



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2019.04.30**

**(21)** Номер заявки  
**201500132**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.07.11**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/22** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

**(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО К VEGF/ANG-2, НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ ЭТО АНТИТЕЛО, ВЕКТОР, СОДЕРЖАЩИЙ НУКЛЕИНОВУЮ КИСЛОТУ, КЛЕТКА-ХОЗЯИН, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА И СОДЕРЖАЩАЯ ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ**

**(31)** **12176299.1**

**(32)** **2012.07.13**

**(33)** **EP**

**(43)** **2015.08.31**

**(86)** **PCT/EP2013/064672**

**(87)** **WO 2014/009465 2014.01.16**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**РОШЕ ГЛИКАРТ АГ (CH)**

**(72)** Изобретатель:

**Дюрр Харальд, Хертинг Франк (DE),  
Клайн Кристиан (CH), Регула Йёрг  
Томас, Рют Маттиас, Штубенрах  
Кай-Гуннар (DE)**

**(74)** Представитель:

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

**(56)** **WO-A1-2011117329**

**WO-A1-2010040508**

**WO-A1-2009080251**

**KIM HYUNCHEOL ET AL.:** "FcRn receptor-mediated pharmacokinetics of therapeutic IgG in the eye.", *MOLECULAR VISION* 2009, vol. 15, 2009, pages 2803-2812, XP002688851, ISSN: 1090-0535 cited in the application the whole document

**TIMOTHY T. KUO ET AL.:** "Neonatal Fc Receptor: From Immunity to Therapeutics", *JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE*, vol. 30, no. 6, 1 October 2010 (2010-10-01), pages 777-789, XP019858481, ISSN: 1573-2592, DOI: 10.1007/S10875-010-9468-4 the whole document

**KIM J-K ET AL.:** "Mapping the site on human IgG for binding of the MHC class I-related receptor, FcRn", *EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY*,

**WILEY - V C H VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE**, vol. 29, no. 9, 1 September 1999 (1999-09-01), pages 2819-2825, XP002300286, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199909)29:09<2819: :AID-IMMU2819>3.0.CO; 2-6 the whole document

**S.-W. QIAO ET AL.:** "Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn", *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, vol. 105, no. 27, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 9337-9342, XP055046753, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0801717105 the whole document

**DEISSLER HEIDRUN L. ET AL.:** "Actions of bevacizumab and ranibizumab on microvascular retinal endothelial cells: similarities and differences.", *THE BRITISH JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY* JUL 2012, vol. 96, no. 7, 26 April 2012 (2012-04-26), pages 1023-1028, XP002688852, ISSN: 1468-2079 the whole document

**SINAPIS CHRISTOS I. ET AL.:** "Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin(R)) in rabbits.", *CLINICAL OPHTHALMOLOGY (AUCKLAND, N.Z.)* 2011, vol. 5, 2011, pages 697-704, XP002688853, ISSN: 1177-5483 the whole document

**RIDGWAY ET AL.:** " 'KNOBS-INTO-HOLES' ENGINEERING OF ANTIBODY CH3 DOMAINS FOR HEAVY CHAIN HETERODIMERIZATION", *PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB*, vol. 9, no. 7, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 617-621, XP002084766, ISSN: 0269-2139 the whole document

**WO-A2-2009155513**

**CHENNAMSETTY N. ET AL.:** "Aggregation-Prone Motifs in Human Immunoglobulin G", *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM*, vol. 391, no. 2, 14 August 2009 (2009-08-14), pages 404-413, XP026350710, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2009.06.028 [retrieved on 2009-06-13] the whole document

**CHENNAMSETTY NARESH ET AL.:** "Design of therapeutic proteins with enhanced stability", *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES - PNAS, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US*, vol. 106, no. 29, 21 July 2009 (2009-07-21), pages 11937-11942, XP002546638, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.09041911106 [retrieved on 2009-07-01] the whole document

**(57)** В изобретении описано биспецифическое антитело к человеческому сосудистому эндотелиальному фактору роста (VEGF/VEGF-A) и к человеческому ангиопоэтину-2 (ANG-2) человеческого

подкласса IgG1 с мутациями I253A, H310A и H435A, нуклеиновая кислота, кодирующая это антитело, экспрессионный вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту, прокариотическая или эукариотическая клетка-хозяин - продуцент биспецифического антитела, способ его получения, фармацевтическая композиция, содержащая указанное антитело которая предназначена для лечения сосудистых заболеваний глаз.

032192 B1

032192 B1

---

Изобретение относится к биспецифическому антителу к человеческому сосудистому эндотелиальному фактору роста (VEGF/VEGF-A) и к человеческому ангиопоэтину-2 (ANG-2), способу его получения, фармацевтическим композициям, содержащим указанные антитела.

#### **Предпосылки создания изобретения**

Ангиогенез участвует в патогенезе различных нарушений, включая солидные опухоли, внутриглазные неоваскулярные синдромы, такие как пролиферативные ретинопатии или возрастная дегенерация желтого пятна (AMD), ревматоидный артрит и псориаз (Folkman и др., *J. Biol. Chem.* 267, 1992, с. 10931-10934; Klagsbrun M. и др., *Annu. Rev. Physiol.* 53, 1991, с. 217-239 и Garner A., *Vascular diseases*, в: *Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach*, под ред. Garner A. и Klintworth G. K., 2-ое изд., изд-во Marcel Dekker, New York, 1994, с. 1625-1710).

Ранибизумаб (товарный знак Lucentis®) представляет собой фрагмент моноклонального антитела, выведенный из того же самого родительского мышинового антитела, что и бевацизумаб (авастин). Однако его подвергали процедуре созревания аффинности для достижения более сильного связывания с VEGF-A (WO 98/45331). Известно, что блокада VEGF-A может быть связана с некоторыми симптомами системной токсичности, по этой причине ранибизумаб лишен Fc-области для уменьшения времени полужизни в сыворотке и, следовательно, системной токсичности. Он представляет собой антиангиогенный агент, который разрешен для лечения возрастной дегенерации желтого пятна "влажного типа" (ARMD), обычной формы связанной с возрастом потери зрения.

Анализ ангиогенеза в роговице продемонстрировали, что ANG-1 и ANG-2 оказывают сходные воздействия, обладая синергетической активностью при совместном действии с VEGF, в отношении ускорения роста новых кровеносных сосудов (Asahara T. и др., *Circ. Res.* 83, 1998, с. 233-240). Возможность того, имел место зависящий от дозы эндотелиальный ответ, вытекала из данных о том, что *in vitro* ANG-2 в высокой концентрации может также обладать проангиогенным действием (Kim I. и др., *Oncogene* 19, 2000, с. 4549-52). В высокой концентрации ANG-2 действует в качестве фактора выживания при апоптозе эндотелиальных клеток в процессе истощения в сыворотке факторов апоптоза в результате активации Tie2 посредством пути PI-3-киназы и Akt (Kim I. и др., *Oncogene* 19, 2000, с. 4549-4552).

В WO 2010/040508 A9 и WO 2011/117329 описаны биспецифические антитела к VEGF/ANG-2. В WO 2008/132568 описаны слитые белки, связывающиеся с факторами роста. В WO 2009/136352 описаны антиангиогенные соединения. В WO 2009/080253 и WO 2011/117330 описаны биспецифические двухвалентные форматы антител. В WO 2010/069532 описаны антитела к Ang2.

Сосудистые глазные заболевания, такие как возрастная дегенерация желтого пятна (ARMD) и диабетическая ретинопатия (DR), являются результатом аномальной хороидаальной или ретинальной неоваскуляризации соответственно. Они являются основными причинами потери зрения у жителей промышленно развитых стран. Поскольку сетчатка состоит из хорошо оформленных слоев нейронных, глиальных и сосудистых элементов, относительно небольшие нарушения, такие, которые имеют место при пролиферации сосудов или отеке, могут приводить к значительному снижению зрительной функции. Наследственные дегенерации сетчатки, такие как пигментный ретинит (RP), ассоциированы также с сосудистыми нарушениями, такими как сужение артериол и сосудистая атрофия. Они поражают 1 из 3500 индивидуумов и характеризуются прогрессирующей ночной слепотой, уменьшением поля зрения, атрофией зрительного нерва, ослаблением артериол и снижением центрального зрения, часто прогрессирующим вплоть до полной слепоты.

Ишемические ретинопатии характеризуются снижением или дисфункцией сосудистой сети сетчатки, что приводит к снижению потока крови и гипоксии. Сетчатка реагирует на гипоксию генерированием сигналов роста новых кровеносных сосудов, однако эти новые сосуды, как правило, являются ломкими и неупорядоченными. Так, рост этих аномальных новых сосудов может создавать угрозу зрению, поскольку они могут истекать, кровоточить или приводить к рубцеванию, что, в конце концов, может заканчиваться отслоением сетчатки. Современные пути лечения ишемических ретинопатий направлены на остановку роста патологических сосудов, но они не воздействуют на лежащую в их основе ишемию, которая запускает их рост. Кроме того, стандартное лечение диабетической ретинопатии, ишемической ретинопатии, которая поражает миллионы людей, включает разрушение части сетчатки лазером с целью прекращения роста новых сосудов и сохранения центрального зрения. Известно применение стратегий для блокады функции сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), основного активатора роста сосудов. Кратковременная анти-VEGF терапия может улучшать зрение, но она не направлена на лежащую в основе заболевания ишемию и фактически может обострять это состояние, поскольку ингибирует роста всех сосудов, включая оказывающие благоприятное действие коллатерали. Существует также серьезная проблема, связанная с системной экспозицией этих лекарственных средств в организме престарелых и/или страдающих диабетом пациентов, для которых может требоваться рост новых сосудов при ишемии головного мозга, сердца или конечностей.

Как правило, при глазных болезнях часто применяют введение в стекловидное тело более мелких фрагментов антител типа Fab or Fab(2), поскольку они имеют короткое время полужизни в сыворотке и низкий риск системной токсичности. Однако указанные более мелкие фрагменты, как правило, обладают также и более коротким временем полужизни в стекловидном теле (например, из-за более быстрой диф-

фузии в сыворотку) и, как правило, их необходимо чаще дозировать.

У Kim и др., Molecular Vision, 15, 2009, с. 2803-2812 описаны полноразмерные антитела, которые вводят вводимые внутрь стекловидного тела (интравитреально) в глаз, для которых установлено, что IgG, связывающиеся с FcRn, элиминировались в кровь у мышей дикого типа, в то время как IgY, не связывающиеся с FcRn, не элиминировались в кровеносную систему. Кроме того, IgG, связывающиеся с FcRn, не элиминировались в кровеносную систему у мышей с "выключенным" FcRn.

Таким образом, в данной области существует необходимость в создании улучшенных средств для лечения и предупреждения различных сосудистых глазных заболеваний, таких как ишемические ретинопатии.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

Одним из объектов изобретения является биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий центр, который специфически связывается с человеческим VEGF, и второй антигенсвязывающий центр, который специфически связывается с человеческим ANG-2, в котором

I) указанный первый антигенсвязывающий центр, специфически связывающийся с VEGF, содержит в переменном домене тяжелой цепи CDR3H-участок, имеющий SEQ ID NO: 1, CDR2H-участок, имеющий SEQ ID NO: 2, и CDR1H-участок, имеющий SEQ ID NO: 3, и в переменном домене легкой цепи CDR3L-участок, имеющий SEQ ID NO: 4, CDR2L-участок, имеющий SEQ ID NO: 5, и CDR1L-участок, имеющий SEQ ID NO: 6; и

II) указанный второй антигенсвязывающий центр, специфически связывающийся с ANG-2, содержит в переменном домене тяжелой цепи CDR3H-участок, имеющий SEQ ID NO: 9, CDR2H-участок, имеющий SEQ ID NO: 10, и CDR1H-участок, имеющий SEQ ID NO: 11, и в переменном домене легкой цепи CDR3L-участок, имеющий SEQ ID NO: 12, CDR2L-участок, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR1L-участок, имеющий SEQ ID NO: 14, причем указанное биспецифическое антитело содержит константную область тяжелой цепи человеческого подкласса IgG1 (происходящую из человеческого антитела) и содержащую мутации I253A, H310A и H435A (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В предпочтительном варианте указанный первый антигенсвязывающий центр, специфически связывающийся с VEGF, этого антитела содержит в качестве переменного домена тяжелой цепи VH аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 и в качестве переменного домена легкой цепи VL аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, а указанный второй антигенсвязывающий центр, специфически связывающийся с ANG-2, содержит в качестве переменного домена тяжелой цепи VH аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и в качестве переменного домена легкой цепи VL аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

При этом константная область тяжелой цепи IgG1-подкласса указанного биспецифического антитела в более предпочтительном варианте содержит также мутации L234A, L235A и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Кроме того, биспецифическое антитело, включающее первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает человеческий VEGF, и второй антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает человеческий ANG-2, в наиболее предпочтительном варианте включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28, или же аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24.

Вторым объектом данного изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая указанное антитело и фармацевтически приемлемый носитель, для применения в лечении сосудистых заболеваний глаз.

В предпочтительном варианте эта фармацевтическая композиция предназначена для интравитреального введения.

Третьим объектом данного изобретения является нуклеиновая кислота, кодирующая указанное биспецифическое антитело.

Четвертым объектом является экспрессионный вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту, который обладает способностью экспрессировать указанную нуклеиновую кислоту в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине, а пятым объектом - прокариотическая или эукариотическая клетка-хозяин, содержащая вектор.

И наконец, последними объектами служит способ получения биспецифического антитела, включающий стадии, на которых

а) трансформируют клетку-хозяина векторами, содержащими молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют указанное антитело;

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

в) выделяют указанную молекулу антитела из указанной культуры, а также биспецифическое антитело, полученное с помощью данного способа.

#### **Описание чертежей**

На чертежах показано:

на фиг. 1 - схема, иллюстрирующая концепцию и преимущества антител к VEGF-ANG-2 (<VEGF-

ANG-2>) IgG1- или IgG4-типа с мутациями AAA (мутации I253A, H310A и H435A - нумерация согласно EU-индексу Кэбота);

на фиг. 2 - результаты измерений вязкости в лабораторных условиях на основе DLS (динамическое рассеяние света). Представлены данные о полученной путем экстраполяции вязкости при 150 мг/мл в 200мМ аргинине/сукцинате, pH 5,5 (сравнение антител <VEGF-ANG-2>, предлагаемых в изобретении, VEGFang2-0016 (с AAA-мутациями) с референс-антителом VEGFang2-0015 (без AAA-мутаций));

на фиг. 3 - полученные с помощью DLS данные об агрегации в зависимости от температуры (включающие полученные с помощью DLS данные о температуре начала агрегации) в 20мМ His, 140мМ NaCl, pH 6,05 (сравнение антител <VEGF-ANG-2>, предлагаемых в изобретении, VEGFang2-0016 (с AAA-мутациями) с референс-антителом VEGFang2-0015 (без AAA-мутаций));

на фиг. 4 - данные о хранении в течение 7 дней при 40°C в концентрации 100 мг/мл (снижение основного пика и повышение пика, соответствующего высокомолекулярным (HMW) видам (сравнение антител <VEGF-ANG-2>, предлагаемых в изобретении, VEGFang2-0016 (с AAA-мутациями), для которых характерна более низкая агрегация, с референс-антителом VEGFang2-0015 (без AAA-мутаций));

на фиг. 5А - данные об аффинности к FcRn в стабильном состоянии VEGFang2-0015 (без AAA-мутаций): наложение Вiasoge-сенсограмм, полученных при различных концентрациях, демонстрирует зависящее от концентрации связывание VEGFang2-0015 (без AAA-мутаций) с FcRn;

на фиг. 5Б - данные об аффинности к FcRn в стабильном состоянии антитела, представленного на фиг. 5А: VEGFang2-0015 (без AAA-мутаций): кривая зависимости связывания от концентрации VEGFang2-0015 (без AAA-мутаций), описывающая связывание с FcRn;

на фиг. 5В - данные об аффинности к FcRn в стабильном состоянии VEGFang2-0016 (с AAA-мутациями): наложение Вiasoge-сенсограмм, полученных при различных концентрациях, демонстрирует отсутствие связывания с FcRn при всех концентрациях;

на фиг. 5Г - данные об аффинности к FcRn в стабильном состоянии VEGFang2-0016 (с AAA-мутациями): кривая зависимости связывания от концентрации VEGFang2-0016 (с AAA-мутациями), демонстрирует отсутствие связывания с FcRn;

на фиг. 5Д - данные об аффинности к FcRn в стабильном состоянии VEGFang2-0016 (с AAA-мутациями): кривая зависимости связывания от концентрации VEGFang2-0016 (с AAA-мутациями), демонстрирует отсутствие связывания с FcRn (диапазон ответа от -0,6 до 0,2 RU/диапазоны концентраций от 0 до 0,35М);

на фиг. 6 - результаты количественной оценки взаимодействия Fc гамма RIIIa с VEGFang2-0015 без AAA-мутаций и VEGFang2-0016 с AAA-мутациями (оба в виде антител IgG1-подкласса с мутациями P329G LALA; в качестве контроля применяли антитело к Dig IgG1-подкласса и антитело, основой которого являлся IgG4);

на фиг. 7А - схема, иллюстрирующая принцип применяемого для изучения ФК ELISA-анализа, предназначенного для определения концентраций биспецифических антител <VEGF/Ang2> в сыворотке и лизатах всего глаза;

на фиг. 7Б - концентрация в сыворотке после внутривенного введения: сравнение соединений VEGFang2-0015 без AAA-мутаций и VEGFang2-0016 с AAA-мутациями;

на фиг. 7В - концентрация в сыворотке после интравитреального введения: сравнение соединений VEGFang2-0015 с AAA-мутациями и VEGFang2-0016 без AAA-мутаций;

на фиг. 7Г - концентрация в глазных лизатах VEGFang2-0016 (с AAA-мутациями) в правом и левом глазу (после интравитреального введения только в правый глаз в сравнении с внутривенным введением): после интравитреального введения значительные концентрации удалось обнаружить только в правом глазу. После внутривенного введения в лизатах глаз не удалось обнаружить никаких концентраций из-за небольшого времени полужизни в сыворотке VEGFang2-0016 (с AAA-мутацией);

на фиг. 7Д - концентрация глазных в лизатах VEGFang2-0015 (без AAA-мутации) правого и левого глаза (после интравитреального введения только в правый глаз в сравнении с внутривенным введением): в правом глазу (и в некоторой степени в левом глазу) после интравитреального введения удалось обнаружить концентрации VEGFang2-0015. Это свидетельствует о диффузии из правого глаза в сыворотку и из нее в левый глаз, что можно объяснить длительным временем полужизни VEGFang2-0015 (без AAA-мутации). После внутривенного введения удалось также обнаружить значительные концентрации в лизатах обоих глаз в результате диффузии в глаза сохраняющего стабильность в сыворотке VEGFang2-0015 (без AAA-мутации).

#### Подробное описание изобретения

Итак, биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, является двухвалентным.

Указанное биспецифическое двухвалентное антитело отличается тем, что содержит:

а) тяжелую цепь и легкую цепь первого полноразмерного антитела, которое специфически связывается с VEGF;

б) модифицированную тяжелую цепь и модифицированную легкую цепь второго полноразмерного антитела, которое специфически связывается с ANG-2, в котором константные домены CL и CH1 заменены друг на друга.

Такой формат биспецифического двухвалентного антитела в качестве биспецифического антитела, специфически связывающегося с человеческим сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF) и человеческим ангиопоэтином-2 (ANG-2), описан в WO 2009/080253 (включая модифицированные с помощью технологии "knobs-into-holes" (обеспечение взаимодействия по типу "выступы-во впадины") СН3-домены). Антитела, основой которых является указанный формат биспецифического двухвалентного антитела, обозначают как CrossMab.

Биспецифическое двухвалентное антитело может содержать:

а) в качестве тяжелой цепи первого полноразмерного антитела аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 и в качестве легкой цепи первого полноразмерного антитела аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и

б) в качестве модифицированной тяжелой цепи второго полноразмерного антитела аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 и в качестве модифицированной легкой цепи второго полноразмерного антитела аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

Биспецифическое двухвалентное антитело может также содержать:

а) в качестве тяжелой цепи первого полноразмерного антитела аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 и в качестве легкой цепи первого полноразмерного антитела аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и

б) в качестве модифицированной тяжелой цепи второго полноразмерного антитела аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 и в качестве модифицированной легкой цепи второго полноразмерного антитела аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Итак, биспецифическое двухвалентное антитело может содержать первый антигенсвязывающий центр, который специфически связывается с человеческим VEGF, и второй антигенсвязывающий центр, который специфически связывается с человеческим ANG-2, и характеризоваться аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28 или же с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24.

Биспецифическое антитело, может содержать:

а) тяжелую цепь и легкую цепь первого полноразмерного антитела, которое специфически связывается с VEGF;

б) тяжелую цепь и легкую цепь второго полноразмерного антитела, которое специфически связывается с ANG-2, в котором N-конец тяжелой цепи соединен с С-концом легкой цепи через пептидный линкер.

Указанный формат биспецифического двухвалентного антитела в качестве биспецифического антитела, специфически связывающегося с человеческим сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF) и человеческим ангиопоэтином-2 (ANG-2), описан в WO 2011/117330, включая модифицированные с помощью технологии "knobs-into-holes" СН3-домены. Антитела, основой которых является указанный формат биспецифического двухвалентного антитела, обозначают как OAscFab.

