



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120029** (13) **C2**  
(51) МПК (2019.01)

**C07K 16/22** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C12N 15/13** (2006.01)  
**A61P 27/00**

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: <b>а 2015 01008</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>11.07.2013</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.09.2019</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>12176299.1</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>13.07.2012</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву: <b>ЕР</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: <b>25.05.2015, Бюл.№ 10</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.09.2019, Бюл.№ 18</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ <b>РСТ/ЕР2013/064672, 11.07.2013</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Дюрр Харальд (DE), Хертінг Франк (DE), Кляйн Крістіан (CH), Регула Йорг Томас (DE), Рют Маттіас (DE), Штубенраух Кай-Гуннар (DE)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>РОШ ГЛІКАРТ АГ, Wagistrasse 18, CH-8952 Schlieren, Switzerland (CH)</b></p> <p>(74) Представник: <b>Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2011117329 A1, 29.09.2011 WO 2009155513 A2, 23.12.2009 WO 2010040508 A1, 15.04.2010 WO 2009080251 A1, 02.07.2009 KIM HYUNCHEOL et al. FcRn receptor-mediated pharmacokinetics of therapeutic IgG in the eye. Molecular vision 2009, Vol. 15, P. 2803 – 2812 TIMOTHY T. KUO et al. Neonatal Fc receptor: from immunity to therapeutics", Journal of clinical immunology, Kluwer academic publishers-plenum publishers, NE, 2010, Vol. 30, no. 6, P. 777 – 789 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 - VCHVerlag GMBH &amp; CO. KGAA, DE, 1999, Vol. 29, no. 9, P. 2819 – 2825 S.-W. QIAO et al. Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. Proceedings of the national academy of sciences, 2008, Vol. 105, no. 27, P. 9337 – 9342 DEISLER H.L. et al. Actions of bevacizumab and ranibizumab on microvascular retinal endothelial cells: similarities and differences. The british journal of ophthalmology, 2012, Vol. 96, no. 7, P. 1023 – 1028 SINAPIS C.I. et al. Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin(R)) in rabbits. Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.), 2011, Vol. 5, P. 697 – 704 RIDGWAY et al. Knobs-into-holes' engineering of antibody ch3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein engineering, Oxford university press, Surrey, GB, 1996, Vol. 9, no. 7, P. 617 – 621 CHENNAMSETTY N. et al. Aggregation-prone motifs in human immunoglobulin G. Journal of molecular biology, Academic press, United Kingdom, 2009, Vol. 391, no. 2, P. 404 – 413</p>
---	--

## (54) СПОСІБ ЗНИЖЕННЯ В'ЯЗКОСТІ БІСПЕЦИФІЧНОГО АНТИТІЛА ДО VEGF/ANG-2 ТА ЗАСТОСУВАННЯ ТАКОГО АНТИТІЛА ДЛЯ ЛІКУВАННЯ СУДИННИХ ОЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

### (57) Реферат:

Винахід належить до способу зниження в'язкості біспецифічного антитіла, яке специфічно зв'язується з людським судинним ендотеліальним фактором росту (VEGF/VEGF-A) і людським

UA 120029 C2

ангіопоетином-2 (ANG-2) людського підкласу IgG1 або IgG4 з мутаціями 1253A, H310A і H435A, способу одержання такого антитіла, фармацевтичної композиції, що містить зазначене антитіло, та його застосування.

Даний винахід належить до способу зниження в'язкості антитіла (включаючи біспецифічне антитіло), такого як людське антитіло підкласу IgG1 або людське антитіло підкласу IgG4, до біспецифічних антитіл до людського судинного ендотеліального фактору росту (VEGF/VEGF-A) і до людського ангіопетину-2 (ANG-2), способів їх одержання, фармацевтичних композицій, що містять зазначені антитіла, і їх застосувань.

Передумови створення винаходу

Ангіогенез бере участь у патогенезі різних порушень, включаючи солідні пухлини, внутрішні неоваскулярні синдроми, такі як проліферативні ретинопатії або вікова дегенерація жовтої плями (AMD), ревматоїдний артрит і псоріаз (Folkman та ін., J. Biol. Chem. 267, 1992, сс. 10931-10934; Klagsbrun M. та ін., Annu. Rev. Physiol. 53, 1991, сс. 217-239 і Garner A., Vascular diseases, в: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, під ред. Garner A. і Klintworth G. K., 2-е вид., вид-во Marcel Dekker, New York, 1994, сс. 1625-1710).

Ранібізумаб (товарний знак Lucentis®) являє собою фрагмент моноклонального антитіла, виведений з того ж самого батьківського мишачого антитіла, що і бевацизумаб (авастін). Однак його піддавали процедурі дозрівання афінності для досягнення більш сильного зв'язування з VEGF-A (WO 98/45331). Відомо, що блокада VEGF-A може бути пов'язана з деякими симптомами системної токсичності, з цієї причини ранібізумаб позбавлений Fc-ділянки для зменшення часу напівжиття в сироватці і, отже, системної токсичності. Він являє собою антиангіогенний агент, який дозволений для лікування вікової дегенерації жовтої плями "вологого типу" (ARMD), звичайної форми пов'язаної з віком втрати зору.

Аналізи ангіогенезу в рогівці продемонстрували, що ANG-1 і ANG-2 чинять подібні дії, і мають синергетичну активність при спільній дії з VEGF, відносно прискорення росту нових кровоносних судин (Asahara T. та ін., Circ. Res. 83, 1998, сс. 233-240). Можливість того, мала місце залежна від дози ендотеліальна відповідь, впливала з даних про те, що *in vitro* ANG-2 у високій концентрації може також мати проангіогенну дію (Kim I. та ін., Oncogene 19, 2000, сс. 4549-52). У високій концентрації ANG-2 діє в якості фактора виживання при апоптозу ендотеліальних клітин в процесі виснаження в сироватці факторів апоптозу в результаті активації Tie2 за допомогою шляху PI-3-кінази і Akt (Kim I. та ін., Oncogene 19, 2000, сс. 4549-4552).

У WO 2010/040508 A9 і WO 2011/117329 описані біспецифічні антитіла до VEGF/ANG-2. У WO 2008/132568 описані злиті білки, що зв'язуються з факторами росту. У WO 2009/136352 описані антиангіогенні сполуки. У WO 2009/080253 і WO 2011/117330 описані біспецифічні двовалентні формати антитіл. У WO 2010/069532 описані антитіла до Ang2.

Судинні очні захворювання, такі як вікова дегенерація жовтої плями (ARMD) і діабетична ретинопатія (DR), є результатом аномальної хороїдальної або ретинальної неоваскуляризації відповідно. Вони є основними причинами втрати зору у жителів промислово розвинених країн. Оскільки сітківка складається з добре оформлених шарів нейронних, гліальних і судинних елементів, відносно невеликих порушення, такі, які мають місце при проліферації судин або набряку, можуть призводити до значного зниження зорової функції. Спадкові дегенерації сітківки, такі як пігментний ретиніт (RP), асоційовані також із судинними порушеннями, такими як звуження артерій і судинна атрофія. Вони вражають 1 з 3500 індивідуумів і характеризуються прогресуючою нічною сліпотою, зменшенням поля зору, атрофією зорового нерва, ослабленням артерій і зниженням центрального зору, часто прогресуючим аж до повної сліпоти.

Ішемічні ретинопатії характеризуються зниженням або дисфункцією судинної мережі сітківки, що призводить до зниження потоку крові і гіпоксії. Сітківка реагує на гіпоксію генеруванням сигналів зростання нових кровоносних судин, однак ці нові судини, як правило, є ламкими і неупорядкованими. Так, зростання цих аномальних нових судин може створювати загрозу зору, оскільки вони можуть витікати, кровоточити або приводити до рубцювання, що, зрештою, може закінчуватися відшаруванням сітківки. Сучасні шляхи лікування ішемічних ретинопатій спрямовані на зупинку зростання патологічних судин, але вони не впливають на лежачу в їх основі ішемію, яка запускає їх зростання. Крім того, стандартне лікування діабетичної ретинопатії, ішемічної ретинопатії, яка вражає мільйони людей, включає руйнування частини сітківки лазером з метою припинення зростання нових судин і збереження центрального зору. Відомо застосування стратегій для блокади функції судинного ендотеліального фактору росту (VEGF), основного активатора росту судин. Короткочасна анти-VEGF терапія може покращувати зір, але вона не спрямована на лежачу в основі захворювання ішемію і фактично може загострювати цей стан, оскільки інгібує зростання всіх сусідів, включаючи такі, що чинять сприятливу дію колатералі. Існує також серйозна проблема, пов'язана з системною експозицією цих лікарських засобів в організмі людей похилого віку та/або пацієнтів, які страждають на діабет, для яких може вимагатися зростання нових судин

при ішемії головного мозку, серця або кінцівок.

Як правило, при очних хворобах часто застосовують введення в склоподібне тіло більш дрібних фрагментів антитіл типу Fab or Fab (2), оскільки вони мають короткий час напівжиття в сироватці і низький ризик системної токсичності. Однак зазначені більш дрібні фрагменти, як

правило, мають також і більш короткий час напівжиття в склоподібному тілі (наприклад, через більш швидку дифузію в сироватку) і, як правило, їх необхідно частіше дозувати.

У Kim та ін., Molecular Vision, 15, 2009, сс. 2803-2812 описані повнорозмірні антитіла, які вводять такі, що вводяться всередину скловидного тіла (інтравітреально) в око, для яких встановлено, що IgG, що зв'язується з FcRn, елімінувалися в кров у мишей дикого типу, в той час як IgY, що не зв'язується з FcRn, що не елімінувалися в кровоносну систему. Крім того, IgG, що зв'язується з FcRn, не елімінувалися в кровоносну систему у мишей з "вимкненим" FcRn.

Таким чином, в даній області існує необхідність у створенні поліпшених засобів для лікування та попередження різних судинних очних захворювань, таких як ішемічні ретинопатії.

Короткий виклад суті винаходу

Одним з об'єктів винаходу є спосіб зниження в'язкості антитіла, де антитіло містить константну ділянку важкого ланцюга людського підкласу IgG1 або людського підкласу IgG4 (виведену з людського антитіла) і де спосіб полягає в тому, що модифікують константну ділянку важкого ланцюга людського підкласу IgG1 або людського підкласу IgG4 за допомогою мутації I253A, H310A і H435A (нумерація згідно EU-індексу Кебота).

В одному з варіантів здійснення винаходу вказаний спосіб відрізняється тим, що антитіло являє собою біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, в якому

I) зазначений перший антигензв'язуючий центр, специфічно зв'язується з VEGF, містить в варіабельному домені важкого ланцюга CDR3H-ділянку, що має SEQ ID NO: 1, CDR2H-ділянку, що має SEQ ID NO: 2, і CDR1H-ділянку, що має SEQ ID NO: 3, і в варіабельному домені легкого ланцюга CDR3L-ділянку, що має SEQ ID NO: 4, CDR2L-ділянку, що має SEQ ID NO: 5, і CDR1L-ділянку, що має SEQ ID NO: 6; і

II) зазначений другий антигензв'язуючий центр, специфічно зв'язується з ANG-2, містить в варіабельному домені важкого ланцюга CDR3H-ділянку, що має SEQ ID NO: 9, CDR2H-ділянку, що має SEQ ID NO: 10, і CDR1H-ділянку, що має SEQ ID NO: 11, і в варіабельному домені легкого ланцюга CDR3L-ділянку, що має SEQ ID NO: 12, CDR2L-ділянку, що має SEQ ID NO: 13, і CDR1L-ділянку, що має SEQ ID NO: 14, і де

III) біспецифічне антитіло містить константну ділянку важкого ланцюга людського підкласу IgG1 або людського підкласу IgG4 (виведену з людського антитіла) і містить мутації I253A, H310A і H435A (нумерація згідно EU-індексу Кебота).

В одному з варіантів здійснення винаходу вказаний спосіб відрізняється тим, що вказане описане вище біспецифічне антитіло містить константну ділянку людського підкласу IgG1 (виведену з людського антитіла) і таку, що містить мутації I253A, H310A і H435A, (нумерація згідно EU-індексу Кебота), а також містить мутації L234A, L235A і P329G (нумерація згідно EU-індексу Кебота).

Одним з варіантів здійснення винаходу є антитіло, отримане зазначеним способом.

Одним з варіантів здійснення винаходу є застосування мутацій I253A, H310A і H435A (нумерація згідно EU-індексу Кебота) для зниження в'язкості антитіла, де антитіло містить константну ділянку важкого ланцюга людського підкласу IgG1 або людського підкласу IgG4 (виведену з людського антитіла).

В одному з варіантів здійснення винаходу вказане застосування відрізняється тим, що антитіло являє собою біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, в якому

I) зазначений перший антигензв'язуючий центр, специфічно зв'язується з VEGF, містить в варіабельному домені важкого ланцюга CDR3H-ділянку, що має SEQ ID NO: 1, CDR2H-ділянку, що має SEQ ID NO: 2, і CDR1H-ділянку, що має SEQ ID NO: 3, і в варіабельному домені легкого ланцюга CDR3L-ділянку, що має SEQ ID NO: 4, CDR2L-ділянку, що має SEQ ID NO: 5, і CDR1L-ділянку, що має SEQ ID NO: 6; і

II) зазначений другий антигензв'язуючий центр, що специфічно зв'язується з ANG-2, містить в варіабельному домені важкого ланцюга CDR3H-ділянку, що має SEQ ID NO: 9, CDR2H-ділянку, що має SEQ ID NO: 10, і CDR1H-ділянку, що має SEQ ID NO: 11, і в варіабельному домені легкого ланцюга CDR3L-ділянку, що має SEQ ID NO: 12, CDR2L-ділянку, що має SEQ ID NO: 13, і CDR1L-ділянку, що має SEQ ID NO: 14, і в якому



III) біспецифічне антитіло містить константну ділянку важкого ланцюга людського підкласу IgG1 або людського підкласу IgG4 (виведену з людського антитіла) і що містить мутації I253A, H310A і H435A (нумерація згідно EU-індексу Кебота).

В одному з варіантів здійснення винаходу вказане конкретне застосування відрізняється тим, що біспецифічне антитіло містить константну ділянку людського підкласу IgG1 (виведену з людського антитіла) і що містить мутації I253A, H310A і H435A (нумерація згідно EU-індексу Кебота), а також що містить мутації L234A, L235A і P329G (нумерація згідно EU-індексу Кебота).

Винахід належить також до біспецифічному двовалентному антитілу, яке містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2,

в якому

I) зазначений перший антигензв'язуючий центр, що специфічно зв'язується з VEGF, містить в варіабельному домені важкого ланцюга CDR3H-ділянку, що має SEQ ID NO: 1, CDR2H-ділянку, що має SEQ ID NO: 2, і CDR1H-ділянку, що має SEQ ID NO: 3, і в варіабельному домені легкого ланцюга CDR3L-ділянку, що має SEQ ID NO: 4, CDR2L-ділянку, що має SEQ ID NO: 5, і CDR1L-ділянку, що має SEQ ID NO: 6; і

II) зазначений другий антигензв'язуючий центр, що специфічно зв'язується з ANG-2, містить в варіабельному домені важкого ланцюга CDR3H-ділянку, що має SEQ ID NO: 9, CDR2H-ділянку, що має SEQ ID NO: 10, і CDR1H-ділянку, що має SEQ ID NO: 11, і в варіабельному домені легкого ланцюга CDR3L-ділянку, що має SEQ ID NO: 12, CDR2L-ділянку, що має SEQ ID NO: 13, і CDR1L-ділянку, що має SEQ ID NO: 14, і де

III) біспецифічне антитіло містить константну ділянку важкого ланцюга людського підкласу IgG1 або людського підкласу IgG4 (виведену з людського антитіла) і що містить мутації I253A, H310A і H435A (нумерація згідно EU-індексу Кебота).

В одному з варіантів здійснення винаходу вказане біспецифічне антитіло відрізняється тим, що

I) зазначений перший антигензв'язуючий центр, що специфічно зв'язується з VEGF, містить в якості варіабельного домену важкого ланцюга VH амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7 і в якості варіабельного домену легкого ланцюга VL амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8 і

II) зазначений другий антигензв'язуючий центр, що специфічно зв'язується з ANG-2, містить в якості варіабельного домену важкого ланцюга VH амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15 і в якості варіабельного домену легкого ланцюга VL амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16.

В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне антитіло відрізняється тим, що константна ділянка важкого ланцюга, зазначена у підпункті III), являє собою константну ділянку людського підкласу IgG1. В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне антитіло підкласу IgG1 відрізняється тим, що константна ділянка важкого ланцюга підкласу IgG1 містить також мутації L234A, L235A і P329G (нумерація згідно EU-індексу Кебота).

В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне антитіло відрізняється тим, що константна ділянка важкого ланцюга, зазначена у підпункті III), являє собою константну ділянку людського підкласу IgG4. В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне антитіло підкласу IgG4 відрізняється тим, що константна ділянка важкого ланцюга підкласу IgG4 містить також мутації S228P і L235E (нумерація згідно EU-індексу Кебота). В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне антитіло підкласу IgG4 відрізняється тим, що константна ділянка важкого ланцюга підкласу IgG4 містить також мутації S228P, L235E і P329G (нумерація згідно EU-індексу Кебота).

Наступними об'єктами винаходу є фармацевтична композиція, що містить вказане біспецифічне антитіло, зазначена фармацевтична композиція, призначена для застосування для лікування судинних очних захворювань, застосування вказаного біспецифічного антитіла для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування судинних очних захворювань, спосіб лікування пацієнта, що страждає судинними очними захворюваннями, шляхом запровадження зазначеного біспецифічного антитіла пацієнту, який потребує зазначеного лікування. В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне антитіло або фармацевтичну композицію, що містить вказане біспецифічне антитіло, застосовують шляхом інтравітреального введення.

Наступним об'єктом винаходу є молекула нуклеїнової кислоти, що кодує важкий і/або легкий ланцюг біспецифічного антитіла, запропонованого у винаході.

У винаході запропоновані також експресійні вектори, що містять зазначену нуклеїнову кислоту, пропонувану у винаході, які можуть експресувати зазначену нуклеїнову кислоту в прокаріотичній або еукаріотичній клітині-хазяїні, і клітини-хазяїні, що містять зазначені вектори, які містять зазначені вектори, призначені для рекомбінантного одержання біспецифічного

антитіла, запропонованого у винаході.

Винахід належить також до прокаріотів або еукаріотичних клітин-хазяїнів, які містять вектор, запропонований у винаході.

Винахід належить також до способу одержання біспецифічного антитіла, запропонованого у винаході, що відрізняється тим, що експресують нуклеїнову кислоту, запропоновану у винаході, в прокаріотичній або еукаріотичній клітині-хазяїні і виділяють вказане біспецифічне антитіло із зазначеної клітини або супернатанта клітинної культури. Одним з варіантів здійснення винаходу є спосіб отримання біспецифічного антитіла, запропонованого у винаході, що полягає в тому, що здійснюють стадії, на яких

а) трансформують клітину-хазяїна векторами, що містять молекули нуклеїнових кислот, які кодувають антитіло;

б) культивують клітину-хазяїна в умовах, які забезпечують синтез зазначеної молекули антитіла; і

в) виділяють зазначену молекулу антитіла із зазначеної культури.

Винахід належить також до антитіла, отриманого за допомогою зазначеного способу одержання біспецифічного антитіла.

Таким чином, одним з варіантів здійснення винаходу є біспецифічне двовалентне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, що відрізняється тим, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 і SEQ ID NO: 24.

Таким чином, одним з варіантів здійснення винаходу є біспецифічне двовалентне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, що відрізняється тим, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 і SEQ ID NO: 28.

