованием известных методов и процедур рекомбинации путем соединения
10 соответствующих сегментов нуклеиновых кислот, например, с использованием уникальных сайтов рестрикции, в соответствующих векторах.

Субклонированные нуклеотидные последовательности подтверждали секвенированием ДНК. Для осуществления кратковременных трансфекций плазмиды создавали в больших количествах посредством получения плазмид из
15 трансформированных культур *E. coli* (набор Nucleobond AX, фирма Macherey-Nagel).

Методики культивирования клеток

Применяли стандартные методики культивирования клеток, описанные в
20 Current Protocols in Cell Biology, под ред. Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J. и Yamada K.M., изд-во John Wiley & Sons, Inc., 2000.

Мультиспецифические антитела экспрессировали путем кратковременной котрансфекции соответствующими экспрессионными плазмидами выращенных в виде прикрепленных культур клеток HEK293-EBNA или выращенных в виде суспензионных культур клеток HEK29-F, что будет описано ниже.

Кратковременные трансфекции в системе HEK293-EBNA

Мультиспецифические антитела экспрессировали путем кратковременной котрансфекции соответствующими экспрессионными плазмидами (например, кодирующими тяжелую и модифицированную тяжелую цепь, а также соответствующую легкую цепь и модифицированную легкую цепь) выращенных
30 в виде прикрепленных культур клеток HEK293-EBNA (линия клеток почки человеческого эмбриона 293, экспрессирующая ядерный антиген вируса Эпштейна-Барра; депонирована в Американской коллекции типовых культур под номером ATCC № CRL-10852, партия 959218), которые культивировали в среде

DMEM (модифицированная по методу Дульбекко среда Игла, Gibco®),
дополненной 10% FCS (фетальная телячья сыворотка, Gibco®) с ультра низким
содержанием IgG (Ultra Low IgG FCS), 2мМ L-глутамином (Gibco®) и 250
мкг/мл генетицина (Gibco®). Для трансфекции применяли реагент для
5 трансфекции типа FuGENE™ 6 (фирма Roche Molecular Biochemicals), используя
соотношение реагента FuGENE™ (мкл) и ДНК (мкг) 4:1 (диапазон от 3:1 до 6:1).
Белки экспрессировали, применяя соответствующие плазмиды, с
использованием плазмид, кодирующих (модифицированные и дикого типа)
легкую цепь и тяжелую цепь, в молярном соотношении 1:1 (эквимольное
10 соотношение), диапазон от 1:2 до 2:1 соответственно. Клетки подпитывали в
день 3 L-глутамином до концентрации 4мМ, глюкозой (фирма Sigma) и NAA
(амид никотиновой кислоты) (Gibco®). В дни с 5 по 11 после трансфекции
собирали путем центрифугирования супернатанты клеточных культур,
содержащие мультиспецифическое антитело, и хранили при -20°C. Общую
15 информацию, касающуюся рекомбинантной экспрессии человеческих
иммуноглобулинов, например, в НЕК293-клетках, см. у Meissner P. и др.,
Biotechnol. Bioeng. 75, 2001, сс. 197-203.

Кратковременные трансфекции в системе НЕК293-F

Мультиспецифические антитела получали путем кратковременной
20 трансфекции соответствующими плазмидами (например, кодирующими тяжелую
и модифицированную тяжелую цепь, а также соответствующую легкую цепь и
модифицированную легкую цепь), используя систему НЕК293-F (фирма
Invitrogen) согласно инструкции производителя. В целом, метод состоял в
следующем: НЕК293-F-клетки (фирма Invitrogen), выращенные в виде
25 суспензионной культуры либо во встряхиваемой колбе, либо в ферментере с
мешалкой в бессывороточной среде для экспрессии типа FreeStyle™ 293 (фирма
Invitrogen), трансфектировали смесью четырех экспрессионных плазмид и 293-
фектином™ или фектином (фирма Invitrogen). В 2-литровую встряхиваемую
колбу (фирма Corning) высевали клетки НЕК293-F с плотностью $1,0 \times 10^6$
30 клеток/мл в 600 мл и инкубировали при 120 об/мин, 8% CO₂. Через 1 день клетки
трансфектировали при плотности клеток примерно $1,5 \times 10^6$ клеток/мл с помощью
примерно 42 мл смеси А), содержащей 20 мл среды Opti-MEM (фирма
Invitrogen), с 600 мкг общей плазмидной ДНК (1 мкг/мл), которая кодирует

соответственно тяжелую или модифицированную тяжелую цепь и соответствующую легкую цепь, в эквимольном соотношении, и смеси Б), содержащей 20 мл Opti-MEM + 1,2 мл 293-фектина или фектина (2 мкл/мл). В зависимости от поглощения глюкозы в процессе ферментации добавляли раствор
5 глюкозы. Через 5-10 дней собирали супернатант, содержащий секретированное антитело, и либо очищали антитела непосредственно из супернатанта, либо супернатант замораживали и помещали на хранение.

Определение белка

Концентрацию белков очищенных антител и их производных определяли на
10 основе оптической плотности (ОП) при 280 нм, используя коэффициент молярной экстинкции, рассчитанный на основе аминокислотной последовательности согласно методу, который описан у Расе и др., Protein Science, 4, 1995, сс. 2411-1423.

Определение концентрации антител в супернатантах

15 Концентрацию антител и их производных в супернатантах клеточных культур определяли путем иммунопреципитации с белок А-агарозными гранулами (фирма Roche). 60 мкл белок А-агарозных гранул промывали трижды в TBS-NP40 (50мМ Трис, рН 7,5, 150мМ NaCl, 1% Nonidet-P40). Затем 1-15 мл супернатанта клеточной культуры наносили на белок А-агарозные гранулы,
20 предварительно уравновешенные в TBS-NP40. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре гранулы промывали на фильтрующей колонке типа Ultrafree-МС (фирма Amicon), используя однократно 0,5 мл TBS-NP40, дважды 0,5 мл двукратного (2×) забуференного фосфатом физиологического раствора (2×3ФР, фирма Roche) и быстро четыре раза, используя 0,5 мл 100мМ Na-
25 цитратного буфера, рН 5,0. Связанное антитело элюировали, добавляя 35 мкл буфера для образцов NuPAGE® LDS (фирма Invitrogen). Половину образца объединяли с восстановителем для образцов NuPAGE® или оставляли в невосстановленной форме соответственно и выдерживали в течение 10 мин при 70°C. Затем по 5-30 мкл применяли для осуществления ДСН-ПААГ с
30 использованием 4-12% бис-Трис-гелей NuPAGE® (фирма Invitrogen) (применяя буфер MOPS для осуществления ДСН-ПААГ в невосстанавливающихся условиях и буфер MES в виде подвижного буфера с антиоксидантной добавкой

NuPAGE® (фирма Invitrogen) для осуществления ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях) и окрашивали кумасси бриллиантовым голубым.

Концентрацию антител и их производных в супернатантах клеточных культур оценивали количественно с помощью аффинной ЖХВР-хроматографии.

5 В целом, метод состоял в следующем: супернатанты клеточных культур, содержащие антитела и их производные, которые связывались с белком А, вносили на колонку Applied Biosystems Poros A/20 в 200мМ KH_2PO_4 , 100мМ цитрате натрия, рН 7,4 и элюировали из матрикса с помощью 200мМ NaCl, 100мМ лимонной кислоты, рН 2,5 с использованием системы Agilent HPLC 1100.
10 Элюированный белок оценивали количественно с помощью измерения УФ-абсорбции и интегрирования площадей пиков. Очищенное стандартное антитело в виде IgG1 служило в качестве стандарта.

В альтернативном варианте концентрацию антител и их производных в супернатантах клеточных культур оценивали с помощью «сэндвич»-IgG-ELISA.

15 В целом, метод состоял в следующем: 96-луночные титрационные микропланшеты, обладающие высокой способностью связывать стрептавидин А (планшеты типа StreptaWell High Bind Streptavidin А (фирма Roche)), сенсibiliзировали из расчета 100 мкл/лунку биотинилированным античеловеческим IgG F(ab')₂-FcγBI (фирма Dianova), применяемым в
20 качестве иммобилизованной молекулы, в концентрации 0,1 мкг/мл в течение 1 ч при комнатной температуре или в другом варианте в течение ночи при 4°C и затем промывали трижды, используя 200 мкл/лунку ЗФР, 0,05% Твин (ЗФРТ, фирма Sigma). Добавляли в лунки по 100 мкл/лунку серийных разведений в ЗФР (фирма Sigma) супернатантов клеточных культур, содержащих соответствующее
25 антитело, и инкубировали в течение 1-2 ч на шейкере для титрационных микропланшетов при комнатной температуре. Лунки промывали трижды, используя 200 мкл/лунку ЗФРТ, и выявляли связанное антитело с помощью 100 мкл F(ab')₂-hFcγPOD (фирма Dianova) в концентрации 0,1 мкг/мл в качестве идентифицирующего антитела в течение 1-2 ч на шейкере для титрационных
30 микропланшетов при комнатной температуре. Несвязанное идентифицирующее антитело отмывали трижды, используя 200 мкл/лунку ЗФРТ, а связанное идентифицирующее антитело выявляли, добавляя 100 мкл АВТС/лунку.

Определение абсорбции осуществляли на спектрометре типа Tecan Fluor при длине волны 405 нм (длина референс-волны 492 нм).

Очистка белков

Белки очищали из профильтрованных супернатанов клеточных культур согласно стандартным протоколам. В целом, метод состоял в следующем: антитела вносили на колонку, заполненную белок А-сефарозой (фирма GE Healthcare), и промывали 3ФР. Элюцию антител осуществляли при pH 2,8 с последующей немедленной нейтрализацией образца. Агрегированный белок отделяли от мономерных антител гель-фильтрацией (Супердекс 200, фирма GE Healthcare) в 3ФР или в 20мМ гистидине, 150мМ NaCl, pH 6,0. Фракции мономерных антител объединяли, (при необходимости) концентрировали, используя, например, центрифужный концентратор типа MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCО (молекулярновесовой предел), замораживали и хранили при -20°C или -80°C. Часть образцов оставляли для последующего аналитического изучения белка и его аналитической характеристики, например, с помощью ДСН-ПААГ, гель-фильтрации (ГФ) или масс-спектрометрии.

ДСН-ПААГ

Применяли гелевую систему NuPAGE® Pre-Cast (фирма Invitrogen) согласно инструкции производителя. В частности, использовали 10% или 4-12% бис-Трис Pre-Cast-гели NuPAGE®, Novex® (pH 6,4) и подвижные буферы, такие как NuPAGE® MES (гели, применяемые в восстанавливающих условиях, подвижный буфер с антиоксидантной добавкой NuPAGE®) или MOPS (гели, применяемые в невосстанавливающих условиях).

Аналитическая гель-фильтрация

В качестве гель-фильтрации (ГФ), предназначенной для определения агрегированного и олигомерного состояния антител, применяли ЖХВР-хроматографию. В целом, метод состоял в следующем: очищенные на белке А антитела вносили на колонку типа Tosoh TSKgel G3000SW в 300мМ NaCl, 50мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,5 в системе Agilent HPLC 1100, или на колонку Супердекс 200 (фирма GE Healthcare) в 2 × 3ФР в ЖХВР-системе Dionex. Количество элюированного белка определяли на основе УФ-абсорбции и интегрирования площадей пиков. В качестве стандарта применяли стандарт для гель-фильтрации фирмы BioRad (Gel Filtration Standard 151–1901).

Масс-спектрометрия

В этом разделе описана характеристика мультиспецифических антител с VH/VL-обменом (VH/VL-CrossMab), особое значение при осуществлении которой придавали их правильной сборке. Ожидаемые первичные структуры анализировали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем (ESI-МС) дегликозилированных интактных CrossMab и дегликозилированных/расщепленных плазмином или в другом варианте дегликозилированных/ограниченно расщепленных LysC CrossMab.

VH/VL-CrossMab дегликозилировали с помощью N-гликозидазы F в фосфатном или Трис-буфере при 37°C в течение вплоть до 17 ч при концентрации белка 1 мг/мл. Расщепление плазмином или ограниченное расщепление LysC (фирма Roche) осуществляли, используя 100 мкг дегликозилированных VH/VL-CrossMab в Трис-буфере, pH 8 при комнатной температуре в течение 120 ч и при 37°C в течение 40 мин соответственно. Перед осуществлением масс-спектрометрии образцы обессоливали с помощью ЖХВР на колонке Сефадекс G25 (фирма GE Healthcare). Общую массу определяли с помощью ESI-МС с использованием МС-системы maXis 4G UHR-QTOF, снабженной источником NanoMate TriVersa (фирма Advion).