Вариабельный домен тяжелой цепи антитела (VH) и вариабельный домен легкой цепи антитела (VL) тяжелой и легкой цепи второго полноразмерного антитела можно стабилизировать дисульфидом путем интродукции дисульфидной связи между следующими положениями: положение 44 в вариабельном домене тяжелой цепи и положение 100 в вариабельном домене легкой цепи (нумерация во всех случаях согласно EU-индексу Кэбота (Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991). Указанной дополнительной стабилизации дисульфидом достигают путем интродукции дисульфидной связи между вариабельными доменами VH и VL тяжелой и легкой цепи второго полноразмерного антитела. Методики интродукции не встречающихся в естественных условиях дисульфидных мостиков для стабилизации описаны, например, в WO 94/029350, у Rajagopal V. и др., Prot. Engin. 10, 1997, с. 1453-1459; Kobayashi и др., Nuclear Medicine & Biology 25, 1998, с. 387-393 или Schmidt M. и др., Oncogene 18, 1999, с. 1711-1721.

СН3-домены биспецифического двухвалентного антитела можно изменять с помощью технологии "knob-into-holes", которая описана подробно с помощью нескольких примеров, например, в WO 96/027011, у Ridgway J.B. и др., Protein Eng 9, 1996, с. 617-621 и Merchant A.M. и др., Nat Biotechnol 16, 1998, с. 677-681. При осуществлении этого метода поверхности взаимодействия двух СН3-доменов изменяют с целью повышения гетеродимеризации обеих тяжелых цепей, содержащих два указанных СН3-домена. Каждый из двух СН3-доменов (двух тяжелых цепей) может представлять собой "выступ", а другой представлять собой "впадину". Интродукция дисульфидного мостика стабилизирует гетеродимеры (Merchant A.M. и др., Nature Biotech 16, 1998, с. 677-681; Atwell S. и др., J. Mol. Biol. 270, 1997, с. 26-35) и повышает выход.

Биспецифические антитела могут содержать СН3-домен одной тяжелой цепи и СН3-домен другой тяжелой цепи каждый вступает в контакт на поверхности раздела, которая представляет собой исходную поверхность раздела между СН3-доменами антитела, где указанную поверхность изменяют так, чтобы способствовать образованию биспецифического антитела, где изменение отличается тем, что

а) изменяют СН3-домен одной тяжелой цепи, так, что в исходной поверхности раздела СН3-домена одной тяжелой цепи, которая контактирует с исходной поверхностью раздела СН3-домена другой тяже-

лой цепи в биспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, имеющий больший объем боковой цепи, создавая тем самым выпуклость на поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая может помещаться в полость в поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи, и

б) изменяют СНЗ-домен другой тяжелой цепи, так, что в исходной поверхности раздела второго СНЗ-домена, которая контактирует с исходной поверхностью раздела первого СНЗ-домена в биспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, имеющий меньший объем боковой цепи, создавая тем самым полость в поверхности раздела второго СНЗ-домена, в которую может помещаться выпуклость на поверхности раздела первого СНЗ-домена.

Таким образом, антитело может характеризоваться тем, что СНЗ-домен первой тяжелой цепи полноразмерного антитела, указанного в подпункте а), и СНЗ-домен второй тяжелой цепи полноразмерного антитела, указанного в подпункте б), каждый вступает в контакт на поверхности раздела, которая имеет изменение в исходной поверхности раздела между СНЗ-доменами антитела, где

I) в СНЗ-доме одной тяжелой цепи аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, имеющий больший объем боковой цепи, создавая тем самым выпуклость на поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая может помещаться в полость в поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи, и где

II) в СНЗ-доме второй тяжелой цепи аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, имеющий меньший объем боковой цепи, создавая тем самым полость в поверхности раздела второго СНЗ-домена, в которую может помещаться выпуклость на поверхности раздела первого СНЗ-домена.

Предпочтительно аминокислотный остаток, имеющий больший объем боковой цепи, выбирают из группы, состоящей из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y), триптофана (W).

Предпочтительно аминокислотный остаток, имеющий меньший объем боковой цепи, выбирают из группы, состоящей из аланина (A), серина (S), треонина (T), валина (V).

Оба СНЗ-домена можно дополнительно изменять путем интродукции аминокислоты цистеина (C) в соответствующие положения каждого СНЗ-домена, так, чтобы мог образовываться дисульфидный мостик между обоими СНЗ-доменами.

Биспецифическое антитело может отличаться наличием одного или нескольких следующих свойств (для определения которых применяют анализы, описанные в примере б) а именно:

более низкой концентрацией в сыворотке по сравнению с соответствующим биспецифическим антителом без мутаций, указанных в подпункте III) (через 96 ч после введения в стекловидное тело у мышей, которые имеют дефицит мышинового FcRn, но являются гемизиготными трансгенными по человеческому FcRn);

сходной (фактор 0,8-1,2) концентрацией в лизатах всего правого глаза по сравнению с соответствующим биспецифическим антителом без мутаций, указанных в подпункте III) (у мышей, которые имеют дефицит мышинового FcRn, но являются гемизиготными трансгенными по человеческому FcRn, через 96 ч после введения в стекловидное тело правого глаза).

Биспецифическое двухвалентное антитело может содержать первый антигенсвязывающий центр, который специфически связывается с человеческим VEGF, и второй антигенсвязывающий центр, который специфически связывается с человеческим ANG-2, причем

I) указанный первый антигенсвязывающий центр может содержать в качестве переменного домена тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 7, а в качестве переменного домена легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 8; и

II) указанный второй антигенсвязывающий центр может содержать в качестве переменного домена тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 15, а в качестве переменного домена легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 16, и

III) биспецифическое антитело может содержать константную область тяжелой цепи подкласса IgG1 или IgG4 (выведенную из человеческого антитела) и содержащую мутации L253A, L235A и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота), и характеризоваться наличием одного или нескольких следующих свойств (для определения которых применяют анализы, описанные в примере б) более низкой концентрацией в сыворотке по сравнению с соответствующим биспецифическим антителом без мутаций, указанных в подпункте III) (через 96 ч после интравитреального введения мышам, которые имеют дефицит мышинового FcRn, но являются гемизиготными трансгенными по человеческому FcRn);

сходной (отличаются в 0,8-1,2 раза) концентрацией в лизатах всего правого глаза по сравнению с соответствующим биспецифическим антителом без мутаций, указанных в подпункте III) (у мышей, которые имеют дефицит мышинового FcRn, но являются гемизиготными трансгенными по человеческому FcRn, через 96 ч после интравитреального введения в правый глаз).

Биспецифическое двухвалентное антитело может содержать первый антигенсвязывающий центр, который специфически связывается с человеческим VEGF, и второй антигенсвязывающий центр, который специфически связывается с человеческим ANG-2, отличающиеся тем, что

I) указанный первый антигенсвязывающий центр может содержать в качестве переменного доме-

на тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 7 с 1, 2 или 3 аминокислотными заменами, а в качестве переменного домена легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 8 с 1, 2 или 3 аминокислотными заменами; и

II) указанный второй антигенсвязывающий центр может содержать в качестве переменного домена тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 15 с 1, 2 или 3 аминокислотными заменами, а в качестве переменного домена легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 16 с 1, 2 или 3 аминокислотными заменами, и

III) биспецифическое антитело может содержать константную область тяжелой цепи подкласса IgG1 или IgG4 (выведенную из человеческого антитела) и содержащую мутации L253A, L235A и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота), и может характеризоваться наличием одного или нескольких следующих свойств (для определения которых применяют анализы, описанные в примере б) более низкой концентрацией в сыворотке по сравнению с соответствующим биспецифическим антителом без мутаций, указанных в подпункте III) (через 96 ч после интравитреального введения мышам, которые имеют дефицит мышинового FcRn, но являются гемизиготными трансгенными по человеческому FcRn);

сходной (отличаются в 0,8-1,2 раза) концентрацией в лизатах всего правого глаза по сравнению с соответствующим биспецифическим антителом без мутаций, указанных в подпункте III) (у мышей, которые имеют дефицит мышинового FcRn, но являются гемизиготными трансгенными по человеческому FcRn, через 96 ч после интравитреального введения в правый глаз).

В контексте настоящего описания понятие "антитело" относится к связывающему белку, который содержит антигенсвязывающие центры (сайты). Понятия "связывающий сайт" или "антигенсвязывающий центр" в контексте настоящего описания означает область(и) молекулы антитела, в которой(ыми) фактически связывается лиганд. "Антигенсвязывающий центр" содержит переменные домены тяжелой цепи антитела (VH) и переменные домены легкой цепи антитела (VL) (пара VH/VL).

Понятие "специфичность антитела" относится к избирательному распознаванию антителом конкретного эпитопа антигена. Встречающиеся в естественных условиях антитела являются, например, моноспецифическими.

Согласно изобретению "биспецифические антитела" представляют собой антитела, которые имеют две различные антигенсвязывающие специфичности. Антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, являются специфическими в отношении двух различных антигенов, VEGF в качестве первого антигена и ANG-2 в качестве второго антигена.

В контексте настоящего описания понятие "моноспецифическое" антитело означает антитело, которое имеет один или несколько связывающих сайтов, каждый из которых связывается с одним и тем же эпитопом одного и того же антигена.

В контексте настоящего описания понятие "валентный" означает присутствие конкретного количества связывающих сайтов в молекуле антитела. Так, понятия "двухвалентный", "четырёхвалентный" и "шестивалентный" означает присутствие двух связывающих сайтов, четырех связывающих сайтов и шести связывающих сайтов соответственно в молекуле антитела. Биспецифические антитела, предлагаемые в изобретении, являются "двухвалентными".

В контексте настоящего описания понятие "VEGF" относится к человеческому сосудистому эндотелиальному фактору роста (VEGF/VEGF-A), т.е. состоящему из 165 аминокислот фактору роста человеческих эндотелиальных клеток сосудов (аминокислоты 27-191 последовательности-предшественника человеческого VEGF165: SEQ ID NO: 17; аминокислоты 1-26 обозначают сигнальный пептид), и к родственным изоформам 121, 189 и 206 фактора роста эндотелиальных клеток сосудов, которые описаны у Leung D.W. и др., *Science* 246, 1989, с. 1306-1309; Houck и др., *Mol. Endocrin.* 5, 1991, с. 1806-1814; Keck P.J. и др., *Science* 246, 1989, с. 1309-1312 и Connolly D.T. и др., *J. Biol. Chem.* 264, 1989, с. 20017-20024; а также к встречающимся в естественных условиях аллельным и процессированным формам указанных факторов роста. VEGF участвует в регуляции нормального и аномального ангиогенеза и неоваскуляризации, ассоциированной с опухолями и внутриглазными болезнями (Ferrara N. и др., *Endocr. Rev.* 18, 1997, с. 4-25; Berkman R.A. и др., *J. Clin. Invest.* 91, 1993, с. 153-159; Brown L.F. и др., *Human Pathol.* 26, 1995, с. 86-91; Brown L.F. и др., *Cancer Res.* 53, 1993, с. 4727-4735; Mattern J. и др., *Brit. J. Cancer.* 73, 1996, с. 931-934 и Dvorak H.F. и др., *Am. J. Pathol.* 146, 1995, с. 1029-1039). VEGF представляет собой гомодимерный гликопротеин, который был выделен из нескольких источников и включает несколько изоформ. Для VEGF характерна высокая специфическая митогенная активность в отношении эндотелиальных клеток.

В контексте настоящего описания понятие "ANG-2" относится к человеческому ангиопоэтину-2 (ANG-2) (который сокращенно обозначают как ANGPT2 или ANG2) (SEQ ID NO: 18), который описан, например, у Maisonpierre P.C. и др., *Science* 277, 1997, с. 55-60 и Cheung A.H. и др., *Genomics* 48, 1998, с. 389-391. Ангиопоэтины-1 (SEQ ID NO: 19) и -2 описаны в качестве лигандов Tie, семейства тирозинкиназ, которые избирательно экспрессируются в сосудистом эндотелии (Yancopoulos G.D. и др., *Nature* 407, 2000, 242-248). В настоящее время известно четыре определенных представителя семейства ангиопоэтинов. Ангиопоэтин-3 и -4 (Ang-3 и Ang-4) могут представлять собой отличающиеся широким разнообразием копии одного и того же генного локуса у мышей и человека (Kim I. и др., *FEBS Lett.* 443, 1999, с. 353-356; Kim I. и др., *J. Biol. Chem.* 274, 1999, с. 26523-26528). ANG-1 и ANG-2 впервые идентифицированы в экспериментах, проведенных на культурах ткани, в качестве агониста и антагониста соответственно (см. касательно ANG-1: Davis S. и др., *Cell* 87, 1996, с. 1161-1169; и касательно ANG-2: Maisonpierre P.C.

и др., *Science* 277, 1997, с. 55-60). Все известные ангиопоэтины связываются, прежде всего, с Tie2 (SEQ ID NO: 20), а аффинность связывания обоих Ang-1 и -2 с Tie2 составляет 3нМ (Kd) (Maisonpierre P.C. и др., *Science* 277, 1997, с. 55-60).

Антигенсвязывающие центры биспецифического антитела, предлагаемого в изобретении, содержат шесть гипервариабельных участков (CDR), которые обуславливают различные уровни аффинности связывающего антиген центра. Присутствует три CDR в вариабельном домене тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2 и CDRH3) и три CDR в вариабельном домене легкой цепи (CDRL1, CDRL2 и CDRL3). Протяженность CDR и каркасных участков (FR) определяют путем сравнения с компилированной базой данных аминокислотных последовательностей, в которых эти области определены на основе вариабельности между последовательностями.

Антитела могут содержать константные области иммуноглобулинов, полученные из человеческих иммуноглобулинов одного или нескольких классов, где указанные классы иммуноглобулинов включают классы IgG, IgM, IgA, IgD и IgE и в случае IgG и IgA их подклассы, прежде всего IgG1 и IgG4.

В контексте настоящего описания понятия "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела" относятся к препарату молекул антител с одинаковым аминокислотным составом.

Понятие "химерное антитело" относится к антителу, содержащему вариабельную область, т.е. связывающую область, из одного источника или вида и по меньшей мере часть константной области, выведенную из другого источника или вида, как правило, полученному с помощью методов рекомбинантной ДНК. Предпочтительными являются химерные антитела, содержащие мышиную вариабельную область и человеческую константную область. Другими предпочтительными формами "химерных антител" являются антитела, константная область которых модифицирована или изменена по сравнению с исходным антителом для создания свойств, прежде всего касающихся C1q-связывания и/или связывания Fc-рецептора (FcR). Указанные химерные антитела обозначают также как "антитела переключенного класса". Химерные антитела являются продуктом экспрессированных генов иммуноглобулинов, содержащих ДНК-сегменты, которые кодируют вариабельные области иммуноглобулина, и ДНК-сегменты, которые кодируют константные области иммуноглобулина. Методы создания химерных антител включают общепринятые 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, с. 6851-6855; US 5202238 и US 5204244).

Понятие "гуманизованное антитело" относится к антителам, в которых каркасный участок или гипервариабельные участки ("определяющие комплементарность участки" (CDR)) модифицированы так, что содержат CDR иммуноглобулина другой специфичности относительно родительского иммуноглобулина. Мышиный CDR можно трансплантировать в каркасный участок человеческого антитела для получения "гуманизованного антитела" (см., например, Riechmann L. и др., *Nature* 332, 1988, с. 323-327 и Neuberger M.S. и др., *Nature* 314, 1985, с. 268-270). Наиболее предпочтительные CDR соответствуют участкам, которые представлены последовательностями, распознающими антигены, указанным выше для химерных антител. Другими формами "гуманизованных антител" являются антитела, константная область которых дополнительно модифицирована или изменена по сравнению с исходным антителом для создания свойств, прежде всего касающихся C1q-связывания и/или связывания Fc-рецептора (FcR).

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "человеческое антитело" относится к антителам, которые имеют вариабельные и константные области, выведенные из последовательностей иммуноглобулинов 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, с. 368-374). Человеческие антитела можно получать также в трансгенных животных (например, мышах), которые могут после иммунизации продуцировать весь спектр человеческих антител или отобранные человеческие антитела в отсутствие эндогенного производства иммуноглобулинов. Перенос массива генов иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии в таких несущих мутант зародышевой линии мышей может приводить к производству человеческих антител после контрольного заражения антигеном (см., например, Jakobovits A. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, с. 2551-2555; Jakobovits A. и др., *Nature* 362, 1993, с. 255-258; Brueggemann M. и др., *Year Immunol.* 7, 1993, с. 33-40). Человеческие антитела можно получать также в фаговых дисплейных библиотеках (Hoogenboom H.R. и Winter G., *J. Mol. Biol.* 227, 1992, с. 381-388; Marks J.D. и др., *J. Mol. Biol.* 222, 1991, с. 581-597). Для получения человеческих моноклональных антител можно применять также методики, разработанные Cole A. с соавторами и Voerner P. с соавторами (Cole A. и др., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, изд-во Liss A.L., 1985, с. 77 и Voerner P. и др., *J. Immunol.* 147, 1991, с. 86-95). Как уже указывалось для химерных и гуманизованных антител в контексте настоящего описания понятие "человеческое антитело" относится также к антителам, константная область которых модифицирована для создания свойств, прежде всего касающихся C1q-связывания и/или связывания Fc-рецептора (FcR), например, путем "переключения класса", т.е. изменения или мутации Fc-областей (например, с IgG1 на IgG4 и/или мутация IgG1/IgG4).

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "рекомбинантное антитело" включает все человеческие антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены методами рекомбинации, например, антитела, выделенные из клетки-хозяина, такой как NSO- или CHO-клетка или

из животного (например, мышцы), трансгенного по генам человеческого иммуноглобулина, или антитела, экспрессированные с помощью рекомбинантного экспрессионного вектора, которым трансфектирована клетка-хозяин. Указанные рекомбинантные антитела имеют переменные и константные области в преобразованной форме. Рекомбинантные антитела подвергались соматической гипермутации *in vivo*. Так, аминокислотные последовательности VH- и VL-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые хотя выведены и родственны последовательностям VH и VL человеческой зародышевой линии, могут не существовать в естественных условиях в популяции антител человеческой зародышевой линии *in vivo*.

В контексте настоящего описания "переменный домен" (переменный домен легкой цепи (VL), переменный домен тяжелой цепи (VH)) обозначает каждую из пары из легких и тяжелых цепей, которые непосредственно участвуют 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 обладают выраженным консерватизмом, соединенные тремя "гиперпеременными участками" (или определяющими комплементарность участками, CDR). Каркасные участки адаптированы к  $\beta$ -складчатой конформации, а CDR могут образовывать петли, соединяющие  $\beta$ -складчатую структуру. CDR в каждой цепи сохраняют свою трехмерную структуру с помощью каркасных участков и образуют вместе с CDR из другой цепи антигенсвязывающий центр. CDR3-участки тяжелой и легкой цепи антитела играют наиболее важную роль в специфичности/аффинности связывания антител.

В контексте настоящего описания понятия "гиперпеременный участок" или "антигенсвязывающая область антитела" относится к аминокислотным остаткам, которые ответственны за связывание антигена. Гиперпеременный участок содержит аминокислотные остатки из "определяющих комплементарность участков" или "CDR". "Каркасные участки" или "FR"-участки представляют собой области переменного домена, отличные от остатков гиперпеременных участков. Таким образом, легкие и тяжелые цепи антитела содержат в направлении от N- к C-концу домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR на каждой цепи разделены указанными аминокислотами каркасного участка. CDR3 тяжелой цепи представляет собой область, которая вносит основной вклад в связывание антигена. CDR- и FR-участки определяют согласно стандартному определению 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.

В контексте настоящего описания понятие "связывание" или "специфическое связывание" относится к связыванию антитела с эпитопом антигена (либо человеческого VEGF, либо человеческого ANG-2), установленному в анализе *in vitro*, предпочтительно анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore, фирма GE-Healthcare Упсалла, Швеция), с очищенным антигеном дикого типа. Аффинность связывания оценивают в понятиях  $k_a$  (константа скорости ассоциации антитела/антигена в комплекс),  $k_D$  (константа диссоциации) и  $K_D$  ( $k_D/k_a$ ). Связывание или специфическое связывание может характеризоваться аффинностью связывания ( $K_D$ ), составляющей  $10^{-8}$  моль/л или менее.

Понятие "эпитоп" относится к любой полипептидной детерминанте, обладающей способностью специфически связываться с антителом. Эпитопная детерминанта химически включает активные расположенные на поверхности группы молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи аминокислот, фосфат или сульфат, и может иметь специфические характеристики трехмерной структуры и/или специфические характеристики заряда. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается с антителом.

Считается, что антитело специфически связывается с антигеном, когда оно избирательно распознает свой антиген-мишень в сложной смеси белков и/или макромолекул.