Антитіла, запропоновані у винаході, мають дуже цінні властивості, пов'язаними зі специфічними модифікаціями в Fc-ділянки/константної ділянки, що забезпечує сприятливу дію на пацієнта, що страждає судинними очними захворюваннями. Вони відрізняються високою стабільністю в середовищі склоподібного тіла, і повільною дифузією з ока (порівняно з фрагментами антитіл меншого розміру, що не містять константну ділянку важкого ланцюга), при цьому фактичне захворювання локалізується і лікується (таким чином, схему лікування потенційно можна покращувати в порівнянні зі схемою, в якій застосовують не-IgG-подібні антитіла, наприклад, типу Fab- і (Fab) 2-фрагментів). При створенні винаходу неочікувано було встановлено, що в порівнянні з немодифікованими антитілами IgG-типу час напівжиття в оці після інтравітреального введення антитіл з мутаціями I253A, H310A і H435A в константній ділянці (які не мають більше здатність до зв'язування FcRn) виявилось схожим (лише незначно знижувався) (таблиці 17a і 18a і фіг. 7Г і 7Д), в той час як дифузія з ока в сироватку крові була подібною (таблиця 15 і фіг. 7Б). Це є дуже цінним, оскільки для лікування судинних очних захворювань, пов'язаних з ANG2 та/або VEGF, потрібно елімінувати VEGF і Ang2 з ока (наприклад, за допомогою транспортування в сироватку крові у вигляді комплексу антитіло до ANG2/ANG2 або комплексу антитіло до VEGF/VEGF). З іншого боку, для антитіл, запропонованих у винаході, характерний досить швидкий кліренс із сироватки в порівнянні з немодифікованими антитілами IgG-типу (що є дуже бажаним для зниження потенційних побічних дій, пов'язаних з системною експозицією).

При створенні винаходу також неочікувано було встановлено, що зазначені антитіла мають низьку в'язкість (див. фіг. 2) (порівняно з версіями, що не мають мутацій I253A, H310A і H435A в константній ділянці), і, отже, найбільш придатні для введення в склоподібне тіло за допомогою тонких голок в процесі лікування очних хвороб (для зазначеного застосування, як правило, використовують тонкі голки і висока в'язкість дуже ускладнює вказане введення). Більш низька в'язкість дозволяє також використовувати більш концентровані композиції.

При створенні винаходу також неочікувано була виявлена менша тенденція до агрегації (фіг. 4) в процесі зберігання (у порівнянні з версіями без мутацій I253A, H310A і H435A в Fc-ділянці), що має вирішальне значення для введення в склоподібне тіло ока (оскільки агрегація в оці може призводити до ускладнень в процесі такого лікування). Біспецифічні антитіла, запропоновані у винаході, мають високу ефективність щодо придушення судинних захворювань.

У деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічні антитіла, запропоновані у винаході, завдяки їх специфічним модифікаціям в константній ділянці (наприклад, P329G LALA), відрізняються цінними властивостями, такими як відсутність зв'язування з Fcгамма-

рецепторами, що знижує ризик побічних дій, таких як тромбоз і/або небажана клітинна загибель (пов'язана, наприклад, з ADCC).

Опис креслень

На кресленнях показано:

5 на фіг. 1 - схема, що ілюструє концепцію та переваги антитіл до VEGF-ANG-2 (<VEGF-ANG-2>) IgG1- або IgG4-типу з мутаціями AAA (мутації I253A, H310A і H435A - нумерація згідно EU-індексу Кебота);

10 на фіг. 2 - результати вимірювань в'язкості в лабораторних умовах на основі DLS (динамічне розсіювання світла). Представлені дані про отриману шляхом екстраполяції в'язкість при 150 мг/мл в 200мМ аргініні/сукцинаті, рН 5,5 (порівняння антитіл <VEGF-ANG-2>, запропонованих у винаході, VEGFang2-0016 (з AAA-мутаціями) з референс-антитілом VEGFang2-0015 (без AAA-мутацій));

15 на фіг. 3 - отримані за допомогою DLS дані про агрегації в залежності від температури (які включають отримані за допомогою DLS дані про температуру початку агрегації) в 20мМ His, 140мМ NaCl, рН 6,05 (порівняння антитіл <VEGF-ANG-2>, запропонованих у винаході, VEGFang2-0016 (з AAA-мутаціями) з референс-антитілом VEGFang2-0015 (без AAA-мутацій));

20 на фіг. 4 - дані про зберігання протягом 7 днів при 40 °С в концентрації 100 мг/мл (зниження основного піку і підвищення піку, відповідного високомолекулярним (HMW) видам (порівняння антитіл <VEGF-ANG-2>, запропонованих у винаході, VEGFang2-0016 (з AAA-мутаціями), для яких характерна більш низька агрегація, з референс-антитілом VEGFang2-0015 (без AAA-мутацій));

на фіг. 5А - дані про афінність до FcRn в стабільному стані VEGFang2-0015 (без AAA-мутацій): накладення Biacore-сенсограмм, отриманих при різних концентраціях, демонструє залежне від концентрації зв'язування VEGFang2-0015 (без AAA-мутацій) з FcRn;

25 на фіг. 5Б - дані про афінність до FcRn в стабільному стані антитіла, представленого на фіг. 5А: VEGFang2-0015 (без AAA-мутацій): крива залежності зв'язування від концентрації VEGFang2-0015 (без AAA-мутацій), що описує зв'язування з FcRn;

30 на фіг. 5В - дані про афінність до FcRn в стабільному стані VEGFang2-0016 (з AAA-мутаціями): накладення Biacore-сенсограмм, отриманих при різних концентраціях, демонструє відсутність зв'язування з FcRn при всіх концентраціях;

на фіг. 5Г - дані про афінність до FcRn в стабільному стані VEGFang2-0016 (з AAA-мутаціями): крива залежності зв'язування від концентрації VEGFang2-0016 (з AAA-мутаціями, демонструє відсутність зв'язування з FcRn;

35 на фіг. 5Д - дані про афінність до FcRn в стабільному стані VEGFang2-0016 (з AAA-мутаціями): крива залежності зв'язування від концентрації VEGFang2-0016 (з AAA-мутаціями), демонструє відсутність зв'язування з FcRn (діапазон відповіді від -0,6 до 0, 2 RU/діапазони концентрацій від 0 до 0,35М);

40 на фіг. 6 - результати кількісної оцінки взаємодії FcгаммаRIIIa з VEGFang2-0015 без AAA-мутацій і VEGFang2-0016 з AAA-мутаціями (обидва у вигляді антитіл IgG1-підкласу з мутаціями P329G LALA; в якості контролю застосовували антитіло до Dig IgG1-підкласу і антитіло, основою якого був IgG4);

на фіг. 7А - схема, що ілюструє принцип застосовуваного для вивчення ФК ELISA-аналізу, призначеного для визначення концентрацій біспецифічних антитіл <VEGF/Ang2> в сироватці і лізату всього ока;

45 на фіг. 7Б - концентрація в сироватці після внутрішньовенного введення: порівняння сполук VEGFang2-0015 без AAA-мутацій і VEGFang2-0016 з AAA-мутаціями;

на фіг. 7В - концентрація в сироватці після інтравітреального введення: порівняння сполук VEGFang2-0015 з AAA-мутаціями та VEGFang2-0016 без AAA-мутацій;

50 на фіг. 7Г - концентрація в очних лізатах VEGFang2-0016 (з AAA-мутаціями) у правому та лівому оці (після інтравітреального введення тільки в праве око в порівнянні з внутрішньовенним введенням): після інтравітреального введення значні концентрації вдалося виявити тільки в правому оці. Після внутрішньовенного введення в лізатах очей не вдалося виявити ніяких концентрацій через невеликий час напівжиття в сироватці VEGFang2-0016 (з AAA-мутацією);

55 на фіг. 7Д - концентрація очних в лізатах VEGFang2-0015 (без AAA-мутації) правого і лівого ока (після інтравітреального введення тільки в праве око в порівнянні з внутрішньовенним введенням): в правому оці (і в деякій мірі в лівому оці) після інтравітреального введення вдалося виявити концентрації VEGFang2-0015. Це свідчить про дифузію з правого ока в сироватку і з неї в ліве око, що можна пояснити тривалим часом напіввиведення VEGFang2-0015 (без AAA-мутації). Після внутрішньовенного введення вдалося також виявити значні

концентрації в лізатах обох очей в результаті дифузії в ока, що зберігає стабільність в сироватці VEGFang2-0015 (без AAA-мутації).

Детальний опис винаходу

В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне антитіло, пропонуване у винаході, є двовалентним.

В одному з об'єктів винаходу вказане біспецифічне двовалентне антитіло, пропонуване у винаході, відрізняється тим, що містить

а) важкий ланцюг і легкий ланцюг першого повнорозмірного антитіла, яке специфічно зв'язується з VEGF;

б) модифікований важкий ланцюг і модифікований легкий ланцюг другого повнорозмірного антитіла, яке специфічно зв'язується з ANG-2, в якому константні домени CL і CH1 замінені один на одного.

Зазначений формат біспецифічного двовалентного антитіла в якості біспецифічного антитіла, що специфічно зв'язується з людським судинним ендотеліальним фактором росту (VEGF) і людським ангіопоеїном-2 (ANG-2), описаний у WO 2009/080253 (включаючи модифіковані за допомогою технології "knobs-into-holes" (забезпечення взаємодії по типу "виступи-у западини") CH3-домени). Антитіла, основою яких є зазначений формат біспецифічного двовалентного антитіла, позначають як CrossMab.

В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне двовалентне антитіло відрізняється тим, що містить

а) в якості важкого ланцюга першого повнорозмірного антитіла амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25 і в якості легкого ланцюга першого повнорозмірного антитіла амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27, і

б) в якості модифікованої важкого ланцюга другого повнорозмірного антитіла амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26 і в якості модифікованого легкого ланцюга другого повнорозмірного антитіла амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28.

В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне двовалентне антитіло відрізняється тим, що містить

а) в якості важкого ланцюга першого повнорозмірного антитіла амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21 і в якості легкого ланцюга першого повнорозмірного антитіла амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 23, і

б) в якості модифікованого важкого ланцюга другого повнорозмірного антитіла амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22 і в якості модифікованого легкого ланцюга другого повнорозмірного антитіла амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24.

В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне двовалентне антитіло відрізняється тим, що містить

а) в якості важкого ланцюга першого повнорозмірного антитіла амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29 і в якості легкого ланцюга першого повнорозмірного антитіла амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 31, і

б) в якості модифікованого важкого ланцюга другого повнорозмірного антитіла амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 30 і в якості модифікованого легкого ланцюга другого повнорозмірного антитіла амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 32.

Таким чином, одним з варіантів здійснення винаходу є біспецифічне двовалентне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, що відрізняється тим, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 і SEQ ID NO: 28.

Таким чином, одним з варіантів здійснення винаходу є біспецифічне двовалентне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, що відрізняється тим, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 і SEQ ID NO: 24.

Таким чином, одним з варіантів здійснення винаходу є біспецифічне двовалентне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, що відрізняється тим, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 і SEQ ID NO: 32.

Іншим об'єктом винаходу є біспецифічне антитіло, запропонуване у винаході, що відрізняється тим, що містить

а) важкий ланцюг і легкий ланцюг першого повнорозмірного антитіла, яке специфічно

зв'язується з VEGF;

б) важкий ланцюг і легкий ланцюг другого повнорозмірного антитіла, яке специфічно зв'язується з ANG-2, в якому N-кінець важкого ланцюга з'єднаний з C-кінцем легкого ланцюга через пептидний лінкер.

5 Зазначений формат біспецифічного двовалентного антитіла в якості біспецифічного антитіла, що специфічно зв'язується з людським судинним ендотеліальним фактором росту (VEGF) і людським ангіопоетином-2 (ANG-2), описаний в WO 2011/117330, включаючи модифіковані за допомогою технології "knobs-into-holes" CH3-домени. Антитіла, основою яких є зазначений формат біспецифічного двовалентного антитіла, позначають як OAscFab.

10 В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне двовалентне антитіло відрізняється тим, що містить

а) в якості важкого ланцюга першого повнорозмірного антитіла амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 і в якості легкого ланцюга першого повнорозмірного антитіла амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35, і

15 б) в якості важкого ланцюга другого повнорозмірного антитіла, поєднаного з легким ланцюгом другого повнорозмірного антитіла через пептидний лінкер, амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34.

В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне двовалентне антитіло відрізняється тим, що містить

20 а) в якості важкого ланцюга першого повнорозмірного антитіла амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 36 і в якості легкого ланцюга першого повнорозмірного антитіла амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38, і

25 б) в якості важкого ланцюга другого повнорозмірного антитіла, поєднаного з легким ланцюгом другого повнорозмірного антитіла через пептидний лінкер, амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37.

В одному з варіантів здійснення винаходу варіабельний домен важкого ланцюга антитіла (VH) і варіабельний домен легкого ланцюга антитіла (VL) важкого та легкого ланцюга другого повнорозмірного антитіла стабілізують дисульфідом шляхом інтродукції дисульфідного зв'язку між наступними положеннями: становище 44 в варіабельному домені важкого ланцюга і положення 100 в варіабельному домені легкого ланцюга (нумерація у всіх випадках згідно EU-індексу Кебота (Kabat EA та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, п'ятий вид., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991). Зазначеною додатковою стабілізацією дисульфідом досягають шляхом інтродукції дисульфідного зв'язку між варіабельними доменами VH і VL важкого та легкого ланцюга другого повнорозмірного антитіла. Методики інтродукції дисульфідних містків для стабілізації, що не зустрічаються в природних умовах, описані, наприклад, у WO 94/029350, у Rajagopal V. та ін., Prot. Engin. 10, 1997, сс. 1453-1459; Kobayashi та ін., Nuclear Medicine & Biology 25, 1998, сс. 387-393 або Schmidt M. та ін., Oncogene 18, 1999, сс. 1711-1721.

40 Одним з варіантів здійснення винаходу є біспецифічне двовалентне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, що відрізняється тим, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 і SEQ ID NO: 35.

45 Одним з варіантів здійснення винаходу є біспецифічне двовалентне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, що відрізняється тим, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38.

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу CH3-домени біспецифічного двовалентного антитіла, запропонованого у винаході, змінюють за допомогою технології "knob-into-holes", яка описана детально за допомогою декількох прикладів, наприклад, у WO 50 96/027011, у Ridgway J.B. та ін., Protein Eng 9, 1996, сс. 617-621 і Merchant A.M. та ін., Nat Biotechnol 16, 1998, сс. 677-681. При здійсненні цього методу поверхні взаємодії двох CH3-домени змінюють з метою підвищення гетеродимеризації обох важких ланцюгів, що містять два зазначених CH3-домени. Кожен з двох CH3-домени (двох важких ланцюгів) може являти собою "виступ", а інший являти собою "западину". Інтродукція дисульфідного містка стабілізує гетеродимери (Merchant AM та ін., Nature Biotech 16, 1998, сс. 677-681; Atwell S. та ін., J. Mol. Biol. 270, 1997, сс. 26-35) і підвищує вихід.

В кращому об'єкті винаходу все біспецифічні антитіла, запропоновані у винаході, відрізняються тим, що

60 CH3-домен одного важкого ланцюга і CH3-домен іншого важкого ланцюга кожен вступає в контакт на поверхні розділу, яка представляє собою вихідну поверхню розділу між CH3-

доменами антитіла,

де зазначену поверхню змінюють так, щоб сприяти утворенню біспецифічного антитіла, де зміна відрізняється тим, що

а) змінюють СН3-домен одного важкого ланцюга,

так, що у вихідній поверхні розділу СН3-домену одного важкого ланцюга, яка контактує з вихідною поверхнею розділу СН3-домену іншого важкого ланцюга в біспецифічному антитілі,

амінокислотний залишок замінюють на амінокислотний залишок, який має більший обсяг бічного ланцюга, створюючи тим самим опуклість на поверхні розділу СН3-домену одного важкого ланцюга, що може поміщатися в порожнину в поверхні розділу СН3-домену іншого важкого ланцюга,

i

б) змінюють СН3-домен іншого важкого ланцюга,

так, що у вихідній поверхні розділу другого СН3-домена, яка контактує з вихідною поверхнею розділу першого СН3-домена в біспецифічному антитілі,

амінокислотний залишок замінюють на амінокислотний залишок, який має менший обсяг бічного ланцюга, створюючи тим самим порожнину в поверхні розділу другого СН3-домену, в яку може поміщатися опуклість на поверхні розділу першого СН3-домена.

Таким чином, антитіло, запропоноване у винаході, відрізняється тим, що

СН3-домен першого важкого ланцюга повнорозмірного антитіла, зазначеного в підпункті а), і СН3-домен другого важкого ланцюга повнорозмірного антитіла, зазначеного в підпункті б), кожен вступає в контакт на поверхні розділу, яка має зміну у вихідній поверхні розділу між СН3-доменами антитіла,

де I) в СН3-домени одного важкого ланцюга

амінокислотний залишок замінюють на амінокислотний залишок, який має більший обсяг бічного ланцюга, створюючи тим самим опуклість на поверхні розділу СН3-домену одного важкого ланцюга, що може поміщатися в порожнину в поверхні розділу СН3-домену іншого важкого ланцюга,

i де II) в СН3-домени другого важкого ланцюга

амінокислотний залишок замінюють на амінокислотний залишок, який має менший обсяг бічного ланцюга, створюючи тим самим порожнину в поверхні розділу другого СН3-домену, в яку може поміщатися опуклість на поверхні розділу першого СН3-домена.

Краще амінокислотний залишок, який має більший обсяг бічного ланцюга, вибирають з групи, що складається з аргініну (R), фенілаланіну (F), тирозину (Y), триптофану (W).

Краще амінокислотний залишок, який має менший обсяг бічного ланцюга, вибирають з групи, що складається з аланіну (A), серину (S), треоніну (T), валіну (V).

В одному з об'єктів винаходу обидва СН3-домени додатково змінюють шляхом інтродукції амінокислоти цистеїну (C) у відповідні положення кожного СН3-домена, так, щоб міг утворюватися дисульфідний місток між обома СН3-доменами.

В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне антитіло містить мутацію Т366W в СН3-домени "ланцюга з виступами" і мутації Т366S, L368A, Y407V в СН3-домени "ланцюга з западиною". Можна застосовувати також додатковий міжланцюговий дисульфідний місток між СН3-доменами (Merchant A.M та ін., Nature Biotech 16, 1998, сс. 677-681), наприклад, шляхом інтродукції мутації Y349C в СН3-домен "ланцюга з виступами" і мутації E356C або мутації S354C в СН3-домен "ланцюга з западиною".

В іншому варіанті здійснення винаходу біспецифічне антитіло містить мутації Y349C, T366W в одному з двох СН3-домени і мутації E356C, T366S, L368A, Y407V у другому з двох СН3-домени. В іншому кращому варіанті здійснення винаходу біспецифічне антитіло містить мутації Y349C, T366W в одному з двох СН3-домени і мутації S354C, T366S, L368A, Y407V у другому з двох СН3-домени (додаткова мутація Y349C в одному з СН3-домени і додаткова мутація E356C або S354C в іншому СН3-домени призводить до утворення міжланцюгового дисульфідного містка) (нумерація у всіх випадках згідно EU-індексу Кебота (Kabat та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, п'ятий вид., вид-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)). В альтернативному або додатковому варіанті можна застосовувати також інші варіанти технології "knobs-in-holes", представлені в EP 1870459 A1. Так, іншим прикладом мутацій для біспецифічного антитіла є мутації R409D; K370E в СН3-домени "ланцюга з виступами" і мутації D399K; E357K в СН3-домени "ланцюга з западиною" (нумерація у всіх випадках згідно EU-індексу Кебота (Kabat та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е вид., вид-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)).

В іншому варіанті здійснення винаходу біспецифічне антитіло містить мутацію Т366W в СН3-

домені "ланцюга з виступами" і мутації T366S, L368A, Y407V в CH3-домені "ланцюга з западиною" і додатково мутації R409D; K370E в CH3-домені "ланцюга з виступами" і мутації D399K; E357K в CH3-домені "ланцюга з западиною".

В іншому варіанті здійснення винаходу біспецифічне антитіло містить мутації Y349C, T366W в одному з двох CH3-доменів і мутації S354C, T366S, L368A, Y407V у другому з двох CH3-доменів або зазначене трьохвалентне біспецифічне антитіло містить мутації Y349C, T366W в одному з двох CH3-доменів і мутації S354C, T366S, L368A, Y407V у другому з двох CH3-доменів і додатково мутації R409D; K370E в CH3-домені "ланцюга з виступами" і мутації D399K; E357K в CH3-домені "ланцюга з западиною".