Определение связывания или аффинности связывания мультиспецифических антител с соответствующими антигенами с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (BIACORE)

Связывание созданных антител с соответствующими антигенами (например, ANG2 и VEGF) изучали с помощью поверхностного плазмонного резонанса, применяя устройство BIACORE (фирма GE Healthcare Biosciences AB, Уппсала, Швеция). В целом, метод состоял в следующем: для оценки аффинности козы античеловеческие антитела IgG-типа JIR 109-005-098 иммобилизовали на CM5-чипе посредством аминного сочетания для презентации антител к соответствующему антигену. Связывание измеряли в HBS-буфере (HBS-P (10мМ HEPES, 150мМ NaCl, 0,005% Твин 20, pH 7,4) при 25°C (или в альтернативном варианте при 37°C). Добавляли антиген (фирма R&D Systems или очищенный в лаборатории заявителей) в различных концентрациях в растворе. Для измерения ассоциации инъекцию антигена осуществляли в течение промежутка времени, составляющего от 80 с до 3 мин; диссоциацию

измеряли путем промывки поверхности чипа HBS-буфером в течение 3-10 мин и величину KD определяли, используя модель связывания Ленгмюра при соотношении 1:1. Данные, полученные для отрицательного контроля (например, кривые, полученные для буфера) вычитали из кривых для образца для коррекции 5 присущей системе сдвигу и для снижения шумового сигнала. Соответствующую программу Biacore Evaluation применяли для анализа сенсограмм и для расчета данных об аффинности.

Пример 1А

10 Производство и экспрессия мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (*CrossMAb^{Vh-VL}*) в одном связывающем плече и с единичными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL

В качестве первого примера создавали мультиспецифические антитела, которые связываются с человеческим ангиопоэтином-2 (ANG2) и человеческим 15 VEGF, с помощью описанных в разделе «Общие методы» классических методик молекулярной биологии и кратковременно экспрессировали в НЕК293-клетках согласно описанному выше методу. Общая схема указанных соответствующих мультиспецифических антител представлена на фиг. 1А - В. Для сравнения получали также антитела дикого типа (wt) с обменом/заменой VH/VL-доменов, 20 но без замены в поверхности раздела CH1/CL. Кроме того, для сравнения использовали также другие альтернативные замены в непосредственной близости к поверхности раздела CH1/CL (упомянутые, например, в EP 2647707). Мультиспецифические антитела экспрессировали, используя экспрессионные 25 аминокислотные последовательности, представленные в таблице 2а.

Таблица 2а: Аминокислотные последовательности легких цепей (LC) и тяжелых цепей (HC) мультиспецифических антител к *Ang2-VEGF* Ang2VEGF-0273, Ang2VEGF-0396, Ang2VEGF-0397, Ang2VEGF-0394, Ang2VEGF-0395 с обменом/заменой VH/VL-доменов (*CrossMAb^{Vh-VL}*): дикого типа (wt) и с различными комбинациями единичных замен заряженных аминокислот

Антитело	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0396	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0397	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0394	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0395	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4

Для всех конструкций применяли технологию гетеродимеризации «knobs into holes» с типичной заменой, приводящей к образованию «выступа» (T366W) в первом CH3-домене и соответствующими заменами, приводящими к образованию «впадины» (T366S, L368A и Y407V) во втором CH3-домене (а также интродукцию двух дополнительных остатков цистеина S354C/Y349’C) (которые содержались в соответствующих последовательностях тяжелых цепей (HC), указанных выше).

Пример 1Б

Очистка и характеристика мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (*CrossMAb^{Vh-VL}*) в одном связывающем плече и с единичными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL

Мультиспецифические антитела, экспрессия которых описана выше, очищали из супернатанта путем комбинации аффинной хроматографии на белке А и гель-фильтрации. Все мультиспецифические антитела можно получать с высокими выходами, и они являлись стабильными.

Полученные продукты характеризовали в отношении их идентичности с помощью масс-спектрометрии и определяли их аналитические свойства, такие как чистота, которую оценивали с помощью ДСН-ПААГ, содержание мономеров и стабильность.

Масс-спектрометрия

Ожидаемые первичные структуры анализировали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем (ESI-МС) дегликозилированных интактных CrossMab и дегликозилированных/расщепленных плазмином или в другом варианте дегликозилированных/ограниченно расщепленных LysC CrossMab.

VH/VL-CrossMab дегликозилировали с помощью N-гликозидазы F в фосфатном или Трис-буфере при 37°C в течение вплоть до 17 ч при концентрации белка 1 мг/мл. Расщепление плазмином или ограниченное расщепление LysC (фирма Roche) осуществляли, используя 100 мкг дегликозилированных VH/VL-CrossMab в Трис-буфере, pH 8 при комнатной температуре в течение 120 ч и при 37°C в течение 40 мин соответственно. Перед осуществлением масс-спектрометрии образцы обессоливали с помощью ЖХВР на колонке Сефадекс G25 (фирма GE Healthcare). Общую массу определяли с помощью ESI-МС с использованием МС-системы maXis 4G UHR-QTOF, снабженной источником NanoMate TriVersa (фирма Advion).

Результаты представлены в таблице 2б и на фиг. 4а.

Таблица 2б: Снижение содержания основного побочного продукта, полученного в результате бенс-джонсовского взаимодействия, путем единичных замен заряженных аминокислот, предлагаемых в изобретении, в поверхности раздела CH1/CL

	CL ANG-2 (положение 124)	CL ANG-2 (положение 123)	CH1 ANG-2 (положение 147)	CH1 ANG-2 (положение 213)	CH1 VEGF	CL VEGF	Основной побочный продукт (ошибочное спаривание бенс-джонсовского типа) % с помощью МС
Ang2VEGF-0273	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	Wt	~ 20
Ang2VEGF-0396	Q124K	Wt	K147E	wt	wt	Wt	~ 3
Ang2VEGF-0397	Q124K	Wt	wt	K213E	wt	Wt	~ 3
Ang2VEGF-0394	wt	E123K	K147E	wt	wt	Wt	~ 15
Ang2VEGF-0395	wt	E123K	wt	K213E	wt	Wt	~ 15

Результаты, представленные в таблице 2б и на фиг. 4а, свидетельствуют о том, что с помощью замен единичных заряженных аминокислот на

аминокислоты с противоположным зарядом в CH1- и CL-доменах, предлагаемых в изобретении/указанных в настоящем описании (пара CL:Q124K и CH1:K147E или пара CL:Q124K и CH1:K213E), содержание основного побочного продукта (полученного в результате ошибочного спаривания бенс-джонсовского типа) значительно снижалось по сравнению с мультиспецифическим антителом дикого типа без указанных замен (снижение на ~ 17%). При использовании других замен, находящихся в тесной близости от указанных (пара CL:Q123K и CH1:K147E или пара CL:Q123K CH1:K213E), обнаружено лишь небольшое снижение количества основного побочного продукта по сравнению с мультиспецифическим антителом дикого типа без указанных замен (снижение на ~ 5%).

Пример 1В

Антигенсвязывающие свойства мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (*CrossMab^{Vh-VL}*) в одном связывающем плече и с единичными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL

Связывание мультиспецифических антител, описанных выше в примерах 1А и 1В, с соответствующими антигенами-мишеням, т.е. ANG2 и VEGF, оценивали с помощью Viacore®.

Связывание с VEGF оценивали согласно следующей процедуре:

Связывание указанных антител с человеческим VEGFA-121 изучали с помощью поверхностного плазмонного резонанса, используя устройство VIACORE® T200 (фирма GE Healthcare). Примерно 10000 (RU) антитела к His (1 мкг/мл антитела к His; код заказа: 28995056; фирма GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция) сшивали с CM5-чипом серий S (фирма GE Healthcare, BR-1005-30) при pH 5,0, применяя набор для аминного сочетания, поставляемый фирмой GE Healthcare. Буфер HBS-N (10мМ HEPES, 150мМ NaCl, pH 7,4, фирма GE Healthcare) применяли в качестве подвижного буфера при осуществлении процедуры иммобилизации. При последующей характеристике кинетики буфер для образца и подвижный буфер представлял собой ЗФР-Т (10мМ забуференный фосфатом физиологический раствор, включающий 0,05% Твин 20), pH 7,4. Температуру проточной ячейки устанавливали на 25°C, а температуру блока для

образца устанавливали на 12°C и прямировали дважды, используя подвижный буфер, перед осуществлением характеристики кинетики.

VEFGA-121-His «захватывали» путем инъекции раствора с концентрацией 0,5 мкг/мл в течение 30 с при скорости потока 5 мкл/мин. Ассоциацию измеряли 5 путем инъекции указанных антител в различных концентрациях в растворе в течение 180 с при скорости потока 30 мкл/мин, начиная с 1000нМ, осуществляя серийные разведения 1:3. Мониторинг фазы диссоциации осуществляли в течение промежутка времени, составляющего вплоть до 600 с, и ее запускали путем замены раствора для образца на подвижный буфер. Поверхность 10 регенерировали путем 60-секундной промывки с помощью раствора глицина, рН 1,5 при скорости потока 30 мкл/мин. Все различия в коэффициентах преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного от поверхности, покрытой антителом к His. Вычитали также данные, полученные при осуществлении контрольных «пустых» инъекций (двойной контроль). Для 15 расчета величины K_D и других кинетических параметров применяли модель 1:1 Лэнгмюра.

Связывание Ang-2 оценивали согласно следующей процедуре:

Связывание указанных антител с человеческим Ang-2-RBD-Fc изучали с помощью поверхностного плазмонного резонанса, используя устройство 20 BIACORE® T200 (фирма GE Healthcare). Примерно 8000 (RU) козьего античеловеческого $F(ab')_2$ (10 мкг/мл античеловеческого $F(ab')_2$; код заказа: 28958325; фирма GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция) сшивали с CM5-чипом серий S (фирма GE Healthcare, BR-1005-30) при рН 5,0, применяя набор для аминного сочетания, поставляемый фирмой GE Healthcare. Буфер HBS-N (10мМ 25 HEPES, 150мМ NaCl, рН 7,4, фирма GE Healthcare) применяли в качестве подвижного буфера при осуществлении процедуры иммобилизации. При последующей характеристике кинетики буфер для образца и подвижный буфер представлял собой ЗФР-Т (10мМ забуференный фосфатом физиологический 30 раствор, включающий 0,05% Твин 20), рН 7,4. Температуру проточной ячейки устанавливали на 25°C, а температуру блока для образца устанавливали на 12°C и прямировали дважды, используя подвижный буфер, перед осуществлением характеристики кинетики.

Биспецифическое антитело «захватывали» путем инъекции раствора с концентрацией 5нМ в течение 25 с при скорости потока 5 мкл/мин. Ассоциацию измеряли путем инъекции человеческого Ang2-RBD-Fc в различных концентрациях в растворе в течение 120 с при скорости потока 30 мкл/мин, начиная с 100нМ, осуществляя серийные разведения 1:3. Мониторинг фазы диссоциации осуществляли в течение промежутка времени, составляющего вплоть до 180 с, и ее запускали путем замены раствора для образца на подвижный буфер. Поверхность регенерировали путем 60-секундной промывки с помощью раствора глицина, рН 2,1 при скорости потока 30 мкл/мин. Все различия в коэффициентах преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного от поверхности, покрытой козьим античеловеческим F(ab')₂. Вычитали также данные, полученные при осуществлении контрольных «пустых» инъекций (двойной контроль). Для расчета кажущейся величины K_D и других кинетических параметров применяли модель 1:1 Лэнгмюра.

В качестве применяемого для сравнения примера параллельно изучали контрольное антитело, специфически связывающееся с Ang2 и VEGF, которое содержало обмен/замену VH/VL-доменов, но в котором отсутствовали замены заряженных аминокислот (антитело Ang2VEGF-0273 в таблице 2б).

Результаты представлены в таблицах 2в и 2г.

Таблица 2в: Аффинность к VEGF указанных антител

Образец	KD (нМ)
Ang2VEGF-0273	6
Ang2VEGF-0396	3
Ang2VEGF-0397	4
Ang2VEGF-0394	3
Ang2VEGF-0395	4

Таблица 2г: Аффинность к Ang2 указанных антител

Образец	KD (нМ)
Ang2VEGF-0273	15
Ang2VEGF-0396	17
Ang2VEGF-0397	14
Ang2VEGF-0394	12
Ang2VEGF-0395	15

Все протестированные антитела специфически связывались с обеими мишенями, т.е. Ang2 и VEGF, и величина их аффинности к антигену находилась в наномолярном диапазоне.

Пример 1Г

Стабильность мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMab^{Vh-VL}) в одном связывающем плече и с единичными заменами
5 заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL

Для оценки стабильности конструкций антител оценивали термостабильность, а также температуры начала агрегации согласно следующей процедуре.

10 Образцы указанных антител приготавливали в концентрации 1 мг/мл в 20мМ гистидине/хлориде гистидина, 140мМ NaCl, pH 6,0, переносили в набор 10-микролитровых кювет и фиксировали данные о статическом рассеянии света, а также данные о флуоресценции после возбуждения лазером при длине волны 266 нм с помощью устройства Optim1000 (фирма Avacta Inc.), при этом температуру образцов повышали со скоростью 0,1°C/ мин с 25°C до 90°C.