Понятие "полноразмерное антитело" относится к антителу, состоящему из двух "тяжелых цепей полноразмерного антитела" и двух "легких цепей полноразмерного антитела". "Тяжелая цепь полноразмерного антитела" представляет собой полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу тяжелой цепи антитела переменный домен (VH), домен 1 константной области тяжелой цепи антитела (CH1), шарнирную область антитела (HR), домен 2 константной области тяжелой цепи антитела (CH2) и домен 3 константной области тяжелой цепи антитела (CH3), что сокращенно обозначают как VH-CH1-HR-CH2-CH3; и необязательно домен 4 константной области тяжелой цепи антитела (CH4) в случае антитела подкласса IgE. Предпочтительно "тяжелая цепь полноразмерного антитела" представляет собой полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу VH, CH1, HR, CH2 и CH3. "Легкая цепь полноразмерного антитела" представляет собой полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу легкой цепи антитела переменный домен легкой цепи антитела (VL) и константный домен легкой цепи антитела (CL), что сокращенно обозначают как VL-CL. Константный домен легкой цепи антитела (CL) может быть  $\kappa$ - (каппа) или  $\lambda$ - (лямбда) типа. Две цепи полноразмерного антитела связаны друг с другом через межполипептидные дисульфидные связи между CL-доменом и CH1-доменом и между шарнирными областями тяжелых цепей полноразмерного антитела. Примерами типичных полноразмерных антител являются встречающиеся в естественных условиях антитела типа IgG (например, IgG1 и IgG2), IgM, IgA, IgD и IgE. Полноразмерные антитела могут иметь происхождение из одного вида, на-

пример, человека, или они могут представлять собой химерные или гуманизированные антитела. Полноразмерные антитела содержат два антигенсвязывающих центра, каждый образованный парой VH и VL, которые оба специфически связываются с одним и тем же антигеном. Под С-концом тяжелой или легкой цепи указанного полноразмерного антитела понимают последнюю аминокислоту на С-конце указанной тяжелой или легкой цепи. Под N-концом тяжелой или легкой цепи указанного полноразмерного антитела понимают последнюю аминокислоту на N-конце указанной тяжелой или легкой цепи.

В контексте изобретения под "пептидным линкером" понимают пептид, содержащий аминокислотные последовательности, который предпочтительно имеет синтетическое происхождение. Указанные пептиды применяют для соединения С-конца легкой цепи с N-концом тяжелой цепи второго полноразмерного антитела (которое специфически связывается со вторым антигеном) через пептидный линкер. Пептидный линкер в тяжелой и легкой цепи второго полноразмерного антитела представляет собой пептид, аминокислотная последовательность которого состоит по меньшей мере из 30 аминокислот, предпочтительно из 32-50 аминокислот. Пептидный линкер может представлять собой пептид, аминокислотная последовательность которого состоит из 32-40 аминокислот. Указанный пептидный линкер также может представлять собой  $(G \times S)_n$ , где G = глицин, S =серин, ( $x=3, n=8, 9$  или  $10$  и  $m=0, 1, 2$  или  $3$ ) или ( $x=4$  и  $n=6, 7$  или  $8$  и  $m=0, 1, 2$  или  $3$ ), предпочтительно  $x=4, n=6$  или  $7$ , и  $m=0, 1, 2$  или  $3$ , более предпочтительно  $x=4, n=7$  и  $m=2$  или  $(G_4S)_6G_2$ .

В контексте настоящего описания понятие "константная область" означает сумму доменов антитела, отличных от вариабельной области. Константная область не участвует непосредственно в связывании антигена, но обеспечивает различные эффекторные функции. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей антитела подразделяют на классы: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них можно дополнительно подразделять на подклассы, такие как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, IgA1 и IgA2. Константные области тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулина, обозначают как  $\alpha, \delta, \epsilon, \gamma$  и  $\mu$  соответственно. Константные области легкой цепи антитела, которые могут присутствовать во всех пяти классах антител, обозначают как каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ).

В контексте настоящего описания понятия "константная область, выведенная из человеческого источника" или "человеческая константная область" означают константную область тяжелой цепи человеческого антитела подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 и/или константную область легкой каппа- или лямбда-цепи. Указанные константные области хорошо известны в данной области и описаны, например, 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 (см, например, также Johnson G. и Wu T.T., *Nucleic Acids Res.* 28, 2000, с. 214-218; Kabat E.A. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1975, с. 2785-2788). В контексте настоящего описания для нумерации положений и мутаций применяют систему нумерации EU (EU-индекс) согласно 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 и обозначают как "нумерация в соответствии с EU-индексом Кэбота".

Биспецифические антитела могут иметь константную область человеческого подкласса IgG1 (выведенную из человеческого подкласса IgG1), или константную область человеческого подкласса IgG4 (выведенную из человеческого подкласса IgG4).

Биспецифическое антитело может представлять собой человеческое антитело подкласса IgG1 с мутациями L234A (Leu235Ala), L235A (Leu234Ala) и P329G (Pro329Gly). Указанное антитело обладает пониженной способностью связываться с FcR (прежде всего оно больше не может связываться с FcR гамма I, FcR гамма II и FcR гамма III). Это, прежде всего, ценно для снижения потенциальных побочных действий типа, например, тромбоза (Meyer T. и др., *J. Thromb. Haemost.* 7, 2009, с. 171-181). Биспецифическое антитело может представлять собой человеческое антитело подкласса IgG4 с мутациями S228P (Ser228Pro), L235E (Leu235Glu) и P329G (Pro329Gly). Указанное антитело обладает пониженной описанной выше способностью связываться с FcR. Хотя уже описанная ранее мутация Pro329Ala удаляет только две трети взаимодействия при оценке с использованием Fc гамма RIIIa-сэндвича, Pro329Gly в антителах полностью нарушает связывание Fc-области с Fc гамма RIII. Это является особенно ценным, поскольку связывание с Fc гамма RIII участвует в ADCC (антитело-обусловленная клеточнoзависимая цитотоксичность), которая приводит к гибели клеток, что может быть полезным при лечении раковых заболеваний, но может вызывать серьезные побочные действия при лечении с использованием антител других сосудистых или иммунологических заболеваний. Поэтому антитела IgG1-подкласса с мутациями L234A, L235A и P329G и IgG4-подкласса с мутациями S228P, L235E и P329G являются наиболее ценными, поскольку они оба больше не могут связываться с FcR гамма I, FcR гамма II и FcR гамма III.

В контексте настоящего описания понятие "с AAA-мутациями" относится к мутациям I253A (Ile253Ala), H310A (His310Ala) и H435A (His435Ala) в константной области тяжелой цепи IgG1 или IgG4, где нумерация соответствует EU-индексу Кэбота.

В контексте настоящего описания понятие "с P329G LALA-мутациями" относится к мутациям L234A (Leu235Ala), L235A (Leu234Ala) и P329G (Pro329Gly) в константной области тяжелой цепи IgG1-подкласса, где нумерация соответствует EU-индексу Кэбота. В контексте настоящего описания понятие

"с SPLE-мутациями" относится к мутациям S228P (Ser228Pro) и L235E (Leu235Glu) в константной области тяжелой цепи IgG4-подкласса, где нумерация соответствует EU-индексу Кэбота. В контексте настоящего описания понятие "с SPLE и P239G-мутациями" относится к мутациям S228P (Ser228Pro), L235E (Leu235Glu) и P239G (Pro239Gly) в константной области тяжелой цепи IgG4-подкласса, где нумерация соответствует EU-индексу Кэбота.

Антитело можно получать с помощью методов рекомбинации. Методы рекомбинантного получения широко известны в данной области и заключаются в том, что экспрессируют белок в прокариотических и эукариотических клетках с последующим выделением антитела и, как правило, очисткой до фармацевтически приемлемой чистоты. Для экспрессии антител в вышеуказанных клетках-хозяевах нуклеиновую кислоту, кодирующую соответствующие модифицированные легкие и тяжелые цепи, встраивают в экспрессионные векторы с помощью стандартных методов. Экспрессию осуществляют в пригодных прокариотических и эукариотических клетках-хозяевах типа СНО-клеток, NSO-клеток, SP2/0-клеток, HEK293-клеток, COS-клеток, PER.C6-клеток, дрожжей или клеток *E.coli*, и антитело выделяют из клеток (из супернатанта или клеток после лизиса). Общие методы рекомбинантного получения антител хорошо известны в данной области и описаны, например, в обзорных статьях Makrides S.C., *Protein Expr. Purif.* 17, 1999, с.183-202; Geisse S. и др., *Protein Expr. Purif.* 8, 1996, с. 271-282; Kaufman R.J., *Mol. Biotechnol.* 16, 2000, с. 151-160; Werner R.G., *Drug Res.* 48, 1998, с. 870-880.

Итак, способ получения биспецифического антитела может заключаться в том, что осуществляют стадии, на которых

а) трансформируют клетку-хозяина векторами, содержащими молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют указанное антитело;

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

в) выделяют указанную молекулу антитела из указанной культуры. Стадия выделения, указанная в подпункте в), может включать применение специфического "захватывающего" реагента для константной области легкой цепи (который, например, является специфическим для константной области легкой каппа- или лямбда-цепи, в зависимости от того, легкая каппа- или лямбда цепь применяется в биспецифическом антителе, предлагаемом в изобретении). Причем указанный специфически "захватывающий" легкую цепь реагент применяют в режиме связывания-и-элюции). Примерами указанных специфических для константной области легкой цепи "захватывающих" реагентов являются, например, KappaSelect™ и LambdaFabSelect™ фирмы GE Healthcare/BAC, основой которых является очень жесткий матрикс на основе агарозы, который обеспечивает высокие скорости потока и низкое обратное давление при крупномасштабном анализе. Их особенностью является лиганд, который связывается с константной областью легкой каппа- или лямбда-цепи соответственно (т.е. фрагменты, лишенные константной области легкой цепи не связываются; фиг. 1). Таким образом, оба реагента обладают способностью связываться с другими молекулами-мишенями, которые содержат константную область легкой цепи, например, IgG, IgA и IgM. Лиганды присоединяют к матриксу через плечо длинного гидрофильного спейсера, что делает их легко доступными для связывания с молекулой-мишенью. Они находятся на одноцепочечном фрагменте антитела, который подвергают скринингу в отношении каппа- или лямбда-цепи человеческого Ig.

Биспецифические антитела можно отделять от культуральной среды с помощью общепринятых процедур очистки иммуноглобулинов, таких, например, как хроматография на белок А-сефарозе, хроматография на гидроксилapatите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография. ДНК и РНК, кодирующие моноклональные антитела, легко выделять и секвенировать с помощью общепринятых процедур. Клетки гибридомы могут служить в качестве источника таких ДНК и РНК. После выделения ДНК можно встраивать в экспрессионные векторы, которыми затем трансфектируют клетки-хозяева, такие как HEK293-клетки, СНО-клетки или клетки миеломы, которые в противном случае не могут продуцировать белок иммуноглобулина, с получением в результате синтеза рекомбинантных моноклональных антител в клетках-хозяевах.

Варианты (или мутанты) аминокислотной последовательности биспецифического антитела получают путем интродукции соответствующих нуклеотидных замен в ДНК антитела или путем синтеза нуклеотидов. Однако указанные модификации можно осуществлять только в очень ограниченном диапазоне. Например, модификации не должны изменять указанные выше характеристики антитела, такие как IgG-подкласс и связывание антигена, но могут повышать выход рекомбинантного производства, стабильность белка или облегчать очистку.

В контексте настоящего описания понятие "клетка-хозяин" означает любой тип клеточной системы, который можно создавать для получения антител. В качестве клеток-хозяев можно применять HEK293-клетки и СНО-клетки.

В контексте настоящего описания понятия "клетка", "клеточная линия" и "клеточная культура" используются взаимозаменяемо, и они все включают потомство указанных клеток. Так, понятия "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают первично трансформированную клетку и выведенные из нее культуры безотносительно к количеству пересевов. Следует понимать также, что потомство может не быть полностью идентичным по составу ДНК из-за произвольных или преднамеренных му-

таций. Под объем изобретения подпадает вариант потомства, который обладает такой же функцией или биологической активностью, которая обнаружена в результате скрининга или отобрана у исходной трансформированной клетки.

Экспрессия в NSO-клетках описана, например, у Barnes L.M. и др., *Cytotechnology* 32, 2000, с. 109-123; Barnes L.M. и др., *Biotech. Bioeng.* 73, 2001, с. 261-270. Кратковременная экспрессия описана, например, у Durocher Y. и др., *Nucl. Acids. Res.* 30, 2002, E9. Клонирование переменных доменов описано у Orlandi R. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1989, с. 3833-3837; Carter P. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1992, с. 4285-4289 и у Norderhaug L. и др., *J. Immunol. Methods* 204, 1997, с. 77-87. Предпочтительная система кратковременной экспрессии (HEK293) описана у Schlaeger E.-J. и Christensen K., *Cytotechnology* 30, 1999, с. 71-83 и у Schlaeger E.-J., *J. Immunol. Methods* 194, 1996, с. 191-199.

Контролирующие последовательности, которые можно применять для прокариот, включают, например, промотор, необязательно последовательность оператора и сайт связывания рибосом. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, энхансеры и сигналы полиаденилирования.

Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", когда она находится в функциональной взаимосвязи с другой нуклеиновой кислотой. Например, ДНК предпоследовательности или секреторного лидера функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в виде предбелка, который принимает участие в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательности, если он влияет на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы облегчать трансляцию. Как правило, "функционально связанные" означает, что последовательности ДНК, подлежащие связыванию, являются смежными, а в случае секреторного лидера, смежными и находиться в рамке считывания. Однако не является обязательным, чтобы энхансеры были смежными. Связывание осуществляют путем лигирования в приемлемых сайтах рестрикции. Если указанные сайты не существуют, то согласно принятой практике используют синтетические олигонуклеотидные адапторы или линкеры.

Очистку антител осуществляют для того, чтобы элиминировать клеточные компоненты или другие загрязнители, например, другие клеточные нуклеиновые кислоты или белки, с использованием стандартных методик, включая обработку щелочью/ДСН, CsCl-бэндинг, хроматографию на колонках, электрофорез в агарозном геле и другие методы, хорошо известные в данной области (см. в *Current Protocols in Molecular Biology*, под ред. Ausubel F. и др., изд-во Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987). Для очистки белков детально разработаны и нашли широкое применение различные методы, такие как аффинная хроматография с использованием белков микроорганизмов (например, аффинная хроматография на белке А или белке G), ионообменная хроматография (например, катионообменная (карбоксиметильные смолы), анионообменная (аминоэтильные смолы) и хроматография на основе обмена смешанного типа), тиофильная адсорбция (например, с бета-меркаптоэтанолом и другими лигандами SH), хроматография гидрофобного взаимодействия или ароматической адсорбции (например, с фенил-сефарозой, аза-аренофильными смолами или м-аминофенилборной кислотой), металл-хелатная аффинная хроматография (например, с Ni(II)- и Cu(II)-аффинный материалом), гель-фильтрация и электрофоретические методы (такие как гель-электрофорез, капиллярный электрофорез) (Vijayalakshmi M.A., *Appl. Biochem. Biotech.* 75, 1998, с. 93-102).

Биспецифические двухвалентные антитела оказывают благоприятное воздействие на больных людей, которые нуждаются в VEGF- и ANG-2-направленной терапии.

Двухвалентные биспецифические антитела к человеческому VEGF и человеческому ANG-2 могут иметь ценный профиль эффективности/безопасности и могут оказывать благоприятное действие на пациента, который нуждается в анти-VEGF- и анти-ANG-2-терапии.

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 введения подлежащему лечению индивидууму местным путем. Например, антитело или содержащую его композицию можно вводить индивидууму путем внутриглазного применения, например, путем внутриглазной инъекции, такой как интравитреальная инъекция. Это можно осуществлять с помощью стандартных процедур, известных в данной области (см., например, Ritter и др., *J. Clin. Invest.* 116, 2006, с. 3266-76; Russelakis-Carneiro и др., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 25, 1999, с. 196-206 и Wray и др., *Arch. Neurol.* 33, 1976, с. 183-185).

Эту композицию 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 введения соединения, 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 фармацевтически приемлемым 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.

Можно применять целый ряд возможных путей введения, включая (но, не ограничиваясь только ими) внутриглазное применение или местное нанесение. Применение может быть внутриглазным и включает (но, не ограничиваясь ими) подконъюнктивальную инъекцию, внутричерепную инъекцию, инъекцию в переднюю камеру через темпоральный лимб, интрастромальную инъекцию, инъекцию в роговицу, инъекцию сетчатку, инъекцию в водянистую влагу глаза, инъекцию в субтенное пространство глаза или введение с помощью устройства с замедленным высвобождением, интравитреальную инъекцию (например, инъекцию в переднюю, срединную или заднюю область стекловидного тела). Причем применение может быть местным и включает (но, не ограничиваясь только ими) нанесение глазных капель на роговицу.

Биспецифическое антителио или фармацевтическую композицию можно применять путем интравитреального введения, например, путем инъекции в стекловидное тело. Это можно осуществлять с помощью стандартных процедур, известных в данной области (см., например, Ritter и др., *J. Clin. Invest.* 116, 2006, с. 3266-76; Russelakis-Carneiro и др., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 25, 1999, с. 196-206 и Wray и др., *Arch. Neurol.* 33, 1976, с. 183-185).

Причем терапевтические наборы могут содержать одну или несколько доз биспецифического антитела в фармацевтической композиции, указанной в настоящем описании, приемлемое устройство для инъекции в стекловидное тело фармацевтической композиции и инструкцию, детализирующую показания для применения индивидуумам и протоколы осуществления инъекции. Композиции, как правило, вводят индивидууму, который нуждается в лечении, путем инъекции в стекловидное тело. Это можно осуществлять с помощью стандартных процедур, известных в данной области (см., например, Ritter и др., *J. Clin. Invest.* 116, 2006, с. 3266-3276; Russelakis-Carneiro и др., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 25, 1999, с. 196-206 и Wray и др., *Arch. Neurol.* 33, 1976, с. 183-185).

Композиции могут содержать также адъюванты, такие как консерванты, смачивающие вещества, 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, сорбиновая кислота и т.п. Целесообразно 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.

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

Фактические уровни доз действующих веществ в фармацевтических композициях можно варьировать для получения количества действующего вещества, которое является эффективным для достижения требуемого терапевтического ответа у конкретного пациента при использовании конкретной композиции и пути введения, но которое 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, продолжительность введения, скорость экскреции конкретного применяемого соединения, 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 ее можно было вводить с помощью шприца. Помимо воды 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 веществ. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию агенты для придания изотоничности, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит или сорбит, и хлорид натрия.

Композиция может представлять собой офтальмическую композицию в форме депо, содержащую действующее вещество для субконъюнктивального введения. Офтальмическая композиция в форме депо содержит микрочастицы практически чистого действующего вещества, например, биспецифического антитела. Микрочастицы, содержащие биспецифическое антителио могут быть погружены в биосовместимый фармацевтически приемлемый полимер или липидный капсулирующий агент. Композиции в форме депо можно адаптировать для высвобождения всего или практически всего действующего вещества в течение удлиненного периода времени. Полимерный или липидный матрикс, если он присутству-

ет, может быть адаптирован к расщеплению, достаточному для того, чтобы транспортироваться от места введения после высвобождения всего или практического всего действующего вещества. Композиция в форме депо может представлять собой жидкую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый полимер и растворенное или диспергированное действующее вещество. После инъекции полимер образует депо в месте инъекции, например, путем образования геля или осаждения.

Итак, описанное биспецифическое антитело и указанная фармацевтическая композиция предназначены для лечения сосудистых глазных заболеваний.

Понятия "сосудистое глазное заболевание" и "сосудистое заболевание глаз" в контексте настоящего описания применяют взаимозаменяемо, и они включают (но, не ограничиваясь только ими) синдромы внутриглазной неоваскуляризации, такие как диабетическая ретинопатия, диабетический отек желтого пятна, ретролентальная фиброплазия, неоваскулярная глаукома, окклюзии вен сетчатки, окклюзии центральной вены сетчатки, дегенерация желтого пятна, возрастная дегенерация желтого пятна, пигментный ретинит, ретиальная ангиоматозная пролиферация, телеангиэктазия желтого пятна, ишемическая ретинопатия, неоваскуляризация радужной оболочки, внутриглазная неоваскуляризация, неоваскуляризация роговицы, неоваскуляризация сетчатки, хороидальная неоваскуляризация и дегенерация сетчатки (Garner A., *Vascular diseases, v: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach*, под ред. Garner A. и Klintworth G.K., 2-ое изд., изд-во Marcel Dekker, New York, 1994, с. 1625-1710). В контексте настоящего описания сосудистое глазное заболевание включает любые патологические состояния, отличающиеся измененной или нерегулируемой пролиферацией и инвазией новых кровеносных сосудов в структуры тканей глаза, таких как сетчатка или роговица. Сосудистое глазное заболевание выбирают из группы, включающей: влажную возрастную дегенерацию желтого пятна (влажная форма AMD), сухую возрастную дегенерацию желтого пятна (сухая форма AMD), диабетический отек желтого пятна (DME), цистойдный отек желтого пятна (CME), непролиферативную диабетическую ретинопатию (NPDR), пролиферативную диабетическую ретинопатию (PDR), цистойдный отек желтого пятна, васкулит (например, окклюзия центральной вены сетчатки) папиллоэдему (отек диска зрительного нерва), ретинит, конъюнктивит, увеит, хороидит, мультифокальный хороидит, гитоплазмоз глаза, блефарит, "сухой глаз" (болезнь Шегрена) и другие офтальмические заболевания, при которых глазное заболевание или нарушение ассоциировано с неоваскуляризацией глаза, просачиванием из сосудов и/или отеком сетчатки. Таким образом, биспецифические антитела можно применять для предупреждения и лечения влажной формы AMD, сухой формы AMD, CME, DME, NPDR, PDR, блефарита, "сухого глаза" и увеита, предпочтительно также влажной формы AMD, сухой формы AMD, блефарита и "сухого глаза", предпочтительно также CME, DME, NPDR и PDR, предпочтительно также блефарита и "сухого глаза", в частности влажной формы AMD и сухой формы AMD, а также наиболее предпочтительно важной формы AMD. Глазное заболевание можно выбрать из группы, включающей влажную возрастную дегенерацию желтого пятна (влажная форма AMD), отек сетчатки, окклюзии вен сетчатки, ретролентальную фиброплазию и диабетическую ретинопатию.