В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне антитіло, запропоноване у винаході, відрізняється наявністю одного або декількох наступних властивостей (для визначення яких застосовують аналізи, описані в прикладі 6)

- характеризується більш низькою концентрацією в сироватці порівняно з відповідним біспецифічним антитілом без мутацій, зазначених у підпункті III) (через 96 годин після введення в склоподібне тіло у мишей, які мають дефіцит мишачого FcRn, але являються гемізиготними трансгенними за людським FcRn);

- характеризується подібною (фактор 0,8-1,2) концентрацією в лізатах всього правого ока порівняно з відповідним біспецифічним антитілом без мутацій, зазначених у підпункті III) (у мишей, які мають дефіцит мишачого FcRn, але є гемізиготними трансгенними за людським FcRn, через 96 годин після введення в склоподібне тіло правого ока).

В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне двухвалентне антитіло відрізняється тим, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, що відрізняються тим, що

I) зазначений перший антигензв'язуючий центр містить в якості варіабельного домену важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO: 7 і в якості варіабельного домену легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO: 8; і

II) зазначений другий антигензв'язуючий центр містить в якості варіабельного домену важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO: 15 і в якості варіабельного домену легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO: 16, і

III) біспецифічне антитіло містить константну ділянку важкого ланцюга підкласу IgG1 або IgG4 (виведену з людського антитіла) і містить мутації I253A, H310A і H435A (нумерація згідно EU-індексу Кебота), і

відрізняється наявністю одного або декількох наступних властивостей (для визначення яких застосовують аналізи, описані в прикладі 6)

- характеризується більш низькою концентрацією в сироватці порівняно з відповідним біспецифічним антитілом без мутацій, зазначених у підпункті III) (через 96 годин після інтравітреального введення мишам, які мають дефіцит мишачого FcRn, але є гемізиготними трансгенними за людським FcRn);

- характеризується подібною (відрізняються в 0,8-1,2 рази) концентрацією в лізатах всього правого ока порівняно з відповідним біспецифічним антитілом без мутацій, зазначених у підпункті III) (у мишей, які мають дефіцит мишачого FcRn, але є гемізиготними трансгенними за людським FcRn, через 96 годин після інтравітреального введення в праве око).

В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне двовалентне антитіло відрізняється тим, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, що відрізняються тим, що

I) зазначений перший антигензв'язуючий центр містить в якості варіабельного домену важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO: 7 з 1, 2 або 3 амінокислотними замінами і в якості варіабельного домену легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO: 8 з 1, 2 або 3 амінокислотними замінами; і

II) зазначений другий антигензв'язуючий центр містить в якості варіабельного домену важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO: 15 з 1, 2 або 3 амінокислотними замінами і в якості варіабельного домену легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO: 16 з 1, 2 або 3 амінокислотними замінами, і

III) біспецифічне антитіло містить константну ділянку важкого ланцюга підкласу IgG1 або IgG4 (виведену з людського антитіла) і містить мутації I253A, H310A і H435A (нумерація згідно EU-індексу Кебота), і

відрізняється наявністю одного або декількох наступних властивостей (для визначення яких застосовують аналізи, описані в прикладі 6)

- характеризується більш низькою концентрацією в сироватці порівняно з відповідним біспецифічним антитілом без мутацій, зазначених у підпункті III) (через 96 годин після інтравітреального введення мишам, які мають дефіцит мишачого FcRn, але є гемізиготними трансгенними за людським FcRn);

5 - характеризується подібною (відрізняються в 0,8-1,2 рази) концентрацією в лізатах всього правого ока порівняно з відповідним біспецифічним антитілом без мутацій, зазначених у підпункті III) (у мишей, які мають дефіцит мишачого FcRn, але є гемізиготними трансгенними по людському FcRn, через 96 годин після інтравітреального введення в праве око).

10 У контексті даного опису поняття "антитіло" належить до зв'язуючого білку, який містить антигензв'язуючі центри (сайти). Поняття "зв'язуючий сайт" або "антигензв'язуючий центр" в контексті даного опису означає область (і) молекули антитіла, в якій (ими) фактично пов'язується ліганд. "Антигензв'язуючий центр" містить варіабельні домени важкого ланцюга антитіла (VH) і варіабельні домени легкого ланцюга антитіла (VL) (пара VH/VL).

15 Поняття "специфічність антитіла" належить до виборчого розпізнавання антитілом конкретного епітопу антигену. Антитіла, що зустрічаються в природних умовах, є, наприклад, моноспецифічними.

20 Згідно винаходу "біспецифічні антитіла" представляють собою антитіла, які мають дві різні антигензв'язуючі специфічності. Антитіла, пропонувані в даному винаході, є специфічними відносно двох різних антигенів, VEGF в якості першого антигену і ANG-2 в якості другого антигену.

У контексті даного опису поняття "моноспецифічне" антитіло означає антитіло, яке має один або декілька зв'язуючих сайтів, кожен з яких зв'язується з одним і тим же епітопом одного і того ж антигену.

25 У контексті даного опису поняття "валентний" означає присутність конкретної кількості зв'язуючих сайтів в молекулі антитіла. Так, поняття "двовалентний", "чотирихвалентний" і "шестивалентний" означає присутність двох зв'язуючих сайтів, чотирьох зв'язуючих сайтів і шести зв'язуючих сайтів відповідно в молекулі антитіла. Біспецифічні антитіла, запропоновані у винаході, краще є "двовалентними".

30 У контексті даного опису поняття "VEGF" належить до людського судинного ендотеліального фактора росту (VEGF/VEGF-A), тобто такому, що складається з 165 амінокислот, фактору росту людських ендотеліальних клітин судин (амінокислоти 27-191 послідовності-попередника людського VEGF165: SEQ ID NO: 17; амінокислоти 1-26 позначають сигнальний пептид), і до споріднених ізоформ 121, 189 і 206 фактора росту ендотеліальних клітин судин, які описані у Leung D.W. та ін., Science 246, 1989, сс. 1306-1309; Houck та ін., Mol. Endocrin. 5, 1991, сс. 1806-1814; Kerk P.J. та ін., Science 246, 1989, сс. 1309-1312 і Connolly D.T. та ін., J. Biol. Chem. 264, 1989, сс. 20017-20024; а також до таких, що зустрічаються в природних умовах алельних і процесованих форм зазначених факторів росту. VEGF бере участь у регуляції нормального і аномального ангиогенезу і неоваскуляризації, асоційованої з пухлинами та внутрішньочеревними хворобами (Ferrara N. та ін., Endocr. Rev. 18, 1997, сс. 4-25; Berkman R.A. та ін., J. Clin. Invest. 91, 1993, сс. 153-159; Brown L.F. та ін., Human Pathol. 26, 1995, сс. 86-91; Brown L.F. та ін., Cancer Res. 53, 1993, сс. 4727-4735; Mattern J. та ін., Brit. J. Cancer. 73, 1996, сс. 931-934 і Dvorak H.F. та ін., Am. J. Pathol. 146, 1995, сс. 1029-1039). VEGF являє собою гомодимерний глікопротеїн, який був виділений з декількох джерел і включає кілька ізоформ. Для VEGF характерна висока специфічна мітогенна активність щодо ендотеліальних клітин.

45 У контексті даного опису поняття "ANG-2" належить до людського ангиопоетину-2 (ANG-2) (який скороченого позначають як ANGPT2 або ANG2) (SEQ ID NO: 18), який описаний, наприклад, у Maisonpierre P.C. та ін., Science 277, 1997, сс. 55-60 і Cheung A.H. та ін., Genomics 48, 1998, сс. 389-391. Ангиопоетини-1 (SEQ ID NO: 19) і -2 описані в якості лігандів Tie, сімейства тирозинкіназ, які вибірково експресуються в судинному ендотелії (Yancopoulos G.D. та ін., Nature 407, 2000, 242-248). В даний час відомо чотири певних представника сімейства ангиопоетину. Ангиопоетин-3 і -4 (Ang-3 і Ang-4) можуть являти собою відмінні широким розмаїттям копії одного і того ж генного локусу у мишей і людини (Kim I. та ін., FEBS Lett. 443, 1999, сс. 353-356; Kim I. та ін., J. Biol. Chem. 274, 1999, сс. 26523-26528). ANG-1 і ANG-2 вперше ідентифіковані в експериментах, проведених на культурах тканини, в якості агоніста і антагоніста відповідно (див. стосовно ANG-1: Davis S. та ін., Cell 87, 1996, сс. 1161-1169; і стосовно ANG-2: Maisonpierre P.C. та ін., Science 277, 1997, сс. 55-60). Всі відомі ангиопоетини зв'язуються, насамперед, з Tie2 (SEQ ID NO: 20), а афінність зв'язування обох Ang-1 і -2 з Tie2 становить 3nM (Kd) (Maisonpierre P.C. та ін., Science 277, 1997, сс. 55-60).

60 Анतिгензв'язуючі центри біспецифічного антитіла, запропонованого у винаході, містять шість гіперваріабельних ділянок (CDR), які обумовлюють різні рівні афінності зв'язуючого антигену



центру. Присутні три CDR в варіабельному домені важкого ланцюга (CDRH1, CDRH2 і CDRH3) і три CDR в варіабельному домені легкого ланцюга (CDRL1, CDRL2 і CDRL3). Протяжність CDR і каркасних ділянок (FR) визначають шляхом порівняння з компільованою базою даних амінокислотних послідовностей, в яких ці області визначені на основі варіабельності між послідовностями.

Антитіла, запропоновані у винаході, містять константні області імуноглобулінів, одержані з людських імуноглобулінів одного або декількох класів, де зазначені класи імуноглобулінів включають класи IgG, IgM, IgA, IgD і IgE і у випадку IgG і IgA їх підкласи, насамперед IgG1 і IgG4.

У контексті даного описі поняття "моноклональне антитіло" або "композиція моноклонального антитіла" належать до препарату молекул антитіл з однаковим амінокислотним складом.

Поняття "химерне антитіло" належить до антитіла, що містить варіабельну ділянку, тобто зв'язуючу ділянку, з одного джерела або виду і щонайменше частину константної області, виведену з іншого джерела або виду, як правило, отриманому за допомогою методів рекомбінантної ДНК. Кращими є химерні антитіла, що містять мишачу варіабельну ділянку і людську константну ділянку. Іншими кращими формами "химерних антитіл", що підпадають під обсяг винаходу, є антитіла, константна ділянка яких модифікована або змінена в порівнянні з вихідним антитілом для створення властивостей, запропонованих у винаході, насамперед які стосуються C1q-зв'язування і/або зв'язування Fc-рецептора (FcR). Зазначені химерні антитіла позначають також як "антитіла перемикання класу". Химерні антитіла є продуктом експресованих генів імуноглобулінів, що містять ДНК-сегменти, які кодують варіабельні ділянки імуноглобуліну, і ДНК-сегменти, які кодують константні ділянки імуноглобуліну. Методи створення химерних антитіл включають загальноприйняті методи рекомбінантної ДНК і генної трансфекції, які добре відомі в цій галузі (див., наприклад, Morrison S.L. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, сс. 6851-6855; US 5202238 і US 5204244).

Поняття "гуманізоване антитіло" належить до антитіл, в яких каркасна ділянка або гіперваріабельні ділянки ("такі, що визначають компліментарність ділянки" (CDR)) модифіковані так, що містять CDR імуноглобуліну іншої специфічності відносно батьківського імуноглобуліну. У кращому варіанті здійснення винаходу мишачий CDR трансплантують в каркасну ділянку людського антитіла для одержання "гуманізованого антитіла" (див., наприклад, Riechmann L. та ін., Nature 332, 1988, сс. 323-327 і Neuberger M.S. та ін., Nature 314, 1985, сс. 268-270). Найбільш кращі CDR відповідають ділянкам, які представлені послідовностями, що розпізнають антигени, зазначеним вище для химерних антитіл. Іншими формами "гуманізованих антитіл", що підпадають під обсяг винаходу, є антитіла, константна ділянка яких додатково модифікована або змінена в порівнянні з вихідним антитілом для створення властивостей, запропонованих у винаході, насамперед які стосуються C1q-зв'язування і/або зв'язування Fc-рецептора (FcR).

У контексті даного опису мається на увазі, що поняття "людське антитіло" належить до антитіл, які мають варіабельні і константні ділянки, виведені з послідовностей імуноглобулінів людської зародкової лінії. Людські антитіла добре відомі в даній області (van Dijk M.A. і van de Winkel J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 2001, сс. 368-374). Людські антитіла можна одержувати також у трансгенних тваринах (наприклад, мишах), які можуть після імунізації продукувати весь спектр людських антитіл або відібрані людські антитіла у відсутності ендogenous виробництва імуноглобулінів. Перенесення масиву генів імуноглобулінів людської зародків лінії в таких несучих мутант зародковій лінії мишей може призводити до виробництва людських антитіл після контрольного зараження антигеном (див., наприклад, Jakobovits A. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 2551-2555; Jakobovits A. та ін., Nature 362, 1993, сс. 255-258; Brueggemann M. та ін., Year Immunol. 7, 1993, сс. 33-40). Людські антитіла можна одержувати також у фагових дисплейних бібліотеках (Hoogenboom H.R. і Winter G., J. Mol. Biol. 227, 1992, сс. 381-388; Marks J.D. та ін., J. Mol. Biol. 222, 1991, сс. 581-597). Для одержання людських моноклональних антитіл можна застосовувати також методики, розроблені Cole A. зі співавторами і Boerner P. зі співавторами (Cole A. та ін., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, вид-во Liss A.L., 1985, с. 77 і Boerner P. та ін., J. Immunol. 147, 1991, сс. 86-95). Як уже вказувалося для химерних і гуманізованих антитіл, запропонованих у винаході, в контексті даного опису поняття "людське антитіло" належить також до антитіл, константна ділянка яких модифікована для створення властивостей, запропонованих у винаході, насамперед які стосуються C1q-зв'язування і/або зв'язування Fc-рецептора (FcR), наприклад, шляхом "перемикання класу", тобто зміни або мутації Fc-ділянок (наприклад, з IgG1 на IgG4 і/або мутація IgG1/IgG4).

У контексті даного опису мається на увазі, що поняття "рекомбінантне антитіло" включає всі людські антитіла, які одержані, експресувати, створені або виділені методами рекомбінації, наприклад, антитіла, виділені з клітини-хазяїна, такий як NS0- або CHO-клітина або з

тваринного (наприклад, миші), трансгенного по генам людського імуноглобуліну, або антитіла, експресовані за допомогою рекомбінантного експресійного вектора, яким трансфектована клітина-хазяїн. Зазначені рекомбінантні антитіла мають варіабельні і константні ділянки в перетвореній формі. Рекомбінантні антитіла, запропоновані у винаході, піддавалися соматичній гіпермутації *in vivo*. Так, амінокислотні послідовності VH- і VL-областей рекомбінантних антитіл являють собою послідовності, які хоча виведені і споріднені послідовностям VH і VL людській зародковій лінії, можуть не існувати в природних умовах в популяції антитіл людської зародкової лінії *in vivo*.

У контексті даного опису "варіабельний домен" (варіабельний домен легкого ланцюга (VL), варіабельний домен важкого ланцюга (VH)) позначає кожну з пари з легких і важких ланцюгів, які безпосередньо беруть участь у зв'язуванні антитіла з антигеном. Домени варіабельних людських легких і важких ланцюгів мають однакову загальну структуру, і кожен домен містить чотири каркасні ділянки (FR), послідовності яких мають виражений консерватизм, з'єднані трьома "гіперваріабельними ділянками" (або такими, що визначають комплементарність ділянками, CDR). Каркасні ділянки адаптовані до  $\beta$ -складчастої конформації, а CDR можуть утворювати петлі, що з'єднують  $\beta$ -складчасту структуру. CDR в кожному ланцюзі зберігають свою тривимірну структуру за допомогою каркасних ділянок і утворюють разом з CDR з іншого ланцюга антигензв'язуючий центр. CDR3- ділянки важкого і легкого ланцюга антитіла відіграють найбільш важливу роль в специфічності/афінності зв'язування антитіл, запропонованих у винаході, і тому є додатковим об'єктом винаходу.

У контексті даного опису поняття "гіперваріабельна ділянка" або "антигензв'язуюча ділянка антитіла" належить до амінокислотних залишків, які відповідальні за зв'язування антигену. Гіперваріабельна ділянка містить амінокислотні залишки з "визначальних комплементарність ділянок" або "CDR". "Каркасні ділянки" або "FR"-ділянки являють собою ділянки варіабельного домену, відмінні від залишків гіперваріабельних ділянок, зазначених у цьому описі. Таким чином, легкі і важкі ланцюги антитіла містять в напрямку від N- до C-кінця домени FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4. CDR на кожному ланцюзі розділені зазначеними амінокислотами каркасної ділянки. CDR3 важкого ланцюга являє собою ділянку, яка вносить основний вклад в зв'язування антигену. CDR- і FR-ділянки визначають згідно стандартному визначенню Kabat EA та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е вид., вид-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

У контексті даного опису поняття "зв'язування" або "специфічне зв'язування" належить до зв'язування антитіла з епітопом антигену (або людського VEGF, або людського ANG-2), встановленому в аналізі *in vitro*, краще аналізі на основі поверхневого плазмонного резонансу (BIAcore, фірма GE-Healthcare Упсалла, Швеція), з очищеним антигеном дикого типу. Афінність зв'язування оцінюють в поняттях  $K_a$  (константа швидкості асоціації антитіла/антигену в комплекс),  $K_D$  (константа дисоціації) і  $K_D$  ( $K_D/K_a$ ). В одному з варіантів здійснення винаходу зв'язування або специфічне зв'язування характеризується афінністю зв'язування ( $K_D$ ), що становить  $10^{-8}$  моля/л або менше, в одному з варіантів здійснення від  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  моля/л.

Поняття "епітоп" належить до будь-якої поліпептидної детермінанти, що має здатність специфічно зв'язуватися з антитілом. У деяких варіантах здійснення винаходу епітопна детермінанта хімічно включає активні розташовані на поверхні групи молекул, таких як амінокислоти, бічні ланцюги амінокислот, фосфоріл або сульфоніл, і в деяких варіантах здійснення винаходу, може мати специфічні характеристики тривимірної структури і/або специфічні характеристики заряду. Епітоп являє собою ділянку антигену, яка зв'язується з антитілом.

У деяких варіантах здійснення винаходу вважається, що антитіло специфічно зв'язується з антигеном, коли воно вибірково розпізнає свій антиген-мішень у складній суміші білків і/або макромолекул.

Поняття "повнорозмірне антитіло" належить до антитіла, що складається з двох "важких ланцюгів повнорозмірного антитіла" і двох "легких ланцюгів повнорозмірного антитіла". "Важкий ланцюг повнорозмірного антитіла" являє собою поліпептид, що містить в напрямку від N-кінця до C-кінця важкого ланцюга антитіла варіабельний домен (VH), домен 1 константної ділянки важкого ланцюга антитіла (CH1), шарнірну ділянку антитіла (HR), домен 2 константної ділянки важкого ланцюга антитіла (CH2) і домен 3 константної ділянки важкого ланцюга антитіла (CH3), що скорочено позначають як VH-CH1-HR-CH2-CH3; і необов'язково домен 4 константної ділянки важкого ланцюга антитіла (CH4) у разі антитіла підкласу IgE. Краще "важкий ланцюг повнорозмірного антитіла" являє собою поліпептид, що містить в напрямку від N-кінця до C-кінця VH, CH1, HR, CH2 і CH3. "Легкий ланцюг повнорозмірного антитіла" являє собою поліпептид, що містить в напрямку від N-кінця до C-кінця легкого ланцюга антитіла

варіабельний домен легкого ланцюга антитіла (VL) і константний домен легкого ланцюга антитіла (CL), що скорочено позначають як VL-CL. Константний домен легкого ланцюга антитіла (CL) може бути  $\kappa$ -(каппа) або  $\lambda$ -(лямбда) типу. Два ланцюги повнорозмірного антитіла пов'язані один з одним через межполіпептидні дисульфідні зв'язки між CL-доменом і CH1-доменом і між шарнірними областями важких ланцюгів повнорозмірного антитіла. Прикладами типових повнорозмірних антитіл є такі, що зустрічаються в природних умовах антитіла типу IgG (наприклад, IgG1 і IgG2), IgM, IgA, IgD і IgE. Повнорозмірні антитіла, запропоновані у винаході, можуть мати походження з одного виду, наприклад, людини, або вони можуть являти собою химерні або гуманізовані антитіла. Повнорозмірні антитіла, запропоновані у винаході, містять два антигензв'язуючих центри, кожний утворено парю VH і VL, які обидва специфічно зв'язуються з одним і тим же антигеном. Під С-кінцем важкого або легкого ланцюга зазначеного повнорозмірного антитіла розуміють останню амінокислоту на С-кінці зазначеного важкого або легкого ланцюга. Під N-кінцем важкої або легкого ланцюга зазначеного повнорозмірного антитіла розуміють останню амінокислоту на N-кінці зазначеного важкого або легкого ланцюга.