15 Температуру начал агрегации (T_{agg}) определяли как температуру, при которой начинает возрастать интенсивность рассеяния света. Температуру плавления (T_m) определяли как точку излома на графике зависимости интенсивности флуоресценции от длины волны.

Результаты представлены в таблице 2д.

20 Таблица 2д: Температура начала агрегации (T_{agg}) и температура плавления (T_m) указанных антител

Образец	T _{agg} (°C)	T _m (°C)
Ang2VEGF-0273	56,0	61,3
Ang2VEGF-0396	56,9	62,0
Ang2VEGF-0397	56,0	61,7
Ang2VEGF-0394	56,9	62,2
Ang2VEGF-0395	56,8	62,1

Пример 1Д

25 Выход производства мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (CrossMab^{Vh-VL}) в одном связывающем плече и с единичными заменами
заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL

Выходы производства указанных мультиспецифических антител оценивали после очистки на белке А (ProtA). Результаты представлены в таблице 2е.

Таблица 2е: Выходы производства [мг/л супернатанта] указанных антител

Образец	ProtA
Ang2VEGF-0273	65
Ang2VEGF-0396	80,8
Ang2VEGF-0397	68,4
Ang2VEGF-0394	79,2
Ang2VEGF-0395	93,6

Пример 2А

Производство и экспрессия мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (*CrossMab^{Vh-VL}*) в одном связывающем плече и с различными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL

В качестве первого примера создавали мультиспецифические антитела, которые связываются с человеческим ангиопоэтином-2 (ANG2) и человеческим VEGF, согласно классическим методикам молекулярной биологии, описанным в разделе «Общие методы», и кратковременно экспрессировали в НЕК293-клетках согласно описанному выше методу. Общая схема указанных соответствующих мультиспецифических антител представлена на фиг. 1А-В. Для сравнения получали также антитела дикого типа (wt) с обменом/заменой VH/VL-доменов, но без замены в поверхности раздела CH1/CL. Мультиспецифические антитела экспрессировали, используя экспрессионные плазмиды, содержащие нуклеиновые кислоты, которые кодируют аминокислотные последовательности, представленные в таблице 3а.

Таблица 3а: Аминокислотные последовательности легких цепей (LC) и тяжелых цепей (HC) мультиспецифических антител к *Ang2-VEGF* Ang2VEGF-0273, Ang2VEGF-0274, Ang2VEGF-0282, Ang2VEGF-0283, Ang2VEGF-0284, Ang2VEGF-0285, Ang2VEGF-0286 с обменом/заменой VH/VL-доменов (*CrossMab^{Vh-VL}*): дикого типа (wt) и с различными комбинациями замен заряженных аминокислот

Антитело	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0274	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0282	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12
Ang2VEGF-0283	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0284	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0285	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12
Ang2VEGF-0286	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12

Для всех конструкций применяли технологию гетеродимеризации «knobs into holes» с типичной заменой, приводящей к образованию «выступа» (T366W) в первом СНЗ-домене и соответствующими заменами, приводящими к
5 образованию «впадины» (T366S, L368A и Y407V) во втором СНЗ-домене (а также интродукцию двух дополнительных остатков цистеина S354C/Y349'C) (которые содержались в соответствующих последовательностях тяжелых цепей (НС), указанных выше).

Пример 2Б

10 Очистка и характеристика мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (*CrossMab^{Vh-VL}*) в одном связывающем плече и с различными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL

Мультиспецифические антитела, экспрессия которых описана выше,
15 очищали из супернатанта путем комбинации аффинной хроматографии на белке А и гель-фильтрации. Все мультиспецифические антитела можно получать с высокими выходами, и они являлись стабильными.

Полученные продукты характеризовали в отношении их идентичности с помощью масс-спектрометрии и определяли их аналитические свойства, такие
20 как чистота, которую оценивали с помощью ДСН-ПААГ, содержание мономеров и стабильность.

Масс-спектрометрия

Ожидаемые первичные структуры анализировали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем (ESI-МС) дегликозилированных
25 интактных CrossMab и дегликозилированных/расщепленных плазмином или в другом варианте дегликозилированных/ограниченно расщепленных LysC CrossMab.

VH/VL-CrossMab дегликозилировали с помощью N-гликозидазы F в фосфатном или Трис-буфере при 37°C в течение вплоть до 17 ч при
30 концентрации белка 1 мг/мл. Расщепление плазмином или ограниченное расщепление LysC (фирма Roche) осуществляли, используя 100 мкг дегликозилированных VH/VL-CrossMab в Трис-буфере, pH 8 при комнатной температуре в течение 120 ч и при 37°C в течение 40 мин соответственно. Перед

осуществлением масс-спектрометрии образцы обессоливали с помощью ЖХВР на колонке Сефадекс G25 (фирма GE Healthcare). Общую массу определяли с помощью ESI-МС с использованием МС-системы maXis 4G UHR-QTOF, снабженной источником NanoMate TriVersa (фирма Advion).

5 Результаты представлены в таблице 3б и на фиг. 5а.

Таблица 3б: Снижение содержания основного побочного продукта, полученного в результате бенс-джонсовского взаимодействия, путем единичных замен заряженных аминокислот, предлагаемых в изобретении, в поверхности раздела CH1/CL

	CL ANG-2	CL ANG-2	CH1 ANG-2	CH1 ANG-2	CH1 VEGF	CL VEGF	Основной побочный продукт (ошибочное спаривание бенс-джонсовского типа) % с помощью МС
Ang2VEGF-0273	wt: Q124 (каппа)	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124	<u>~20%</u>
Ang2VEGF-0274	Q124K	E123K	K147E	K213E	wt	Wt	0
Ang2VEGF-0282	Q124R	E123K	K147E	K213E	wt	Q124E	0
Ang2VEGF-0283	E124K (лямбда)	E123K	K147E	K213E	wt	wt:	0
Ang2VEGF-0284	Q124R	E123K	K147E	K213D	wt	Wt	0
Ang2VEGF-0285	Q124R	E123K	K147E	K213D	wt	Q124E	0
Ang2VEGF-0286	Q124K	E123K	K147E	K213E	wt	Q124E	0

10

Результаты, представленные в таблице 3б и на фиг. 5а, свидетельствуют о том, что с помощью двойных замен заряженных аминокислот на аминокислоты с противоположным зарядом в CH1- и CL-доменах, предлагаемых в изобретении/указанных в настоящем описании (CL:Q124K/E123K и
 15 CH1:K147E/K213E; CL:Q124R/E123K и CH1:K147E/K213E; CL:Q124R/E123K и CH1:K147E/K213D), основной побочный продукт (полученный в результате ошибочного спаривания бенс-джонсовского типа) полностью отсутствовал при сравнении с мультиспецифическим антителом дикого типа без указанных замен. Это не зависело от дополнительной единичной замены Q124E в CL-домене
 20 другого связывающего плеча, которая не влияла ни на экспрессию, ни на профиль побочных продуктов.

Пример 2В

Антигенсвязывающие свойства мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (*CrossMab^{Vh-VL}*) в одном связывающем плече и с различными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL

Связывание мультиспецифических антител, описанных выше в примерах 2А и 2Б, с соответствующими антигенами-мишенями, т.е. ANG2 и VEGF, оценивали с помощью Вiasoge® согласно методу, изложенному в примере 1В.

В качестве применяемого для сравнения примера параллельно изучали контрольное антитело, специфически связывающееся с Ang2 и VEGF, которое содержало обмен/замену VH/VL-доменов, но в котором отсутствовали замены заряженных аминокислот (антитело Ang2VEGF-0273 в таблице 2б).

Результаты представлены в таблицах 3в и 3г.

Таблица 3в: Аффинность к VEGF указанных антител

Образец	KD (нМ)
Ang2VEGF-0273	6
Ang2VEGF-0274	3
Ang2VEGF-0282	4
Ang2VEGF-0283	4
Ang2VEGF-0284	4
Ang2VEGF-0285	4
Ang2VEGF-0286	4

Таблица 3г: Аффинность к Ang2 указанных антител

Образец	KD (нМ)
Ang2VEGF-0273	15
Ang2VEGF-0274	17
Ang2VEGF-0282	14
Ang2VEGF-0283	15
Ang2VEGF-0284	13
Ang2VEGF-0285	14
Ang2VEGF-0286	12

Все протестированные антитела специфически связывались с обеими мишенями, т.е. Ang2 и VEGF, и величина их аффинности к антигену находилась в наномолярном диапазоне.

Пример 2Г

Стабильность мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF, с обменом/заменой VH/VL-доменов (*CrossMab^{Vh-VL}*) в одном связывающем плече и с единичными заменами

5 заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL

Для оценки стабильности конструкций антител оценивали термостабильность, а также температуры начала агрегации согласно процедуре, изложенной в примере 1Г.

Результаты представлены в таблице 3д.

10 Таблица 3д: Температура начала агрегации (T_{agg}) и температура плавления (T_m) указанных антител

Образец	T_{agg} (°C)	T_m (°C)
Ang2VEGF-0273	56,0	61,3
Ang2VEGF-0274	53,5	58,9
Ang2VEGF-0282	56,9	61,4
Ang2VEGF-0283	56,3	61,0
Ang2VEGF-0284	56,3	61,1
Ang2VEGF-0285	56,3	61,1
Ang2VEGF-0286	56,3	61,6

Пример 3А

Производство и экспрессия мультиспецифических антител, которые связываются с IL-17 и TWEAK, с обменом/заменой VH/VL-доменов (*CrossMab^{Vh-VL}*) в одном связывающем плече и с различными заменами

15 заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL

В качестве первого примера создавали мультиспецифические антитела, которые связываются с человеческим IL-17 и человеческим TWEAK, согласно классическим методикам молекулярной биологии, описанным в разделе «Общие методы», и кратковременно экспрессировали в НЕК293-клетках согласно описанному выше методу. Общая схема указанных соответствующих мультиспецифических антител представлена на фиг. 1А-В. Для сравнения получали также антитела дикого типа (wt) с обменом/заменой VH/VL-доменов, но без замены в поверхности раздела CH1/CL. Мультиспецифические антитела экспрессировали, используя экспрессионные плазмиды, содержащие нуклеиновые кислоты, которые кодируют аминокислотные последовательности, представленные в таблице 4а.

20

25

Таблица 4а: Аминокислотные последовательности легких цепей (LC) и тяжелых цепей (HC) мультиспецифических антител к TWEAK-IL17 TweakIL17-0096, TweakIL17-0097, TweakIL17-0098, TweakIL17-0099, TweakIL17-0100, TweakIL17-0101 с обменом/заменой VH/VL-доменов (*CrossMab*^{Vh-VL}): дикого типа (wt) и с различными комбинациями замен заряженных аминокислот

Антитело	LC IL17	HC IL17	HC TWEAK	LC TWEAK
TweakIL17-0096	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
TweakIL17-0097	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0098	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
TweakIL17-0099	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0100	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0101	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18

Для всех конструкций применяли технологию гетеродимеризации «knobs into holes» с типичной заменой, приводящей к образованию «выступа» (T366W) в первом СН3-домене и соответствующими заменами, приводящими к образованию «впадины» (T366S, L368A и Y407V) во втором СН3-домене (а также интродукцию двух дополнительных остатков цистеина S354C/Y349'C) (которые содержались в соответствующих последовательностях тяжелых цепей (HC), указанных выше).

Пример 3Б

Очистка и характеристика мультиспецифических антител, которые связываются с IL-17 и TWEAK, с обменом/заменой VH/VL-доменов (*CrossMab*^{Vh-VL}) в одном связывающем плече и с различными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL

Мультиспецифические антитела, экспрессия которых описана выше, очищали из супернатанта путем комбинации аффинной хроматографии на белке А и гель-фильтрации. Все мультиспецифические антитела можно получать с высокими выходами, и они являлись стабильными.

Полученные продукты характеризовали в отношении их идентичности с помощью масс-спектрометрии и определяли их аналитические свойства, такие как чистота, которую оценивали с помощью ДСН-ПААГ, содержание мономеров и стабильность.

Масс-спектрометрия

Ожидаемые первичные структуры анализировали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем (ESI-МС) дегликозилированных интактных CrossMab и дегликозилированных/расщепленных плазмином или в другом варианте дегликозилированных/ограниченно расщепленных LysC CrossMab.

VH/VL-CrossMab дегликозилировали с помощью N-гликозидазы F в фосфатном или Трис-буфере при 37°C в течение вплоть до 17 ч при концентрации белка 1 мг/мл. Расщепление плазмином или ограниченное расщепление LysC (фирма Roche) осуществляли, используя 100 мкг дегликозилированных VH/VL-CrossMab в Трис-буфере, pH 8 при комнатной температуре в течение 120 ч и при 37°C в течение 40 мин соответственно. Перед осуществлением масс-спектрометрии образцы обессоливали с помощью ЖХВР на колонке Сефадекс G25 (фирма GE Healthcare). Общую массу определяли с помощью ESI-МС с использованием МС-системы maXis 4G UHR-QTOF, снабженной источником NanoMate TriVersa (фирма Advion).