Другие болезни, ассоциированные с неоваскуляризацией роговицы, включают (но, не ограничиваясь только ими) эпидемический кератоконъюнктивит, дефицит витамина А, переносение положенного времени контактных линз, атопический кератит, верхний лимбический кератит, птеригий, сухой кератит, болезнь Шегрена, розовые угри, фликтенулоз, сифилис, инфекции, вызываемые микобактериями, липидные дегенерации, химические ожоги, бактериальные язвы, грибковые язвы, инфекции, вызываемые вирусом герпеса простого, инфекции, вызываемые вирусом опоясывающего лишая, протозойные инфекции, саркому Капоши, язву Мурена, краевую дегенерацию Терриена, краевой кератолизис, ревматоидный артрит, системную красную волчанку, полиартрит, травму, саркоидоз Вегенера, склерит, болезнь Стивена-Джонсона, периферическую радиальную кератотомию и отторжение трансплантата роговицы.

Заболевания, ассоциированные с ретиальной/хороидальной неоваскуляризацией, включают (но, не ограничиваясь только ими) диабетическую ретинопатию, дегенерацию желтого пятна, серповидноклеточную анемию, саркоид, сифилис, псевдоксантому эластическую, болезнь Педжета, окклюзию вен, окклюзию артерий, обструктивное заболевание сонной артерии, хронический увеит/витрит, инфекции, вызываемые микобактериями, болезнь Лайма, системную красную волчанку, ретролентальную фиброплазию, пигментный ретинит, отек сетчатки (включая отек желтого пятна), болезнь Изла, болезнь Бехчета, инфекции, вызывающие ретинит или хороидит, синдром предполагаемого глазного гитоплазмоза, болезнь Беста, миопию, ямки диска зрительного нерва, болезнь Штаргардта, туберкулез сосудистой оболочки глазного яблока (туберкулезный увеит), хроническое отслоение сетчатки, синдром гипервязкости, токсоплазмоз, осложнения, связанные с травмой и воздействием лазера. Другие болезни включают (но, не ограничиваясь только ими) болезни, ассоциированные с покраснением (неоваскуляризация угла), и болезни, вызываемые аномальной пролиферацией фиброваскулярной или фиброзной ткани, включая все формы пролиферативной витриоретинопатии.

Ретролентальная фиброплазия (ROP) представляет собой заболевание глаза, которое поражает преждевременно родившихся детей. Вероятно, оно вызывается дезорганизованным ростом кровеносных сосудов сетчатки, что может приводить к рубцеванию и отслоению сетчатки. ROP может быть слабой и может спонтанно устраняться, но может в серьезных случаях приводить к слепоте. В целом, все недоношенные дети имеют риск ROP, а очень низкий вес при рождении является дополнительным фактором

риска. Как токсичность кислорода, так и относительно гипоксия могут принимать участие в развитии ROP.

Дегенерация желтого пятна представляет собой медицинское состояние, встречающееся главным образом у престарелых людей, при котором центр внутренней выстилки глаза, известный как желтое пятно (макула) сетчатки, истончается, атрофируется и в некоторых случаях кровоточит. Это может приводить к снижению центрального зрения, что влечет за собой отсутствие возможности видеть мелкие детали, читать или различать лица. Согласно Американской академии офтальмологии в Соединенных Штатах это является причиной потери центрального зрения (слепоты) у людей возрастом старше 50 лет. Хотя некоторые дистрофии желтого пятна, которые поражают более молодых индивидуумов, иногда обозначают как дегенерация желтого пятна, понятие, как правило, относится к возрастной дегенерации желтого пятна (AMD или ARMD).

Возрастная дегенерация желтого пятна начинается с характерных отложений желтого цвета, называемых друзами, в макуле (центральная область сетчатки, которая обеспечивает детализированное центральное зрение, называемая ямкой), между пигментным эпителием сетчатки и низлежащей собственно сосудистой оболочкой глаза. Большинство людей с указанными ранними изменениями (которые называют возрастной макулопатией) имеют хорошее зрение. У людей с друзами может развиваться запущенная форма AMD.

Риск значительно возрастает, когда друзы становятся крупными и многочисленными и связанными с нарушением в слое пигментированных клеток под желтым пятном. Крупные и мягкие друзы связаны с повышенными отложениями холестерина и могут реагировать на лечение снижающими холестерин средствами или Рео-процедуру.

Запущенная форма AMD, ответственная за глубокую (полную) потерю зрения, имеет две формы: сухую и влажную. Затрагивающая центральную ямку географическая атрофия, сухая форма запущенной AMD, является результатом атрофии слоя пигментного эпителия сетчатки, расположенного под сетчаткой, что приводит к потере зрения в результате потери фоторецепторов (палочек и колбочек) в центральной области глаза. Хотя для этого состояния отсутствует лечение, Национальным институтом глаза и другими организациями продемонстрировано, что витаминные добавки с высокими дозами антиоксидантов, лютеином и зеаксантином замедляют развитие сухой формы дегенерации желтого пятна у некоторых пациентов, улучшая визуальную активность.

Ретинит пигментный (RP) представляет собой группу генетических состояний глаза. При прогрессировании симптомов RP, как правило, ночная слепота предшествует туннельному зрению в течение ряда лет или даже десятилетий. Многие люди с RP не становятся формально слепыми до 40 или 50 лет и сохраняют некоторое зрение в течение всей жизни. У других в результате RP развивается полная слепота, в некоторых случаях даже уже в детстве. Развитие RP в каждом случае является различным. RP является типом наследственной дистрофии сетчатки, т.е. относится к группе наследственных нарушений, при которых аномалии фоторецепторов (палочки и колбочки) или ретинального пигментного эпителия (RPE) сетчатки приводит к прогрессирующей потере зрения. Пораженные индивидуумы сначала страдают нарушенной адаптацией к темноте или никталопией (куриная (ночная) слепота), затем снижением периферического поля зрения (так называемым туннельным зрением) и иногда позднее в процессе развития болезни снижением центрального зрения.

Макулярный отек (отек желтого пятна) имеет место, когда жидкость и белковые отложения собираются на макуле или под макулой глаза, центральной областью желтого цвета сетчатки, вызывая утолщение и набухание. Набухание может исказить центральное зрение человека, поскольку желтое пятно находится вблизи центра сетчатки на задней стенке глазного яблока. Эта область содержит плотно упакованные колбочки, что обеспечивает острое, ясное центральное зрение, позволяющее человеку видеть форму, цвет и детали, которые находятся непосредственно на линии взгляда. Цистоидный макулярный отек является типом макулярного отека, который включает образование цист.

Комбинированные терапии: Биспецифическое антитело или фармацевтическую композицию, можно применять индивидуально (без дополнительного терапевтического средства) для лечения одного или нескольких глазных заболеваний, указанных в настоящем описании.

Биспецифическое антитело или фармацевтическую композицию можно применять в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами или методами для лечения одного или нескольких глазных заболеваний, указанных в настоящем описании.

А значит, биспецифическое антитело или фармацевтическую композицию можно приготовить в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами и применять для лечения одного или нескольких глазных заболеваний, указанных в настоящем описании.

Комбинированные терапии, представленные в настоящем описании, предусматривают введение биспецифического антитела или фармацевтической композиции последовательно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами для лечения одного или нескольких глазных заболеваний, указанных в настоящем описании.

Дополнительные терапевтические средства включают (но, не ограничиваясь только ими) триптофан-ТРНК-синтазу (TrpRS), EyeOOI (пэгиллированный анти-VEGF аптамер), скваламин, RETAANE™

(анекортава ацетат в виде депо-суспензии; фирма Alcon, Inc.), пролекарство комбретастина А4 (СА4Р), MACUGEN™, MIFEPREX™ (мифепристон-ru486), субтенон, триамцинолона ацетонид, интравитреальный кристаллический триамцинолона ацетонид, приномастат (AG3340-синтетический ингибитор матричных металлопротеиназ, фирма Pfizer), флуцинолона ацетонид (включая внутриглазной имплантат флуцинолона, фирма Bausch & Lomb/Control Delivery Systems), ингибиторы VEGFR (фирма Sugen), VEGF-Trap (фирма Regeneron/Aventis), ингибиторы тирозинкиназного рецептора VEGF, такие как 4-(4-бром-2-фторанилино)-6-метокси-7-(1-метилпиперидин-4-илметокси)хиназолин (ZD6474), 4-(4-фтор-2-метиллиндол-5-илокси)-6-метокси-7-(3-пирролидин-1-илпропокси)хиназолин (AZD2171), ваталаниб (РТК787) и SU1 1248 (сунитиниб), линомид и ингибиторы функции интегрин бета-3, и ангиостатин.

Другие фармацевтические терапии, которые можно применять в сочетании с биспецифическим антителом или фармацевтической композицией включают (но, не ограничиваясь только ими), VISUDYNE™, применяемый вместе с нетермическим лазером, РКС 412, эндовин (фирма NeuroSearch A/S), нейротрофические факторы, включая в качестве примера глиальный нейротрофический фактор и цилиарный нейротрофический фактор, диатазем, дорзоламид, фототроп (Phototrop), 9-цис-ретиналь, глазные лекарственные средства (включая эхо-терапию (Echo Therapy), включая фосфолина йодид или эхотиофат, или ингибиторы угольной ангидразы, АЕ-941 (фирма AEterna Laboratories, Inc.), Sirna-027 (фирма Sirna Therapeutics, Inc.), пегаптаниб (фирма NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), нейротрофины (включая только в качестве примера, NT-4/5, фирма Genentech), Cand5 (фирма Acuity Pharmaceuticals), INS-37217 (фирма Inspire Pharmaceuticals), антагонисты интегрин (включая препараты фирм Jerini AG и Abbott Laboratories), EG-3306 (фирма Ark Therapeutics Ltd.), BDM-E (фирма BioDiem Ltd.), талидомид (применяемый, например, фирмой EntreMed, Inc.), кардиотрофин-1 (фирма Genentech), 2-метоксиэстрадиол (фирма Allergan/Oculex), DL-8234 (фирма Toray Industries), NTC-200 (фирма Neurotech), тетраиомолибдат (Мичиганский Университет (University of Michigan)), LYN-002 (фирма Lynkeus Biotech), соединение из микроводорослей (фирма Aquasearch/Albany, Mera Pharmaceuticals), D-9120 (фирма Celltech Group pic), АТХ-S10 (Hamamatsu Photonics), TGF-бета 2 (фирма Genzyme/Celtrix), ингибиторы тирозинкиназ (фирмы Allergan, SUGEN, Pfizer), NX-278-L (фирма NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), Opt-24 (фирма OPTIS France SA), нейропротекторы ганглиев клеток сетчатки (фирма Cogent Neurosciences), N-нитропиразольные производные (фирма Texas A&M University System), KP-102 (фирма Krenitsky Pharmaceuticals), циклоспорин А, "ограниченную транслокацию сетчатки", фотодинамическую терапию (PDT) (включая (только в качестве примера) рецепторнаправленную PDT, фирма Bristol-Myers Squibb, Co.; порфирин натрия для инъекции совместно с PDT; вертепорфин, фирма QLT Inc.; растапорфин, применяемый совместно с PDT, фирма Miravent Medical Technologies; талапорфин натрия применяемый совместно с PDT, фирма Nippon Petroleum; мотексафин лютеция, фирма Pharnacsys, Inc.), антисмысловые олигонуклеотиды (включая только в качестве примера, продукты, протестированные фирмой Novagali Pharma SA и ISIS-13650, фирма Isis Pharmaceuticals), лазерную фотокоагуляцию, обработку друз лазером, хирургию макулярных разрывов сетчатки, хирургическую транслокацию макулы, имплантируемые миниатюрные телескопы, ангиографию Phi-движения (известную также как микрولазерная терапия или ангиография фидерных сосудов), бомбардировку протонным пучком, микростимулирующую терапию, хирургию по поводу отслоения сетчатки и операцию на стекловидном теле, операцию вдавливания сферы, операцию в субмакулярной области, транспуиллярную термотерапию, терапию фотосистемы I, применение РНК-интерференции (РНКi), экстракорпоральный реоферез (известный также как мембранная дифференциальная фильтрация и реотерапия), имплантацию микроципов, терапию стволовыми клетками, генную заместительную терапию, генную терапию на основе рибозимов (включая генную терапию с использованием элемента ответа на гипоксию, фирмы Oxford Biomedica; Lentipak, Genetix; генная терапия PDEF, фирма Gen Vec), трансплантацию фоторецепторных/ретинальных клеток (включая трансплантируемые эпителиальные клетки сетчатки, фирма Diacrin, Inc.; трансплантат клеток сетчатки, фирма Cell Genesys, Inc.) и акупунктуру.

Любое антиангиогенное средство можно применять в сочетании с биспецифическим антителом или фармацевтической композиций, включая (но, не ограничиваясь только ими) указанные у Carmeliet и Jain, Nature 407, 2000, с. 249-257. Антиангиогенное средства могут представлять собой другой антагонист VEGF или антагонист рецептора VEGF, такой как варианты VEGF, фрагменты растворимого рецептора VEGF, аптамеры, обладающие способностью блокировать VEGF или VEGFR, нейтрализующие антитела к VEGFR, низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ VEGFR и любые их комбинации, и они включают анти-VEGF аптамеры (например, пегаптаниб), растворимые рекомбинантные рецепторы-ловушки (например, VEGF Trap). Антиангиогенное средство может также включать кортикостероиды, ангиостатические стероиды, анекортава ацетат, ангиостатин, эндостатин, малые интерферирующие РНК, снижающие экспрессию VEGFR или лиганда VEGF, средства пост-VEGFR-блокады на основе ингибиторов тирозинкиназ, ингибиторы MMP, IGFBP3, блокаторы SDF-1, PEDF, гамма-секретазу, дельта-подобный лиганд 4, антагонисты интегрин, блокатор HIF-1-альфа, блокатор протеинкиназы СК2 и ингибитор холинга стволовой клетки (т.е. клетки-предшественника эндотелиальных клеток) к области неоваскуляризации с использованием эндотелиального кадгерина (CD-144) и антител к стромальному фактору (SDF)-I. Можно применять также низкомолекулярные ингибиторы RTK, мишенью которых являются VEGF-

рецепторы, включая РТК787. Можно применять также агенты, обладающие активностью в отношении неоваскуляризации, которые не обязательно представляют собой анти-VEGF-соединения, и они включают противовоспалительные лекарственные средства, ингибиторы m-Tor, рапамицин, эверолимус, темси-ролимус, циклоспон, анти-TNF-агенты, агенты, мишенью которых является комплемент, и нестероидные противовоспалительные средства. Можно применять также агенты, обладающие нейрозащитным действием, и которые могут потенциально снижать развитие сухой формы дегенерации желтого пятна, например, класс лекарственных средств, называемых "нейростероидами". Они включают такие лекарственные средства, как дегидроэпиандростерон (DHEA) (товарные знаки: Prastera® и Fidelin®), дегидроэпиандростерона сульфат и прегненолона сульфат. Любое предназначенное для лечения AMD (возрастная дегенерация желтого пятна) терапевтическое средство можно применять в сочетании с биспецифическим анти-телом или фармацевтической композицией, предлагаемым/предлагаемой в изобретении, включая (но, не ограничиваясь только ими) вертепорфин в сочетании с PDT, пегаптантат натрия, цинк или антиоксидант(ы), индивидуально или в любой комбинации.

Понятия "индивидуум" и "пациент" применяются взаимозаменяемо, и они относятся к млекопитающим, таким как большие люди и приматы кроме человека, а также к экспериментальным животным, таким как кролики, крысы и мыши, а также другие животные. Животные включают всех позвоночных животных, например, млекопитающих и животных, не относящихся к млекопитающим, таким как собаки, кошки, овцы, свиньи, кролики, куры и т.д. Предпочтительными индивидуумами для воплощения на практике терапевтических способов являются люди. Индивидуумы, которые нуждаются в лечении, включают пациентов, которые уже страдают глазным заболеванием или нарушением, а также предрасположенных к развитию нарушения.

В контексте настоящего описания понятия "клетка", "клеточная линия" и "клеточная культура" используются взаимозаменяемо, и они все включают потомство. Так, понятия "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают первично трансформированную клетку и выведенные из нее культуры безотносительно к количеству пересевов. Следует понимать также, что потомство может не быть полностью идентичным по составу ДНК из-за произвольных или преднамеренных мутаций. Под объем изобретения подпадает вариант потомства, который обладает такой же функцией или биологической активностью, которая обнаружена в результате скрининга у исходной трансформированной клетки. В тех случаях, когда следует применять другие обозначения, это должно быть очевидно из контекста.

В контексте настоящего описания понятие "трансформация" относится к процессу переноса векторов/нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Если в качестве клеток-хозяев применяют клетки, оболочки которых не представляют собой труднопреодолимые барьеры, то трансфекцию осуществляют, например, методом, основанным на осаждении фосфатом кальция, описанным у Graham и Van der Eb, *Virology* 52, 1973, с. 546-567. Однако можно применять также и другие методы интродукции ДНК в клетки, такие как инъекция в ядра 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 S.N. и др., *PNAS* 69, 1972, с. 2110-2114.

В контексте настоящего описания понятие "экспрессия" относится к 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 выводят из геномной ДНК, то экспрессия в эукариотической клетке может включать сплайсинг мРНК.

"Вектор" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, в частности самореплицирующуюся молекулу, 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), репликационные векторы, функция которых состоит прежде всего в репликации ДНК или РНК, и в 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.