У контексті винаходу під "пептидним лінкером" розуміють пептид, що містить амінокислотні послідовності, який краще має синтетичне походження. Зазначені пептиди, запропоновані у винаході, застосовують для з'єднання С-кінця легкого ланцюга з N-кінцем важкого ланцюга другого повнорозмірного антитіла (яке специфічно зв'язується з другим антигеном) через пептидний лінкер. Пептидний лінкер в важкому і легкому ланцюзі другого повнорозмірного антитіла являє собою пептид, амінокислотна послідовність якого складається щонайменше з 30 амінокислот, краще з 32-50 амінокислот. В одному з варіантів здійснення винаходу пептидний лінкер являє собою пептид, амінокислотна послідовність якого складається з 32-40 амінокислот. В одному з варіантів здійснення винаходу вказаний пептидний лінкер являє собою  $(GxS)_n$ , де G=гліцин, S=серин, ( $x=3$ ,  $n=8$ , 9 або 10 і  $m=0$ , 1, 2 або 3) або ( $x=4$  і  $n=6$ , 7 або 8 і  $m=0$ , 1, 2 або 3), краще  $x=4$ ,  $n=6$  або 7, і  $m=0$ , 1, 2 або 3, більш краще  $x=4$ ,  $n=7$  і  $m=2$ . В одному з варіантів здійснення винаходу вказаний лінкер являє собою  $(G_4S)_6G_2$ .

У контексті даного опису поняття "константна ділянка" означає суму доменів антитіла, відмінних від варіабельної ділянки. Константна ділянка не бере участі безпосередньо у зв'язуванні антигену, але забезпечує різні ефекторні функції. Залежно від амінокислотної послідовності константної області їх важких ланцюгів антитіла поділяють на класи: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, а деякі з них можна додатково поділяти на підкласи, такі як IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4, IgA1 і IgA2. Константні ділянки важкого ланцюга, які відповідають різним класам імуноглобуліну, позначають як  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  і  $\mu$  відповідно. Константні ділянки легкого ланцюга антитіла, які можуть бути присутніми у всіх п'яти класах антитіл, позначають як каппа ( $\kappa$ ) і лямбда ( $\lambda$ ).

У контексті даного опису поняття "константна ділянка, виведена з людського джерела" або "людська константна ділянка" означають константну ділянку важкого ланцюга людського антитіла підкласу IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 і/або константну ділянку легкого каппа- або лямбда-ланцюга. Зазначені константні ділянки добре відомі в даній області і описані, наприклад, у Kabat E.A. та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е вид., вид-во, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 (див., наприклад, також Johnson G. і Wu T.T., Nucleic Acids Res. 28, 2000, сс. 214-218; Kabat E.A. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1975, сс. 2785-2788). У контексті даного опису для нумерації положень і мутацій застосовують систему нумерації EU (EU-індекс) згідно Kabat E.A. та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е вид., вид-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 і позначають як "нумерація відповідно до EU-індексу Кебота".

В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічні антитіла, запропоновані у винаході, мають константну ділянку людського підкласу IgG1 (виведену з людського підкласу IgG1).

В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічні антитіла, запропоновані у винаході, мають константну ділянку людського підкласу IgG4 (виведену з людського підкласу IgG4).

В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне антитіло, запропоноване у винаході, являє собою людське антитіло підкласу IgG1 з мутаціями L234A (Leu235Ala), L235A (Leu234Ala) і P329G (Pro329Gly). Зазначене антитіло має знижену здатність зв'язуватися з FcR (насамперед вони більше не можуть зв'язуватися з FcR $\alpha$ , FcR $\beta$  і FcR $\gamma$ ). Це, насамперед, цінно для зниження потенційних побічних дій типу, наприклад, тромбозу (Meyer T. та ін., J. Thromb. Haemost. 7, 2009, сс. 171-181). В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне антитіло, запропоноване у винаході, являє собою людське антитіло підкласу IgG4 з мутаціями S228P (Ser228Pro), L235E (Leu235Glu) і P329G (Pro329Gly). Зазначене антитіло має знижену описану вище здатність зв'язуватися з FcR. Хоча вже описана раніше мутація Pro329Ala видаляє тільки дві третини взаємодії при оцінці з використанням Fc $\gamma$ 3-сендвіча, Pro329Gly в антитілах, запропонованих у винаході, повністю порушує зв'язування Fc-ділянки з

FcгаммаRIII. Це є особливо цінним, оскільки зв'язування з FcгаммаRIII бере участь у ADCC (антитіло-обумовлена клітинозалежна цитотоксичність), яка призводить до загибелі клітин, що може бути корисним при лікуванні ракових захворювань, але може викликати серйозні побічні дії при лікуванні з використанням антитіл інших судинних або імунологічних захворювань. Тому

5 пропонувані у винаході антитіла IgG1-підкласу з мутаціями L234A, L235A і P329G і IgG4-підкласу з мутаціями S228P, L235E і P329G є найбільш цінними, оскільки вони обидва більше не можуть зв'язуватися з FcRгаммаI, FcRгаммаII і FcRгаммаIII.

У контексті даного опису поняття "з AAA-мутаціями" належить до мутацій I253A (Ile253Ala), H310A (His310Ala) і H435A (His435Ala) в константній ділянці важкого ланцюга IgG1 або IgG4, де

10 нумерація відповідає EU-індексу Кебота.

У контексті даного опису поняття "з P329G LALA-мутаціями" належить до мутацій L234A (Leu235Ala), L235A (Leu234Ala) і P329G (Pro329Gly) в константній ділянці важкого ланцюга IgG1-підкласу, де нумерація відповідає EU-індексу Кебота. У контексті даного опису поняття "з SPLE-мутаціями" належить до мутацій S228P (Ser228Pro) і L235E (Leu235Glu) в константній ділянці

15 важкого ланцюга IgG4-підкласу, де нумерація відповідає EU-індексу Кебота. У контексті даного опису поняття "з SPLE і P329G-мутаціями" належить до мутацій S228P (Ser228Pro), L235E (Leu235Glu) і P329G (Pro329Gly) в константній ділянці важкого ланцюга IgG4-підкласу, де нумерація відповідає EU-індексу Кебота.

Антитіло, запропоноване у винаході, отримують за допомогою методів рекомбінації. Так, одним з об'єктів винаходу є нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло, запропоноване у винаході, а іншим об'єктом винаходу є клітина, яка містить зазначену нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло, запропоноване у винаході. Методи рекомбінантного одержання широко відомі в даній області і полягають в тому, що експресують білок в прокаріотичних і еукаріотичних клітинах з подальшим виділенням антитіла і, як правило, очищенням до фармацевтично прийнятної

25 чистоти. Для експресії антитіл у вищевказаних клітинах-хазяїнах нуклеїнову кислоту, що кодує відповідні модифіковані легкі і важкі ланцюги, вбудовують в експресійні вектори за допомогою стандартних методів. Експресію здійснюють у придатних прокаріотичних і еукаріотичних клітинах-хазяїнах типу CHO-клітин, NS0-клітин, SP2/0-клітин, HEK293-клітин, COS-клітин, PER.C6-клітин, дріжджів або клітин E.coli, і антитіло виділяють з клітин (з супернатанта або

30 клітин після лізису). Загальні методи рекомбінантного одержання антитіл добре відомі в даній області і описані, наприклад, в оглядових статтях Makrides S.C., Protein Expr. Purif. 17, 1999, сс. 183-202; Geisse S. та ін., Protein Expr. Purif. 8, 1996, сс. 271-282; Kaufman R.J., Mol. Biotechnol. 16, 2000, сс. 151-160; Werner R.G., Drug Res. 48, 1998, сс. 870-880.

Таким чином, одним з варіантів здійснення винаходу є спосіб отримання біспецифічного антитіла, запропонованого у винаході, що полягає в тому, що здійснюють стадії, на яких

35 а) трансформують клітину-хазяїна векторами, що містять молекули нуклеїнових кислот, які кодують вказане антитіло;

б) культивують клітину-хазяїна в умовах, що забезпечують синтез зазначеної молекули антитіла; і

40 в) виділяють зазначену молекулу антитіла із зазначеної культури.

В одному з варіантів здійснення винаходу стадія виділення, зазначена у підпункті в), включає застосування специфічного "захоплюючого" реагенту для константної ділянки легкого ланцюга (який, наприклад, є специфічним для константної ділянки легкого каппа- або лямбда-ланцюга, залежно від того, легкий каппа- або лямбда ланцюг застосовується в біспецифічному

45 антитілі, запропонованому у винаході). В одному з варіантів здійснення винаходу вказаний специфічно "захоплюючий" легкий ланцюг реагент застосовують в режимі зв'язування-і-елюції). Прикладами зазначених специфічних для константної ділянки легкого ланцюга "захоплюючих" реагентів є, наприклад, KappaSelect™ і LambdaFabSelect™ фірми GE Healthcare/BAC, основою яких є дуже жорсткий матрикс на основі агарози, який забезпечує високі швидкості потоку і низький зворотний тиск при великомасштабному аналізі. Їх особливістю є ліганд, який зв'язується з константною областю легкого каппа- або лямбда-ланцюга відповідно (тобто фрагменти, позбавлені константної ділянки легкого ланцюга не зв'язуються; фіг. 1). Таким чином, обидва реагенти мають здатність зв'язуватися з іншими молекулами-мішенями, які містять константну ділянку легкого ланцюга, наприклад, IgG, IgA і IgM. Ліганди приєднують до

55 матриксу через плече довгого гідрофільного спейсера, що робить їх легко доступними для зв'язування з молекулою-мішенню. Вони знаходяться на одноланцюговому фрагменті антитіла, який піддають скринінгу щодо каппа- або лямбда-ланцюга людського Ig.

Біспецифічні антитіла можна відокремлювати від культурального середовища за допомогою загальноприйнятих процедур очищення імуноглобулінів, таких, наприклад, як хроматографія на білок А-сефарозі, хроматографія на гідроксилапатиті, гель-електрофорез, діаліз або афінна

60

хроматографія. ДНК і РНК, що кодують моноклональні антитіла, легко виділяти і секвенувати за допомогою загальноприйнятих процедур. Клітини гібридами можуть слугувати в якості джерела таких ДНК і РНК. Після виділення ДНК можна вбудовувати в експресійні вектори, якими потім трансфектують клітини-хазяї, такі як НЕК 293-клітини, СНО-клітини або клітини мієломи, які в іншому випадку не можуть продукувати білок імуноглобуліну, з одержанням в результаті синтезу рекомбінантних моноклональних антитіл в клітинах-хазяїнах.

Варіанти (або мутанти) амінокислотної послідовності біспецифічного антитіла отримують шляхом інтродукції відповідних нуклеотидних замін в ДНК антитіла або шляхом синтезу нуклеотидів. Однак зазначені модифікації можна здійснювати тільки в дуже обмеженому діапазоні. Наприклад, модифікації не повинні змінювати зазначені вище характеристики антитіла, такі як IgG-підклас і зв'язування антигену, але можуть підвищувати вихід рекомбінантного виробництва, стабільність білка або полегшувати очистку.

У контексті даного опису поняття "клітина-хазяїн" означає будь-який тип клітинної системи, який можна створювати для одержання антитіл, запропонованих в цьому винаході. В одному з варіантів здійснення винаходу в якості клітин-хазяїнів застосовують НЕК293-клітини і СНО-клітини.

У контексті даного опису поняття "клітина", "клітинна лінія" і "клітинна культура" використовуються взаємозамінно, і вони всі включають потомство зазначених клітин. Так, поняття "трансформанти" і "трансформовані клітини" включають первинно трансформовану клітину і виведені з неї культури безвідносно до кількості пересівань. Слід розуміти також, що потомство може не бути повністю ідентичним за складом ДНК через довільних або навмисних мутацій. Під обсяг винаходу підпадає варіант потомства, який має таку ж функцію або біологічну активність, яка виявлена в результаті скринінгу або відібрана у вихідній трансформованій клітині.

Експресія в NS0-клітинах описана, наприклад, у Barnes LM та ін., Cytotechnology 32, 2000, сс. 109-123; Barnes L.M. та ін., Biotech. Bioeng. 73, 2001, сс. 261-270. Короткочасна експресія описана, наприклад, у Durocher Y. та ін., Nucl. Acids. Res. 30, 2002, E9. Клонування варіабельних доменів описано у Orlandi R. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1989, сс. 3833-3837; Carter P. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1992, сс. 4285-4289 і у Norderhaug L. та ін., J. Immunol. Methods 204, 1997, сс. 77-87. Бажана система короткочасної експресії (НЕК 293) описана у Schlaeger E.-J. і Christensen K., Cytotechnology 30, 1999, сс. 71-83 і у Schlaeger E.-J., J. Immunol. Methods 194, 1996, сс. 191-199.

Контролюючі послідовності, які можна застосовувати для прокаріотів, включають, наприклад, промотор, необов'язково послідовність оператора і сайт зв'язування рибосом. Відомо, що еукаріотичні клітини використовують промотори, енхансери і сигнали поліаденілювання.

Нуклеїнова кислота є "функціонально пов'язаною", коли вона знаходиться у функціональному взаємозв'язку з іншою нуклеїновою кислотою. Наприклад, ДНК передпослідовності або секреторного лідера функціонально пов'язана з ДНК поліпептиду, якщо вона експресується у вигляді передбілку, який бере участь у секреції поліпептиду; промотор або енхансер функціонально пов'язаний з кодуючою послідовністю, якщо він впливає на транскрипцію послідовності; або сайт зв'язування рибосом функціонально пов'язаний з кодуючою послідовністю, якщо він розташований так, щоб полегшувати трансляцію. Як правило, "функціонально пов'язані" означає, що послідовності ДНК, що підлягають скріпленню, є суміжними, а в випадку секреторного лідера, суміжними і перебувати в рамці зчитування. Однак не є обов'язковим, щоб енхансери були суміжними. Зв'язування здійснюють шляхом лігування в прийнятних сайтах рестрикції. Якщо зазначені сайти не існують, то згідно з прийнятою практикою використовують синтетичні олігонуклеотидні адаптори або лінкери.

Очистку антитіл здійснюють для того, щоб елімінувати клітинні компоненти або інші забруднювачі, наприклад, інші клітинні нуклеїнові кислоти або білки, з використанням стандартних методик, включаючи обробку лугом/ДСН, CsCl- бендінг, хроматографію на колонках, електрофорез в агарозному гелі й інші методи, добре відомі в цій галузі (див. в Current Protocols in Molecular Biology, під ред. Ausubel F. та ін., вид-во Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987). Для очищення білків детально розроблені і знайшли широке застосування різні методи, такі як афінна хроматографія з використанням білків мікроорганізмів (наприклад, афінна хроматографія на білку А або білку G), іонообмінна хроматографія (наприклад, катіонообмінна (карбоксиметильні смоли), аніонообмінна (аміноетильні смоли) і хроматографія на основі обміну змішаного типу), тіофільна адсорбція (наприклад, з бета-меркаптоетанолом та іншими лігандами SH), хроматографія гідрофобної взаємодії або ароматичної адсорбції (наприклад, з феніл-сефарозою, аза-аренофільними смолами або м-

амінофенілборною кислотою), метал-хелатна афінна хроматографія (наприклад, з Ni (II) - і Cu (II) - афінним матеріалом), гель-фільтрація та електрофоретичні методи (такі як гель-електрофорез, капілярний електрофорез) (Vijayalakshmi M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75, 1998, сс. 93-102).

Біспецифічні двовалентні антитіла, запропоновані у винаході, сприятливо впливають на хворих людей, які потребують VEGF- і ANG-2-спрямованої терапії.

Двовалентні біспецифічні антитіла до людського VEGF і людському ANG-2, запропоновані в даному винаході, можуть мати цінний профіль ефективності/безпеки і можуть сприятливо впливати на пацієнта, який потребує анти-VEGF- і анти-ANG-2-терапії.

Одним з об'єктів винаходу є фармацевтична композиція, яка містить антитіло, запропоноване у винаході. Іншим об'єктом винаходу є застосування антитіла, запропонованого у винаході, для приготування фармацевтичної композиції. Наступним об'єктом винаходу є спосіб приготування фармацевтичної композиції, яка містить антитіло, запропоноване у винаході. Ще одним об'єктом винаходу є композиція, наприклад, фармацевтична композиція, яка містить антитіло, запропоноване в даному винаході, приготування в поєднанні з фармацевтичним носієм.

У контексті даного опису поняття "фармацевтичний носій" включає будь-який і всі розчинники, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні та протигрибкові агенти, що надають ізотонічність і сповільнюють абсорбцію агенти і т. п., які є фізіологічно сумісними. Краще носій можна застосовувати для введення індивідууму, що підлягає лікуванню, місцевим шляхом. Наприклад, антитіло або композицію, що містить його, можна вводити індивідууму шляхом внутрішньоочного застосування, наприклад, шляхом внутрішньоочної ін'єкції, такий як інтравітреальна ін'єкція. Це можна здійснювати за допомогою стандартних процедур, відомих у цій галузі (див., наприклад, Ritter та ін., J. Clin. Invest. 116, 2006, сс. 3266-76; Russelakis-Carneiro та ін., Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25, 1999, сс. 196-206 і Wray та ін., Arch. Neurol. 33, 1976, сс. 183-185).

Композицію, запропоновану в даному винаході, можна вводити за допомогою різних методів, відомих в даній області. Як має бути очевидно спеціалісту в даній області, шлях і/або форму введення можна варіювати залежно від необхідних результатів. Для введення сполуки, запропонованої у винаході, за допомогою певних шляхів введення може виявитися необхідним наносити на сполуку покриття з матеріалу, що перешкоджає його інактивації, або здійснювати введення сполуки спільно з таким матеріалом. Наприклад, сполуку можна вводити індивідууму у відповідному носії, наприклад, в ліпосомах або в розчиннику. До фармацевтично прийнятних розріджувачів належать фізіологічний розчин і водні забуферюючі розчини. До фармацевтично прийнятних носіїв належать стерильні водні розчини або дисперсії і стерильні порошки для приготування стерильних ін'єкційних розчинів або дисперсій безпосередньо перед введенням. Застосування таких середовищ і агентів для таких, які мають фармацевтичну активність субстанцій, відомо в даній області.

Можна застосовувати цілий ряд можливих шляхів введення, включаючи (але не обмежуючись лише ними) внутрішньоочне застосування або місцеве нанесення. В одному з варіантів здійснення винаходу застосування є внутрішньоочним і включає (але, не обмежуючись ними) підкон'юнктивально ін'єкцію, внутрічерепну ін'єкцію, ін'єкцію в передню камеру через темпоральний лімб, інтрастромальну ін'єкцію, ін'єкцію в рогівку, ін'єкцію сітківку, ін'єкцію в водянисту вологу ока, ін'єкцію в субтеновний простір ока або введення за допомогою пристрою з уповільненим вивільненням, інтравітреальну ін'єкцію (наприклад, ін'єкцію в передню, серединну або задню ділянку скловидного тіла). В одному з варіантів здійснення винаходу застосування є місцевим і включає (але, не обмежуючись лише ними) нанесення очних крапель на рогівку.

В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічне антитіло або фармацевтичну композицію, запропоноване/пропоновану у винаході, застосовують шляхом інтравітреального введення, наприклад, шляхом ін'єкції в склоподібне тіло. Це можна здійснювати за допомогою стандартних процедур, відомих у цій галузі (див., наприклад, Ritter та ін., J. Clin. Invest. 116, 2006, сс. 3266-76; Russelakis-Carneiro та ін., Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25, 1999, сс. 196-206 і Wray та ін., Arch. Neurol. 33, 1976, сс. 183-185).