Результаты представлены в таблице 4б и на фиг. 6а.

Таблица 4б: Снижение содержания основного побочного продукта, полученного в результате бенс-джонсовского взаимодействия, путем единичных замен заряженных аминокислот, предлагаемых в изобретении, в поверхности раздела CH1/CL

	CL IL17 (положение 124)	CL IL17 (положение 123)	CH1 IL17 (положение 147)	CH1 IL17 (положение 213)	CH1 TWEAK	CL TWEAK (положение 124)	Основной побочный продукт (ошибочное спаривание бенс- джонсовского типа) % с помощью МС
TweakIL17-0096	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124	~20%
TweakIL17-0097	Q124K	E123R	K147E	K213E	wt	Q124E	0
TweakIL17-0098	Q124K	E123R	K147E	K213D	wt	wt	0
TweakIL17-0099	Q124K	E123R	K147E	K213D	wt	Q124E	0
TweakIL17-0100	Q124K	E123K	K147E	K213E	wt	Q124E	0
TweakIL17-0101	Q124K	E123K	K147E	K213E	wt	wt	не определяли

Результаты, представленные в таблице 4б и на фиг. 6а, свидетельствуют о том, что с помощью двойных замен заряженных аминокислот на аминокислоты с противоположным зарядом в CH1- и CL-доменах, предлагаемых в изобретении/указанных в настоящем описании (CL:Q124K/E123R и
5 CH1:K147E/K213E; CL:Q124K/E123R и CH1:K147E/K213D; CL:Q124K/E123K и CH1:K147E/K213E), основной побочный продукт (полученный в результате ошибочного спаривания бенс-джонсовского типа) полностью отсутствовал при сравнении с мультиспецифическим антителом дикого типа без указанных замен. Это не зависело от дополнительной единичной замены Q124E в CL-домене
10 другого связывающего плеча, которая не влияла ни на экспрессию, ни на профиль побочных продуктов.

Пример 4А

Производство и экспрессия двухвалентных и трехвалентных мультиспецифических антител, которые связываются с Ang2 и VEGF, где антитела лишены Fc-фрагментов и включают обмен/замену VH/VL-доменов в
15 одном связывающем плече и одну или несколько замен заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL

В качестве дополнительного примера создавали мультиспецифические антитела, которые связываются с человеческим ANG2 и человеческим VEGF, с
20 помощью описанных в разделе «Общие методы» классических методик молекулярной биологии и кратковременно экспрессировали в НЕК293-клетках согласно описанному выше методу. Созданные антитела имели в связывающем плече, специфично связывающемся с VEGF, Fab-фрагмент с обменом VH/VL-доменов и в другом связывающем плече, специфично связывающемся с Ang2,
25 Fab-фрагмент без обмена доменов, при этом в мультиспецифическом антителе отсутствовал Fc-фрагмент. Таким образом, первую легкую цепь получали из антитела, которое специфически связывается с человеческим Ang2 и содержит в направлении от N-конца к C-концу домены VL-CL. Тяжелые цепи первого (анти-Ang2) и второго (анти-VEGF) антитела связывали с помощью глицин-серинового
30 пептидного линкера. В тяжелой цепи антитела, специфически связывающегося с VEGF, исходный переменный домен VH заменяли на переменный домен VL, полученный из антитела к VEGF. Таким образом, полипептид, содержащий тяжелые цепи антител к Ang2 и к VEGF, содержал в направлении от N-конца к

С-концу домены VH(Ang2)-CH1(Ang2)-линкер-VL(VEGF)-CH1(VEGF). В легкой цепи, специфически связывающейся с человеческим VEGF, исходный вариабельный домен VL заменяли на вариабельный домен VH, полученный из антитела к VEGF. Таким образом, модифицированная легкая цепь антитела к EGF содержал в направлении от N-конца к С-концу домены VH-CL. Замены конкретных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL представлены в таблице 5б.

В этом примере создавали мультиспецифические антитела, имеющие три основные структуры:

10 I) двухвалентное мультиспецифическое (биспецифическое) антитело к Ang2-VEGF формата CrossFabV_H-V_L -(Fab) (общая структура представлена на фиг. 7Г);

15 II) трехвалентное мультиспецифическое (биспецифическое) антитело к Ang2-VEGF формата (CrossFabV_H-V_L)₂-Fab (общая структура представлена на фиг. 8В (neu));

III) трехвалентное мультиспецифическое (биспецифическое) антитело к Ang2-VEGF формата (Fab)₂-CrossFabV_H-V_L (общая структура представлена на фиг. 8Г).

20 Для сравнения получали также антитела дикого типа (wt) с обменом/заменой VH/VL-доменов, но без замены в поверхности раздела CH1/CL. Мультиспецифические антитела экспрессировали, используя экспрессионные плазмиды, содержащие нуклеиновые кислоты, которые кодируют аминокислотные последовательности, представленные в таблице 5а.

Таблица 5а: Аминокислотные последовательности легких цепей (LC) и тяжелых цепей (HC) мультиспецифических антител к Ang2-VEGF с обменом/заменой VH/VL-доменов: дикого типа («незаряженные») и с различными комбинациями замен заряженных аминокислот («заряженные»)

Антитело	LC Ang2	HC	LC VEGF
xFab-Fab<ANG2-VEGF>-незаряженное (Ang2VEGF-0452)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 4
xFab-Fab<ANG2-VEGF>-заряженное (Ang2VEGF-0447)	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 4
xFab ₂ -Fab<ANG2-VEGF>-незаряженное (Ang2VEGF-0453)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 4
xFab ₂ -Fab<ANG2-VEGF>-заряженное (Ang2VEGF-0448)	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 4
Fab2-xFab<ANG2-VEGF>-незаряженное	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 4
Fab2-xFab<ANG2-VEGF>-заряженное	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 4

5

Таблица 5б: Аминокислотные замены в поверхности раздела CH1/CL в антителах, предлагаемых в изобретении, которые указаны в таблице 5а

	Ang2				VEGF	
	CL (положение 124)	CL (положение 123)	CH1 (положение 147)	CH1 (положение 213)	CH1	CL (положение 124)
xFab-Fab<ANG2-VEGF>-незаряженное (Ang2VEGF-0452)	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124
xFab-Fab<ANG2-VEGF>-заряженное (Ang2VEGF-0447)	Q124R	E123K	K147E	K123E	wt	Wt
xFab ₂ -Fab<ANG2-VEGF>-незаряженное (Ang2VEGF-0453)	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124
xFab ₂ -Fab<ANG2-VEGF>-заряженное (Ang2VEGF-0448)	Q124R	E123K	K147E	K123E	wt	Wt
Fab2-xFab<ANG2-VEGF>-незаряженное	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124
Fab2-xFab<ANG2-VEGF>-заряженное	Q124R	E123K	K147E	K123E	wt	Wt

Пример 4Б:

Производство и экспрессия двухвалентных и трехвалентных мультиспецифических антител, которые связываются с Ang2 и VEGF, где антитела лишены Fc-фрагментов и включают обмен/замену VH/VL-доменов в одном связывающем плече и различные замены заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL

Секретируемый белок очищали стандартными методами аффинной очистки.

Выходы производства после аффинной очистки и фракция молекулы антитела, определенная с помощью аналитической гель-фильтрации, представлены в таблице 5в.

Таблица 5в: Выход производства и фракция требуемого антитела после аффинной очистки

Антитело	Выход [мг/л]	Фракция [%] антитела, определенная с помощью аналитической ГФ
Ang2VEGF-0452	37,8	64,1
Ang2VEGF-0447	26,7	88,5
Ang2VEGF-0453	4,2	88,5
Ang2VEGF-0448	9,7	92,4

Масс-спектрометрия

Ожидаемые первичные структуры анализировали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем (ESI-МС) дегликозилированных интактных CrossMab и дегликозилированных/расщепленных плазмином или в другом варианте дегликозилированных/ограниченно расщепленных LysC CrossMab.

Конструкции VH/VL Fab-CrossFab дегликозилировали с помощью N-гликозидазы F в фосфатном или Трис-буфере при 37°C в течение вплоть до 17 ч при концентрации белка 1 мг/мл. Расщепление плазмином или ограниченное расщепление LysC (фирма Roche) осуществляли, используя 100 мкг дегликозилированных VH/VL-CrossMab в Трис-буфере, pH 8 при комнатной температуре в течение 120 ч и при 37°C в течение 40 мин соответственно. Перед осуществлением масс-спектрометрии образцы обессоливали с помощью ЖХВР на колонке Сефадекс G25 (фирма GE Healthcare). Общую массу определяли с

помощью ESI-МС с использованием МС-системы maXis 4G UHR-QTOF, снабженной источником NanoMate TriVersa (фирма Advion).

Из-за перекрытия диапазона масс представленного продукта и масс, полученных при создании методами МС, образцы оценивали с помощью двух различных методов для обнаружения потенциальных побочных продуктов в более высоком диапазоне масс. При работе в более высоком диапазоне масс (1000-4000 m/z) метод включал CID (светоизлучающий диод)-напряжение (в данном случае сCID 90), при измерении в более низком диапазоне масс (600-2000) не применяли CID. При применении CID повышался шанс получения фрагментов, которые появлялись в источнике фрагментации в масс-спектрометре.

Результаты представлены в таблице 5г.

Таблица 5г: Результаты количественной оценки побочных продуктов указанных антител по данным МС-анализа относительно требуемой основной молекулы

Антитело	Фракция побочных продуктов [%] по данным МС	Побочный продукт
Ang2VEGF-0452	6%	ошибочно спаренный побочный продукт с двумя легкими цепями VL-CL антитела к Ang2
Ang2VEGF-0447	0	<i>не обнаружен</i>
Ang2VEGF-0453	4,4%; 35,7%	ошибочно спаренный побочный продукт с тремя легкими цепями VL-CL антитела к Ang; ошибочно спаренный побочный продукт с двумя легкими цепями VL-CL антитела к Ang и одной цепью VH-CL антитела к VEGF
Ang2VEGF-0448	0	<i>не обнаружен</i>

Пример 4В:

Антигенсвязывающие свойства двухвалентных и трехвалентных мультиспецифических антител, которые связываются с ANG2 и VEGF, где антитела лишены Fc-фрагментов и включают обмен/замену VH/VL-доменов в одном связывающем плече и различные замены заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL

Связывание мультиспецифических антител, описанных выше в примерах 4А и 4Б, с соответствующими антигенами-мишенями, т.е. ANG2 и VEGF, оценивали с помощью Biacore®.

Связывание с VEGF оценивали согласно следующей процедуре:

Связывание указанных антител с человеческим VEGFA-121 изучали с помощью поверхностного плазмонного резонанса, используя устройство BIACORE® T200 (фирма GE Healthcare). Для этой цели 50 RU VEGFA-121-His сшивали с C1-чипом серий S (фирма GE Healthcare BR-1005-35) при pH 5,0, применяя набор для аминного сочетания, поставляемый фирмой GE Healthcare. Буфер HBS-N (10мМ HEPES, 150мМ NaCl, pH 7,4, фирма GE Healthcare) применяли в качестве подвижного буфера при осуществлении процедуры иммобилизации. При последующей характеристике кинетики буфер для образца и подвижный буфер представлял собой 3ФР-Т (10мМ забуференный фосфатом физиологический раствор, включающий 0,05% Твин 20), pH 7,4. Температуру проточной ячейки устанавливали на 25°C, а температуру блока для образца устанавливали на 12°C и прямировали дважды, используя подвижный буфер, перед осуществлением характеристики кинетики.

Ассоциацию измеряли путем инъекции указанных антител в различных концентрациях в растворе в течение 180 с при скорости потока 30 мкл/мин, начиная с 100нМ, осуществляя серийные разведения 1:3. Мониторинг фазы диссоциации осуществляли в течение промежутка времени, составляющего вплоть до 300 с, и ее запускали путем замены раствора образца на подвижный буфер. Поверхность регенерировали путем 60-секундной промывки с помощью 0,85% раствора H₃PO₄ (фосфорная кислота) при скорости потока 30 мкл/мин. Все различия в коэффициентах преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного от поверхности, покрытой антителом к His. Вычитали также данные, полученные при осуществлении контрольных «пустых» инъекций (двойной контроль). Для расчета величины K_D и других кинетических параметров применяли модель 1:1 Лэнгмюра.