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

## Описание перечня последовательностей (аминокислотные последовательности)

SEQ ID NO:	1	CDR3H тяжелой цепи, <VEGF> ранибизумаб
SEQ ID NO:	2	CDR2H тяжелой цепи, <VEGF> ранибизумаб
SEQ ID NO:	3	CDR1H тяжелой цепи, <VEGF> ранибизумаб
SEQ ID NO:	4	CDR3L легкой цепи, <VEGF> ранибизумаб
SEQ ID NO:	5	CDR2L легкой цепи, <VEGF> ранибизумаб
SEQ ID NO:	6	CDR1L легкой цепи, <VEGF> ранибизумаб
SEQ ID NO:	7	вариабельный домен тяжелой цепи VH, <VEGF> ранибизумаб
SEQ ID NO:	8	вариабельный домен легкой цепи VL, <VEGF> ранибизумаб
SEQ ID NO:	9	CDR3H тяжелой цепи, <ANG-2> вариант Ang2i LC10
SEQ ID NO:	10	CDR2H тяжелой цепи, <ANG-2> вариант Ang2i LC10 t
SEQ ID NO:	11	CDR1H тяжелой цепи, <ANG-2> вариант Ang2i LC10
SEQ ID NO:	12	CDR3L легкой цепи, <ANG-2> вариант Ang2i LC10
SEQ ID NO:	13	CDR2L легкой цепи, <ANG-2> вариант Ang2i LC10,
SEQ ID NO:	14	CDR1L легкой цепи, <ANG-2> вариант Ang2i LC10
SEQ ID NO:	15	вариабельный домен тяжелой цепи VH, <ANG-2> вариант Ang2i LC10
SEQ ID NO:	16	вариабельный домен легкой цепи VL, <ANG-2> вариант Ang2i LC10
SEQ ID NO:	17	человеческий сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF); последовательность-предшественник человеческого VEGF165
SEQ ID NO:	18	человеческий ангиопоэтин-2 (ANG-2)
SEQ ID NO:	19	человеческий ангиопоэтин-1 (ANG-1)
SEQ ID NO:	20	человеческий Tie-2-рецептор
SEQ ID NO:	21	тяжелая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 с AAA-мутациями (VEGFang2-0012)
SEQ ID NO:	22	тяжелая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 с AAA-мутациями (VEGFang2-0012)
SEQ ID NO:	23	легкая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 с AAA-мутациями (VEGFang2-0012)
SEQ ID NO:	24	легкая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 с AAA-мутациями (VEGF-Ang2-0012)
SEQ ID NO:	25	тяжелая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 с AAA-мутациями и P329G LALA-мутациями (VEGFang2-0016)
SEQ ID NO:	26	тяжелая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 с AAA-мутациями и P329G LALA-мутациями (VEGFang2-0016)
SEQ ID NO:	27	легкая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 с AAA-мутациями и P329G LALA-мутациями (VEGFang2-0016)
SEQ ID NO:	28	легкая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 с AAA-мутациями и P329G LALA-мутациями (VEGFang2-0016)
SEQ ID NO:	29	тяжелая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG4 с AAA-мутациями и с SPLE-мутациями
SEQ ID NO:	30	тяжелая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG4 с AAA-мутациями и с SPLE-мутациями
SEQ ID NO:	31	легкая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG4 с AAA-мутациями и с SPLE-мутациями
SEQ ID NO:	32	легкая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG4 с AAA-мутациями и с SPLE-мутациями
SEQ ID NO:	33	тяжелая цепь 1 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 с AAA-мутациями
SEQ ID NO:	34	тяжелая цепь 2 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 с AAA-мутациями
SEQ ID NO:	35	легкая цепь 1 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 с AAA-мутациями
SEQ ID NO:	36	тяжелая цепь 1 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 с AAA-мутациями и с SPLE-мутациями
SEQ ID NO:	37	тяжелая цепь 2 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 с AAA-мутациями и с SPLE-мутациями
SEQ ID NO:	38	легкая цепь 1 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 с AAA-мутациями и с SPLE-мутациями
SEQ ID NO:	39	тяжелая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 дикого типа (без AAA-мутаций) (VEGFang2-0201)
SEQ ID NO:	40	тяжелая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 дикого типа (без AAA-мутаций) (VEGFang2-0201)
SEQ ID NO:	41	легкая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 дикого типа (без AAA-мутаций) (VEGFang2-0201)
SEQ ID NO:	42	легкая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 дикого типа (без AAA-мутаций) (VEGFang2-0201)
SEQ ID NO:	43	тяжелая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 только с P329G LALA-мутациями (без AAA-мутаций) (VEGFang2-0015)
SEQ ID NO:	44	тяжелая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 только с P329G LALA-мутациями (без AAA-мутаций) (VEGFang2-0015)
SEQ ID NO:	45	легкая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 только с P329G LALA-мутациями (без AAA-мутаций) (VEGFang2-0015)
SEQ ID NO:	46	легкая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 только с P329G LALA-мутациями (без AAA-мутаций) (VEGFang2-0015)
SEQ ID NO:	47	константная область легкой каппа-цепи
SEQ ID NO:	48	константная область легкой лямбда-цепи
SEQ ID NO:	49	константная область тяжелой цепи, выведенная из человеческого IgG1
SEQ ID NO:	50	константная область тяжелой цепи, выведенная из человеческого IgG4

### Экспериментальные процедуры

Таблица 1. Биспецифические антитела и соответствующие им последовательности

Описание	Сокращенное обозначение	Последовательности
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 с AAA-мутациями	VEGFang2-0012	SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 дикого типа (без AAA-мутаций)	VEGFang2-0201-	SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 с AAA-мутациями и P329G LALA-мутациями	VEGFang2-0016	SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 только с P329G LALA-мутациями (без AAA-мутаций)	VEGFang2-0015	SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 с AAA-мутациями и с SPLE-мутациями	--	SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32
<VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 с AAA-мутациями	-	SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35
<VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 с AAA-мутациями и с SPLE-мутациями	-	SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38

Следует иметь в виду, что в контексте настоящего описания понятие "с AAA-мутациями" относится к мутациям I253A (Leu253Ala), H310A (His310Ala) и H435A (His435Ala) в константной области тяжелой цепи IgG1 или IgG4 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота), понятие "с P329G LALA-мутациями" в контексте настоящего описания относится к мутациям L234A (Leu235Ala), L235A (Leu234Ala) и P329G (Pro329Gly) в константной области тяжелой цепи IgG1-подкласса (нумерация согласно EU-индексу Кэбота), а понятие "с SPLE-мутациями" в контексте настоящего описания относится к мутациям S228P (Ser228Pro) и L235E (Leu235Glu) в константной области тяжелой цепи IgG4-подкласса (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

#### 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 антитела пронумерованы и обозначены согласно EU-нумерации (Edelman G.M. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 1969, с. 78-85; 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).

##### Методы рекомбинантной ДНК

Для манипуляций с ДНК применяли 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. Все применяемые в молекулярной биологии реагенты применяли согласно инструкциям производителей.

##### Синтез генов

Требуемые сегменты генов заказывали в соответствии с представленными спецификациями на фирме Geneart (Регенсбург, Германия).

##### Определение последовательности ДНК

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

##### Анализ последовательностей ДНК и белков и оценка данных о последовательностях

Для создания, картирования, анализа, аннотации и иллюстрации последовательностей применяли пакет программ фирмы GCG (Genetics Computer Group, Мэдисон, шт. Висконсин), версия 10.2 и усовершенствованный набор программ Infomax's Vector NT1, версия 8.0.

##### Экспрессионные векторы

Для экспрессии описанных антител применяли варианты экспрессионных плазмид для кратковременной экспрессии в клетках (например, в НЕК293-Г-клетках), основанных либо на кДНК-организации с интроном А промотора CMV или без него, либо на геномной организации с промотором CMV. Помимо кассеты экспрессии антитела векторы включали:

- сайт инициации репликации, который обеспечивает репликацию этой плазмиды в E. coli,
- ген β-лактамазы, который придает устойчивость E. coli к ампициллину, и
- ген дигидрофолатредуктазы из Mus musculus в качестве селективируемого маркера в эукариотических клетках.

Транскрипционная единица гена антитела состояла из следующих элементов:

уникальный(ые) сайт(ы) рестрикции на 5'-конце, немедленно-ранний энхансер и промотор из человеческого цитомегаловируса, расположенная за ней последовательность интрона А в случае организации на основе кДНК,

5'-нетранслируемая область гена человеческого антитела, сигнальная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина, цепь человеческого антитела (дикого типа или с заменой доменов) либо с организацией на основе кДНК, либо с геномной организацией с экзон-интронной организацией иммуноглобулина,

3'-нетранслируемая область с последовательностью сигнала полиаденилирования и уникальный(ые) сайт(ы) рестрикции на 3'-конце.

Слитые гены, содержащие цепи антитела, описанные ниже, создавали с помощью ПЦР и/или синтеза генов и собирали с помощью известных методов и технологий рекомбинации путем соединения соответствующих сегментов нуклеиновых кислот, например, с использованием уникальных сайтов рестрикции в соответствующих векторах. Субклонированные нуклеотидные последовательности подтверждали секвенированием ДНК. Для кратковременных трансфекций получали большие количества плазмид путем получения плазмид из трансформированных культур *E. coli* (фирма Nucleobond AX, фирма Macherey-Nagel).

### Методики культивирования клеток

Применяли стандартные методики культивирования клеток, описанные в *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.

Биспецифические антитела экспрессировали путем кратковременной котрансфекции соответствующими плазмидами экспрессии клеток НЕК29-F, выращенных в суспензии, согласно описанному ниже методу.

Пример 1. Экспрессия и очистка.

Кратковременные трансфекции в НЕК293-F-системе.

Биспецифические антитела создавали путем кратковременной трансфекции с помощью соответствующих плазмид (например, кодирующих тяжелую цепь и модифицированную тяжелую цепь, а также соответствующую легкую цепь и модифицированную легкую цепь), используя НЕК293-F-систему (фирма Invitrogen), согласно инструкции производителя. В целом, метод состоял в следующем: клетки НЕК293-F (фирма Invitrogen), растущие в суспензии либо во встряхиваемой колбе, либо в ферментере с перемешивающим устройством в бессывороточной среде для экспрессии FreeStyle™ 293 (фирма Invitrogen), трансфектировали смесью из четырех экспрессионных плазмид и 293fectin™ или фектина (фирма Invitrogen). В 2-литровую встряхиваемую колбу (фирма Corning) НЕК293-F-клетки высевали с плотностью  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл в 600 мл и инкубировали при 120 об/мин, 8% CO<sub>2</sub>. Через день клетки трансфектировали при клеточной плотности примерно  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, используя примерно 42 мл смеси, содержащей А) 20 мл среды Opti-MEM (фирма Invitrogen) с 600 мкг общей плазмидной ДНК (1 мкг/мл), кодирующей тяжелую или модифицированную тяжелую цепь соответственно, и соответствующую легкую цепь в эквимолярном соотношении, и Б) 20 мл Opti-MEM + 1,2 мл 293fectin™ или фектина (2 мкл/мл). В зависимости от поглощения глюкозы в процессе ферментации добавляли раствор глюкозы. Супернатант, содержащий секретированное антитело, собирали через 5-10 дней и антитела либо очищали непосредственно из супернатанта или супернатант замораживали и помещали на хранение.

Очистка.

Биспецифические антитела очищали из супернатантов клеточных культур с помощью аффинной хроматографии, используя MabSelectSure-Sepharose (для не ААА-мутантов) (фирма GE Healthcare, Швеция) или kappaSelect-агарозу (для ААА-мутантов) (фирма GE Healthcare, Швеция), хроматографии гидрофобных взаимодействий с использованием бутил-сефарозы (фирма GE Healthcare, Швеция), и гель-фильтрации на смоле супердекс 200 (фирма GE Healthcare, Швеция).

В целом, метод состоял в следующем: полученные после стерилизации фильтрацией супернатанты клеточных культур "захватывали" с помощью смолы MabSelect SuRe, уравновешенной ЗФР-буфером (10мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl, pH 7,4), промывали буфером для уравновешивания и элюировали 25мМ цитратом натрия, pH 3,0. ААА-мутанты "захватывали" с помощью смолы kappaSelect, уравновешенной 25 мМ Трис, 50мМ NaCl, pH 7,2, отмывали буфером для уравновешивания и элюировали 25 мМ цитратом натрия, pH 2,9. Элюированные белковые фракции объединяли и нейтрализовали 2М Трис, pH 9,0. Пулы антител подготавливали для хроматографии гидрофобных взаимодействий, добавляя 1,6М раствор сульфата аммония до конечной концентрации 0,8М сульфат аммония и значение pH доводили до 5,0 с помощью уксусной кислоты. После уравновешивания бутил-сефарозной смолы 35 мМ ацетатом натрия, 0,8М сульфата аммония, pH 5,0 антитела наносили на смолу, промывали буфером для уравновешивания и элюировали линейным градиентом до 35 мМ ацетата натрия, pH 5,0. Фракции, содержащие биспецифическое антитело, объединяли и дополнительно очищали с помощью гель-фильтрации, используя колонку, заполненную смолой супердекс 200 26/60 GL (фирма GE Healthcare, Швеция), уравновешенную 20 мМ гистидином, 140мМ NaCl, pH 6,0. Фракции, содержащие биспецифическое антитело, объединяли, концентрировали до требуемой концентрации, используя уст-

ройства для ультрафильтрации Vivaspin (фирма Sartorius Stedim Biotech S.A., Франция), и хранили при -80°C.

Таблица 2. Выходы биспецифических антител <VEGF-ANG-2>

	VEGFang2-0015 (без AAA-мутации)	VEGFang2-0016 (с AAA-мутацией)
титр супернатанта	64 мкг/мл, (2 л соответствует 128 мг)	п.а. (масштаб 2 л)
белок А (MabSelectSure)	118 мг (~ 70% мономера)	п.а.
КарраSelect	п.а.	117 мг (~ 83% мономера)
бутил-сефароза	60 мг	57 мг
SEC (гель-фильтрация)	35 мг (>95% мономера)	38 мг (>95% мономера)

Чистоту и целостность антитела анализировали после стадии очистки с помощью капиллярного электрофореза в присутствии ДСН (КЭ-ДСН), используя технологию микропотоков Labchip (фирма Caliper Life Science, США). 5 мкл белкового раствора подготавливали для КЭ-ДСН-анализа, используя набор HT Protein Express Reagent согласно инструкциям производителя, и анализировали с помощью системы LabChip GXII, используя чип HT Protein Express. Данные анализировали с помощью программы LabChip GX.

Таблица 3. Удаление типичных побочных продуктов с помощью различных последовательных стадий очистки по данным КЭ-ДСН

Стадия очистки	VEGFang2-0015						VEGFang2-0016					
	% площади пика * * анализ: КЭ-ДСН (Caliper Labchip GXII)											
	МАт	¾ Ат	(НС)2	½ Ат	(LC)2	LC	МАт	¾ Ат	(НС)2	½ Ат	(LC)2	LC
Mab Select Sure	55,7	19	10,6	9,8	3,5	0,9	-					
Карра Select	-						63	13,4	3,5	6,1	5,8	7,4
бутил-сефароза	81,4	1,9	2,3	8,2	3,6	1,8	76,2	1,3	0,7	8,3	7,7	5,8
Супердекс 200 SEC	92,4	1,8	2,6	1,4	0,5	0,5	99	1,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Содержание агрегатов в образцах антител анализировали с помощью высокоэффективной SEC на аналитической колонке для гель-фильтрации, заполненной супердексом 200 (фирма GE Healthcare, Швеция), применяя 2×3ФР (20мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 274 мМ NaCl и 5,4 мМ KCl, pH 7,4) в качестве подвижного буфера, при 25°C. 25 мкг белка инъецировали в колонку со скоростью потока 0,75 мл/мин и подвергали изократическому элюированию в течение 50 мин.

Аналогично этому получали и очищали биспецифические антитела <VEGF-ANG-2> VEGFang2-0012 и VEGFang2-0201, достигая следующих выходов:

	VEGFang2-0012 (с AAA-мутацией)	VEGFang2-0201 (без AAA-мутации)
титр/количество	-	36 мкг/мл/72 мг
масштаб	2,1 л	2 л
белок А (MabSelectSure)	-	66 мг (содержание мономеров ~95%)
карраSelect	43 мг (содержание мономеров ~ 65%)	-
бутил-сефароза	-	45 мг
SEC	14 мг	21 мг (содержание мономеров > 98%)
выход на гидроксилпатите	8,5 мг (содержание мономеров > 98%)	
общий выход (извлечение)	8,5 мг (20%)	21 мг (30%)

Биспецифические антитела <VEGF-ANG-2>, такие как <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 с AAA-мутациями и с SPLE-мутациями (SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32), <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 с AAA-мутациями (SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35) и <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 с AAA-мутациями и с SPLE-мутациями (SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38), также можно получать и очищать аналогичными методами.

Пример 2. Аналитический анализ и возможность обнаружения.

Основанное на DLS измерение вязкости в лабораторных условиях.

Измерение вязкости осуществляли в целом согласно известному методу (He F. и др., Analytical Biochemistry 399, 2009, с. 141-143). В целом, метод состоял в следующем: образцы концентрировали до получения различных концентраций белка в 200 мМ сукцинате аргинина, pH 5,5 перед добавлением гранул из полистирольного латекса (диаметром 300 нм) и полисорбата 20 (0,02 об.%). Образцы переносили в

оптический 384-луночный планшет посредством центрифугирования через 0,4-микрометровую фильтровальную пластину и покрывали парафиновым маслом. Кажущийся диаметр гранул латекса определяли путем динамического рассеяния света при 25°C. Вязкость раствора можно рассчитывать по формуле  $\eta = \eta_0(rh/rh_0)$  ( $\eta$ : вязкость;  $\eta_0$ : вязкость воды;  $rh$ : кажущийся гидродинамический радиус гранул латекса;  $rh_0$ : гидродинамический диаметр гранул латекса в воде).

Для того чтобы можно было осуществлять сравнение различных образцов при одной и той же концентрации, данные о вязкости в зависимости от концентрации аппроксимировали с помощью уравнения Муни (уравнение 1) (Mooney, Colloid Sci, 1951; Monkos, Biochem. Biophys. Acta, 1997) и осуществляли интерполяцию данных с помощью следующего уравнения:

$$\eta = \eta_0 \exp\left(\frac{S\Phi}{1-K\Phi}\right) \quad \text{уравнение 1}$$

(S: параметр гидродинамического взаимодействия белка; K: коэффициент самосжатия;  $\Phi$ : объем фракции растворенного белка).

Результаты представлены на фиг. 2: установлено, что VEGFang2-0016 с AAA-мутациями в Fc-области обладает более низкой вязкостью при всех температурах, при которых осуществляли измерения, по сравнению с VEGFang2-0015 без AAA-мутаций в Fc-области.

Температура начала агрегации по данным DLS.

Образцы приготавливали в концентрации 1 мг/мл в 20 мМ гистидине/хлориде гистидина, 140 мМ NaCl, pH 6,0, переносили в оптический 384-луночный планшет посредством центрифугирования через 0,4-микрометровую фильтровальную пластину и покрывали парафиновым маслом. Гидродинамический радиус и в этом случае измеряли с помощью динамического рассеяния света, при этом образцы нагревали со скоростью 0,05°C/мин с 25 до 80°C. Температуру начала агрегации определяли как температуру, при которой гидродинамический радиус начинал возрастать. Результаты представлены на фиг. 3. На фиг. 3 представлены данные об агрегации VEGFang2-0015 без AAA-мутаций в сравнении с VEGFang2-0016 с AAA-мутациями в Fc-области. Установлено, что для VEGFang2-0016 температура начала агрегации составляла 61°C, в то время как у VEGFang2-0015 без AAA-мутаций температура начала агрегации составляла 60°C.

DLS-анализ в зависимости от времени.

Образцы приготавливали в концентрации 1 мг/мл в 20 мМ гистидине/хлориде гистидина, 140 мМ NaCl, pH 6,0, переносили в оптический 384-луночный планшет посредством центрифугирования через 0,4-микрометровую фильтровальную пластину и покрывали парафиновым маслом. Гидродинамический радиус и в этом случае измеряли с помощью динамического рассеяния света, при этом образцы выдерживали при постоянной температуре 50°C вплоть до 145 ч. В этом эксперименте тенденция к агрегации нативного неужоженного белка при повышенной температуре может приводить к увеличению среднего диаметра частиц с течением времени. Указанный метод на основе DLS является очень чувствительным в отношении агрегатов, поскольку их образование приводит к сверхпропорциональному изменению интенсивности рассеяния света. Даже после выдерживания в течение 145 ч при 50°C (температура, близкая к температуре начала агрегации) средний диаметр частиц как VEGFang2-0015, так и VEGFang2-0016 увеличивался менее чем на 0,5 нм.

Хранение в течение 7 дней при 40°C в концентрации 100 мг/мл (повышение уровня HMW).

Образцы концентрировали до конечной концентрации 100 мг/мл в 200 мМ сукцинате аргинина, pH 5,5, стерилизовали фильтрацией и хранили в покое при 40°C в течение 7 дней. До и после хранения определяли содержание высоко- и низкомолекулярных видов (HMW и LMW соответственно) с помощью гель-фильтрации. Различие в содержании HMW и LMW между образцами после хранения и образцами, в которых измерение осуществляли сразу после приготовления, обозначали как "повышение HMW" и "повышение LMW" соответственно. Результаты, представленные в табл. 4 и на фиг. 4, продемонстрировали, что для VEGFang2-0015 (без AAA-мутации) характерно более выраженное снижение основного пика и более выраженное повышение HMW по сравнению с VEGF Ang2-0016 (с AAA-мутацией). При создании изобретения неожиданно было установлено, что для VEGF Ang2-0016 (с AAA-мутацией) характерна меньшая тенденция к агрегации по сравнению с VEGFang2-0015 (без AAA-мутации).

Таблица 4. Изменение основного пика и пиков, соответствующих HMW и LMW, после хранения в течение 7д при 40°C

	Изменение площади (%) (40°C-(-80°C))		
	Основной пик	HMW	LMW
VEGFang2-0015 (-AAA-мутации)	-3,56	2,89	0,67
VEGFang2-0016 (+AAA-мутации)	-1,74	1,49	0,25

Функциональный анализ биспецифических антител к VEGF и Ang2 осуществляли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), используя устройство BIAcore® T100 или T200 (фирма GE Healthcare), при 25°C. Система BIAcore® хорошо подходит для изучения молекулярных взаимодействий. SPR-технология основана на измерении коэффициента преломления вблизи поверхности покрытого золотом биосенсорного чипа. Изменения коэффициента преломления свидетельствуют об изменениях мас-

сы на поверхности, вызываемых взаимодействием иммобилизованного лиганда с анализируемым веществом, инъецируемым в растворе. Масса возрастает, если молекулы связываются с иммобилизованными лигандами на поверхности, и наоборот масса снижается в случае диссоциации анализируемого вещества от иммобилизованного лиганда (отражая диссоциацию комплекса). SPR позволяет осуществлять непрерывный мониторинг в реальном времени связывания лиганда/анализируемого вещества и таким образом определять константу скорости ассоциации ( $k_a$ ), константу скорости диссоциации ( $k_d$ ) и константу равновесия ( $K_D$ ).

Пример 3. Связывание с VEGF, Ang2, Fc гамма R и FcRn.

Оценка кинетики аффинности к изоформам VEGF, включая оценку видовой перекрестной реактивности.

Примерно 12000 резонансных единиц (RU) системы для "захвата" (10 мкг/мл козьего античеловеческого  $F(ab)'_2$ ; код заказа: 28958325; фирма GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция) сшивали с CM5-чипом (фирма GE Healthcare, BR-1005-30) при pH 5,0, применяя набор для аминного сочетания, поставляемый фирмой GE Healthcare. Буфер для системы и образца 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 примирировали дважды, используя подвижный буфер. Биспецифическое антитело "захватывали" путем инъекции 50нМ раствора в течение 30 с при скорости потока 5 мкл/мин. Ассоциацию измеряли путем инъекции человеческого hVEGF121, мышинового mVEGF120 или крысиного rVEGF164 в различных концентрациях в растворе в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин, начиная с концентрации 300нМ, применяя разведения 1:3. Осуществляли мониторинг фазы диссоциации в течение периода времени вплоть до 1200 с и запускали путем замены раствора образца на подвижный буфер. Поверхность регенерировали путем 60-секундной отмывки с помощью раствора глицина, pH 2, 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 табл. 5.