У деяких варіантах здійснення винаходу терапевтичні набори, запропоновані у винаході, можуть містити одну або декілька доз біспецифічного антитіла у фармацевтичній композиції, зазначеній в цьому описі, прийнятний пристрій для ін'єкції в склоподібне тіло фармацевтичної композиції та інструкцію, що деталізує показання для застосування індивідуумам і протоколи здійснення ін'єкції. У цих варіантах здійснення винаходу композиції, як правило, вводять індивідууму, який потребує лікування, шляхом ін'єкції в скловидне тіло. Це можна здійснювати за допомогою стандартних процедур, відомих у цій галузі (див., наприклад, Ritter та ін., J. Clin.

Invest. 116, 2006, ss. 3266-3276; Russelakis-Carneiro та ін., Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25, 1999, ss. 196-206 і Wray та ін., Arch. Neurol. 33, 1976, ss. 183-185).

Композиції можуть містити також ад'юванти, такі як консерванти, змочувальні речовини, емульгатори і диспергуючі агенти. Відсутність мікроорганізмів можна забезпечувати як за допомогою процедур стерилізації (див. вище), так і шляхом включення різних антибактеріальних і протигрибкових засобів, таких, наприклад, як парабени, хлорбутанол, фенол, сорбінова кислота і т. п. Може виявитися доцільним включати в композиції агенти для додання ізотонічності, такі як цукри, хлорид натрію і т. п. Крім того, можна пролонгувати абсорбцію ін'єкційної фармацевтичної форми шляхом включення речовин, які сповільнюють абсорбцію, таких як моностеарат алюмінію і желатин.

Незалежно від обраного шляху введення сполуки, запропоновані в даному винаході, які можна застосовувати в придатній гідратованій формі, і/або фармацевтичні композиції, запропоновані в даному винаході, готують у вигляді фармацевтично прийнятних форм лікарського засобу за допомогою загальноприйнятих методів, відомих фахівцям у даній галузі.

Фактичні рівні доз діючих речовин у фармацевтичних композиціях, запропонованих в даному винаході, можна варіювати для одержання кількості діючої речовини, яке є ефективним для досягнення необхідного терапевтичного відповіді у конкретного пацієнта при використанні конкретної композиції і шляху введення, але яке не є токсичним для пацієнта. Вибраний рівень доз повинен залежати від різних фармакокінетичних факторів, включаючи активність конкретних застосовуваних композицій, запропонованих в даному винаході, шлях введення, тривалість введення, швидкість екскреції конкретної застосовуваної сполуки, тривалість лікування, інші лікарські засоби, сполуки і/або матеріали, які використовують у поєднанні з конкретними застосовуваними композиціями, вік, стать, вага, стан, загальний стан здоров'я і попередня історія хвороби пацієнта, що підлягає лікуванню, та інші подібні фактори, добре відомі в галузі медицини.

Композиція повинна бути стерильною і текучою в тій мірі, щоб композицію можна було вводити за допомогою шприца. Крім води кращим носієм є ізотонічний забуферений фізіологічний розчин.

Відповідну плинність можна підтримувати, наприклад, шляхом використання покриття, такого як лецитин, шляхом підтримання необхідного розміру часток у разі дисперсії і шляхом застосування поверхнево-активних речовин. У багатьох випадках краще включати в композицію агенти для додання ізотонічності, наприклад, цукри, багатоатомні спирти, такі як маніт або сорбіт, і хлорид натрію.

Композиція може являти собою офтальмічну композицію у формі депо, що містить діючу речовину для субкон'юнктивального введення. Офтальмічна композиція у формі депо містить мікрочастинки практично чистої діючої речовини, наприклад, біспецифічного антитіла, запропонованого у винаході. Мікрочастинки, що містять біспецифічне антитіло, запропоноване у винаході, можуть бути занурені в біосумісний фармацевтично прийнятний полімер або ліпідний капсулюючий агент. Композиції у формі депо можна адаптувати для вивільнення всієї або практично всієї діючої речовини протягом подовженого періоду часу. Полімерний або ліпідний матрикс, якщо він присутній, може бути адаптований до розщеплення, достатнього для того, щоб транспортуватися від місця введення після вивільнення всієї або практичного всієї діючої речовини. Композиція у формі депо може являти собою рідку композицію, що містить фармацевтично прийнятний полімер і розчинену або дисперговану діючу речовину. Після ін'єкції полімер утворює депо в місці ін'єкції, наприклад, шляхом утворення гелю або осадження.

Іншим об'єктом винаходу є біспецифічне антитіло, запропоноване у винаході, призначене для застосування для лікування судинних очних захворювань.

Одним з варіантів здійснення винаходу є біспецифічне антитіло, запропоноване у винаході, призначене для застосування для лікування судинних очних захворювань.

Іншим об'єктом винаходу є зазначена фармацевтична композиція, призначена для застосування для лікування судинних очних захворювань.

Іншим об'єктом винаходу є застосування антитіла, запропонованого у винаході, для приготування лікарського засобу призначеного для лікування судинних очних захворювань.

Іншим об'єктом винаходу є спосіб лікування пацієнта, що страждає судинними очними захворюваннями, що полягає в тому, що вводять антитіло, запропоноване у винаході, пацієнту, який потребує такого лікування.

Поняття "судинне очне захворювання" і "судинне захворювання очей" в контексті даного опису застосовують взаємозамінно, і вони включають (але, не обмежуючись лише ними) синдроми внутрішньоочної неоваскуляризації, такі як діабетична ретинопатія, діабетичний набряк жовтої плями, ретролентальна фіброплазія, неоваскулярна глаукома, оклюзії вен сітківки,

оклюзії центральної вени сітківки, дегенерація жовтої плями, вікова дегенерація жовтої плями, пігментний ретиніт, ретинальна ангіоматозних проліферація, телеангіектазія жовтої плями, ішемічна ретинопатія, неоваскуляризація райдужної оболонки, внутрішньоочна неоваскуляризація, неоваскуляризація рогівки, неоваскуляризація сітківки, хороїдальна неоваскуляризація і дегенерація сітківки (Garner A., Vascular diseases, в: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, під ред. Garner A. и Klintworth G.K., 2-ое изд., изд-во Marcel Dekker, New York, 1994, сс. 1625-1710). У контексті даного опису судинне очне захворювання включає будь-які патологічні стани, що відрізняються зміненою чи нерегульованою проліферацією і інвазією нових кровоносних судин в структури тканин ока, таких як сітківка або рогівка. В одному з варіантів здійснення винаходу судинне очне захворювання вибирають з групи, що включає: вологу вікову дегенерацію жовтої плями (волога форма AMD), суху вікову дегенерацію жовтої плями (суха форма AMD), діабетичний набряк жовтої плями (DME), цистодний набряк жовтої плями (CME), непроліферативну діабетичну ретинопатію (NPDR), проліферативну діабетичну ретинопатію (PDR), цистодний набряк жовтої плями, васкуліт (наприклад, оклюзія центральної вени сітківки) папіллоедему (набряк диска зорового нерва), ретиніт, кон'юнктивіт, увеїт, хороїдїт, мультифокальний хороїдїт, гітоплазмоз ока, блефарит, "сухе око" (хвороба Шегрена) та інші офтальмічні захворювання, при яких очне захворювання або порушення асоційоване з неоваскуляризацією ока, просочуванням з судин і/або набряком сітківки. Таким чином, біспецифічні антитіла, запропоновані у винаході, можна застосовувати для попередження і лікування вологої форми AMD, сухої форми AMD, CME, DME, NPDR, PDR, блефариту, "сухого ока" і увеїта, краще також вологої форми AMD, сухої форми AMD, блефариту і "сухого ока", краще також CME, DME, NPDR і PDR, краще також блефарити і "сухого ока", зокрема вологої форми AMD і сухої форми AMD, а також найбільш краще важливої форми AMD. У деяких варіантах здійснення винаходу очне захворювання вибирають з групи, що включає вологу вікову дегенерацію жовтої плями (волога форма AMD), набряк сітківки, оклюзії вен сітківки, ретролєтальну фіброплазію і діабетичну ретинопатію.

Інші хвороби, асоційовані з неоваскуляризацією рогівки, включають (але, не обмежуючись лише ними) епідемічний кератокон'юнктивіт, дефіцит вітаміну А, переносення відведеного часу контактних лінз, атопічний кератит, верхній лімбічний кератит, птеригій, сухий кератит, хвороба Шегрена, рожеві вугри, філектенулоз, сифіліс, інфекції, викликані мікобактеріями, ліпідні дегенерації, хімічні опіки, бактеріальні виразки, грибові виразки, інфекції, викликані вірусом герпесу простого, інфекції, викликані вірусом оперізуючого лишая, протозойні інфекції, саркому Капоші, виразку Мурена, крайову дегенерацію Террієна, крайовий кератолізіс, ревматоїдний артрит, системну червону волчанку, поліартрит, травму, саркоїдоз Веґенера, склерит, хвороба Стівена-Джонсона, перифігійну радіальну кератотомію і відторгнення трансплантата рогівки.

Захворювання, асоційовані з ретинальною/хороїдальною неоваскуляризацією, включають (але, не обмежуючись лише ними) діабетичну ретинопатію, дегенерацію жовтої плями, серповидноклітинну анемію, саркоїд, сифіліс, псевдоксантому еластичну, хворобу Педжета, оклюзію вен, оклюзію артерій, обструктивне захворювання сонної артерії, хронічний увеїт/вітрит, інфекції, викликані мікобактеріями, хворобу Лайма, системну червону волчанку, ретролєтальну фіброплазію, пігментний ретиніт, набряк сітківки (включаючи набряк жовтої плями), хворобу Ізла, хворобу Бехчета, інфекції, що викликають ретиніт або хороїдїт, синдром передбачуваного очного гітоплазмозу, хворобу Беста, міопію, ямки диска зорового нерва, хворобу Штаргардта, туберкульоз судинної оболонки очного яблука (туберкульозний увеїт), хронічне відшарування сітківки, синдром гіперв'язкості, токсоплазмоз, ускладнення, пов'язані з травмою і впливом лазера. Інші хвороби включають (але, не обмежуючись лише ними) хвороби, асоційовані з почервонінням (неоваскуляризація кута), і хвороби, що викликаються аномальною проліферацією фіброваскулярною або фіброзної тканини, включаючи всі форми проліферативної вітріоретінопатії.

Ретролєтальна фіброплазія (ROP) являє собою захворювання ока, яке вражає передчасно народжених дітей. Ймовірно, воно викликається дезорганізованим зростанням кровоносних судин сітківки, що може призводити до рубцювання і відшарування сітківки. ROP може бути слабкою і може спонтанно усуватися, але може в серйозних випадках приводити до сліпоти. В цілому, всі недоношені діти мають ризик ROP, а дуже низька вага при народженні є додатковим чинником ризику. Як токсичність кисню, так і відносно гіпоксія можуть брати участь у розвитку ROP.

Дегенерація жовтої плями являє собою медичний стан, що зустрічається головним чином у престарілих людей, при якому центр внутрішньої вистилки очі, відомий як жовта пляма (макула) сітківки, стоншується, атрофується і в деяких випадках кровоточить. Це може призводити до зниження центрального зору, що тягне за собою відсутність можливості бачити дрібні деталі,



читати чи розрізняти обличчя. Згідно Американської академії офтальмології в Сполучених Штатах це є причиною втрати центрального зору (сліпоти) у людей віком старше 50 років. Хоча деякі дистрофії жовтої плями, які вражають більш молодих індивідумів, іноді позначають як дегенерація жовтої плями, поняття, як правило, належить до вікової дегенерації жовтої плями (AMD або ARMD).

Вікова дегенерація жовтої плями починається з характерних відкладень жовтого кольору, які називаються друзами, в макулі (центрально ділянка сітківки, яка забезпечує деталізований центральний зір, називається ямкою), між пігментним епітелієм сітківки та низлежачою власне судинною оболонкою ока. Більшість людей із зазначеними ранніми змінами (які називають віковою макулопатією) мають хороший зір. У людей з друзами може розвиватися запущена форма AMD. Ризик значно зростає, коли друзи стають великими і численними і пов'язаними з порушенням в шарі пігментованих клітин під жовтою плямою. Великі і м'які друзи пов'язані з підвищеними відкладеннями холестерину і можуть реагувати на лікування засобами, що знижують холестерин, або Рео-процедуру.

Запущена форма AMD, відповідальна за глибоку (повну) втрату зору, має дві форми: суху і вологу. Географічна атрофія, що зачіпає центральну ямку, суха форма запущеної AMD, є результатом атрофії шару пігментного епітелію сітківки, розташованого під сітківкою, що призводить до втрати зору в результаті втрати фоторецепторів (паличок і колбочок) в центральній області ока. Хоча для цього стану відсутнє лікування, Національним інститутом ока та іншими організаціями продемонстровано, що вітамінні добавки з високими дозами антиоксидантів, лютеїн і зеаксанти сповільнюють розвиток сухої форми дегенерації жовтої плями у деяких пацієнтів, покращуючи візуальну активність.

Ретиніт пігментний (RP) являє собою групу генетичних станів ока. При прогресуванні симптомів RP, як правило, нічна сліпота передує тунельному зору протягом ряду років або навіть десятиліть. Багато людей з RP не стають формально сліпими до 40 або 50 років і зберігають деякий зір протягом усього життя. У інших в результаті RP розвивається повна сліпота, в деяких випадках навіть уже в дитинстві. Розвиток RP в кожному випадку є різним. RP є типом спадкової дистрофії сітківки, тобто належить до групи спадкових порушень, при яких аномалії фоторецепторів (палички і колбочки) або ретинального пігментного епітелію (RPE) сітківки призводять до прогресуючої втрати зору. Уражені індивідууми спочатку страждають порушеною адаптацією до темряви або ніктолопією (курча (нічна) сліпота), потім зниженням периферичного поля зору (так званим тунельним зором) і іноді пізніше в процесі розвитку хвороби зниженням центрального зору.

Макулярний набряк (набряк жовтої плями) має місце, коли рідина і білкові відкладення збираються на макулі або під макулою ока, центральною областю жовтого кольору сітківки, викликаючи потовщення і набухання. Набухання може спотворювати центральний зір людини, оскільки жовта пляма знаходиться поблизу центру сітківки на задній стінці очного яблука. Ця область містить щільно упаковані колбочки, що забезпечує гострий, ясний центральний зір, що дозволяє людині бачити форму, колір і деталі, які знаходяться безпосередньо на лінії погляду. Цістоїдний макулярний набряк є типом макулярного набряку, який включає утворення цист.

Комбіновані терапії: Згідно з деякими варіантами здійснення винаходу біспецифічне антитіло або фармацевтичну композицію, запропоноване/запропоновану у винаході, застосовують індивідуально (без додаткового терапевтичного засобу) для лікування одного або декількох очних захворювань, зазначених у даному описі.

Згідно інших варіантів здійснення винаходу біспецифічне антитіло або фармацевтичну композицію, запропоноване/запропоновану у винаході, застосовують у поєднанні з одним або декількома додатковими терапевтичними засобами або методами для лікування одного або декілька очних захворювань, зазначених у даному описі.

В інших варіантах здійснення винаходу біспецифічне антитіло або фармацевтичну композицію, запропоноване/запропоновану у винаході готують у поєднанні з одним або декількома додатковими терапевтичними засобами і застосовують для лікування одного або декілька очних захворювань, зазначених у цьому описі.

У деяких варіантах здійснення винаходу комбіновані терапії, представлені в даному описі, передбачають введення біспецифічного антитіла або фармацевтичної композиції, запропонованого/запропонованої у винаході, послідовно з одним або декількома додатковими терапевтичними засобами для лікування одного або декілька очних захворювань, зазначених у цьому описі.

Додаткові терапевтичні засоби включають (але, не обмежуючись лише ними) триптофаніл-тРНК-синтетазу (TrpRS), EyeOOI (пегільований анти-VEGF аптамер), скваламін, RETAANE™ (анекортава ацетат у вигляді депо-суспензії; фірма Alcon, Inc.), проліки комбретастатину A4

(CA4P), MACUGEN™, MIFEPREX™ (міфепристон-ru486), субтенон, тріамцінолону ацетонід, інтравітреальний кристалічний тріамцінолону ацетонід, пріномастат (AG3340-синтетичний інгібітор матричних металопротеїназ, фірма Pfizer), флуцінолону ацетонід (включаючи внутрішньоочний імплантат флуцінолона, фірма Bausch & Lomb/Control Delivery Systems),

5 інгібітори VEGFR (фірма Sugen), VEGF-Trap (фірма Regeneron/Aventis), інгібітори тирозинкіназного рецептора VEGF, такі як 4-(4-бром-2-фтораніліно)-6-метокси-7-(1-метилпіперидин-4-ілметокси)хіназолін (ZD6474), 4-(4-фтор-2-метиліндол-5-ілокси)-6-метокси-7-(3-піролідін-1-ілпропокси)хіназолін (AZD2171), ваталаніб (PTK787) і SU1 1248 (сунітиніб), ліномід та інгібітори функції інтегрину бета-3, і ангіостатин.

10 Інші фармацевтичні терапії, які можна застосовувати в поєднанні з біспецифічним антитілом або фармацевтичною композицією, запропонованим/запропонованою у винаході, включають (але, не обмежуючись лише ними), VISUDYNE™, застосовуваний разом з нетермічним лазером, РКС 412, ендовіон (фірма NeuroSearch A/S), нейротрофічні фактори, включаючи в якості прикладу гліальний нейротрофічний фактор і циліарний нейротрофічний фактор,

15 діатазем, дорзоламід, фототроп (Phototrop), 9-цис-ретиналь, очні лікарські засоби (включаючи ехо-терапію (Echo Therapy), включаючи фосфоліну йодид або ехотіофат, або інгібітори вугільної ангідрази, AE-941 (фірма AEterna Laboratories, Inc.), Sirna-027 (фірма Sirna Therapeutics, Inc.), пегаптаніб (фірма NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), нейротрофіни (включаючи тільки в якості прикладу, NT-4/5, фірма Genentech), Cand5 (фірма Acuity Pharmaceuticals), INS-37217

20 (фірма Inspire Pharmaceuticals), антагоністи інтегрину (включаючи препарати фірм Jerini AG і Abbott Laboratories), EG-3306 (фірма Ark Therapeutics Ltd.), BDM-E (фірма BioDiem Ltd.), талідомід (застосовуваний, наприклад, фірмою EntreMed, Inc.), кардіотрофін-1 (фірма Genentech), 2-метоксиестрадіол (фірма Allergan/Oculex), DL-8234 (фірма Toray Industries), NTC-200 (фірма Neurotech), тетратіомолібдат (Мічиганський Університет (University of Michigan)), LYN-002 (фірма Lynkeus Biotech), сполука з мікроводоростей (фірма Aquasearch/Albany, Mera Pharmaceuticals), D-9120 (фірма Celltech Group pic), ATX-S10 (Hamamatsu Photonics), TGF-бета 2 (фірма Genzyme/Celtrix), інгібітори тирозинкіназ (фірми Allergan, SUGEN, Pfizer), NX-278-L (фірма NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), Opt-24 (фірма OPTIS France SA), нейропротектори гангліїв клітин сітківки (фірма Cogent Neurosciences), N-нітропіразольні похідні

30 (фірма Texas A&M University System), KP-102 (фірма Krenitsky Pharmaceuticals), циклоспорин А, "обмежену транслокацію сітківки", фотодинамічну терапію (PDT) (включаючи (тільки в якості прикладу) рецепторнаправлену PDT, фірма Bristol-Myers Squibb, Co.; порфімер натрію для ін'єкції спільно з PDT; вертепорфін, фірма QLT Inc.; ротапорфін, застосовуваний спільно з PDT, фірма Miravent Medical Technologies; талапорфін натрію застосовуваний спільно з PDT, фірма Nippon Petroleum; мотексафін лютецію, фірма Pharmascyclus, Inc.), антисмислові олігонуклеотиди (включаючи лише в якості прикладу, продукти, протестовані фірмою Novagali Pharma SA і ISIS-13650, фірма Isis Pharmaceuticals), лазерну фотокоагуляцію, обробку друз

35 лазером, хірургію макулярних розривів сітківки, хірургічну транслокацію макули, імплантовані мініатюрні телескопи, ангиографію Phi-руху (відому також як мікролазерна терапія або ангиографія фідерних судин), бомбардування протонним пучком, мікростимулюючу терапію, хірургію з приводу відшарування сітківки та операцію на склоподібному тілі, операцію вдавнення сфери, операцію в субмакулярній області, транспупілярну термотерапію, терапію фотосистеми I, застосування РНК-інтерференції (РНКі), екстракорпоральний реоферез (відомий також як мембранна диференціальна фільтрація і реотерапія), імплантацію мікрочіпів, терапію

45 стовбуровими клітинами, генну замісну терапію, генну терапію на основі рибозимів (включаючи генну терапію з використанням елемента відповіді на гіпоксію, фірми Oxford Biomedica; Lentipak, Genetix; генна терапія PDEF, фірма GenVec), трансплантацію фоторецепторних/ретинальних клітин (включаючи епітеліальні клітини сітківки, що трансплантуються, фірма Diacrin, Inc.; трансплантат клітин сітківки, фірма Cell Genesys, Inc.) і акупунктуру.