Связывание Ang-2 оценивали согласно следующей процедуре:

Связывание указанных антител с человеческим Ang-2-RBD-Fc изучали с помощью поверхностного плазмонного резонанса, используя устройство BIACORE® T200 (фирма GE Healthcare). Примерно 8000 (RU) козьего античеловеческого F(ab')₂ (10 мкг/мл античеловеческого F(ab')₂; код заказа: 28958325; фирма GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция) сшивали с CM5-чипом серий S (фирма GE Healthcare, BR-1005-30) при pH 5,0, применяя набор для

аминного сочетания, поставляемый фирмой GE Healthcare. Буфер HBS-N (10мМ HEPES, 150мМ NaCl, pH 7,4, фирма GE Healthcare) применяли в качестве подвижного буфера при осуществлении процедуры иммобилизации. При последующей характеристике кинетики буфер для образца и подвижный буфер представлял собой ЗФР-Т (10мМ забуференный фосфатом физиологический раствор, включающий 0,05% Твин 20), pH 7,4. Температуру проточной ячейки устанавливали на 25°C, а температуру блока для образца устанавливали на 12°C и протирывали дважды, используя подвижный буфер перед осуществлением характеристики кинетики.

10 Биспецифическое антитело «захватывали» путем инъекции раствора с концентрацией 5нМ в течение 25 с при скорости потока 5 мкл/мин. Ассоциацию измеряли путем инъекции человеческого Ang2-RBD-Fc в различных концентрациях в растворе в течение 120 с при скорости потока 30 мкл/мин, начиная с 100нМ, осуществляя серийные разведения 1:3. Мониторинг фазы диссоциации осуществляли в течение промежутка времени, составляющего вплоть до 180 с, и ее запускали путем замены раствора образца на подвижный буфер. Поверхность регенерировали путем 60-секундной промывки с помощью раствора глицина, pH 2,1 при скорости потока 30 мкл/мин. Все различия в коэффициентах преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного от поверхности, покрытой козьим античеловеческим F(ab')₂. Вычитали также данные, полученные при осуществлении контрольных «пустых» инъекций (двойной контроль). Для расчета кажущейся величины K_D и других кинетических параметров применяли модель 1:1 Лэнгмюра.

Результаты представлены в таблицах 5д и 5е.

25 Таблица 5д: Аффинность к VEGF указанных антител

Антитело	KD (нМ)
Ang2VEGF-0452	0,35
Ang2VEGF-0447	0,36
Ang2VEGF-0453	0,22
Ang2VEGF-0448	0,18

Таблица 5е: Аффинность к Ang2 указанных антител

Антитело	KD (нМ)
Ang2VEGF-0452	3
Ang2VEGF-0447	3
Ang2VEGF-0453	5
Ang2VEGF-0448	4

Связывание с антигеном не нарушалось мутациями, интродуцированными в поверхность раздела CH1/CL антител, у которых отсутствует Fc.

5 Пример 5А:

Производство и экспрессия мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF с обменом/заменой VH/VL-доменов (*CrossMab^{Vh-VL}*) в VEGF-связывающем плече и с различными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL в VEGF-связывающем плече

10 В качестве дополнительного примера создавали мультиспецифические антитела, которые связываются с человеческим ангиопоэтином-2 (ANG2) и человеческим VEGF, с помощью описанных в разделе «Общие методы» классических методик молекулярной биологии и кратковременно
15 экспрессировали в НЕК293-клетках согласно описанному выше методу. Общая схема указанных соответствующих мультиспецифических антител представлена на фиг. 1Б, на которой продемонстрировано, что замена различных заряженных аминокислот присутствует в поверхности раздела CH1/CL связывающего плеча, которое содержит обмен/замену VH/VL-доменов. Для сравнения получали также
20 антитела дикого типа (wt) с обменом/заменой VH/VL-доменов, но без замены в поверхности раздела CH1/CL. Мультиспецифические антитела экспрессировали, используя экспрессионные плазмиды, содержащие нуклеиновые кислоты, которые кодируют аминокислотные последовательности, представленные в таблице 6а.

Таблица 6а: Аминокислотные последовательности легких цепей (LC) и тяжелых цепей (HC) мультиспецифических антител к *Ang2-VEGF* Ang2VEGF-0273, Ang2VEGF-0425 и Ang2VEGF-0424 с обменом/заменой VH/VL-доменов (*CrossMab*^{Vh-VL}): дикого типа (wt) и с различными комбинациями замен

5 заряженных аминокислот

Антитело	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0425	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45
Ang2VEGF-0424	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 47

Для всех конструкций применяли технологию гетеродимеризации «knobs into holes» с типичной заменой, приводящей к образованию «выступа» (T366W) в первом CH3-доме и соответствующими заменами, приводящими к образованию «впадины» (T366S, L368A и Y407V) во втором CH3-доме (а также интродукцию двух дополнительных остатков цистеина S354C/Y349'C) (которые содержались в соответствующих последовательностях тяжелых цепей (HC), указанных выше).

15 Пример 5Б

Очистка и характеристика мультиспецифических антител, которые связываются с ангиопоэтином-2 (ANG2) и VEGF с обменом/заменой VH/VL-доменов (*CrossMab*^{Vh-VL}) в одном связывающем плече и с различными заменами заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL

Мультиспецифические антитела, экспрессия которых описана выше, очищали из супернатанта путем комбинации аффинной хроматографии на белке А и гель-фильтрации. Все мультиспецифические антитела можно получать с высокими выходами, и они являлись стабильными.

Полученные продукты характеризовали в отношении их идентичности с помощью масс-спектрометрии и определяли их аналитические свойства, такие как чистота, которую оценивали с помощью ДСН-ПААГ, содержание мономеров и стабильность.

Масс-спектрометрия

Ожидаемые первичные структуры анализировали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем (ESI-МС) дегликозилированных интактных CrossMab и дегликозилированных/расщепленных плазмином или в

другом варианте дегликозилированных/ограниченно расщепленных LysC CrossMab.

VH/VL-CrossMab дегликозилировали с помощью N-гликозидазы F в фосфатном или Трис-буфере при 37°C в течение вплоть до 17 ч при концентрации белка 1 мг/мл. Расщепление плазмином или ограниченное расщепление LysC (фирма Roche) осуществляли, используя 100 мкг дегликозилированных VH/VL-CrossMab в Трис-буфере, pH 8 при комнатной температуре в течение 120 ч и при 37°C в течение 40 мин соответственно. Перед осуществлением масс-спектрометрии образцы обессоливали с помощью ЖХВР на колонке Сефадекс G25 (фирма GE Healthcare). Общую массу определяли с помощью ESI-МС с использованием МС-системы maXis 4G UHR-QTOF, снабженной источником NanoMate TriVersa (фирма Advion).

Результаты представлены в таблице 6б.

Таблица 6б: Профиль побочного продукта, полученного (в результате бенс-джонсовского взаимодействия) путем единичных замен заряженных аминокислот в поверхности раздела CH1/CL в связывающем плече, которое содержит обмен/замену VH/VL-доменов

	CL ANG-2	CH1 ANG-2	CH1 VEGF	CL VEGF	Требуемая молекула	Основной побочный продукт (ошибочное спаривание бенс-джонсовского типа) % с помощью МС
Ang2VEGF-0273	wt (каппа)	wt	wt K147 K213	wt E123 Q124	<i>n.d.</i>	~20%
Ang2VEGF-0425	wt	wt	K147E	Q124K	72%	22%
Ang2VEGF-0424	wt	wt	K147E K213E	E123K Q124K	64%	26%

Результаты, представленные в таблице 6б, продемонстрировали, что профиль побочного продукта (включая продукт, полученный в результате ошибочного спаривания бенс-джонсовского типа) не удалось улучшить для биспецифических антител к Ang2-VEGF с аминокислотными заменами в поверхности раздела CH1/CL, локализованными в связывающем плече, которое содержит обмен/замену VH/VL-доменов.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ
- <120> МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА
- <130> P32061-WO
- <150> EP 14163165.5
- <151> 2014-04-02
- <150> EP 14179034.5
- <151> 2014-07-30
- <160> 47
- <170> PatentIn, версия 3.5
- <210> 1
- <211> 215
- <212> PRT
- <213> Искусственная
- <220>
- <223> легкая цепь (LC) <Ang-2> дикого типа (wt)
- <400> 1

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> 2
<211> 457
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> тяжелая цепь (HC) <Ang-2> дикого типа (wt)

<400> 2

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
450 455

<210> 3

<211> 437

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt)

<400> 3

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
 435

<210> 4
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> легкая цепь (LC) <VEGF> с VH-VL обменом дикого типа (wt)

<400> 4

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> 5

<211> 215

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> легкая цепь (LC) <Ang-2> с Q124K-заменой

<400> 5

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 Lys 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> 6

<211> 457

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с K147E-заменой

<400> 6

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 Glu 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
450 455

<210> 7

<211> 457

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с K213E-заменой

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser 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

Glu 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
 450 455

<210> 8
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> легкая цепь (LC) <Ang-2> с E123K-заменой

<400> 8

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

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

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

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

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

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

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys 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> 9

<211> 215

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> легкая цепь (LC) <Ang-2> с Q124K-заменой и E123K-
заменой

<400> 9

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 Lys Lys 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> 10
<211> 457
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с K147E-заменой и K213E-
заменой

<400> 10

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 Glu 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

Glu 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
450 455

<210> 11

<211> 215

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> легкая цепь (LC) <Ang-2> с Q124R-заменой и E123K-
заменой

<400> 11

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 Lys Arg 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> 12

<211> 230

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> легкая цепь (LC) <VEGF> с Q124E-заменой

<400> 12

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 Glu 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> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> легкая цепь (LC) <Ang-2> с E124K-заменой и E123K-заменой

<400> 13

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 Pro Lys
 100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Lys Lys Leu Gln
 115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
 195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210

<210> 14
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с K147E-заменой и K213D-заменой

<400> 14

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 Glu 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

Asp 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
450 455

<210> 15

<211> 219

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> легкая цепь (LC) <IL-17> дикого типа (wt)

<400> 15

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 Val His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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 Ser Gln Thr
85 90 95

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 16

<211> 446

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) <IL-17> дикого типа (wt)

<400> 16

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 Leu Asp Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu

340

345

350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

<210> 17

<211> 438

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) <TWEAK> с VH-VL-обменом дикого типа (wt)

<400> 17

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Ala Tyr Tyr Asn Ser Arg
85 90 95

Pro Asp Thr Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
 115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
 180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 210 215 220

Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr
 340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435

<210> 18

<211> 227

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> легкая цепь (LC) <TWEAK> с VH-VL-обменом дикого типа (wt)

<400> 18

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

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

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

Gly Thr Val Tyr Val Arg Gln Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Asn Tyr Asp Asp Ala Phe Val Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
115 120 125

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser

130

135

140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
165 170 175

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
180 185 190

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
210 215 220

Gly Glu Cys
225

<210> 19

<211> 219

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> легкая цепь (LC) <IL-17> с Q124K-заменой и E123R-
заменой

<400> 19

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 Val His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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 Ser Gln Thr
85 90 95

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg
115 120 125

Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 20

<211> 446

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) <IL-17> с K147E-заменой и K213E-заменой

<400> 20

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 Leu Asp Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

<210> 21

<211> 227

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> легкая цепь (LC) <TWEAK> с Q124E-заменой

<400> 21

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

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

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

Gly Thr Val Tyr Val Arg Gln Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Asn Tyr Asp Asp Ala Phe Val Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val

115

120

125

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Glu Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
165 170 175

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
180 185 190

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
210 215 220

Gly Glu Cys
225

<210> 22

<211> 446

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) <IL-17> с K147E-заменой и K213D-заменой

<400> 22

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 Leu Asp Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Asp Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

<210> 23

<211> 219

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> легкая цепь (LC) <IL-17> с Q124K-заменой и E123K-
заменой

<400> 23

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 Val His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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 Ser Gln Thr
85 90 95

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys
115 120 125

Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 24

<211> 120

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> переменный домен тяжелой цепи VH <TWEAK > 305-HC4

<400> 24

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

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

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

Gly Thr Val Tyr Val Arg Gln Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Asn Tyr Asp Asp Ala Phe Val Ile Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25

<211> 111

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> переменный домен легкой цепи VL <TWEAK>305-LC2

<400> 25

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Ala Tyr Tyr Asn Ser Arg
85 90 95

Pro Asp Thr Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 26

<211> 121

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> переменный домен тяжелой цепи VH <IL-17> HC136

<400> 26

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 Leu Asp Ser Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> вариабельный домен легкой цепи VL <IL-17> LC136

<400> 27

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 Val His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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 Ser Gln Thr
85 90 95

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

<210> 28

<211> 440

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) <TWEAK> с VH-VL-обменом дикого типа (wt)
(содержащая концевой дипептид GK)

<400> 28

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Ala Tyr Tyr Asn Ser Arg
85 90 95

Pro Asp Thr Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 29

<211> 448

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) <IL-17> с K147E-заменой и K213E-заменой (содержащая концевой дипептид GK)

<400> 29

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 Leu Asp Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245

250

255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 30

<211> 448

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) <IL-17> с K147E-заменой и K213D-
заменой (содержащая концевой содержащая концевой дипептид GK)

<400> 30

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 Leu Asp Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Asp Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 31

<211> 459

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) <Ang-2> дикого типа (wt) (содержащая концевой дипептид GK)

<400> 31

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> 32

<211> 439

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt)
(содержащая концевой дипептид GK)

<400> 32

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> 33

<211> 459

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с K147E-заменой (содержащая концевой дипептид GK)