Аффинность к Ang2 в растворе, включая оценку видовой перекрестной реактивности.

Оценка аффинности в растворе позволяет измерять аффинность взаимодействия путем определения концентрации свободных взаимодействующих партнеров в уравновешенной смеси. Анализ аффинности в растворе включает смешение биспецифического антитела <VEGF-ANG-2>, сохраняя его постоянную концентрацию, с лигандом (т.е. Ang2) в различных концентрациях. Максимальное возможное количество резонансных единиц (например, 17000 резонансных единиц (RU)) антитела иммобилизовали на поверхности CM5-чипа (фирма GE Healthcare, BR-1005-30) при pH 5,0, используя набор для аминного сочетания, поставляемый фирмой GE Healthcare. Буфер для системы и образца представлял собой HBS-P, pH 7,4. Температуру проточной ячейки устанавливали на 25°C, а температуру блока для образца устанавливали на 12°C и примирировали дважды, используя подвижный буфер. Для получения калибровочной кривой Ang2 в возрастающих концентрациях инъецировали в проточную ячейку устройства BIAcore, содержащую иммобилизованное биспецифическое антитело к VEGF-ANG-2. Количество связанного Ang2 оценивали в резонансных единицах (RU) и строили график зависимости от концентрации. Растворы каждого лиганда (11 концентраций в диапазоне от 0 до 200нМ биспецифического антитела к VEGF-ANG-2) инкубировали с 10нМ Ang2 и давали достигать равновесия при комнатной температуре. Концентрации свободного Ang2 определяли с использованием калибровочной кривой, созданной до и после измерения ответа в растворах с известными количествами Ang2. 4-параметрическую подгонку осуществляли с помощью Xlfit4 (программа фирмы IDBS) с моделью 201, откладывая концентрацию свободного ANG-2 на y-оси и концентрацию ингибирующего антитела на x-оси. Аффинность рассчитывали, определяя точку изгиба этой кривой. Поверхность регенерировали путем однократной отмывки в течение 30 с 0,85%-ным раствором  $H_3PO_4$  при скорости потока 30 мкл/мин. Все различия в коэффициентах преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного от поверхности, покрытой "пустым" контролем. Результаты представлены в табл. 6.

Аффинность к FcRn в стабильном состоянии.

Для сравнения биспецифических антител друг с другом определяли аффинность к FcRn в стабильном состоянии. Человеческий FcRn разводили в буфере для сочетания (10 мкг/мл Na-ацетата, pH 5,0) и иммобилизовывали на C1-чипе (фирма GE Healthcare, BR-1005-35), используя процедуру направленной иммобилизации, применяя устройство BIAcore, до достижения конечного ответа 200 RU. Температуру проточной ячейки устанавливали на 25°C, а температуру блока для образца устанавливали на 12°C и дважды примирировали, используя подвижный буфер. Буфер для системы и образца представлял собой 3ФР-Т (10мМ забуференный фосфатом физиологический раствор, включающий 0,05% Твин 20) pH 6,0. Для исследования каждого антитела применяли различные концентрации IgG, составляющие 62,5, 125, 250 и 500 нМ. Скорость потока составляла 30 мкл/мин и различные образцы инъецировали последовательно на поверхность чипа, при этом в качестве периода ассоциации был выбран промежуток времени, составляющий 180 с. Поверхность регенерировали путем инъекции 3ФР-Т, pH 8 в течение 60 с при ско-

рости потока 30 мкл/мин. Все различия в коэффициентах преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного от "пустой" поверхности. Вычитали также результаты, полученные при инъекциях буфера (т.е. применяли двойной контроль). Для расчета аффинности в стабильном состоянии применяли метод, входящий в программу Via-Evaluation. В целом, метод состоял в следующем: строили график зависимости величины RU (RU max) от анализируемых концентраций, получая кривую дозовой зависимости. На основе 2-параметрической подгонки рассчитывали верхнюю асимптоту, что позволяло определять величину RU, составляющую половину от максимальной, и таким образом определять аффинность. Результаты представлены на фиг. 5 и в табл. 7. Аналогичным образом определял аффинность к FcRn обезьян циномоглус (супо), мышей и кроликов.

Оценка связывания Fc гамма RIIIa.

Для измерения аффинности к Fc гамма RIIIa применяли прямой анализ связывания. Систему для "захвата" (1 мкг/мл пента-His; фирма Quiagen) (примерно 3000 резонансных единиц (RU)) сшивали с CM5-чипом (фирма GE Healthcare, BR-1005-30) при pH 5,0, используя набор для аминного сочетания, поставляемый фирмой GE Healthcare. Буфер для системы и образца представлял собой HBS-P, pH 7,4. Температуру проточной ячейки устанавливали на 25°C, а температуру блока для образца устанавливали на 12°C и примирировали дважды, используя подвижный буфер. Fc гамма RIIIa-His-рецептор "захватывали" путем инъекции 100нМ раствора в течение 60 с при скорости потока 5 мкл/мин. Связывание оценивали путем инъекции 100нМ биспецифического антитела или моноспецифических контрольных антител (анти-Dig для антитела IgG1-подкласса и IgG4-подкласса) в течение 180 с при скорости потока 30 мкл/мин. Поверхность регенерировали путем отмывки в течение 120 с раствором глицина, pH 2,5 при скорости потока 30 мкл/мин. Поскольку связывание Fc гамма RIIIa отличается от модели связывания 1:1 Лэнгмюра, в этом анализе определяли только наличие связывания/отсутствие связывания. Аналогичным образом можно определять связывание Fc гамма RIIa и Fc гамма RIa. Из результатов, представленных на фиг. 6, следует, что после интродукции мутаций P329G LALA не удалось обнаружить связывание с Fc гамма RIIIa.

Оценка независимого связывания VEGF и Ang2 с биспецифическими антителами <VEGF-ANG-2>.

Примерно 3500 резонансных единиц (RU) системы для "захвата" (10 мкг/мл козьего античеловеческого IgG; фирма GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция) сшивали с CM4-чипом (фирма GE Healthcare BR-1005-34) при pH 5,0, используя набор для аминного сочетания, поставляемый фирмой GE Healthcare. Буфер для системы и образца 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. Перед "захватом" проточную ячейку дважды примирировали, используя подвижный буфер.

Биспецифическое антитело "захватывали" путем инъекции 10нМ раствора в течение 60 с со скоростью 5 мкл/мин. Независимое связывание каждого лиганда с биспецифическим антителом анализировали, определяя способность активного связывания для каждого лиганда, которые добавляли либо последовательно, либо одновременно (скорость 30 мкл/мин), согласно описанным ниже вариантам:

1. Инъекция человеческого VEGF в концентрации 200 нМ в течение 180 с (демонстрирует индивидуальное связывание антигена).
2. Инъекция человеческого Ang2 в концентрации 100 нМ в течение 180 с (демонстрирует индивидуальное связывание антигена).
3. Инъекция человеческого VEGF в концентрации 200 нМ в течение 180 с с последующей дополнительной инъекцией человеческого Ang2 в концентрации 100 нМ в течение 180 с (демонстрирует связывание Ang2 в присутствии VEGF).
4. Инъекция человеческого Ang2 в концентрации 100 нМ в течение 180 с с последующей дополнительной инъекцией человеческого VEGF в концентрации 200 нМ (демонстрирует связывание VEGF в присутствии Ang2).
5. Совместная инъекция человеческого VEGF в концентрации 200 нМ и человеческого Ang2 в концентрации 100нМ в течение 180 с (демонстрирует одновременное связывание VEGF и Ang2).

Поверхность регенерировали в помощью отмывки в течение 60 с 3 мМ раствором MgCl<sub>2</sub> при скорости потока 30 мкл/мин. Все различия в коэффициентах преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного от поверхности, сенсibilизированной античеловеческим IgG.

Считается, что биспецифическое антитело обладает способностью связываться с обоими антигенами независимо друг от друга, если образующийся конечный сигнал, полученный при применении подходов 3, 4 и 5, равен или близок к сумме индивидуальных конечных сигналов, полученных при применении подходов 1 и 2. Результаты, представленные в табл. 9, демонстрируют, что оба антитела VEGFang2-0016, VEGFang2-0012 обладали способностью независимо друг от друга связываться с VEGF и ANG2.

Оценка одновременного связывания VEGF и Ang2 с биспецифическими антителами <VEGF-ANG-2>.

Во-первых, сшивали примерно 1600 резонансных единиц (RU) VEGF (20 мкг/мл) с CM4-чипом (фирма GE Healthcare, BR-1005-34) при pH 5,0, используя набор для аминного сочетания, поставляемый фирмой GE Healthcare. Буфер для системы и образца 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 примировали дважды, используя подвижный буфер. Во-вторых, 50нМ раствор биспецифического антитела инъецировали в течение 180 с со скоростью 30 мкл/мин. В-третьих, hAng-2 инъецировали в течение 180 с со скоростью 30 мкл/мин. Ответ в виде связывания hAng-2 зависел от количества биспецифического антитела, связанного с VEGF, и он свидетельствовал об одновременном связывании. Поверхность регенерировали путем отмычки в течение 60 с с помощью 0,85%-ного раствора H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> при скорости потока 30 мкл/мин. О наличии одновременного связывания свидетельствует дополнительный специфический сигнал связывания hAng2 относительно предшествующего сигнала связывания VEGF с биспецифическими антителами <VEGF-ANG-2>. Для обоих биспецифических антител VEGFang2-0015 и VEGFang2-0016 удалось обнаружить одновременное связывание VEGF и Ang2 с биспецифическими антителами <VEGF-ANG-2> (данные не представлены).

Таблица 5. Результаты: кинетики аффинности к изоформам VEGF из различных видов

	VEGFang2-0015 - кажущаяся аффинность	VEGFang2-0016 - кажущаяся аффинность	VEGFang2-0012 - кажущаяся аффинность	VEGFang2-0201 - кажущаяся аффинность
человеческий VEGF 121	≤1пМ (по Biacore-спецификации)	≤1пМ (по Biacore-спецификации)	≤1пМ (по Biacore-спецификации)	≤1пМ (по Biacore-спецификации)
мышинный VEGF 120	нет связывания	нет связывания	нет связывания	нет связывания
крысиный VEGF 164	13нМ	14нМ	24нМ	35нМ

Таблица 6: Результаты: аффинность к Ang2 в растворе

	VEGFang2-0015, KD [нМ]	VEGFang2-0016, KD [нМ]	VEGFang2-0012, KD [нМ]	VEGFang2—0201, KD [нМ]
человеческий Ang2	8	20	20	Tbd (подлежит определению)
супо Ang2	5	13	10	Tbd
мышинный Ang2	8	13	8	Tbd
кроличий Ang2	4	11	8	Tbd

Таблица 7: Результаты: аффинность к FcRn биспецифических антител <VEGF-ANG-2>

	VEGFang2-0015 [аффинность]	VEGFang2-0016 [аффинность]	VEGFang2-0012 [аффинность]	VEGFang2--0201 [аффинность]
человеческий FcRn	0,8мкМ	нет связывания	нет связывания	0,8мкМ
супо FcRn	0,9мкМ	нет связывания	нет связывания	1,0мкМ
мышинный FcRn	0,2мкМ	нет связывания	нет связывания	0,2мкМ

Таблица 8. Результаты: связывание с Fc гамма RI-IIIa

	VEGFang2-0015	VEGFang2-0016	VEGFang2-0012	VEGFang2 -0201
FcγRIa	нет связывания	нет связывания	связывание	связывание
FcγRIIa	нет связывания	нет связывания	нет связывания	связывание
FcγRIIIa	нет связывания	нет связывания	нет связывания	связывание

Таблица 9. Результаты: независимое связывание VEGF и Ang2 с биспецифическими антителами <VEGF-ANG-2>

	1) Ang2 [RUmax]	2) VEGF [RUmax]	3) сначала VEGF, затем Ang2 [RUmax]	4) сначала Ang2, затем VEGF [RUmax]	5) Совместная инъекция Ang2+VEGF [RUmax]
VEGFang2-0016	174	50	211	211	211
VEGFang2-0012	143	43	178	177	178

#### Пример 4. Масс-спектрометрия.

В данном разделе описана характеристика биспецифических антител <VEGF-ANG-2> в отношении правильной сборки. Предполагаемые первичные структуры подтверждали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем (ESI-МС) дегликозилированных и интактных или расщепленных с помощью IdeS (расщепляющий IgG фермент из *S. ruogelens*) биспецифических антител <VEGF-ANG-2>. Расщепление с помощью IdeS осуществляли с использованием 100 мкг очищенного антитела,

которое инкубировали с 2 мкг IdeS-протеазы (фирма Roche) в буфере, содержащем 100 ммоль/л  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,1, при 37°C в течение 5 ч. Затем антитела дегликозилировали с помощью N-гликозидазы F, нейраминидазы и O-гликозидазы (фирма Roche) в буфере, содержащем 100 ммоль/л  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,1, при 37°C в течение вплоть до 16 ч, используя белок в концентрации 1 мг/мл, и затем осуществляли обессоливание с помощью ЖХВР на колонке сефадек G25 (фирма GE Healthcare). Общую массу определяли с помощью ESI-МС, применяя МС-систему maXis 4G UHR-QTOF (фирма Bruker Daltonik), снабженную источником TriVersa NanoMate (фирма Advion).

Массы, установленные для расщепленных IdeS, дегликозилированных (табл. 10) или интактных дегликозилированных (табл. 11) молекул, соответствовали предсказанным массам, которые выводили на основе аминокислотных последовательностей биспецифических антител <VEGF-ANG-2>, состоящих из двух различных легких цепей  $\text{LC}_{\text{Ang2}}$  и  $\text{LC}_{\text{луцентис}}$  (ранибизумаб) и двух различных тяжелых цепей  $\text{HC}_{\text{Ang2}}$  и  $\text{HC}_{\text{луцентис}}$ .

Таблица 10. Массы дегликозилированных и расщепленных с помощью IdeS биспецифических антител <VEGF/ANG2>, таких как VEGFang2-0201 (без AAA-мутации) и VEGFang2-0012 (с AAA-мутацией)

Образец	F(ab') <sub>2</sub> биспецифического антитела <VEGF-ANG-2>		Дегликозилированная Fc биспецифического антитела <VEGF-ANG-2>	
	Предсказанная средняя масса [Да]	Обнаруженная средняя масса [Да]	Предсказанная средняя масса [Да]	Обнаруженная средняя масса [Да]
VEGFang2-0201	99360,8	99360,7	47439,2	47430,1
VEGFang2-0012	99360,8	99361,1	47087,7	47082,0

Таблица 11. Массы дегликозилированных биспецифических антител <VEGF/ANG2>, таких как VEGFang2-0016 (с AAA-мутацией) и VEGFang2-0015 (без AAA-мутации)

	Дегликозилированное биспецифического антитела <VEGF-ANG-2>	
	Предсказанная средняя масса [Да]	Обнаруженная средняя масса [Да]
VEGFang2-0016	146156,9	146161,2
VEGFang2-0015	146505,3	146509,4

Пример 5. Хроматография для оценки связывания Fc-Rn.

Сочетание со стрептавидин-сефарозой.

Добавляли 1 г стрептавидин-сефарозы (фирма GE Healthcare) к биотинилированному и подвергнутому диализу рецептору и инкубировали в течение 2 ч при встряхивании. Дериватизированной рецептором сефарозой заполняли 1-миллилитровую ХК-колонку (фирма GE Healthcare).

Хроматография с применением аффинной FcRn-колонки.

Условия:

размеры колонки: 50 мм × 5 мм,

высота слоя: 5 см,

загрузка: 50 мкг образца,

буфер для уравнивания: 20мМ MES с 150мМ NaCl, регулирующий значение pH до 5,5,

буфер для элюции: 20мМ Трис/HCl с 150мМ NaCl, регулирующий значение pH до 8,8,

элюция: 7,5 CV (объем колонки) буфера для уравнивания в от 30 CV до 100% буфера для элюции, 10 CV буфера для элюции.

Колоночная хроматография на основе аффинности к huFcRn.

В приведенной ниже таблице представлены данные о временах удерживания биспецифических антител <VEGF-ANG-2> на колонках для аффинной хроматографии, содержащих человеческий FcRn. Данные получали с использованием указанных выше условий. В приведенной ниже таблице представлены данные о временах удерживания биспецифических антител <VEGF-ANG-2> на человеческом FcRn.

Таблица 12. Результаты: времена удерживания биспецифических антител <VEGF-ANG-2>

Антитело	Время удерживания [мин]
VEGFang2-0015 (без AAA-мутации)	78,5
VEGFang2-0201 (без AAA-мутации)	78,9
VEGFang2-0012 (с AAA-мутацией)	2,7 («пустой» пик)
VEGFang2-0016 (с AAA-мутацией)	2,7 («пустой» пик)

Пример 6. Фармакокинетические (ФК) свойства.

ФК данные в отношении Fc-Rn, полученные на мышах, трансгенных по человеческому FcRn.

Фаза прижизненных исследований.

Опыт проводили на самках мышей C57BL/6J (фон); мышей с дефицитом FcRn, но гемизиготных трансгенных по человеческому FcRn (huFcRn, линия 276 -/tg).

## Часть 1.

Всем мышам инъецировали однократно интравитреально в правый глаз 2 мкл/животное соответствующего раствора (т.е. 21 мкг соединения /животное (VEGF<sub>Ang2</sub>-0015 (без AAA-мутации) или 23,6 мкг соединения /животное (VEGF<sub>Ang2</sub>-0016 (с AAA-мутацией)).

Мышей подразделяли на 2 группы по 6 животных в каждой. Получали образцы крови у животных группы 1 через 2, 24 и 96 ч, а у животных группы 2 через 7, 48 и 168 ч после дозирования.

Осуществляли инъекцию в стекловидное тело правого глаза мышей с помощью включающей микрошприц системы NanoFil для нанолитровых инъекций фирмы World Precision Instruments, Inc., Берлин, Германия. Мышей анестезировали с помощью 2,5% изофлурана и для визуализации глаза мышей применяли микроскоп Leica MZFL 3 с 40-кратным увеличением и источником кольцевого света Leica KL 2500 LCD. Затем 2 мкл соединения инъецировали с помощью иглы 35-размера.

Кровь собирали из ретробульбарного венозного сплетения контралатерального глаза каждого животного для определения уровней соединения в сыворотке.

Образцы сыворотки объемом по меньшей мере 50 мкл получали из крови после выдерживания в течение 1 ч при КТ путем центрифугирования (9300×g) при 4°C в течение 3 мин. Образцы сыворотки замораживали непосредственно после центрифугирования и хранили в замороженном состоянии при -80°C до анализа. Обработанные глаза животных из группы 1 выделяли через 96 ч после обработки, у животных из группы 2 - через 168 ч после обработки. Образцы хранили в замороженном состоянии при -80°C до анализа.

## Часть 2.

Всем мышам инъецировали однократно внутривенно через хвостовую вену по 200 мкл/животное соответствующего раствора (т.е. 21 мкг соединения/животное (VEGF<sub>Ang2</sub>-0015 (без AAA-мутации) или 23,6 мкг соединения/животное (VEGF<sub>Ang2</sub>-0016 (с AAA-мутацией)).

Мышей подразделяли на 2 группы по 5 животных в каждой. Получали образцы крови у животных группы 1 через 1, 24 и 96 ч, а у животных группы 2 через 7, 48 и 168 ч после дозирования. Кровь собирали из ретробульбарного венозного сплетения каждого животного для определения уровней соединения в сыворотке.

Образцы сыворотки объемом по меньшей мере 50 мкл получали из крови после выдерживания в течение 1 ч при КТ путем центрифугирования (9300×g) при 4°C в течение 3 мин. Образцы сыворотки замораживали непосредственно после центрифугирования и хранили в замороженном состоянии при -80°C до анализа.

Получение лизатов всего глаза (мышей).

Лизаты глаз получали путем физико-химического расщепления всего глаза лабораторных животных. Для механического разрушения каждый глаз переносили в микропробирку с коническим дном объемом 1,5 мл. После замораживания-оттаивания глаза промывали однократно промывочным буфером (фирма Bio-Rad, набор для лизиса клеток Bio-Plex, каталожный № 171-304011). На следующей стадии добавляли 500 мкл свежеприготовленного буфера для лизиса клеток и глаза измельчали с помощью 1,5-миллилитрового пестика для измельчения тканей (фирма Kimble Chase, 1,5-миллилитровый пестик, артикул № 749521-1500). Затем смесь 5 раз подвергали замораживанию и оттаиванию и вновь измельчали. Для отделения лизата от оставшейся ткани образцы центрифугировали в течение 4 мин при 4500×g. После центрифугирования супернатант собирали и хранили при -20°C для дополнительного анализа с помощью количественного ELISA.

Анализ.

Концентрации антител <VEGF/ANG2> в сыворотке и лизатах глаз мышей определяли с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA).