50 Будь-який антиангіогенний засіб можна застосовувати в поєднанні з біспецифічним антитілом або фармацевтичною композицією, запропонованим/запропонованою у винаході, включаючи (але не обмежуючись лише ними) зазначені у Carmeliet і Jain, Nature 407, 2000, сс. 249-257. У деяких варіантах здійснення винаходу антиангіогенний засіб являє собою інший антагоніст VEGF або антагоніст рецептора VEGF, такий як варіанти VEGF, фрагменти розчинного рецептора VEGF, аптамери, що мають здатність блокувати VEGF або VEGFR, нейтралізуючі антитіла до VEGFR, низькомолекулярні інгібітори тирозинкіназ VEGFR і будь-які їх комбінації, і вони включають анти-VEGF аптамери (наприклад, пегаптаніб), розчинні

55 рекомбінантні рецептори-пастки (наприклад, VEGF Trap). У деяких варіантах здійснення винаходу антиангіогенний засіб включає кортикостероїди, ангіостатичні стероїди, анекортава ацетат, ангіостатин, ендостатин, малі інтерферуючі РНК, що знижують експресію VEGFR або

60

ліганда VEGF, засоби пост-VEGFR-блокади на основі інгібіторів тирозинкіназ, інгібітори MMP, IGFBP3, блокатори SDF-1, PEDF, гамма-секретази, дельта-подібний ліганд 4, антагоністи інтегрину, блокатор HIF-1-альфа, блокатор протеїнкінази CK2 і інгібітор хомінгу стовбурової клітини (тобто клітини-попередника ендотеліальних клітин) до ділянки неоваскуляризації з використанням ендотеліального кадхеріна (CD-144) і антитіл до стромального фактору (SDF)-1. Можна застосовувати також низькомолекулярні інгібітори RTK, мішенню яких є VEGF-рецептори, включаючи PTK787. Можна застосовувати також агенти, що мають активність відносно неоваскуляризації, які не обов'язково являють собою анти-VEGF-сполуки, і вони включають протизапальні лікарські засоби, інгібітори m-Tor, рапаміцин, еверолімус, темсіролімус, ціклоспон, анти-TNF-агенти, агенти, мішенню яких є комплемент, і нестероїдні протизапальні засоби. Можна застосовувати також агенти, що мають нейрозахисну дію, і які можуть потенційно знижувати розвиток сухої форми дегенерації жовтої плями, наприклад, клас лікарських засобів, званих "нейростероїдів". Вони включають такі лікарські засоби, як дегідроепіандростерон (DHEA) (товарні знаки: Prastera® і Fidelin®), дегідроепіандростерону сульфат і прегненолону сульфат. Будь-який призначений для лікування AMD (вікова дегенерація жовтої плями) терапевтичний засіб можна застосовувати в поєднанні з біспецифічним антитілом або фармацевтичною композицією, запропонованим/запропонованою у винаході, включаючи (але не обмежуючись лише ними) вертепорфін в поєднанні з PDT, пегаптаніб натрію, цинк або антиоксидант (и), індивідуально або в будь-якій комбінації.

Поняття "індивідуум" і "пацієнт" застосовують взаємозамінно, і вони відносяться до ссавців, таких як хворі люди і примати крім людини, а також до експериментальних тварин, таким як кролики, щури та миші, а також інші тварини. Тварини включають всіх хребетних тварин, наприклад, ссавців і тварин, що не відносяться до ссавців, таких як собаки, кішки, вівці, свині, кролики, кури і т. д. Кращими індивідуумами для втілення на практиці терапевтичних способів, запропонованих в даному винаході, є люди. Індивідууми, які потребують лікування, включають пацієнтів, які вже страждають очним захворюванням або порушенням, а також схильних до розвитку порушення.

У контексті даного опису поняття "клітина", "клітинна лінія" і "клітинна культура" використовуються взаємозамінно, і вони всі включають потомство. Так, поняття "трансформанти" і "трансформовані клітини" включають первинно трансформовану клітину і виведені з неї культури безвідносно до кількості пересівань. Слід розуміти також, що потомство може не бути повністю ідентичним за складом ДНК через довільні або навмисні мутації. Під обсяг винаходу підпадає варіант потомства, який має таку ж функцію або біологічну активність, яка виявлена в результаті скринінгу у вихідній трансформованій клітині. У тих випадках, коли слід застосовувати інші позначення, це має бути очевидно з контексту.

У контексті даного опису поняття "трансформація" належить до процесу переносу векторів/нуклеїнової кислоти в клітину-хазяїна. Якщо в якості клітин-хазяїнів застосовують клітини, оболонки яких не являють собою важкопереможні бар'єри, то трансфекцію здійснюють, наприклад, методом, заснованим на осадженні фосфатом кальцію, описаним у Graham і Van der Eb, Virology 52, 1973, сс. 546-567. Однак можна застосовувати також і інші методи інтродукції ДНК в клітини, такі як ін'єкція в ядра або злиття протопластів. Якщо використовують прокаріотичні клітини або клітини, що мають значні клітинні оболонки, то в якості методу трансфекції можна застосовувати обробку кальцієм з використанням хлориду кальцію, описану у Cohen SN та ін., PNAS 69, 1972, сс. 2110-2114.

У контексті даного опису поняття "експресія" належить до процесу, за допомогою якого здійснюється транскрипція нуклеїнової кислоти в мРНК, і/або до процесу, за допомогою якого транскрибована мРНК (яку називають також транскриптом) згодом транслюється з утворенням пептидів, поліпептидів або білків. Транскрипти і поліпептиди, що кодуються, в цілому називають генним продуктом. Якщо полінуклеотид виводять з геномної ДНК, то експресія в еукаріотичній клітині може включати сплайсинг мРНК.

"Вектор" являє собою молекулу нуклеїнової кислоти, зокрема самореplikуючу молекулу, яка переносить вбудовану молекулу нуклеїнової кислоти в клітини-хазяїни і/або між клітинами-хазяїнами. Поняття включає вектори, функція яких полягає, насамперед, у вбудовуванні ДНК або РНК в клітину (наприклад, хромосомна інтеграція). Реплікаційні вектори, функція яких полягає насамперед у реплікації ДНК або РНК, і в експресійні вектори, функція яких полягає насамперед у транскрипції і/або трансляції ДНК або РНК. Під поняття підпадають також вектори, які мають кількома зазначеними функціями.

"Експресійний вектор" являє собою полінуклеотид, який при інтродукції у відповідну клітину-хазяїна може транскрибуватися і транслюватися в поліпептид. Поняття "експресійна система" належить, як правило, до прийнятної клітини-хазяїна, що містить експресійний вектор,

функцією якої може бути вихід необхідного продукту експресії.

Наступні приклади, перелік послідовностей і креслення подані з метою кращого розуміння цього винаходу, повний обсяг якого представлений у наведеній нижче формулі винаходу. Очевидно, що у викладених процедурах можуть бути зроблені модифікації без відхилення від суті винаходу.

5

Опис переліку послідовностей (амінокислотні послідовності)

SEQ ID NO:	1	CDR3H важкого ланцюга, <VEGF> ранібізумаб
SEQ ID NO:	2	CDR2H важкого ланцюга, <VEGF> ранібізумаб
SEQ ID NO:	3	CDR1H важкого ланцюга, <VEGF> ранібізумаб
SEQ ID NO:	4	CDR3L легкого ланцюга, <VEGF> ранібізумаб
SEQ ID NO:	5	CDR2L легкого ланцюга, <VEGF> ранібізумаб
SEQ ID NO:	6	CDR1L легкого ланцюга, <VEGF> ранібізумаб
SEQ ID NO:	7	варіабельний домен важкого ланцюга VH, <VEGF> ранібізумаб
SEQ ID NO:	8	варіабельний домен легкого ланцюга VL, <VEGF> ранібізумаб
SEQ ID NO:	9	CDR3H важкого ланцюга, <ANG-2> варіант Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	10	CDR2H важкого ланцюга, <ANG-2> варіант Ang2i_LC10 t
SEQ ID NO:	11	CDR1H важкого ланцюга, <ANG-2> варіант Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	12	CDR3L легкого ланцюга, <ANG-2> варіант Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	13	CDR2L легкого ланцюга, <ANG-2> варіант Ang2i_LC10,
SEQ ID NO:	14	CDR1L легкого ланцюга, <ANG-2> варіант Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	15	варіабельний домен важкого ланцюга VH, <ANG-2> варіант Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	16	варіабельний домен легкого ланцюга VL, <ANG-2> варіант Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	17	людський судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF); послідовність-попередник людського VEGF165
SEQ ID NO:	18	людський ангіопоетин-2 (ANG-2)
SEQ ID NO:	19	людський ангіопоетин-1 (ANG-1)
SEQ ID NO:	20	людський Tie-2-рецептор
SEQ ID NO:	21	важкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями (VEGFang2-0012)
SEQ ID NO:	22	важкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями (VEGFang2-0012)
SEQ ID NO:	23	легкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями (VEGFang2-0012)
SEQ ID NO:	24	легкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями (VEGF-Ang2-0012)
SEQ ID NO:	25	важкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями і P329G LALA-мутаціями (VEGFang2-0016)
SEQ ID NO:	26	важкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями і P329G LALA-мутаціями (VEGFang2-0016)
SEQ ID NO:	27	легкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями і P329G LALA-мутаціями (VEGFang2-0016)
SEQ ID NO:	28	легкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями і P329G LALA-мутаціями (VEGFang2-0016)
SEQ ID NO:	29	важкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 з AAA-мутаціями і з SPLE-мутаціями
SEQ ID NO:	30	важкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 з AAA-мутаціями і з SPLE-мутаціями
SEQ ID NO:	31	легкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 з AAA-мутаціями і з SPLE-мутаціями
SEQ ID NO:	32	легкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 з AAA-мутаціями і з SPLE-мутаціями
SEQ ID NO:	33	важкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 з AAA-мутаціями
SEQ ID NO:	34	важкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 з AAA-мутаціями

SEQ ID NO:	35	легкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 з AAA-мутаціями
SEQ ID NO:	36	важкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 з AAA-мутаціями і з SPLE-мутаціями
SEQ ID NO:	37	важкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 з AAA-мутаціями і з SPLE-мутаціями
SEQ ID NO:	38	легкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 з AAA-мутаціями і з SPLE-мутаціями
SEQ ID NO:	39	важкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 дикого типу (без AAA-мутацій) (VEGFang2-0201)
SEQ ID NO:	40	важкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 дикого типу (без AAA-мутацій) (VEGFang2-0201)
SEQ ID NO:	41	легкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 дикого типу (без AAA-мутацій) (VEGFang2-0201)
SEQ ID NO:	42	легкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 дикого типу (без AAA-мутацій) (VEGFang2-0201)
SEQ ID NO:	43	важкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 тільки з P329G LALA-мутаціями (без AAA-мутацій) (VEGFang2-0015)
SEQ ID NO:	44	важкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 тільки з P329G LALA-мутаціями (без AAA-мутацій) (VEGFang2-0015)
SEQ ID NO:	45	легкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 тільки з P329G LALA-мутаціями (без AAA-мутацій) (VEGFang2-0015)
SEQ ID NO:	46	легкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 тільки з P329G LALA-мутаціями (без AAA-мутацій) (VEGFang2-0015)
SEQ ID NO:	47	константна ділянка легкого каппа-ланцюга
SEQ ID NO:	48	константна ділянка легкого лямбда-ланцюга
SEQ ID NO:	49	константна ділянка важкого ланцюга, виведена з людського IgG1
SEQ ID NO:	50	константна ділянка важкого ланцюга, виведена з людського IgG4

Нижче перераховані такі варіанти здійснення винаходу:

1. Біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, в якому

I) зазначений перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з VEGF, містить в варіабельному домені важкого ланцюга CDR3H-ділянку, що має SEQ ID NO: 1, CDR2H-ділянку, що має SEQ ID NO: 2, і CDR1H- ділянку, що має SEQ ID NO: 3, і в варіабельному домені легкого ланцюга CDR3L-ділянку, що має SEQ ID NO: 4, CDR2L-ділянку, що має SEQ ID NO: 5, і CDR1L-ділянку, що має SEQ ID NO: 6; і

II) зазначений другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з ANG-2, містить в варіабельному домені важкого ланцюга CDR3H-ділянку, що має SEQ ID NO: 9, CDR2H-ділянку, що має SEQ ID NO: 10, і CDR1H-ділянку, що має SEQ ID NO: 11, і в варіабельному домені легкого ланцюга CDR3L-ділянку, що має SEQ ID NO: 12, CDR2L-ділянку, що має SEQ ID NO: 13, і CDR1L-ділянку, що має SEQ ID NO: 14, і в якому

III) біспецифічне антитіло містить константну ділянку важкого ланцюга людського підкласу IgG1 або людського підкласу IgG4 (виведену з людського антитіла), що містить мутації I253A, H310A і H435A (нумерація згідно EU-індексу Кебота).

2. Біспецифічне антитіло за варіантом здійснення винаходу 1, в якому

I) зазначений перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з VEGF, містить в якості варіабельного домену важкого ланцюга VH амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7 і в якості варіабельного домену легкого ланцюга VL амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8 і

II) зазначений другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з ANG-2, містить в якості варіабельного домену важкого ланцюга VH амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15 і в якості варіабельного домену легкого ланцюга VL амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16.

3. Біспецифічне антитіло за одним з варіантів здійснення винаходу 1-2, в якому константна ділянка важкого ланцюга, зазначена у підпункті III), належить до IgG1-підкласу.

4. Біспецифічне антитіло за варіантом здійснення винаходу 3, в якому константна ділянка важкого ланцюга IgG1-підкласу містить також мутації L234A, L235A і P329G (нумерація згідно EU-індексу Кебота).

5. Біспецифічне антитіло за одним з варіантів здійснення винаходу 1-2, в якому константна

ділянка важкого ланцюга, зазначена у підпункті III), належить до IgG4-підкласу.

6. Біспецифічне антитіло за варіантом здійснення винаходу 5, в якому константна ділянка важкого ланцюга IgG4-підкласу містить також мутації S228P і L235E (нумерація згідно EU-індексу Кебота).

5 7. Біспецифічне антитіло за варіантом здійснення винаходу 5, в якому константна ділянка важкого ланцюга IgG4-підкласу містить також мутації S228P, L235E і P329G (нумерація згідно EU-індексу Кебота).

8. Фармацевтична композиція, що містить антитіло за одним з варіантів здійснення винаходу 1-7.

10 9. Біспецифічне антитіло за одним з варіантів здійснення винаходу 1-7, призначене для застосування для лікування судинних очних захворювань.

10. Застосування біспецифічного антитіла за одним з варіантів здійснення винаходу 1-7 для приготування лікарського засобу для лікування судинних захворювань очей.

15 11. Біспецифічне антитіло за одним з варіантів здійснення винаходу 9 або 10, де антитіло застосовують шляхом інтравітреального введення.

12. Спосіб лікування пацієнта, що страждає судинними захворюваннями очей, що полягає в тому, що вводять антитіло за одним з варіантів здійснення винаходу 1-7 пацієнту, який потребує такого лікування.

20 13. Нуклеїнова кислота, що кодує біспецифічне антитіло за одним з варіантів здійснення винаходу 1-7.

14. Експресійний вектор, що містить зазначену нуклеїнову кислоту за варіантом здійснення винаходу 13, який має здатність експресувати зазначену нуклеїнову кислоту в прокариотичній або еукаріотичній клітині-хазяїні.

25 15. Прокариотична або еукаріотична клітина-хазяїн, що містить вектор за варіантом здійснення винаходу 14.

16. Спосіб одержання біспецифічного антитіла за варіантами здійснення винаходу 1-7, що полягає в тому, що здійснюють стадії, на яких

а) трансформують клітину-хазяїна векторами, що містять молекули нуклеїнових кислот, які кодують вказане антитіло;

30 б) культивують клітину-хазяїна в умовах, що забезпечують синтез зазначеного молекули антитіла; і

в) виділяють зазначену молекулу антитіла із зазначеної культури.

17. Біспецифічне антитіло, одержане способом за варіантом здійснення винаходу 16.

35 18. Біспецифічне двовалентне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, що відрізняється тим, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 і SEQ ID NO: 28.

40 19. Біспецифічне двовалентне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, що відрізняється тим, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 і SEQ ID NO: 24.

45 20. Біспецифічне двовалентне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, що відрізняється тим, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 і SEQ ID NO: 32.

Експериментальні процедури

Таблиця 1

## Біспецифічні антитіла і відповідні їм послідовності

Опис	Скорочене позначення	Послідовності
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями	VEGFang2-0012	SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 дикого типу (без AAA-мутацій)	VEGFang2-0201-	SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями і P329G LALA-мутаціями	VEGFang2-0016	SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 тільки з P329G LALA-мутаціями (без AAA-мутацій)	VEGFang2-0015	SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 з AAA-мутаціями і з SPLE-мутаціями	--	SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32
<VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 з AAA-мутаціями	-	SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35
<VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 з AAA-мутаціями і з SPLE-мутаціями	-	SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38

- Слід мати на увазі, що в контексті даного опису поняття "з AAA-мутаціями" належить до мутацій I253A (Ile253Ala), H310A (His310Ala) і H435A (His435Ala) в константній ділянці важкого ланцюга IgG1 або IgG4 (нумерація згідно EU-індексу Кебота), поняття "з P329G LALA-мутаціями" в контексті даного опису належить до мутацій L234A (Leu235Ala), L235A (Leu234Ala) і P329G (Pro329Gly) в константній ділянці важкого ланцюга IgG1-підкласу (нумерація згідно EU-індексу Кебота), а поняття "з SPLE-мутаціями" в контексті даного опису належить до мутацій S228P (Ser228Pro) і L235E (Leu235Glu) в константній ділянці важкого ланцюга IgG4-підкласу (нумерація згідно EU-індексу Кебота).

## Приклади

## Матеріали та загальні методи

- Загальна інформація, що стосується нуклеотидних послідовностей легких і важких ланцюгів людського імуноглобуліну, представлена у Kabat E.A. та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е вид., вид-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Амінокислоти ланцюгів антитіла пронумеровані і позначені згідно EU-нумерації (Edelman G.M. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 1969, сс. 78-85; Kabat E.A. та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е вид., вид-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

## Методи рекомбінантної ДНК

- Для маніпуляцій з ДНК застосовували стандартні методи, описані у Sambrook J. та ін., Molecular Cloning: A laboratory manual; вид-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Всі застосовувані в молекулярній біології реагенти застосовували згідно з інструкціями виробників.

## Синтез генів

Необхідні сегменти генів замовляли відповідно до представлених специфікацій на фірмі Geneart (Регенсбург, Німеччина).

## Визначення послідовності ДНК

- Послідовності ДНК визначали шляхом секвенування двох ланцюгів, яке здійснювали на фірмі MediGenomix GmbH (Мартінсрид, Німеччина) або Sequiserve GmbH (Фатерштеттен, Німеччина).