<400> 33

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 Glu 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> 34
<211> 459
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с K213E-заменой (содержащая концевой дипептид GK)

<400> 34

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

Glu 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> 35

<211> 459

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с K147E-заменой и K213E-
заменой (содержащая концевой дипептид GK)

<400> 35

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 Glu 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

Glu 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> 36

<211> 459

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) <Ang-2> с K147E-заменой и K213D-
заменой (содержащая концевой дипептид GK)

<400> 36

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 Glu 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

Asp 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> 37
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> тяжелая цепь (HC) <IL-17> дикого типа (wt) (содержащая концевой дипептид GK)

<400> 37

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 Leu Asp Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu

65

70

75

80

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

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

325

330

335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 38

<211> 688

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) Fab2-CrossFab, включающая две тяжелые цепи (HC) <Ang-2> дикого типа (wt), сцепленные с одной тяжелой цепью (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt) через глицин-сериновые линкеры

<400> 38

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 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
 225 230 235 240

Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
 245 250 255

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met
 260 265 270

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp
 275 280 285

Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly
 290 295 300

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 305 310 315 320

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 325 330 335

Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly

340

345

350

Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
 355 360 365

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 370 375 380

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 385 390 395 400

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 405 410 415

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 420 425 430

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 435 440 445

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 450 455 460

Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
 465 470 475 480

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
 485 490 495

Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr
 500 505 510

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser
 515 520 525

Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 530 535 540

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 545 550 555 560

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln
 565 570 575

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 580 585 590

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

595

600

605

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
610 615 620

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
625 630 635 640

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
645 650 655

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
660 665 670

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
675 680 685

<210> 39

<211> 688

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) Fab2-CrossFab, включающая две тяжелые цепи (HC) <Ang-2> с K147E- и K213E-заменами, сцепленные с одной тяжелой цепью (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt) через глицин-сериновые линкеры

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

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

115

120

125

Ser 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 Glu 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

Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
 225 230 235 240

Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
 245 250 255

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met
 260 265 270

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp
 275 280 285

Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly
 290 295 300

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 305 310 315 320

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 325 330 335

Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly
 340 345 350

Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
 355 360 365

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser

370

375

380

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe
385 390 395 400

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
405 410 415

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
420 425 430

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
435 440 445

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys
450 455 460

Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
465 470 475 480

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
485 490 495

Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr
500 505 510

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser
515 520 525

Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
530 535 540

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
545 550 555 560

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln
565 570 575

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
580 585 590

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
595 600 605

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
610 615 620

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

625 630 635 640
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 645 650 655
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 660 665 670
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 675 680 685

 <210> 40
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> тяжелая цепь (HC) CrossFab-Fab, включающая одну тяжелую цепь (HC) <VEGF>
 с VH-VL-обменом дикого типа (wt), сцепленную с одной тяжелой цепью (HC) <Ang-2>
 дикого типа (wt) через глицин-сериновые линкеры

 <400> 40
 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	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	
	210					215					220					
Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	
225					230					235					240	
Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	
				245					250					255		
Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	
			260					265					270			
Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	
			275				280					285				
Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	
	290					295					300					
Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Pro	Asn	Pro	
305					310					315					320	
Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile	
				325					330					335		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	
			340					345					350			
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	
		355				360						365				
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	
	370					375					380					
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	
385					390					395					400	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	

405

410

415

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 420 425 430

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 435 440 445

Ser Cys
 450

<210> 41

<211> 450

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) CrossFab-Fab, включающая одну тяжелую цепь (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt), сцепленную с одной тяжелой цепью (HC) <Ang-2> с K147E- и K213E-заменами через глицин-сериновые линкеры

<400> 41

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 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu
 210 215 220

Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys
 225 230 235 240

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg
 245 250 255

Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn
 260 265 270

Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met
 275 280 285

Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu
 290 295 300

Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro
 305 310 315 320

Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile
 325 330 335

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 340 345 350

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 355 360 365

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 370 375 380

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 385 390 395 400

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val

405

410

415

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
420 425 430

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys
435 440 445

Ser Cys
450

<210> 42

<211> 667

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) CrossFab2-Fab, включающая две тяжелые цепи (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt), сцепленные с одной тяжелой цепью (HC) <Ang-2> дикого типа (wt) через глицин-сериновые линкеры

<400> 42

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 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
 210 215 220

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 225 230 235 240

Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
 245 250 255

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu
 260 265 270

His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 275 280 285

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 290 295 300

Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 305 310 315 320

Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 325 330 335

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 340 345 350

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 355 360 365

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 370 375 380

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 385 390 395 400

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 405 410 415

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly
420 425 430

Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
435 440 445

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
450 455 460

Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
465 470 475 480

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala
485 490 495

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
500 505 510

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
515 520 525

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly
530 535 540

Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
545 550 555 560

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
565 570 575

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
580 585 590

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
595 600 605

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
610 615 620

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
625 630 635 640

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
645 650 655

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
660 665

<210> 43
<211> 667
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> тяжелая цепь (HC) CrossFab2-Fab, включающая две тяжелые цепи (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом дикого типа (wt), сцепленные с одной тяжелой цепью (HC) <Ang-2> с K147E- и K231E-заменами через глицин-сериновые линкеры

<400> 43

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

Asp Arg Val 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 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
210 215 220

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
225 230 235 240

Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
245 250 255

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu
260 265 270

His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
275 280 285

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
290 295 300

Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
305 310 315 320

Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
325 330 335

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
340 345 350

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
355 360 365

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
370 375 380

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
385 390 395 400

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
405 410 415

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly
420 425 430

Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
435 440 445

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
450 455 460

Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
465 470 475 480

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala
485 490 495

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
500 505 510

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
515 520 525

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly
530 535 540

Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
545 550 555 560

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
565 570 575

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
580 585 590

Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
595 600 605

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
610 615 620

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
625 630 635 640

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
645 650 655

Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
660 665

<210> 44

<211> 439

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом с K147E-
заменой

<400> 44

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 Glu 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> 45

<211> 230

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> легкая цепь (LC) <VEGF> с VH-VL-обменом с Q124K-
заменой

<400> 45

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 Lys 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> 46

<211> 439

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь (HC) <VEGF> с VH-VL-обменом с K147E, и K213E-заменой

<400> 46

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 Glu 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 Glu 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> 47

<211> 230

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> легкая цепь (LC) <VEGF> с VH-VL обменом с E123K, и Q124K-
заменой

<400> 47

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly 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 Lys Lys 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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мультиспецифическое антитело, содержащее:

5 а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном, и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга; и

10 в котором

I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в котором в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в
15 положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); или

II) в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R)
20 или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в котором в константном домене CH1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

25

2. Мультиспецифическое антитело, содержащее:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое
30 специфически связывается со вторым антигеном, и в котором переменные домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела заменены друг на друга; и

в котором

в константном домене СL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K) или аргинин (R) (нумерация согласно Кэботу) и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или
5 аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

3. Мультиспецифическое антитело по п. 1 или п. 2,
в котором в константном домене СL первой легкой цепи, указанной в
10 подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

15 4. Мультиспецифическое антитело по п. 2,
в котором в константном домене СL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном
20 предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и аминокислота в положении 123 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 заменена независимо на
25 глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

30 5. Мультиспецифическое антитело по п. 1,
в котором в константном домене СL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном

предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в котором в константном домене СН1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

6. Мультиспецифическое антитело по п. 2, в котором в константном домене СL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена на лизин (K) (нумерация согласно Кэботу) и аминокислота в положении 123 заменена на лизин (K) (нумерация согласно Кэботу)

и в котором в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

7. Антитело по одному из предыдущих пунктов, **отличающееся тем**, что первый СН3-домен первой тяжелой цепи антитела, указанной в подпункте а), и второй СН3-домен тяжелой цепи антитела, указанной в подпункте б), каждый соприкасается друг с другом на поверхности раздела, которая представляет собой исходную поверхность раздела между СН3-доменами антитела,

при этом указанная поверхность раздела изменена для стимулирования формирования мультиспецифического антитела, где изменение отличается тем, что:

1) СН3-домен одной тяжелой цепи изменен так, что на исходной поверхности раздела СН3-домена одной тяжелой цепи, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела СН3-домена другой тяжелой цепи в мультиспецифическом антителе,

аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет бо́льшую по объему боковую цепь, с образованием в результате этого выпуклости на поверхности раздела СН3-домена одной тяжелой цепи, которая

может помещаться в полость в поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи,

и

II) СНЗ-домен другой тяжелой цепи изменен

5 так, что на исходной поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи в мультиспецифическом антителе,

аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, с образованием в результате этого 10 полости в поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи, в которую может помещаться выпуклость на поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи.

8. Антитело по п. 7, **отличающееся тем**, что

15 указанный аминокислотный остаток, имеющий больший объем боковой цепи, выбран из группы, состоящей из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y) и триптофана (W), а указанный аминокислотный остаток, имеющий меньший объем боковой цепи, выбран из группы, состоящей из аланина (A), серина (S), треонина (T) и валина (V).

20 9. Антитело по п. 7 или п. 8, **отличающееся тем**, что оба СНЗ-домена дополнительно изменены путем интродукции цистеина (C) в качестве аминокислоты в соответствующие положения каждого СНЗ-домена таким образом, чтобы мог образоваться дисульфидный мостик между обоими 25 СНЗ-доменами.

10. Мультиспецифическое антитело по одному из предыдущих пунктов, которое специфически связывается с человеческим TWEAK и которое специфически связывается с человеческим IL17, где

30 А) мультиспецифическое антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий SEQ ID NO:24, и переменный домен легкой цепи (VL), имеющий SEQ ID NO:25; и

Б) мультиспецифическое антитело содержит

вариабельный домен тяжелой цепи (VH), имеющий SEQ ID NO:26, и
вариабельный домен легкой цепи (VL), имеющий SEQ ID NO:27.

11. Способ получения мультиспецифического антитела по одному из п.п. 1-
5 10, включающий стадии, на которых
- А) трансформируют клетку-хозяина векторами, которые содержат
молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют
- а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь первого антитела, которое
специфически связывается с первым антигеном; и
- 10 б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь второго антитела, которое
специфически связывается со вторым антигеном, и в котором вариабельные
домены VL и VH во второй легкой цепи и второй тяжелой цепи второго антитела
заменены друг на друга; и
в котором
- 15 I) в константном домене CL первой легкой цепи, указанной в подпункте а),
аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R)
или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном
варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R))
и в котором в константном домене CH1 первой тяжелой цепи, указанной в
20 подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении
213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую
кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); или
- II) в константном домене CL второй легкой цепи, указанной в подпункте б),
аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R)
25 или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном
варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R))
и в котором в константном домене CH1 второй тяжелой цепи, указанной в
подпункте б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении
213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую
30 кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота);
- Б) культивируют клетку-хозяина в условиях, обеспечивающих синтез
указанной молекулы антитела; и
- В) выделяют указанную молекулу антитела из указанной культуры.

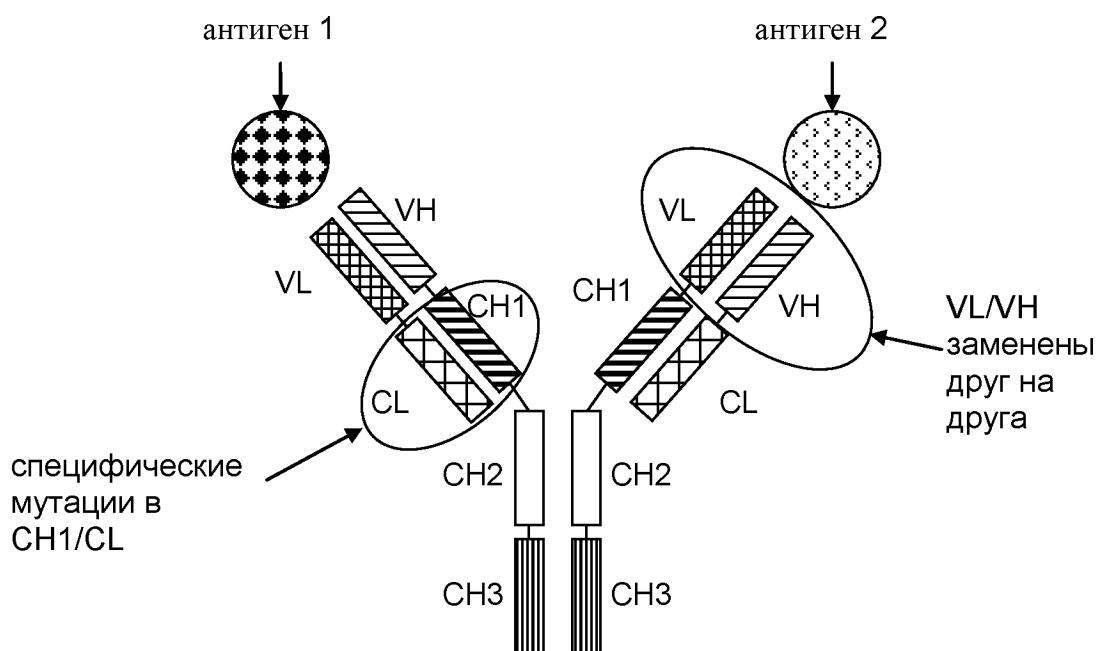
12. Нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотные последовательности мультиспецифического антитела по одному из п.п. 1-10.