Для количественной оценки антител <VEGF/ANG2> в образцах сыворотки и лизатах глаз мышей осуществляли стандартный твердофазный серийный сэндвич-иммуноанализ с применением биотинилированного и дигоксигенированного моноклональных антител в качестве иммобилизованного ("захватывающего") и идентифицирующего антител. Подтверждением сохранения биспецифичности анализируемого соединения должно являться то, что биотинилированное "захватывающее" антитело распознает анти-VEGF-связывающий сайт, в то время как дигоксигенированное идентифицирующее антитело связывается с анти-Ang2-связывающим сайтом анализируемого соединения. Связанный иммунный комплекс, включающий "захватывающее" антитело, анализируемое соединение и идентифицирующее антитело, на твердой фазе сенсibilизированного стрептавидином титрационного микропланшета (SA-MTP) затем выявляли с помощью сшитого с пероксидазой из хрена антитела к дигоксигенину. После отмывки несвязанного материала из SA-MTP и добавления ABTS-субстрата полученный сигнал пропорционален количеству анализируемого соединения, связанного с твердой фазой SA-MTP. Затем осуществляли количественную оценку путем превращения измеренных сигналов образцов в концентрации, определенные относительно калибраторов, анализируемых параллельно.

На первой стадии SA-MTP сенсibilизировали, используя 100 мкл/лунку раствора биотинилированного "захватывающего" антитела (Mat<Id<VEGF>>M-2.45.51-IgG-Bi(DDS)) в концентрации 1 мкг/мл в течение 1 ч при 500 об/мин на MTP-шейкере. Тем временем подготавливали калибраторы, QC-образцы

(образцы для контроля качества) и образцы. Калибраторы и QC-образцы разводили до 2% сывроточной основой; образцы разводили до тех пор, пока сигналы не попадали в линейную область калибраторов.

После сенсбилизации SA-MTP "захватывающим" антителом планшет промывали трижды промывочным буфером, используя 300 мкл/лунку. Затем с помощью пипетки вносили по 100 мкл/лунку калибраторов, QC-образцов и образцов в SA-MTP и вновь инкубировали в течение 1 ч при 500 об/мин. При этом анализируемое соединение связывалось с помощью его анти-VEGF-связывающего сайта через "захватывающее" антитело с твердой фазой SA-MTP. После инкубации и удаления несвязанного анализируемого соединения путем промывки планшета в SA-MTP добавляли по 100 мкл/лунку первого идентифицирующего антитела (МАт<Id-<Ang2>>М-2.6.81-IgG-Dig(XOSu)) в концентрации 250 нг/мл. И в этом случае планшет инкубировали в течение 1 ч при 500 об/мин на шейкере. После промывки в лунки SA-MTP добавляли по 100 мкл/лунку второго идентифицирующего антитела (ПАт<дигоксигенин>S-Fab-POD (поли)) в концентрации 50 мед./мл и планшет вновь инкубировали в течение 1 ч при 500 об/мин. После конечной стадии промывки для удаления идентифицирующего антитела добавляли по 100 мкл/лунку субстрата (ABTS). Конъюгат антитело-фермент катализировал цветную реакцию ABTS®-субстрата. Затем сигнал измеряли с помощью ридера для ELISA при длине волны 405 нм (длина референс-волны: 490 нм ([405/490]нм)).

Оценка фармакокинетики.

Фармакокинетические параметры рассчитывали с помощью некомпартментального анализа, используя программу для оценки фармакокинетических параметров WinNonlin™ (фирма Pharsight), версия 5.2.1.

Результаты: А) Концентрации в сывортке.

Результаты определения концентраций в сывортке представлены в табл. 13-16 и на фиг. 7Б-7В.

Таблица 13. VEGFang2-0015 (без AAA-мутации): сравнение концентраций в сывортке после интравитреального и внутривенного введения

	Концентрация в сывортке после интравитреального введения	Концентрация в сывортке после внутривенного введения
Время	Средняя конц. [мкг/мл]	Средняя конц. [мкг/мл]
1 ч		17,7
2 ч	9,8	
7 ч	10,4	12,1
24 ч	6,4	8,3
48 ч	6,5	6,9
96 ч	3,4	4,1
168 ч	2,9	2,7

Таблица 14. VEGFang2-0016 (с AAA-мутацией): сравнение концентраций в сывортке после интравитреального и внутривенного введения

	Концентрация в сывортке после интравитреального введения	Концентрация в сывортке после внутривенного введения
Время	Средняя конц. [мкг/мл]	Средняя конц. [мкг/мл]
1 ч		18,4
2 ч	7,0	
7 ч	8,7	10,0
24 ч	2,2	3,3
48 ч	1,0	1,0
96 ч	0,1	0,1
168 ч	0,0	0,0

Таблица 15. VEGFang2-0015 (без AAA-мутации) и VEGFang2-0016 (с AAA-мутацией): сравнение концентраций в сывортке после интравитреального введения

	VEGFang2-0015 (без AAA-мутации)	VEGFang2-0016 (с AAA-мутацией)
Время	Средняя конц. [мкг/мл]	Средняя конц. [мкг/мл]
2 ч	9,8	7,0
7 ч	10,4	8,7
24 ч	6,4	2,2
48 ч	6,5	1,0
96 ч	3,4	0,1
168 ч	2,9	0,0

Таблица 16. VEGFang2-0015 (без AAA-мутации) и VEGFang2-0016 (с AAA-мутацией): сравнение концентраций в сыворотке после внутривенного

	VEGFang2-0015 (без AAA-мутации)	VEGFang2-0016 (с AAA-мутацией)
Время	Средняя конц. [мкг/мл]	Средняя конц. [мкг/мл]
1 ч	17,7	18,4
7 ч	12,1	10,0
24 ч	8,3	3,3
48 ч	6,9	1,0

	VEGFang2-0015 (без AAA-мутации)	VEGFang2-0016 (с AAA-мутацией)
Время	Средняя конц. [мкг/мл]	Средняя конц. [мкг/мл]
96 ч	4,1	0,1
168 ч	2,7	0,0

Результаты: Б) Концентрации в глазных лизатах левых и правых глаз.

Результаты определения концентраций в глазных лизатах представлены в табл. 17-18 и на фиг. 7Г-

7Д.

Таблица 17а. Концентрации VEGFang2-0015 (без AAA-мутации) в глазных лизатах после интравитреального введения в правый глаз

Средние величины конц. для n=6 мышей		
Время		Средняя конц. [нг/мл]
96 ч	левый глаз	8,7
	правый глаз	46,1
168 ч	левый глаз	4,3
	правый глаз	12,9

Таблица 17б. Концентрации VEGFang2-0015 (без AAA-мутации) в глазных лизатах после внутривенного введения

Средние величины конц. для n=5 мышей		
Время		Средняя конц. [нг/мл]
96 ч	левый глаз	4,2
	правый глаз	7,5
168 ч	левый глаз	3,4
	правый глаз	6,1

Таблица 18а. Концентрации VEGFang2-0016 (с AAA-мутациями) в глазных лизатах после интравитреального введения в правый глаз

Средние величины конц. Для n=5 мышей		
Время		Средняя конц. [нг/мл]
96 ч	левый глаз	0,3
	правый глаз	34,5
168 ч	левый глаз	0,1
	правый глаз	9,0

Таблица 18б. Концентрации VEGFang2-0016 (с AAA-мутациями) в глазных лизатах после внутривенного введения

Средние величины конц. Для n=5 мышей		
Время		Средняя конц. [нг/мл]
96 ч	левый глаз	0,0
	правый глаз	0,1
168 ч	левый глаз	0,0
	правый глаз	0,1

Обобщение результатов.

После интравитреального введения биспецифического антитела <VEGF/ANG2>, предлагаемого в изобретении, такого как VEGFang2-0016 (с AAA-мутацией), в глазных лизатах обнаружены его концентрации (через 96 и 168 ч), близкие к концентрациям биспецифического антитела <VEGF/ANG2> без AAA-мутации, такого как VEGFang2-0015.

Кроме того, после интравитреального введения биспецифического антитела <VEGF/ANG2>, предлагаемого в изобретении, такого как VEGFang2-0016 (с AAA-мутацией), обнаружены также более быстрый клиренс и более короткое время полужизни в сыворотке по сравнению с биспецифическим антителом <VEGF/ANG2> без AAA-мутации, таким как VEGFang2-0015.

Пример 7. Анализ ангиогенеза в микрокармане роговицы мышей.

Для оценки антиангиогенного действия биспецифического антитела <VEGF/ANG2> с соответствующими последовательностями анти-VEGF VH и VL SEQ ID NO: 7 и 8 и анти-ANG2 VH и VL SEQ ID NO: 15 и 16 в отношении индуцируемого VEGF ангиогенеза *in vivo*, при создании изобретения осуществляли анализ ангиогенеза в роговице мышей. При осуществлении этого анализа насыщенный VEGF Nylaflo-диск имплантировали в карман из бессосудистой роговицы на фиксированном расстоянии от сосудов лимба. В ответ на создание градиента VEGF в роговице сразу начинался рост сосудов. Опыт проводили на самках мышей линии Balb/c возрастом 8-10 недель, которых покупали у фирмы Charles River, Сульцфельд, Германия. Протокол модифицировали согласно методу, описанному у Rogers M.S. и др., Nat. Protoc. 2, 2007, с. 2545-2550. В целом, метод состоял в следующем: у анестезированных мышей создавали под микроскопом микрокарманы глубиной примерно 500 мкм на расстоянии примерно 1 мм от лимба до верхней части роговицы, используя хирургическое лезвие и острые пинцеты. Имплантировали диск (Nylaflo®, фирма Pall Corporation, шт. Мичиган) диаметром 0,6 мм и поверхность области имплантации выравнивали. Диски инкубировали в соответствующем факторе роста или наполнителе в течение по меньшей мере 30 мин. Через 3, 5 и 7 дней (или в другом варианте только после 3, 5 или 7 дней) глаза фотографировали и оценивали сосудистый ответ. Результаты анализа выражали количественно, рассчитывая процент области новых сосудов относительно общей площади роговицы.

Диски пропитывали 300 нг VEGF или ЗФР в качестве контроля и имплантировали на 7 дней. Выросты сосудов из лимба в диск оценивали в день 3, 5 и/или 7. За 1 день до имплантации диска внутривенно вводили антитело в дозе 10 мг/кг (благодаря тому, что при внутривенном применении стабильное в сыворотке антитело VEGFang2-0015 (без AAA-мутации), которое отличалось от VEGFang2-0016 только AAA-мутацией и имело такие же анти-VEGF и анти-ANG2 VH- и VL-области, опосредующие эффективность, его применяли в качестве заместителя указанного антитела) для тестирования антиангиогенного действия в отношении индуцированного VEGF ангиогенеза *in vivo*. Животных в контрольной группе обрабатывали наполнителем. Применяемый объем составлял 10 мл/кг.

#### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Роше Гликарт АГ

<120> БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО К VEGF/ANG-2, НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ

ЭТО АНТИТЕЛО, ВЕКТОР, СОДЕРЖАЩИЙ НУКЛЕИНОВУЮ КИСЛОТУ, КЛЕТКА-ХОЗЯИН, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА И СОДЕРЖАЩАЯ ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ

<130> 31094 WO

<150> EP12176299.1

<151> 2012-07-13

<160> 50

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR3H тяжелой цепи, <VEGF>ранибизумаб

<400> 1

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

<210> 2  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> CDR2H тяжелой цепи, <VEGF>ранибизумаб

<400> 2

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

Arg

<210> 3  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> CDR1H тяжелой цепи, <VEGF>ранибизумаб

<400> 3

His Tyr Gly Met Asn  
 1 5

<210> 4  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> CDR3L легкой цепи, <VEGF>ранибизумаб

<400> 4

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr  
 1 5

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> CDR2L легкой цепи, <VEGF>ранибизумаб

<400> 5

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser  
 1 5

<210> 6  
 <211> 11

## 032192

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR1L легкой цепи, &lt;VEGF&gt;ранибизумаб

&lt;400&gt; 6

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

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 123

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; переменный домен тяжелой цепи VH, &lt;VEGF&gt;ранибизумаб

&lt;400&gt; 7

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
 50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

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

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

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; переменный домен легкой цепи VL, &lt;VEGF&gt;ранибизумаб

&lt;400&gt; 8

032192

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
 85 90 95

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

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR3H тяжелой цепи, <ANG-2> вариант Ang2i\_LC10

<400> 9

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

Ala Phe Asp Ile  
 20

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR2H тяжелой цепи, <ANG-2> вариант Ang2i\_LC10

<400> 10

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

Gly

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

<220>  
 <223> CDR1H тяжелой цепи, <ANG-2> вариант Ang2i\_LC10

<400> 11

Gly Tyr Tyr Met His  
 1 5

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

<220>  
 <223> CDR3L легкой цепи, <ANG-2> вариант Ang2i\_LC10

<400> 12

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

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

<220>  
 <223> CDR2L легкой цепи, <ANG-2> вариант Ang2i\_LC10

<400> 13

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
 1 5

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

<220>  
 <223> CDR1L легкой цепи, <ANG-2> вариант Ang2i\_LC10

<400> 14

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

<210> 15  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная

<220>

## 032192

<223> варьируемый домен тяжелой цепи VH, <ANG-2> вариант Ang2i\_LC10

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 16

<211> 110

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> варьируемый домен легкой цепи VL, <ANG-2> вариант Ang2i\_LC10

<400> 16

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

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

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser





## 032192

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

## 032192

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

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

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

<210> 19

<211> 498

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 032192

Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser  
 180 185 190

Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu  
 195 200 205

Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr  
 210 215 220

Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala  
 225 230 235 240

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

Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu  
 260 265 270

Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp  
 275 280 285

Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile  
 290 295 300

Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn  
 305 310 315 320

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

Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser  
 340 345 350

Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln  
 355 360 365

Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg  
 370 375 380

Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn  
 385 390 395 400

Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser  
 405 410 415

Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn  
 420 425 430

## 032192

Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp  
 435 440 445

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

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

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

Asp Phe

<210> 20  
 <211> 1124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 032192

Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser  
 145 150 155 160  
  
 Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val  
 165 170 175  
  
 His Leu Pro His Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg  
 180 185 190  
  
 Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val  
 195 200 205  
  
 Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn His Leu Cys  
 210 215 220  
  
 Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys  
 225 230 235 240  
  
 Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu  
 245 250 255  
  
 Leu His Thr Phe Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu  
 260 265 270  
  
 Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser  
 275 280 285  
  
 Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys His Pro  
 290 295 300  
  
 Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly  
 305 310 315 320  
  
 Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln  
 325 330 335  
  
 Gly Leu Gln Cys Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Thr Pro Lys Ile  
 340 345 350  
  
 Val Asp Leu Pro Asp His Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys Phe Asn Pro  
 355 360 365  
  
 Ile Cys Lys Ala Ser Gly Trp Pro Leu Pro Thr Asn Glu Glu Met Thr  
 370 375 380  
  
 Leu Val Lys Pro Asp Gly Thr Val Leu His Pro Lys Asp Phe Asn His  
 385 390 395 400

032192

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Glu Leu Cys Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly Gly Glu Gly  
 515 520 525

His Pro Gly Pro Val Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro  
 530 535 540

Pro Pro Arg Gly Leu Asn Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Thr Leu Asn  
 545 550 555 560

Leu Thr Trp Gln Pro Ile Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Val  
 565 570 575

Glu Val Glu Arg Arg Ser Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys  
 580 585 590

Val Pro Gly Asn Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu His Pro Arg  
 595 600 605

Glu Gln Tyr Val Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu  
 610 615 620

Trp Ser Glu Asp Leu Thr Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro  
 625 630 635 640

Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val

## 032192

				645					650							655
Ile	Ser	Trp	Thr	Ile	Leu	Asp	Gly	Tyr	Ser	Ile	Ser	Ser	Ile	Thr	Ile	
			660					665					670			
Arg	Tyr	Lys	Val	Gln	Gly	Lys	Asn	Glu	Asp	Gln	His	Val	Asp	Val	Lys	
		675					680					685				
Ile	Lys	Asn	Ala	Thr	Ile	Thr	Gln	Tyr	Gln	Leu	Lys	Gly	Leu	Glu	Pro	
	690					695					700					
Glu	Thr	Ala	Tyr	Gln	Val	Asp	Ile	Phe	Ala	Glu	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser	
705					710					715					720	
Ser	Asn	Pro	Ala	Phe	Ser	His	Glu	Leu	Val	Thr	Leu	Pro	Glu	Ser	Gln	
				725					730					735		
Ala	Pro	Ala	Asp	Leu	Gly	Gly	Gly	Lys	Met	Leu	Leu	Ile	Ala	Ile	Leu	
			740					745					750			
Gly	Ser	Ala	Gly	Met	Thr	Cys	Leu	Thr	Val	Leu	Leu	Ala	Phe	Leu	Ile	
		755					760					765				
Ile	Leu	Gln	Leu	Lys	Arg	Ala	Asn	Val	Gln	Arg	Arg	Met	Ala	Gln	Ala	
	770					775					780					
Phe	Gln	Asn	Val	Arg	Glu	Glu	Pro	Ala	Val	Gln	Phe	Asn	Ser	Gly	Thr	
785					790					795					800	
Leu	Ala	Leu	Asn	Arg	Lys	Val	Lys	Asn	Asn	Pro	Asp	Pro	Thr	Ile	Tyr	
				805					810					815		
Pro	Val	Leu	Asp	Trp	Asn	Asp	Ile	Lys	Phe	Gln	Asp	Val	Ile	Gly	Glu	
			820					825					830			
Gly	Asn	Phe	Gly	Gln	Val	Leu	Lys	Ala	Arg	Ile	Lys	Lys	Asp	Gly	Leu	
		835					840					845				
Arg	Met	Asp	Ala	Ala	Ile	Lys	Arg	Met	Lys	Glu	Tyr	Ala	Ser	Lys	Asp	
	850					855					860					
Asp	His	Arg	Asp	Phe	Ala	Gly	Glu	Leu	Glu	Val	Leu	Cys	Lys	Leu	Gly	
865					870					875					880	
His	His	Pro	Asn	Ile	Ile	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Glu	His	Arg	Gly	
				885					890					895		

## 032192

Tyr Leu Tyr Leu Ala Ile Glu Tyr Ala Pro His Gly Asn Leu Leu Asp  
 900 905 910

Phe Leu Arg Lys Ser Arg Val Leu Glu Thr Asp Pro Ala Phe Ala Ile  
 915 920 925

Ala Asn Ser Thr Ala Ser Thr Leu Ser Ser Gln Gln Leu Leu His Phe  
 930 935 940

Ala Ala Asp Val Ala Arg Gly Met Asp Tyr Leu Ser Gln Lys Gln Phe  
 945 950 955 960

Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn Tyr  
 965 970 975

Val Ala Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ser Arg Gly Gln Glu Val Tyr  
 980 985 990

Val Lys Lys Thr Met Gly Arg Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Ile Glu  
 995 1000 1005

Ser Leu Asn Tyr Ser Val Tyr Thr Thr Asn Ser Asp Val Trp Ser  
 1010 1015 1020

Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Val Ser Leu Gly Gly Thr Pro  
 1025 1030 1035

Tyr Cys Gly Met Thr Cys Ala Glu Leu Tyr Glu Lys Leu Pro Gln  
 1040 1045 1050

Gly Tyr Arg Leu Glu Lys Pro Leu Asn Cys Asp Asp Glu Val Tyr  
 1055 1060 1065

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

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

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

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

<210> 21  
 <211> 453  
 <212> PRT

## 032192

<213> Искусственная

<220>

<223> тяжелая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 с AAA-мутациями (VEGFang2-0012)

<400> 21

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
210 215 220

## 032192

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
245 250 255

Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
275 280 285

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu  
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
355 360 365

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

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 22

<211> 463

## 032192

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Тяжелая цепь 2 &lt;VEGF-ANG-2&gt; CrossMAb IgG1 с AAA-мутациями (VEGFang2-0012)

&lt;400&gt; 22

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His  
225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr  
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro  
355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala  
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
435 440 445

His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
450 455 460

<210> 23

## 032192

<211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> Легкая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 с AAA-мутациями  
 (VEGFang2-0012)  
  
 <400> 23  
  
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile  
 35 40 45  
  
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
 85 90 95  
  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 24  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Легкая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 с AAA-мутациями  
 (VEGF-Ang2-0012)

<400> 24

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

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

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

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

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

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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser  
 100 105 110

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

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

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

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

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val

195

200

205

Glu Pro Lys Ser Cys  
210

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 453

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная

&lt;220&gt;

<223> Тяжелая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 с AAA-мутациями  
и P329G LALA-мутациями (VEGFang2-0016)

&lt;400&gt; 25

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val

## 032192

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

## 032192

Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 26

<211> 463

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Тяжелая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 с AAA-мутациями  
 и P329G LALA-мутациями (VEGFang2-0016)

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
 165 170 175

## 032192

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
 195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His  
 225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val  
 245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr  
 260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 325 330 335

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

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro  
 355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala  
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 420 425 430

## 032192

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 435 440 445

His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460

<210> 27

<211> 214

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Легкая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 с AAA-мутациями  
 и P329G LALA-мутациями (VEGFang2-0016)

<400> 27

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

## 032192

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 28

<211> 213

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Легкая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 с AAA-мутациями  
и P329G LALA-мутациями (VEGFang2-0016)

<400> 28

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

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

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

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

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

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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser  
100 105 110

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

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

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

## 032192

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

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

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

Glu Pro Lys Ser Cys  
210

<210> 29

<211> 450

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Тяжелая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 с AAA-мутациями  
и с SPLE-мутациями