## Аналіз послідовностей ДНК і білків і оцінка даних про послідовності

- Для створення, картування, аналізу, анотації та ілюстрації послідовностей застосовували пакет програм фірми GCG (Genetics Computer Group, Медісон, шт. Вісконсін), версія 10.2 і вдосконалений набір програм Infomax's Vector NT1, версія 8.0.

### Експресійні вектори

Для експресії описаних антитіл застосовували варіанти експресійних плазмід для короткочасної експресії в клітинах (наприклад, в HEK293-F-клітинах), заснованих або на кДНК-організації з інтроном А промотора CMV або без нього, або на геномній організації з промотором CMV.

Крім касети експресії антитіла вектори включали:

- сайт ініціації реплікації, який забезпечує реплікацію цієї плазмиди в *E. coli*,
- ген  $\beta$ -лактамази, який надає стійкість *E. coli* до ампіциліну, і
- ген дигідрофолатредуктази із *Mus musculus* в якості маркера, що селектується, в клітині.

Транскрипційна одиниця гена антитіла складалася з наступних елементів:

- унікальний (і) сайт (и) рестрикції на 5'-кінці,
- негайно-ранній енхансер і промотор з людського цитомегаловірусу,
- розташована за нею послідовність інтрону А в разі організації на основі кДНК,
- 5'-нетрансльована ділянка гена людського антитіла,
- сигнальна послідовність важкого ланцюга імуноглобуліну,
- ланцюг людського антитіла (дикого типу або із заміною доменів) або з організацією на основі кДНК, або з геномною організацією з екзон-інтронною організацією імуноглобуліну,
- 3'- нетрансльована ділянка з послідовністю сигналу поліаденілювання і
- унікальний (і) сайт (и) рестрикції на 3'-кінці.

Злиті гени, що містять ланцюги антитіла, описані нижче, створювали за допомогою ПЛР і/або синтезу генів і збирали за допомогою відомих методів і технологій рекомбінації шляхом з'єднання відповідних сегментів нуклеїнових кислот, наприклад, з використанням унікальних сайтів рестрикції у відповідних векторах. Субклоновані нуклеотидні послідовності підтверджували секвенуванням ДНК. Для короткочасних трансфекцій одержували більші кількості плазмід шляхом отримання плазмід з трансформованих культур *E. coli* (фірма Nucleobond AX, фірма Macherey-Nagel).

### Методики культивування клітин

Застосовували стандартні методики культивування клітин, описані в *Current Protocols in Cell Biology*, під ред. Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz, J і Yamada K.M, вид-во John Wiley & Sons, Inc, 2000.

Біспецифічні антитіла експресували шляхом короткочасної котрансфекції відповідними плазмідами експресії клітин HEK29-F, вирощених в суспензії, згідно описаного нижче методу.

### Приклад 1

#### Експресія та очистка

Короткочасні трансфекції в HEK293-F-системі

Біспецифічні антитіла створювали шляхом короткочасної трансфекції за допомогою відповідних плазмід (наприклад, що кодують важкий ланцюг і модифікований важкий ланцюг, а також відповідний легкий ланцюг і модифікований легкий ланцюг), використовуючи HEK293-F-систему (фірма Invitrogen), відповідно до інструкції виробника. В цілому, метод полягав у наступному: клітини HEK293-F (фірма Invitrogen), що ростуть в суспензії або під струшують колбі, або в ферментері із пристроєм, в бессироватковому середовищі для експресії FreeStyle™ 293 (фірма Invitrogen), трансфектували сумішшю з чотирьох експресійних плазмід і 293fectin™ або фектіну (фірма Invitrogen). У 2-літрову колбу, яку струшують (фірма Corning) HEK293-F-клітини висівали із щільністю  $1,0 \times 10^6$  клітин/мл в 600 мл і інкубували при 120 об./хв., 8 % CO<sub>2</sub>. Через день клітини трансфектували при клітинній щільності приблизно  $1,5 \times 10^6$  клітин/мл, використовуючи приблизно 42 мл суміші, що містить А) 20 мл середовища Opti-MEM (фірма Invitrogen) з 600 мкг загальної плазмідної ДНК (1 мкг/мл), що кодує важкий або модифікований важкий ланцюг відповідно, і відповідний легкий ланцюг в еквімолярному співвідношенні, і Б) 20 мл Opti-MEM+1,2 мл 293fectin™ або фектіну (2 мкл/мл). Залежно від поглинання глюкози в процесі ферментації додавали розчин глюкози. Супернатант, що містить секретувати антитіло, збирали через 5-10 днів і антитіла або очищали безпосередньо з супернатанта або супернатант заморожували і поміщали на зберігання.

#### Очистка

Біспецифічні антитіла очищали з супернатантів клітинних культур за допомогою афінної хроматографії, використовуючи MabSelectSure-Sepharose™ (для не-AAA-мутантів) (фірма GE Healthcare, Швеція) або kappaSelect-агарозу (для AAA-мутантів) (фірма GE Healthcare, Швеція), хроматографії гідрофобних взаємодій з використанням бутіл-сефарози (фірма GE Healthcare, Швеція), і гель-фільтрації на смолі супердекс 200 (фірма GE Healthcare, Швеція).

В цілому, метод полягав у наступному: одержані після стерилізації фільтрацією супернатанти клітинних культур "захоплювали" за допомогою смоли MabSelect SuRe,



- врівноваженої 3ФР-буфером (10мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137мМ NaCl і 2,7мМ KCl, pH 7,4), промивали буфером для врівноваження і елюювали 25мМ цитратом натрію, pH 3,0. AAA-мутанти "захоплювали" за допомогою смоли kappaSelect, врівноваженої 25мМ Tris, 50мМ NaCl, pH 7,2, відмивали буфером для врівноваження і елюювали 25мМ цитратом натрію, pH 2,9.
- 5 Елюювані білкові фракції об'єднували і нейтралізували 2М Tris, pH 9,0. Пули антитіл готували для хроматографії гідрофобних взаємодій, додаючи 1,6М розчин сульфату амонію до кінцевої концентрації 0,8М сульфат амонію і значення pH доводили до 5,0 за допомогою оцтової кислоти. Після врівноваження бутил-сефарозної смоли 35мМ ацетатом натрію, 0,8М сульфату амонію, pH 5,0 антитіла наносили на смолу, промивали буфером для врівноваження і
- 10 елюювали лінійним градієнтом до 35мМ ацетату натрію, pH 5,0. Фракції, що містять біспецифічне антитіло, об'єднували і додатково очищали за допомогою гель-фільтрації, використовуючи колонку, заповнену смолою супердекс 200 26/60 GL (фірма GE Healthcare, Швеція), врівноважену 20мМ гістидином, 140мМ NaCl, pH 6,0. Фракції, що містять біспецифічне антитіло, об'єднували, концентрували до необхідної концентрації, використовуючи пристрій для
- 15 ультрафільтрації Vivaspin (фірма Sartorius Stedim Biotech SA, Франція), і зберігали при -80 °C.

Таблиця 2

## Виходи біспецифічних антитіл &lt;VEGF-ANG-2&gt;

	VEGFang2-0015 (без AAA-мутації)	VEGFang2-0016 (с AAA-мутацією)
титр супернатанту	64 мкг/мл, (2 л відповідає 128 мг)	п.а. (масштаб 2 л)
білок A (MabSelectSure)	118 мг (~ 70 % мономеру)	п.а.
KappaSelect	п. а.	117 мг (~ 83 % мономеру)
бутил-сефароза	60 мг	57 мг
SEC (гель-фільтрація)	35 мг (>95 % мономеру)	38 мг (>95 % мономеру)

- Чистоту і цілісність антитіла аналізували після стадії очищення за допомогою капілярного електрофорезу у присутності ДСН (КЕ-ДСН), використовуючи технологію мікропотоків Labchip (фірма Caliper Life Science, США). 5 мкл білкового розчину готували для КЕ-ДСН-аналізу, використовуючи набір HT Protein Express Reagent згідно з інструкціями виробника, і аналізували за допомогою системи LabChip GXII, використовуючи чіп HT Protein Express. Дані аналізували за допомогою програми LabChip GX.
- 20

Таблиця 3

Видалення типових побічних продуктів  
за допомогою різних послідовних стадій очищення за даними КЕ-ДСН

Стадія очистки	VEGFang2-0015						VEGFang2-0016					
	% площі піку ** аналіз: KE-ДЧН (Caliper Labchip GXII)											
	МАт	¾ Ат	(HC)2	½ Ат	(LC)2	LC	МАт	¾ Ат	(HC)2	½ Ат	(LC) 2	LC
Mab Select Sure	55,7	19	10,6	9,8	3,5	0,9	-					
Кappa Select	-						63	13,4	3,5	6,1	5,8	7,4
бутил-сефарозу	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.

25

Вміст агрегатів в зразках антитіл аналізували за допомогою вискоефективної SEC на аналітичній колонці для гель-фільтрації, заповненої супердексом 200 (фірма GE Healthcare, Швеція), застосовуючи 2×3ФР (20мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 274мМ NaCl і 5,4мМ KCl, pH 7,4) в якості рухомого буфера, при 25 °C. 25 мкг білка ін'єктували в колонку зі швидкістю потоку 0,75

30 мл/хв і піддавали ізократичному елююванню протягом 50 хв.

Аналогічно цьому одержували і очищали біспецифічні антитіла <VEGF-ANG-2> VEGFang2-0012 і VEGFang2-0201, досягаючи наступних виходів:

	VEGFang2-0012 (з AAA-мутацією)	VEGFang2-0201 (без AAA-мутації)
титр/кількість	-	36 мкг/мл/72 мг
масштаб	2,1 л	2 л
білок А (MabSelectSure)	-	66 мг (вміст мономерів ~95 %)
kappaSelect	43 мг (вміст мономерів ~ 65 %)	-
бутил-сефароза	-	45 мг
SEC	14 мг	21 мг (вміст мономерів > 98 %)
вихід на гідроксилапатиті	8,5 мг (вміст мономерів > 98 %)	
загальний вихід (витяг)	8,5 мг (20 %)	21 мг (30 %)

Біспецифічні антитіла <VEGF-ANG-2>, такі як <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 з AAA-мутаціями і з SPLE-мутаціями (SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32), <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 з AAA-мутаціями (SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35) и <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 з AAA-мутаціями і з SPLE-мутаціями (SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38), також можна отримувати і очищати аналогічними методами.

Приклад 2

Аналітичний аналіз і можливість виявлення

Засноване на DLS вимірювання в'язкості в лабораторних умовах

Вимірювання в'язкості здійснювали в цілому згідно з відомим методом (He F. та ін., Analytical Biochemistry 399, 2009, сс. 141-143). В цілому, метод полягав у наступному: зразки концентрували до одержання різних концентрацій білка в 200мМ сукцинаті аргініну, рН 5,5 перед додаванням гранул з полістирольного латексу (діаметром 300 нм) і полісорбату 20 (0,02 об. %). Зразки переносили в оптичний 384-лунковий планшет допомогою центрифугування через 0,4-мікрометровою фільтрувальну пластину і покривали парафіновим маслом. Уявний діаметр гранул латексу визначали шляхом динамічного розсіювання світла при 25 °С. В'язкість розчину можна розраховувати за формулою  $\eta = \eta_0(rh/rh, 0)$  ( $\eta$ : в'язкість;  $\eta_0$ : в'язкість води;  $rh$ : удаваний гідродинамічний радіус гранул латексу;  $rh, 0$ : гідродинамічний діаметр гранул латексу у воді).

Для того щоб можна було здійснювати порівняння різних зразків при одній і тій же концентрації, дані про в'язкості залежно від концентрації апроксимували за допомогою рівняння Муні (рівняння 1) (Mooney, Colloid Sci, 1951; Monkos, Biochem. Biophys. Acta, 1997) і здійснювали інтерполяцію даних за допомогою наступного рівняння:

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

(S: параметр гідродинамічної взаємодії білка; K: коефіцієнт самотиску;  $\Phi$ : обсяг фракції розчиненого білка).

Результати представлені на фіг. 2: встановлено, що VEGFang2-0016 з AAA-мутаціями в Fc-ділянці має більш низьку в'язкість при всіх температурах, при яких здійснювали вимірювання, порівняно з VEGFang2-0015 без AAA-мутацій в Fc-ділянці.

Температура початку агрегації за даними DLS

Зразки готували в концентрації 1 мг/мл у 20мМ гістидином/хлориді гістидину, 140мМ NaCl, рН 6,0, переносили в оптичний 384-лунковий планшет за допомогою центрифугування через 0,4-мікрометровою фільтрувальну пластину і покривали парафіновим маслом. Гідродинамічний радіус і в цьому випадку вимірювали за допомогою динамічного розсіювання світла, при цьому зразки нагрівали зі швидкістю 0,05 °С/хв. з 25 °С до 80 °С. Температуру початку агрегації визначали як температуру, при якій гідродинамічний радіус починав зростати. Результати представлені на фіг. 3. На фіг. 3 представлені дані про агрегації VEGFang2-0015 без AAA-мутацій у порівнянні з VEGFang2-0016 з AAA-мутаціями в Fc-ділянці. Встановлено, що для VEGFang2-0016 температура початку агрегації становила 61 °С, в той час як у VEGFang2-0015 без AAA-мутацій температура початку агрегації становила 60 °С.

DLS- аналіз в залежності від часу

Зразки готували в концентрації 1 мг/мл у 20мМ гістидином/хлориді гістидину, 140мМ NaCl, рН 6,0, переносили в оптичний 384-лунковий планшет за допомогою центрифугування через

0,4-мікрометрового фільтрувальну пластину і покривали парафіновим маслом. Гідродинамічний радіус і в цьому випадку вимірювали за допомогою динамічного розсіювання світла, при цьому зразки витримували при постійній температурі 50 °C аж до 145 год. В цьому експерименті тенденція до агрегації нативного неуложеного білка при підвищеній температурі може

приводити до збільшення середнього діаметра частинок з плином часу. Зазначений метод на основі DLS є дуже чутливим щодо агрегатів, оскільки їх утворення призводить до надпропорційної зміни інтенсивності розсіювання світла. Навіть після витримання протягом 145 год. при 50 °C (температура, близька до температурі початку агрегації) середній діаметр частинок як VEGFang2-0015, так і VEGFang2-0016 збільшувався менш ніж на 0,5 нм.

Зберігання протягом 7 днів при 40 °C в концентрації 100 мг/мл (підвищення рівня HMW) зразки концентрували до кінцевої концентрації 100 мг/мл в 200мМ сукцинаті аргініну, pH 5,5, стерилізували фільтрацією і зберігали в спокої при 40 °C протягом 7 днів. До і після зберігання визначали вміст високо- і низькомолекулярних видів (HMW і LMW відповідно) за допомогою гель-фільтрації. Різниця у вмісті HMW і LMW між зразками після зберігання та зразками, в яких вимірювання здійснювали відразу після приготування, позначали як "підвищення HMW" і "підвищення LMW" відповідно. Результати, представлені в таблиці 4 і на фіг. 4, продемонстрували, що для VEGFang2-0015 (без AAA-мутації) характерно більш виражене зниження основного піку і більш виражене підвищення HMW в порівнянні з VEGF Ang2-0016 (з AAA-мутацією). При створенні винаходу неочікувано було встановлено, що для VEGF Ang2-0016 (з AAA-мутацією) характерна менша тенденція до агрегації у порівнянні з VEGFang2-0015 (без AAA-мутації).

Таблиця 4

Зміна основного піку і піків, відповідних HMW і LMW, після зберігання протягом 7д при 40 °C

	Зміна площі (%) (40 °C-(-80 °C))		
	Основний пік	HMW	LMW
VEGFang2-0015 (-AAA-мутації)	-3,56	2,89	0,67
VEGFang2-0016 (+AAA-мутації)	-1,74	1,49	0,25

Функціональний аналіз біспецифічних антитіл до VEGF і Ang2 здійснювали за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR), використовуючи пристрій BIAcore® T100 або T200 (фірма GE Healthcare), при 25 °C. Система BIAcore® добре підходить для вивчення молекулярних взаємодій. SPR-технологія заснована на вимірюванні коефіцієнта заломлення поблизу поверхні покритого золотом біосенсорного чіпа. Зміни коефіцієнта заломлення свідчать про зміни маси на поверхні, що викликаються взаємодією іммобілізованого ліганда з аналізованою речовиною, ін'єктованою в розчині. Маса зростає, якщо молекули зв'язуються з іммобілізованими лігандами на поверхні, і навпаки маса знижується в випадку дисоціації аналізованої речовини від іммобілізованого ліганда (відображаючи дисоціацію комплексу). SPR дозволяє здійснювати безперервний моніторинг в реальному часі зв'язування ліганда/аналізованої речовини і таким чином визначати константу швидкості асоціації (ka), константу швидкості дисоціації (kd) і константу рівноваги (KD).

#### Приклад 3

Зв'язування з VEGF, Ang2, FcгаммаR і FcRn

Оцінка кінетики афінності до ізоформ VEGF, включаючи оцінку видової перехресної реактивності

Приблизно 12000 резонансних одиниць (RU) системи для "захоплення" (10 мкг/мл козячого антилюдського F(ab)'<sub>2</sub>; код замовлення: 28958325; фірма GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеція) зшивали з CM5-чіпом (фірма GE Healthcare, BR-1005-30) при pH 5,0, застосовуючи набір для амінного поєднання, що поставляється фірмою GE Healthcare. Буфер для системи і зразка являв собою ЗФР-Т (10 мМ забуферений фосфатом фізіологічний розчин, що включає 0,05 % Твін 20), pH 7,4. Температуру проточної осередки встановлювали на 25 °C, а температуру блоку для зразка встановлювали на 12 °C і примірювали двічі, використовуючи рухливий буфер. Біспецифічне антитіло "захоплювали" шляхом ін'єкції 50 нМ розчину протягом 30 с при швидкості потоку 5 мкл/хв. Асоціацію вимірювали шляхом ін'єкції людського hVEGF121, мишачого mVEGF120 або щурячого rVEGF164 в різних концентраціях в розчині протягом 300 с при швидкості потоку 30 мкл/хв., починаючи з концентрації 300 нМ, застосовуючи розведення 1: 3. Здійснювали моніторинг фази дисоціації протягом періоду часу аж до 1200 с і запускали шляхом заміни розчину зразка на рухливий буфер. Поверхню регенерували шляхом 60-

секундного відмивання за допомогою розчину гліцину, pH 2, при швидкості потоку 30 мкл/хв. Всі відмінності в коефіцієнтах заломлення коректували шляхом вирахування відповіді, отриманої від поверхні, покритої козячим антилюдським F(ab')<sub>2</sub>. Вчитали також дані, отримані при здійсненні контрольних "порожніх" ін'єкцій (подвійний контроль). Для розрахунку уявної величини KD та інших кінетичних параметрів застосовували модель 1: 1 Ленгмюра. Результати

представлені в таблиці 5.

Афінність до Ang2 в розчині, включаючи оцінку видової перехресної реактивності

Оцінка афінності в розчині дозволяє вимірювати афінність взаємодії шляхом визначення концентрації вільних взаємодіючих партнерів у врівноваженій суміші. Аналіз афінності у розчині включає змішання біспецифічного антитіла <VEGF-ANG-2>, зберігаючи його постійну концентрацію, з лігандом (тобто Ang2) у різних концентраціях. Максимальну можливу кількість резонансних одиниць (наприклад, 17000 резонансних одиниць (RU)) антитіла іммобілізували на поверхні CM5-чіпа (фірма GE Healthcare, BR-1005-30) при pH 5,0, використовуючи набір для амінного поєднання, що постачається фірмою GE Healthcare. Буфер для системи і зразка являв собою HBS-P, pH 7,4. Температуру проточної осередки встановлювали на 25 °C, а температуру блоку для зразка встановлювали на 12 °C і примірювали двічі, використовуючи рухливий буфер. Для одержання калібрувальної кривої Ang2 у зростаючих концентраціях ін'єктували у проточний осередок пристрою BIAcore, що містить іммобілізоване біспецифічне антитіло до VEGF-ANG-2. Кількість зв'язаного Ang2 оцінювали у резонансних одиницях (RU) і будували графік залежності від концентрації. Розчини кожного ліганда (11 концентрацій у діапазоні від 0 до 200нМ біспецифічного антитіла до VEGF-ANG-2) інкубували з 10нМ Ang2 і давали досягати рівноваги при кімнатній температурі. Концентрації вільного Ang2 визначали з використанням калібрувальної кривої, створеної до і після вимірювання відповіді в розчинах з відомими кількостями Ang2. 4-параметричну підгонку здійснювали за допомогою XLfit4 (програма фірми IDBS) з моделлю 201, відкладаючи концентрацію вільного ANG-2 на у-осі і концентрацію інгібуючого антитіла на х-осі. Афінність розраховували, визначаючи точку вигину цієї кривої. Поверхню регенерували шляхом одноразового відмивання протягом 30 з 0,85 %- ним розчином H3PO4 при швидкості потоку 30 мкл/хв. Всі відмінності в коефіцієнтах заломлення коректували шляхом вирахування відповіді, отриманої від поверхні, покритої "порожнім" контролем. Результати представлені в таблиці 6.