5 13. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 12, который обладает способностью экспрессировать указанную нуклеиновую кислоту в клетке-хозяине.

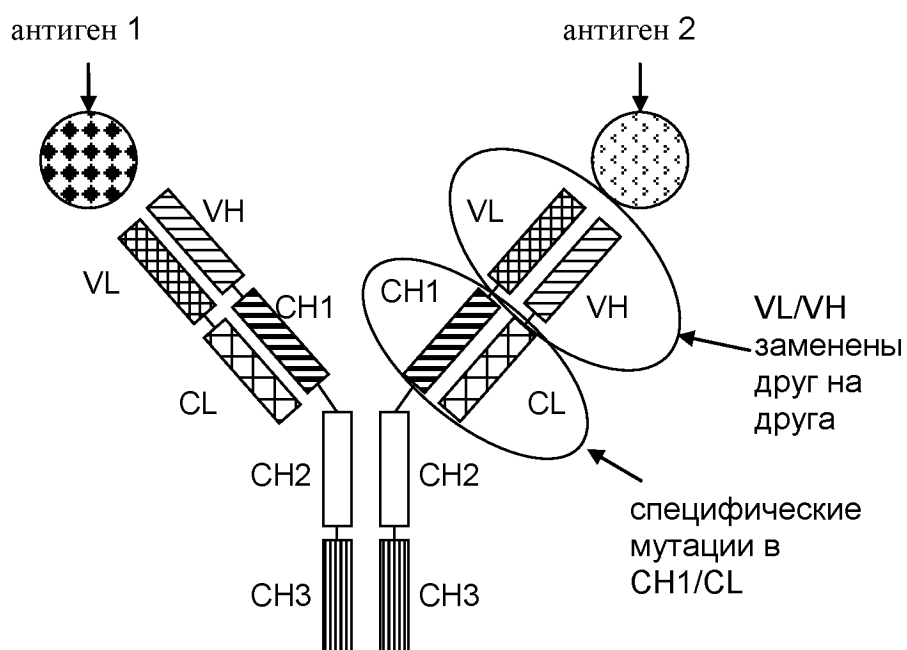
14. Композиция, содержащая антитело по одному из п.п. 1-10.

10 15. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по одному из п.п. 1-10 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

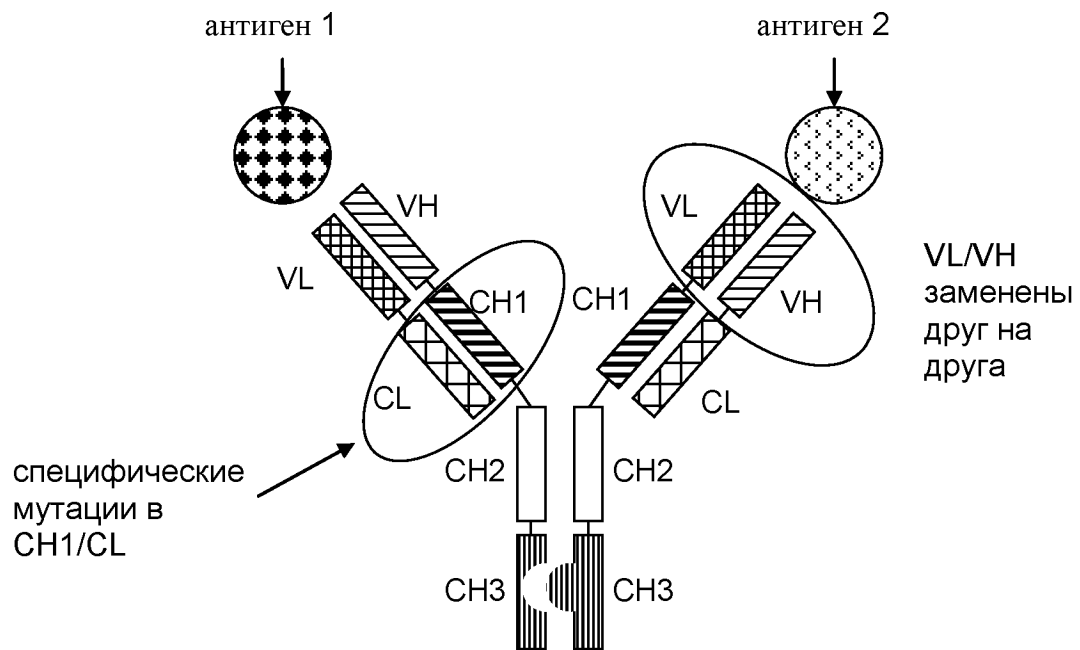
Фиг. 1А



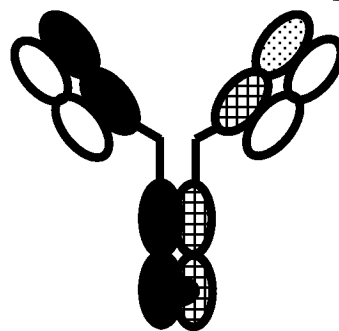
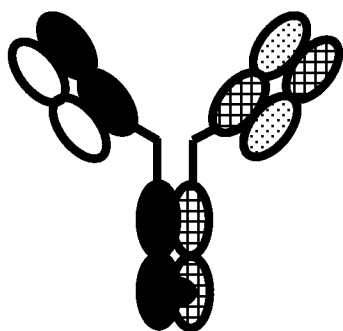
Фиг. 1Б



Фиг. 1В



Фиг. 2А







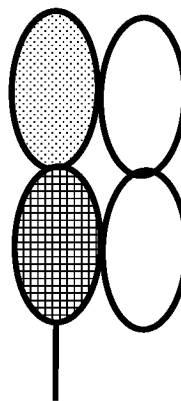
требуемое биспецифическое
антитело с обменом/заменой VH-
VL в одном из связывающих
плечей

основной побочный продукт:
результат бенс-джонсовского
взаимодействия «скрещенной»
НС с «нескрещенной» LC

	антиген 1	антиген 2
домены НС		
домены LC		

Фиг. 2Б

	антиген 1	антиген 2
домены HC		
домены LC		

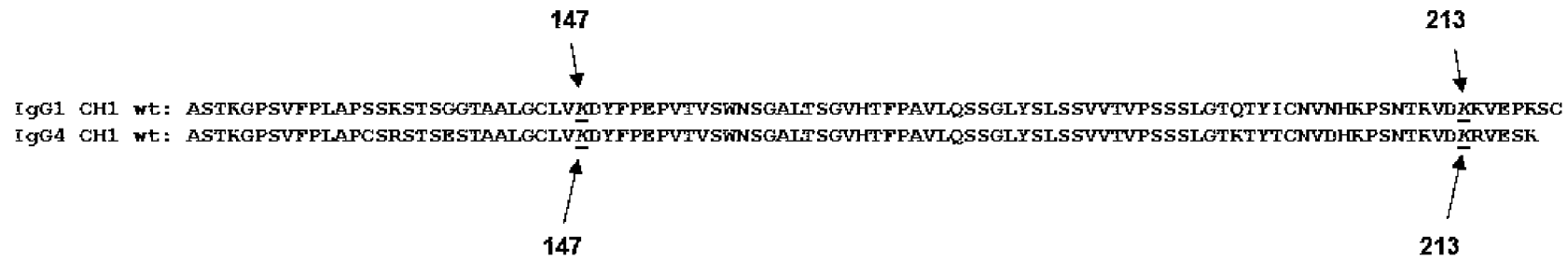


слабое бенс-джонсоновское взаимодействие VL-VL

сильное взаимодействие CH1-CK дикого типа

результат бенс-джонсовского взаимодействия «скрещенной» HC с «нескрещенной» LC

Фиг. 3А



Фиг. 3Б

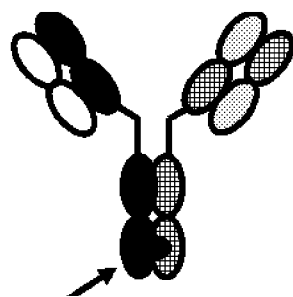


Фиг. 3В

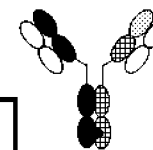


Фиг. 4А

ANG-2 VEGF
«нескрещенные» «скрещенные»

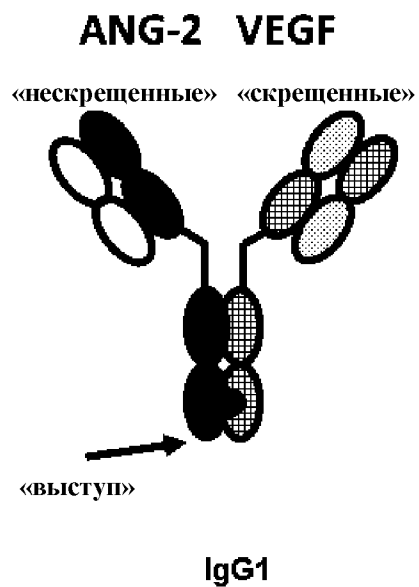


IgG1



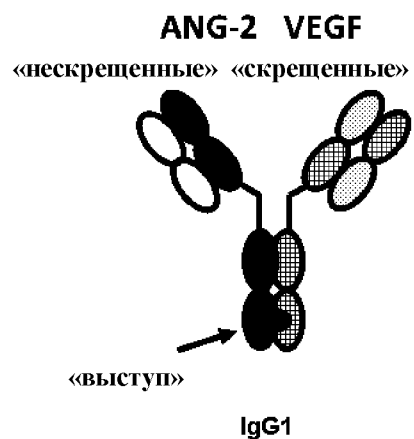
	изо-тип CL	без VH/VL-обмена – «нескрещенные»				с VH/VL-обменом – «скрещенные»			% ошибочного спаривания бенс-джонс. типа (VH-CH1/VL-CL-спаривание) (кол-во антител с 2 ANG2-LC) по данным МС
		CL ANG-2 (полож. 124)	CL ANG-2 (полож. 123)	CH1 ANG-2 (полож. 147)	CH1 ANG-2 (полож. 213)	изотип CL	CH1 VEGF	CL VEGF	
Ang2VEGF-0273	каппа	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	каппа	wt	wt	~20
Ang2VEGF-0396	каппа	Q124K	wt	K147E	wt	каппа	wt	wt	~3
Ang2VEGF-0397	каппа	Q124K	wt	wt	K213E	каппа	wt	wt	~3
Ang2VEGF-0394	каппа	wt	E123K	K147E	wt	каппа	wt	wt	~15
Ang2VEGF-0395	каппа	wt	E123K	wt	K213E	каппа	wt	wt	~15

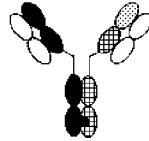
Фиг. 4Б



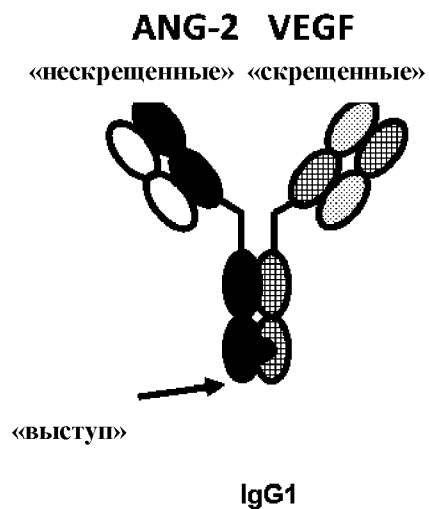
	без VH/XL-обмена – «нескрещенные»		с VH/VL-обменом – «скрещенные»	
	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0396	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0397	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0394	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0395	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4

Фиг. 5А



	без VH/VL-обмена – «нескрещенные»					с VH/VL-обменом – «скрещенные»			 % ошибочного спаривания бес-джонс. типа (VL/CH1/VL-CL-спаривание) (кол-во антитела с 2Ang2-LC) по данным МС
	изотип CL	CL ANG-2	CL ANG-2	CH1 ANG-2	CH1 ANG-2	изотип CL	CH1 VEGF	CL VEGF	
Ang2VEGF-0273	каппа	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	каппа	wt	wt: Q124	~20%
Ang2VEGF-0274	каппа	Q124K	E123K	K147E	K213E	каппа	wt	wt	0
Ang2VEGF-0282	каппа	Q124R	E123K	K147E	K213E	каппа	wt	Q124E	0
Ang2VEGF-0283	лямбда (лямбда wt E124/ E123)	E124K	E123K	K147E	K213E	каппа	wt	wt:	0
Ang2VEGF-0284	каппа	Q124R	E123K	K147E	K213D	каппа	wt	wt	0
Ang2VEGF-0285	каппа	Q124R	E123K	K147E	K213D	каппа	wt	Q124E	0
Ang2VEGF-0286	каппа	Q124K	E123K	K147E	K213E	каппа	wt	Q124E	0