<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 Tyr Asp Phe Thr His Tyr  
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

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

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

## 032192

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys  
 450

<210> 30

<211> 460

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Тяжелая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 с AAA-мутациями  
 и с SPLE-мутациями

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
 195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Pro Pro Cys Pro  
 225 230 235 240

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 245 250 255

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 260 265 270

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
 275 280 285

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 290 295 300

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 305 310 315 320

Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 325 330 335

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 340 345 350

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln  
 355 360 365

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly  
 370 375 380

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro







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

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

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

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

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

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255

Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335

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

Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln

## 032192

355                                      360                                      365  
 Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
     370                                      375                                      380  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385                                      390                                      395                                      400  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu  
                                     405                                      410                                      415  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
                                     420                                      425                                      430  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
                                     435                                      440                                      445  
 Leu Ser Pro Gly Lys  
     450  
 <210> 34  
 <211> 705  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная  
 <220>  
 <223> Тяжелая цепь 2 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 с AAA-мутациями  
 <400> 34  
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
 1                                      5                                      10                                      15  
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
                                     20                                      25                                      30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
                                     35                                      40                                      45  
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
     50                                      55                                      60  
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His  
                                     85                                      90                                      95  
 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys  
                                     100                                      105                                      110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu  
245 250 255

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
260 265 270

Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
275 280 285

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr  
290 295 300

Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr  
305 310 315 320

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp  
325 330 335

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp  
340 345 350

Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly



## 032192

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp  
610 615 620

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
625 630 635 640

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
645 650 655

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
660 665 670

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
675 680 685

Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
690 695 700

Lys  
705

<210> 35  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Искусственная

<220>  
<223> Легкая цепь 1 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 с AAA-мутациями

<400> 35

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

## 032192

100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210  
 <210> 36  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная  
 <220>  
 <223> Тяжелая цепь 1 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 с AAA-мутациями  
 и с SPLE-мутациями  
 <400> 36  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
 50 55 60  
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys



## 032192

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys  
450

<210> 37

<211> 702

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Тяжелая цепь 2 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 с AAA-мутациями и с SPLE-мутациями

<400> 37

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

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

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

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

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

## 032192

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

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

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu  
 245 250 255

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
 260 265 270

Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
 275 280 285

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr  
 290 295 300

Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr  
 305 310 315 320

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp  
 325 330 335

## 032192

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp  
 340 345 350

Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
 355 360 365

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 370 375 380

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu  
 385 390 395 400

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 405 410 415

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 420 425 430

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 435 440 445

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
 450 455 460

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
 465 470 475 480

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 485 490 495

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro  
 500 505 510

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
 515 520 525

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 530 535 540

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 545 550 555 560

Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 565 570 575

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 580 585 590

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
595 600 605

Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val  
610 615 620

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
625 630 635 640

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
645 650 655

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
660 665 670

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
675 680 685

Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
690 695 700

<210> 38

<211> 214

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Легкая цепь 1 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 с AAA мутациями и  
с SPLE-мутациями

<400> 38

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 39

<211> 453

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Тяжелая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 дикого типа  
 без AAA-мутаций) (VEGFang2-0201)

<400> 39

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
 50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

## 032192

325 330 335  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365  
 Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 405 410 415  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Leu Ser Pro Gly Lys  
 450  
 <210> 40  
 <211> 463  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная  
 <220>  
 <223> Тяжелая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 дикого типа  
 (без AAA-мутаций) (VEGFang2-0201)  
 <400> 40  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr



## 032192

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro  
355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala  
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
450 455 460

<210> 41  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Искусственная

<220>  
<223> Легкая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 дикого типа  
(без AAA-мутаций) (VEGFang2-0201)

<400> 41

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

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

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

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

## 032192

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 42

<211> 213

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Легкая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 дикого типа  
(без AAA-мутаций) (VEGFang2-0201)

<400> 42

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

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

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

## 032192

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

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

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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Glu Pro Lys Ser Cys  
210

<210> 43

<211> 453

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Тяжелая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 только с P329G LALA-  
мутациями (без AAA-мутаций) (VEGFang2-0015)

<400> 43

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

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

## 032192

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
 50 55 60  
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125  
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140  
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 145 150 155 160  
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205  
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala  
 225 230 235 240  
 Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270  
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285

## 032192

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala  
325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
355 360 365

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

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 44

<211> 463

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Тяжелая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 только с P329G LALA-  
мутациями (без AAA-мутаций) (VEGFang2-0015)

<400> 44

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

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

032192

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr  
 100 105 110  
 Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser  
 115 120 125  
 Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 130 135 140  
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 145 150 155 160  
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
 165 170 175  
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
 180 185 190  
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
 195 200 205  
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 210 215 220  
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His  
 225 230 235 240  
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val  
 245 250 255  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 260 265 270  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 325 330 335

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

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro  
 355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala  
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460

<210> 45

<211> 214

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Легкая цепь 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 только с P329G LALA-  
 мутациями (без AAA-мутаций) (VEGFang2-0015)

<400> 45

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 46

<211> 213

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Легкая цепь 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 только с P329G LALA-  
 мутациями (без AAA-мутаций) (VEGFang2-0015)

<400> 46

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

## 032192

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

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

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

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

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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Glu Pro Lys Ser Cys  
210

<210> 47  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 47

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

## 032192

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

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

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

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

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

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

<210> 48  
<211> 105  
<212> PRT  
<213> homo sapiens

<400> 48

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

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

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

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

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

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

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
100 105

<210> 49  
<211> 330

## 032192

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 49

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 50

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий центр, который специфически связывается с человеческим VEGF, и второй антигенсвязывающий центр, который специфически связывается с человеческим ANG-2, в котором:

I) указанный первый антигенсвязывающий центр, специфически связывающийся с VEGF, содержит в переменном домене тяжелой цепи CDR3H-участок, имеющий SEQ ID NO: 1, CDR2H-участок, имеющий SEQ ID NO: 2, и CDR1H-участок, имеющий SEQ ID NO: 3, и в переменном домене легкой цепи CDR3L-участок, имеющий SEQ ID NO: 4, CDR2L-участок, имеющий SEQ ID NO: 5, и CDR1L-участок, имеющий SEQ ID NO: 6; и

II) указанный второй антигенсвязывающий центр, специфически связывающийся с ANG-2, содержит в переменном домене тяжелой цепи CDR3H-участок, имеющий SEQ ID NO: 9, CDR2H-участок, имеющий SEQ ID NO: 10, и CDR1H-участок, имеющий SEQ ID NO: 11, и в переменном домене легкой цепи CDR3L-участок, имеющий SEQ ID NO: 12, CDR2L-участок, имеющий SEQ ID NO: 13, и CDR1L-участок, имеющий SEQ ID NO: 14, и в котором

III) биспецифическое антитело содержит константную область тяжелой цепи человеческого подкласса IgG1 (происходящую из человеческого антитела) и содержащую мутации I253A, H310A и H435A (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

2. Биспецифическое антитело по п.1, в котором:

I) указанный первый антигенсвязывающий центр, специфически связывающийся с VEGF, содержит в качестве переменного домена тяжелой цепи VH аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 и в качестве переменного домена легкой цепи VL аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 и

II) указанный второй антигенсвязывающий центр, специфически связывающийся с ANG-2, содержит в качестве переменного домена тяжелой цепи VH аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и в качестве переменного домена легкой цепи VL аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

3. Биспецифическое антитело по п.1, в котором константная область тяжелой цепи IgG1-подкласса содержит также мутации L234A, L235A и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

4. Биспецифическое антитело по п.1, включающее аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28.

5. Биспецифическое антитело по п.1, включающее аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24.

6. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-5 и фармацевтически приемлемый носитель, для лечения сосудистых заболеваний глаз.

7. Фармацевтическая композиция по п.6 для интравитреального введения.

8. Нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифическое антитело по любому из пп.1-5.

9. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.8, который обладает способностью экспрессировать указанную нуклеиновую кислоту в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине.

10. Прокариотическая или эукариотическая клетка-хозяин, содержащая вектор по п.9.

11. Способ получения биспецифического антитела по любому из пп.1-5, включающий стадии, на которых:

а) трансформируют клетку-хозяин вектором, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует указанное антитело;

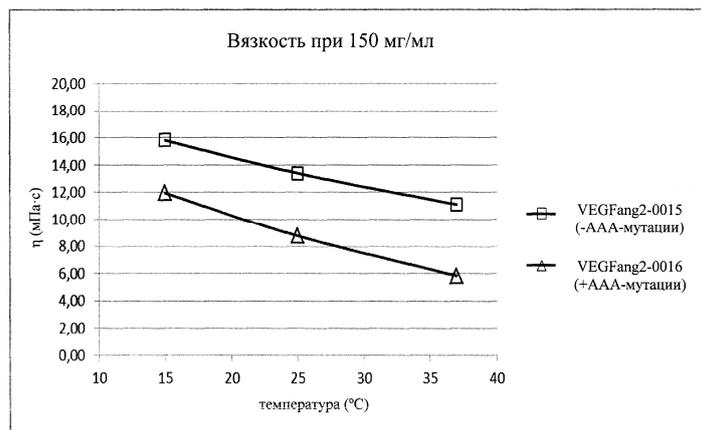
б) культивируют указанную клетку-хозяин в условиях, обеспечивающих синтез указанной молекулы антитела; и

в) выделяют указанную молекулу антитела из указанной культуры.

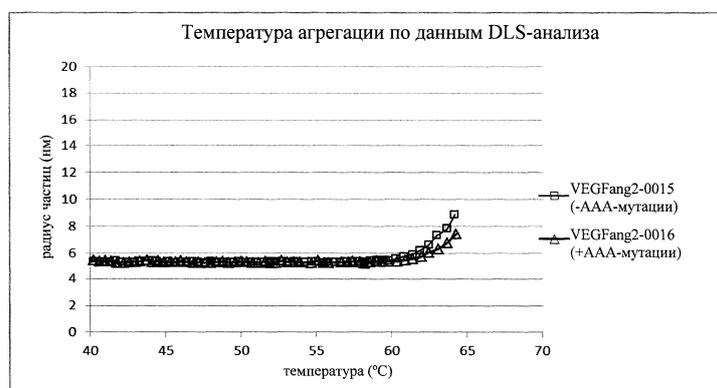
12. Биспецифическое антитело, полученное с помощью способа по п.11.



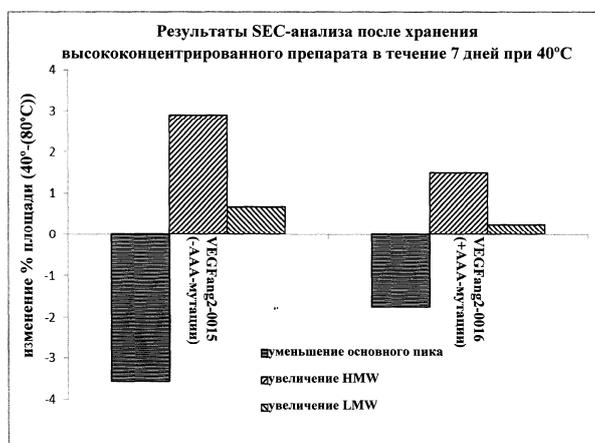
Фиг. 1



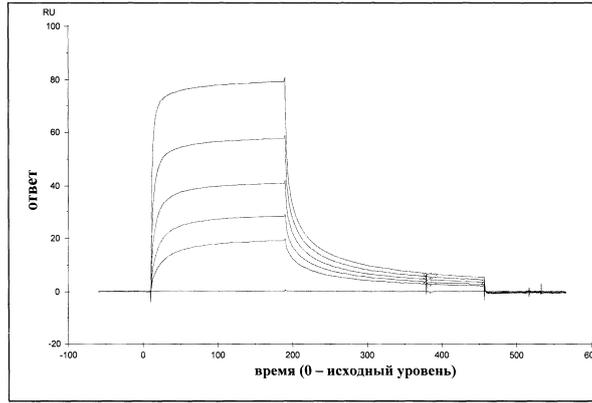
Фиг. 2



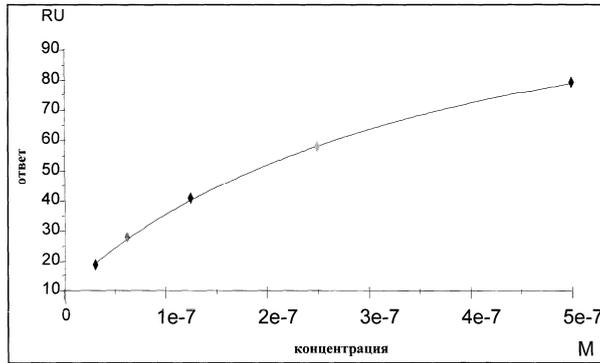
Фиг. 3



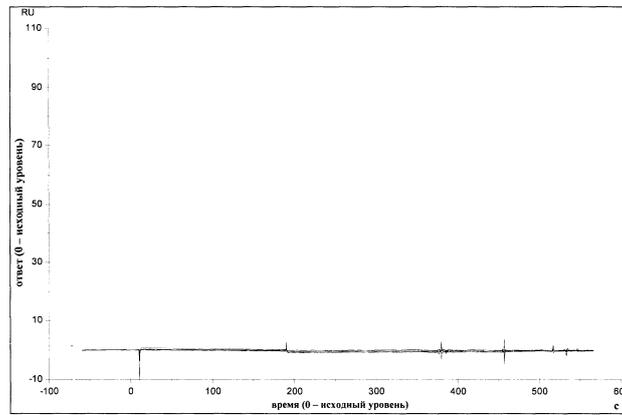
Фиг. 4



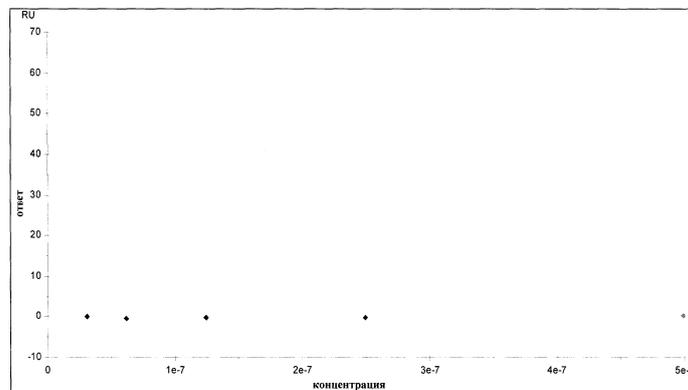
Фиг. 5А



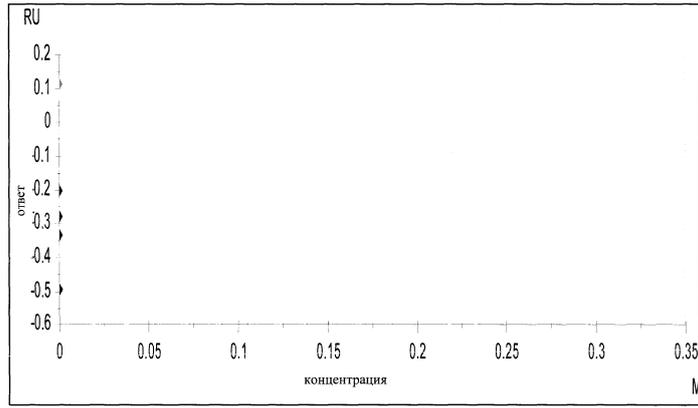
Фиг. 5Б



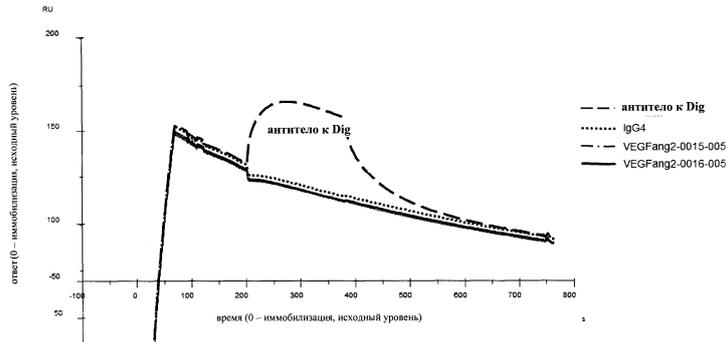
Фиг. 5В



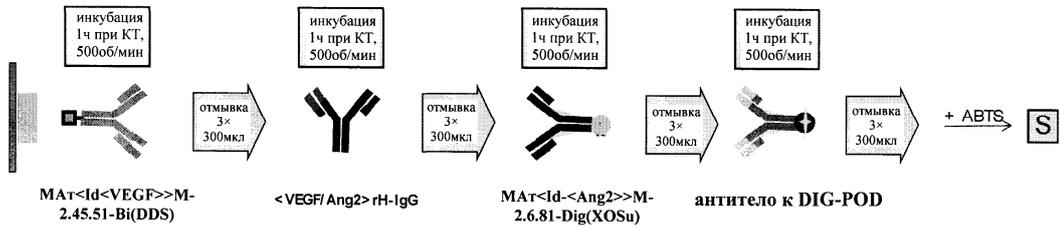
Фиг. 5Г



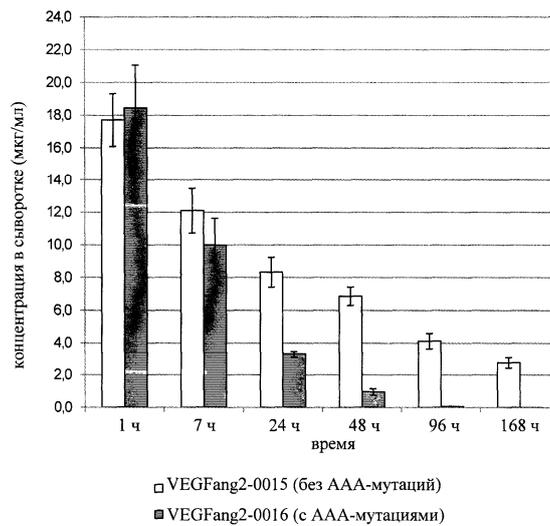
Фиг. 5Д



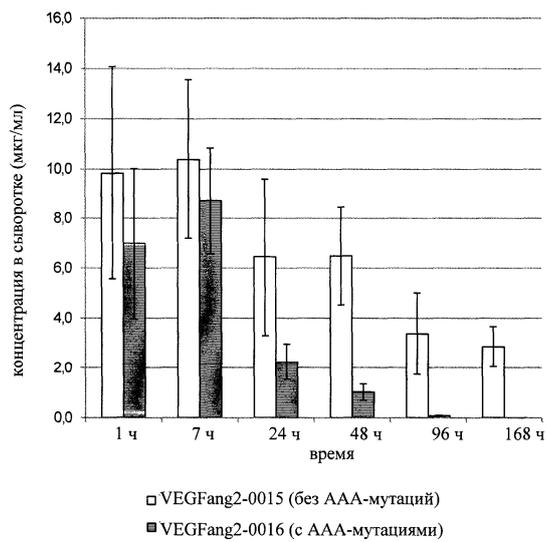
Фиг. 6



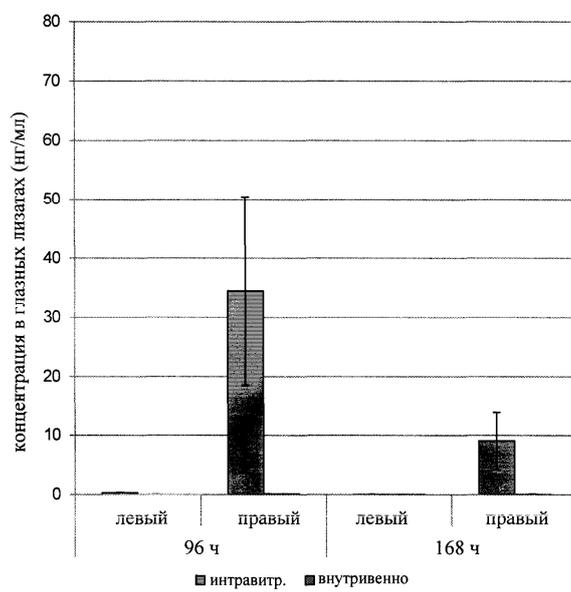
Фиг. 7А



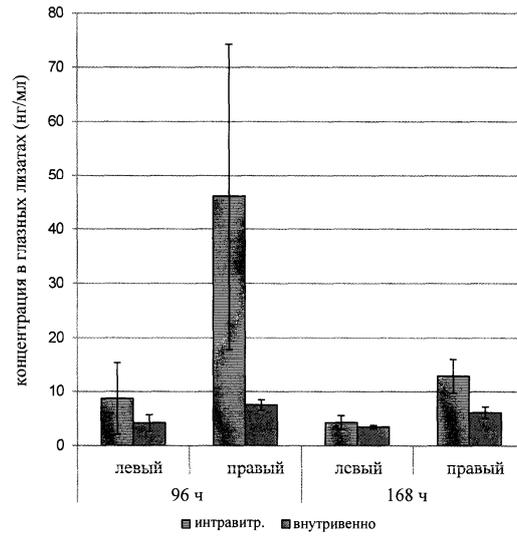
Фиг. 7Б



Фиг. 7В



Фиг. 7Г



Фиг. 7Д