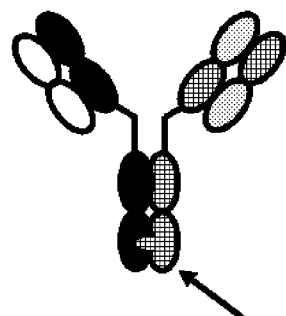
Фиг. 5Б



	без VH/VL-обмена – «нескрещенные»		с VH/VL-обменом – «скрещенные»	
	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0274	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0282	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12
Ang2VEGF-0283	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0284	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0285	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12
Ang2VEGF-0286	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12

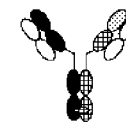
Фиг. 6А

IL17 «нескрещенный» Tweak «скрещенный»



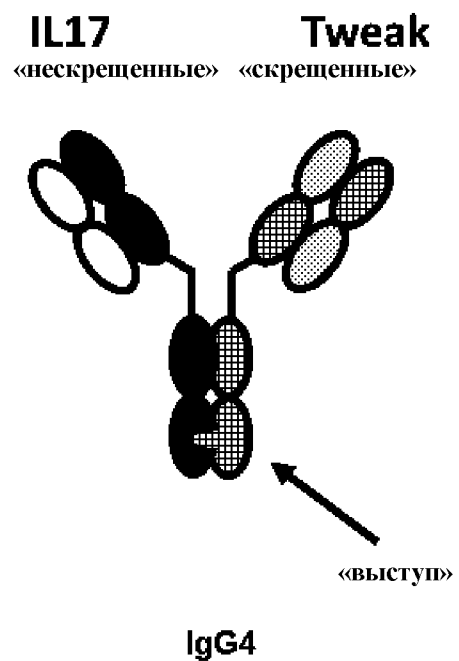
«ВЫСТУП»

IgG4

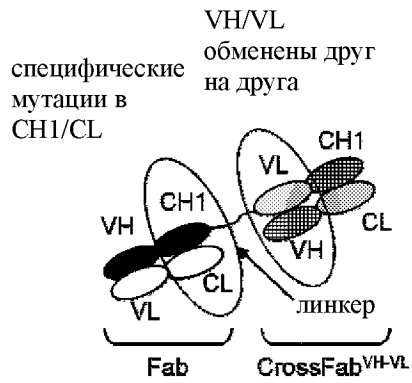


	изотип CL	без VH/VL-обмена – «нескрещенные»				с VH/VL-обменом – «скрещенные»			% ошибочного спаривания бенс-джонс. типа (VL-VL/VL-CL-спаривание) (кол-во антигел с2 IL17-LC) по данным МС
		CL IL17 (полож. 124)	CL IL17 (полож. 123)	CH1 IL17 (полож. 147)	CH1 IL17 (полож. 213)	изотип CL	CH1 TWEAK	CL TWEAK (полож. 124)	
TweakIL 17-0096	каппа	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	каппа	wt	wt: Q124	<u>~20%</u>
TweakIL 17-0097	каппа	Q124K	E123R	K147E	K213E	каппа	wt	Q124E	0
TweakIL 17-0098	каппа	Q124K	E123R	K147E	K213D	каппа	wt	wt	0
TweakIL 17-0099	каппа	Q124K	E123R	K147E	K213D	каппа	wt	Q124E	0
TweakIL 17-0100	каппа	Q124K	E123K	K147E	K213E	каппа	wt	Q124E	0
TweakIL 17-0101	каппа	Q124K	E123K	K147E	K213E	каппа	wt	wt	не опред.

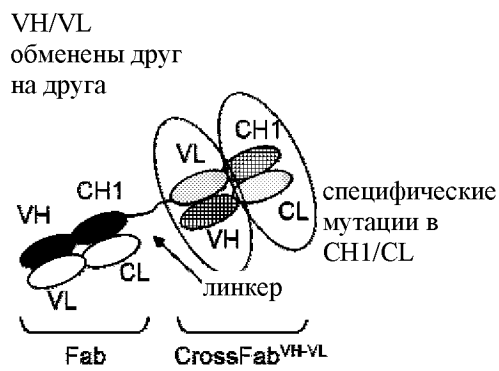
Фиг. 6Б



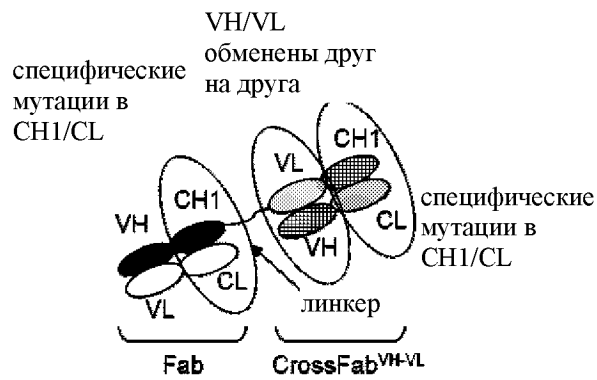
	без VH/VL-обмена «нескрещенные»		с VH/VL-обменом – «скрещенные»	
	LC IL17	HC IL17	HC Tweak	LC Tweak
TweakIL17-0096	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
TweakIL17-0097	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0098	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
TweakIL17-0099	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0100	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0101	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18



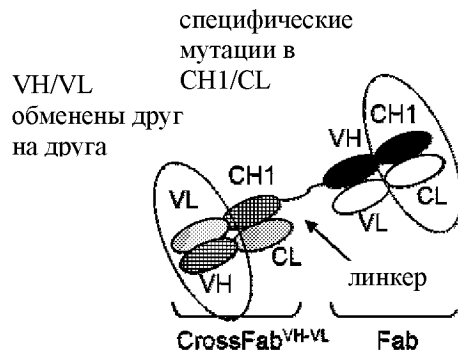
Фиг. 7А



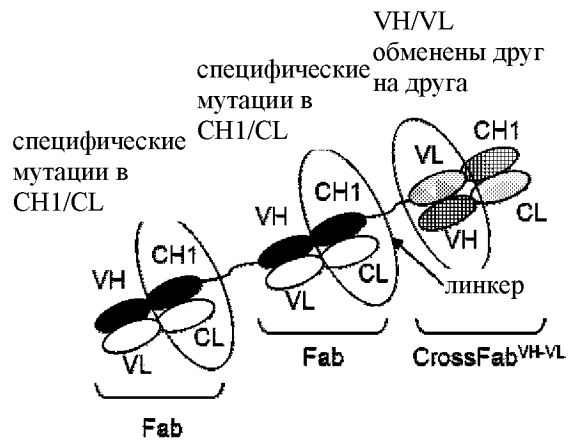
Фиг. 7Б



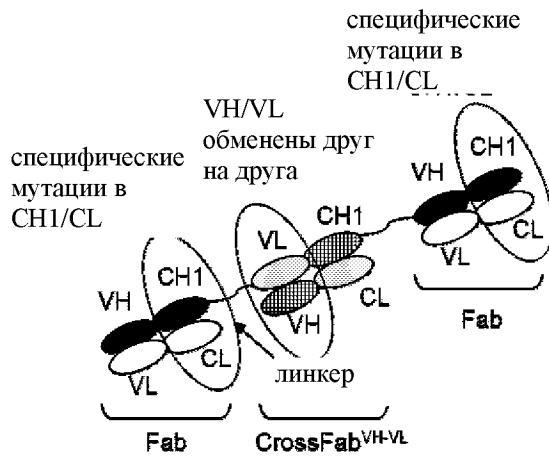
Фиг. 7В



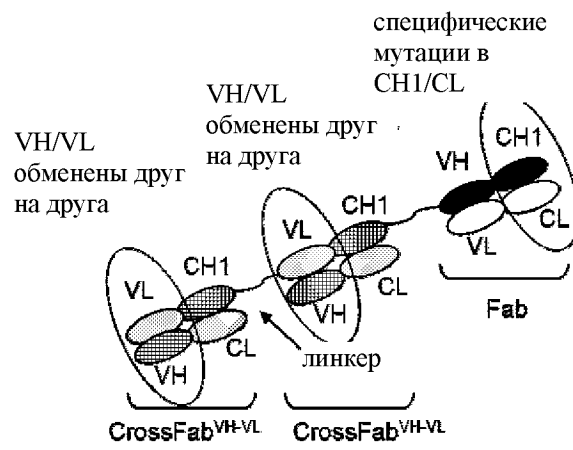
Фиг. 7Г



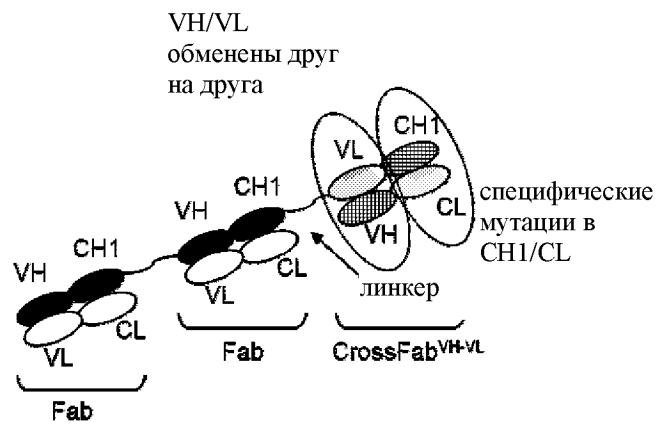
Фиг. 8А



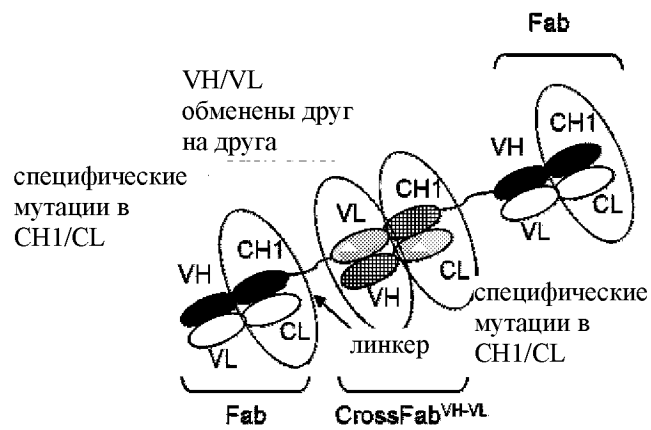
Фиг. 8Б



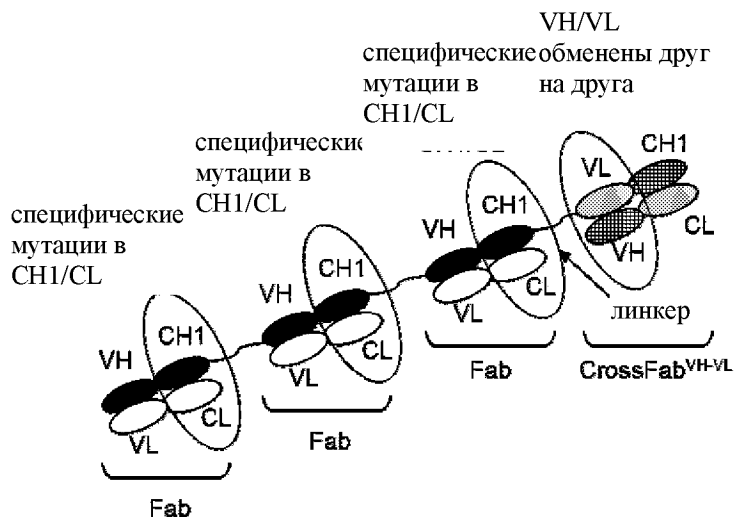
Фиг. 8В



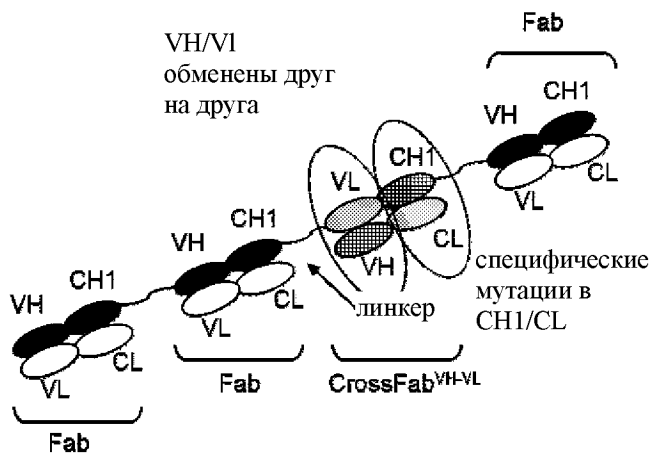
Фиг. 8Г



Фиг. 8Е



Фиг. 9А



Фиг. 9Б