Афінність до FcRn у стабільному стані

Для порівняння біспецифічних антитіл один з одним визначали афінність до FcRn у стабільному стані. Людський FcRn розводили у буфері для поєднання (10 мкг/мл Na-ацетату, pH 5,0) та іммобілізували на C1-чіпі (фірма GE Healthcare, BR-1005-35), використовуючи процедуру спрямованої іммобілізації, застосовуючи пристрій BIAcore, до досягнення кінцевої відповіді 200 RU. Температуру проточної осередки встановлювали на 25 °C, а температуру блоку для зразка встановлювали на 12 °C і двічі примірювали, використовуючи рухливий буфер. Буфер для системи і зразка являв собою 3ФР-Т (10мМ забуферений фосфатом фізіологічний розчин, що включає 0,05 % Твін 20) pH 6,0. Для дослідження кожного антитіла застосовували різні концентрації IgG, що становлять 62,5, 125, 250 і 500нМ. Швидкість потоку становила 30 мкл/хв. і різні зразки ін'єктували послідовно на поверхню чіпа, при цьому в якості періоду асоціації був вибраний проміжок часу, що становить 180 с. Поверхню регенерували шляхом ін'єкції 3ФР-Т, pH 8 протягом 60 с при швидкості потоку 30 мкл/хв. Всі відмінності в коефіцієнтах заломлення коректували шляхом вирахування відповіді, отриманої від "порожньої" поверхні. Вчитали також результати, отримані при ін'єкціях буфера (тобто застосовували подвійний контроль). Для розрахунку афінності у стабільному стані застосовували метод, що входить у програму Bia-Evaluation. В цілому, метод полягав у наступному: будували графік залежності величини RU (RU max) від аналізованих концентрацій, отримуючи криву дозової залежності. На основі 2-параметричної підгонки розраховували верхню асимптоту, що дозволяло визначати величину RU, що становить половину від максимальної, і таким чином визначати афінність. Результати представлені на фіг. 5 і у таблиці 7. Аналогічним чином визначав афінність до FcRn мавп ціномолгус (супо), мишей і кроликів.

Оцінка зв'язування FcгаммаRIIIa

Для вимірювання афінності до FcгаммаRIIIa застосовували прямий аналіз зв'язування. Систему для "захоплення" (1 мкг/мл пента-His; фірма Qiagen) (приблизно 3000 резонансних одиниць (RU)) зшивали з CM5-чіпом (фірма GE Healthcare, BR-1005-30) при pH 5,0, використовуючи набір для амінного поєднання, що постачається фірмою GE Healthcare. Буфер для системи і зразка являв собою HBS-P, pH 7,4. Температуру проточної осередки встановлювали на 25 °C, а температуру блоку для зразка встановлювали на 12 °C і примірювали двічі, використовуючи рухливий буфер. FcгаммаRIIIa-His-рецептор "захоплювали"

шляхом ін'єкції 100нМ розчину протягом 60 с при швидкості потоку 5 мкл/хв. Зв'язування оцінювали шляхом ін'єкції 100нМ біспецифічного антитіла або моноспецифічних контрольних антитіл (анти-Dlg для антитіла IgG1-підкласу та IgG4-підкласу) протягом 180 с при швидкості потоку 30 мкл/хв. Поверхню регенерували шляхом відмивання протягом 120 з розчином гліцину, рН 2,5 при швидкості потоку 30 мкл/хв. Оскільки зв'язування FcгаммаRIIIa відрізняється від моделі зв'язування 1: 1 Ленгмюра, у цьому аналізі визначали тільки наявність зв'язування/відсутність зв'язування. Аналогічним чином можна визначати зв'язування FcгаммаRIa і FcгаммаRIIa. З результатів, представлених на фіг. 6, випливає, що після інтродукції мутації P329G LALA не вдалося виявити зв'язування з FcгаммаRIIIa.

Оцінка незалежного зв'язування VEGF і Ang2 з біспецифічними антитілами <VEGF-ANG-2>

Приблизно 3500 резонансних одиниць (RU) системи для "захоплення" (10 мкг/мл козячого антилюдського IgG; фірма GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеція) зшивали з CM4-чіпом (фірма GE Healthcare BR-1005-34) при рН 5, 0, використовуючи набір для амінного поєднання, що постачається фірмою GE Healthcare. Буфер для системи і зразка являв собою ЗФР-Т (10мМ забуферений фосфатом фізіологічний розчин, що включає 0,05 % Твін 20) рН 7,4. Температуру проточної осередки встановлювали на 25 °С, а температуру блоку для зразка встановлювали на 12 °С. Перед "захопленням" проточний осередок двічі примірували, використовуючи рухливий буфер.

Біспецифічне антитіло "захоплювали" шляхом ін'єкції 10нМ розчину протягом 60 с зі швидкістю 5 мкл/хв. Незалежне зв'язування кожного ліганда з біспецифічним антитілом аналізували, визначаючи здатність активного зв'язування для кожного ліганда, які додавали або послідовно, або одночасно (швидкість 30 мкл/хв.), згідно з описаними нижче варіантами:

1. Ін'єкція людського VEGF у концентрації 200нМ протягом 180 с (демонструє індивідуальне зв'язування антигену).

2. Ін'єкція людського Ang2 у концентрації 100нМ протягом 180 с (демонструє індивідуальне зв'язування антигену).

3. Ін'єкція людського VEGF у концентрації 200нМ протягом 180 с з наступною додатковою ін'єкцією людського Ang2 у концентрації 100нМ протягом 180 с (демонструє зв'язування Ang2 у присутності VEGF).

4. Ін'єкція людського Ang2 у концентрації 100нМ протягом 180 с з наступною додатковою ін'єкцією людського VEGF у концентрації 200нМ (демонструє зв'язування VEGF у присутності Ang2).

5. Спільна ін'єкція людського VEGF у концентрації 200нМ і людського Ang2 у концентрації 100нМ протягом 180 с (демонструє одночасне зв'язування VEGF і Ang2).

Поверхню регенерували в допомогою відмивання протягом 60 с 3 мм розчином MgCl<sub>2</sub> при швидкості потоку 30 мкл/хв. Всі відмінності в коефіцієнтах заломлення коректували шляхом вирахування відповіді, отриманої від поверхні, сенсibilізованої антилюдським IgG.

Вважається, що біспецифічне антитіло має здатність зв'язуватися з обома антигенами незалежно один від одного, якщо утворюється кінцевий сигнал, отриманий при застосуванні підходів 3, 4 і 5, дорівнює або близький до суми індивідуальних кінцевих сигналів, отриманих при застосуванні підходів 1 і 2. Результати, представлені у таблиці 9, демонструють, що обидва антитіла VEGFang2-0016, VEGFang2-0012 мали здатність незалежно один від одного зв'язуватися з VEGF і ANG2.

Оцінка одночасного зв'язування VEGF і Ang2 з біспецифічними антитілами <VEGF-ANG-2>

По-перше, зшивали приблизно 1600 резонансних одиниць (RU) VEGF (20 мкг/мл) з CM4-чіпом (фірма GE Healthcare, BR-1005-34) при рН 5,0, використовуючи набір для амінного поєднання, що постачається фірмою GE Healthcare. Буфер для системи і зразка представляв собою ЗФР-Т (10мМ забуферений фосфатом фізіологічний розчин, що включає 0,05 % Твін 20), рН 7,4. Температуру проточної осередки встановлювали на 25 °С, а температуру блоку для зразка встановлювали на 12 °С і примірували двічі, використовуючи рухливий буфер. По-друге, 50нМ розчин біспецифічного антитіла ін'єктували протягом 180 с зі швидкістю 30 мкл/хв. По-третє, hAng-2 ін'єктували протягом 180 с зі швидкістю 30 мкл/хв. Відповідь у вигляді зв'язування hAng-2 залежала від кількості біспецифічного антитіла, пов'язаного з VEGF, і вона свідчила про одночасне зв'язування. Поверхню регенерували шляхом відмивання протягом 60 с в допомогою 0,85 %-ного розчину H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> при швидкості потоку 30 мкл/хв. Про наявність одночасного зв'язування свідчить додатковий специфічний сигнал зв'язування hAng2 відносно попереднього сигналу зв'язування VEGF з біспецифічними антитілами <VEGF-ANG-2>. Для обох біспецифічних антитіл VEGFang2-0015 і VEGFang2-0016 вдалося виявити одночасне зв'язування VEGF і Ang2 з біспецифічними антитілами <VEGF-ANG-2> (дані не представлені).

Таблиця 5

Результати: Кінетики афінності до ізоформ VEGF з різних видів

	VEGFang2-0015 - уявна афінність	VEGFang2-0016 - уявна афінність	VEGFang2-0012 - уявна афінність	VEGFang2-0201 - уявна афінність
людський VEGF 121	≤1пМ (за Biacore- специфікацією)	≤1пМ (за Biacore- специфікацією)	≤1пМ (за Biacore- специфікацією)	≤1пМ (за Biacore- специфікацією)
мишачий VEGF 120	немає зв'язування	немає зв'язування	немає зв'язування	немає зв'язування
щурячий VEGF 164	13нМ	14нМ	24нМ	35нМ

Таблиця 6

Результати: Афінність до Ang2 у розчині

	VEGFang2-0015, KD [нМ]	VEGFang2-0016, KD [нМ]	VEGFang2-0012, KD [нМ]	VEGFang2—0201, KD [нМ]
людський Ang2	8	20	20	Tbd (підлягає визначенню)
супо Ang2	5	13	10	Tbd
мишачий Ang2	8	13	8	Tbd
кролячий Ang2	4	11	8	Tbd

5

Таблиця 7

Результати: Афінність до FcRn біспецифічних антитіл &lt;VEGF-ANG-2&gt;

	VEGFang2-0015 [афінність]	VEGFang2-0016 [афінність]	VEGFang2-0012 [афінність]	VEGFang2--0201 [афінність]
людський FcRn	0,8мкМ	немає зв'язування	немає зв'язування	0,8мкМ
супо FcRn	0,9мкМ	немає зв'язування	немає зв'язування	1,0мкМ
мишачий FcRn	0,2мкМ	немає зв'язування	немає зв'язування	0,2мкМ

Таблиця 8

Результати: Связывание с FcгаммаRI-IIIa

	VEGFang2-0015	VEGFang2-0016	VEGFang2-0012	VEGFang2-0201
FcγRIa	немає зв'язування	немає зв'язування	зв'язування	зв'язування
FcγRIIa	немає зв'язування	немає зв'язування	немає зв'язування	зв'язування
FcγRIIIa	немає зв'язування	немає зв'язування	немає зв'язування	зв'язування

Таблиця 9

Результати: Незалежне зв'язування VEGF і Ang2 з біспецифічними антитілами &lt;VEGF-ANG-2&gt;

	1) Ang2 [RUmax]	2) VEGF [RUmax]	3) спочатку VEGF, потім Ang2 [RUmax]	4) спочатку Ang2, потім VEGF [RUmax]	5) Спільна ін'єкція Ang2+VEGF [RUmax]
VEGFang2-0016	174	50	211	211	211
VEGFang2-0012	143	43	178	177	178

## Приклад 4

## 5 Мас-спектрометрія

У даному розділі описана характеристика біспецифічних антитіл <VEGF-ANG-2> відносно правильної збірки. Передбачувані первинні структури підтверджували за допомогою мас-спектрометрії з іонізацією електроспреем (ESI-MC) деглікозильованих та інтактних або розщеплених за допомогою IdeS (розщеплюючий IgG фермент з *S. pyogenes*) біспецифічних антитіл <VEGF-ANG-2>. Розщеплення за допомогою IdeS здійснювали з використанням 100 мкг очищеного антитіла, яке інкубували з 2 мкг IdeS-протеази (фірма Roche) у буфері, що містить 100 ммоль/л  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,1, при 37 °C протягом 5 год. Потім антитіла деглікозильовали за допомогою N-глікозидози F, нейрамінідази і O-глікозидози (фірма Roche) у буфері, що містить 100 ммоль/л  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,1, при 37 °C протягом аж до 16 год., використовуючи білок у концентрації 1 мг/мл, і потім здійснювали знесолення за допомогою PXBP на колонці сефадекс G25 (фірма GE Healthcare). Загальну масу визначали за допомогою ESI-MC, застосовуючи MC-систему maXis 4G UHR-QTOF (фірма Bruker Daltonik), забезпечену джерелом TriVersa NanoMate (фірма Advion).

Маси, встановлені для розщеплених IdeS, деглікозильованих (таблиця 10) або інтактних деглікозильованих (таблиця 11) молекул, відповідали передбаченим масам, які виводили на основі амінокислотних послідовностей біспецифічних антитіл <VEGF-ANG-2>, що складаються з двох різних легких ланцюгів  $\text{LC}_{\text{Ang2}}$  і  $\text{LC}_{\text{луцентис}}$  (ранібізумаб) і двох різних важких ланцюгів  $\text{HC}_{\text{Ang2}}$  і  $\text{HC}_{\text{луцентис}}$ .

Таблиця 10

Маси деглікозильованих і розщеплених за допомогою IdeS біспецифічних антитіл <VEGF/ANG2>, таких як VEGFang2-0201 (без AAA-мутації) і VEGFang2-0012 (з AAA-мутацією)

Зразок	F(ab') <sub>2</sub> біспецифічного антитіла <VEGF-ANG-2>		Деглікозильована Fc біспецифічного антитіла <VEGF-ANG-2>	
	Передбачена середня маса [Да]	Виявлена середня маса [Да]	Передбачена середня маса [Да]	Виявлена середня маса [Да]
VEGFang2-0201	99360,8	99360,7	47439,2	47430,1
VEGFang2-0012	99360,8	99361,1	47087,7	47082,0

Таблиця 11

Маси деглікозильованих біспецифічних антитіл <VEGF/ANG2>, таких як VEGFang2-0016 (з AAA-мутацією) і VEGFang2-0015 (без AAA-мутації)

	Деглікозильоване біспецифічне антитіло <VEGF-ANG-2>	
	Передбачена середня маса [Да]	Виявлена середня маса [Да]
VEGFang2-0016	146156,9	146161,2
VEGFang2-0015	146505,3	146509,4

#### Приклад 5

Хроматографія для оцінки зв'язування Fc-Rn

5 Поєднання зі стрептавідин-сефарозою:

Додавали 1 г стрептавідин-сефарози (фірма GE Healthcare) до біотинільованого і підданого діалізу рецептору і інкубували протягом 2 год. при струшуванні. Дериватизованою рецептором сефарозою заповнювали 1-мілілітрову ХК-колону (фірма GE Healthcare).

Хроматографія із застосуванням афінної FcRn-колони:

10 Умови:

розміри колонки: 50 мм × 5 мм,

висота шару: 5 см,

завантаження: 50 мкг зразка,

буфер для врівноваження: 20мМ MES с 150мМ NaCl, регулюючий значення pH до 5,5,

15 буфер для елюції: 20мМ Тріс/HCl с 150мМ NaCl, регулюючий значення pH до 8,8,

елюція: 7,5 CV (обсяг колонки) буфера для врівноваження у від 30 CV до 100 % буфера для елюції, 10 CV буфера для елюції.

Колонкова хроматографія на основі афінності до huFcRn

20 У наведеній нижче таблиці представлені дані про часи утримування біспецифічних антитіл <VEGF-ANG-2> на колонках для афінної хроматографії, що містять людський FcRn. Дані одержували з використанням зазначених вище умов. У наведеній нижче таблиці представлені дані про часи утримування біспецифічних антитіл <VEGF-ANG-2> на людському FcRn.

Таблиця 12

Результати: Часи утримування біспецифічних антитіл <VEGF-ANG-2>

Антитіло	Час утримування [хв.]
VEGFang2-0015 (без AAA-мутації)	78,5
VEGFang2-0201 (без AAA-мутації)	78,9
VEGFang2-0012 (з AAA-мутацією)	2,7 ("пустий" пік)
VEGFang2-0016 (з AAA-мутацією)	2,7 ("пустий" пік)

#### 25 Приклад 6

Фармакокінетичні (ФК) властивості

ФК дані відносно Fc-Rn, одержані на мишах, трансгенних за людським FcRn

Фаза прижиттєвих досліджень

30 Дослідження проводили на самках мишей C57BL/6J (фон); мишей з дефіцитом FcRn, але гемізиготних трансгенних за людським FcRn (huFcRn, лінія 276 -/tg)

Частина 1

Всім мишам ін'єктували одноразово інтравітреально у праве око 2 мкл/тварина відповідного розчину (тобто 21 мкг сполуки/тварина (VEGFang2-0015 (без AAA-мутації) або 23,6 мкг сполуки/тварина (VEGFang2-0016 (з AAA-мутацією).

35 Мишей підрозділяли на 2 групи по 6 тварин у кожній. Одержували зразки крові у тварин групи 1 через 2, 24 і 96 год., а у тварин групи 2 через 7, 48 і 168 год. після дозування.

40 Здійснювали ін'єкцію у склоподібне тіло правого ока мишей за допомогою системи, що включає мікрошприц NanoFil, для нанолітрових ін'єкцій фірми World Precision Instruments, Inc., Берлін, Німеччина. Мишей анестезували за допомогою 2,5 % ізофлурану і для візуалізації ока мишей застосовували мікроскоп Leica MZFL 3 з 40-кратним збільшенням і джерелом кільцевого світла Leica KL 2500 LCD. Потім 2 мкл сполуки ін'єктували за допомогою голки 35-розміру.



Кров збирали з ретробульбарного венозного сплетення контралатерального ока кожної тварини для визначення рівнів сполуки у сироватці.

Зразки сироватки обсягом щонайменше 50 мкл одержували з крові після витримування протягом 1 год. при 4 °C шляхом центрифугування (9300×g) при 4 °C протягом 3 хв. Зразки сироватки заморожували безпосередньо після центрифугування і зберігали у замороженому стані при -80 °C до аналізу. Оброблені очі тварин з групи 1 виділяли через 96 годин після обробки, у тварин з групи 2 - через 168 годин після обробки. Зразки зберігали в замороженому стані при -80 °C до аналізу.

#### Частина 2

Всім мишам ін'єктували одноразово внутрішньовенно через хвостову вену по 200 мкл/тварина відповідного розчину (тобто 21 мкг сполуки/тварина (VEGFAng2-0015 (без AAA-мутації) або 23,6 мкг сполуки/тварина (VEGFAng2-0016 (з AAA мутації)).

Мишей підрозділяли на 2 групи по 5 тварин у кожній. Одержували зразки крові у тварин групи 1 через 1, 24 і 96 год., а у тварин групи 2 через 7, 48 і 168 год. після дозування. Кров збирали з ретробульбарного венозного сплетення кожної тварини для визначення рівнів сполуки у сироватці.

Зразки сироватки обсягом щонайменше 50 мкл одержували з крові після витримування протягом 1 год. при 4 °C шляхом центрифугування (9300 × g) при 4 °C протягом 3 хв. Зразки сироватки заморожували безпосередньо після центрифугування і зберігали у замороженому стані при -80 °C до аналізу.

#### Одержання лізатів всього ока (мишей)

Лізати очей одержували шляхом фізико-хімічного розщеплення всього ока лабораторних тварин. Для механічного руйнування кожне око переносили у мікропробірку з конічним дном об'ємом 1,5 мл. Після заморожування-відтавання ока промивали одноразово промивальним буфером (фірма Bio-Rad, набір для лізису клітин Bio-Plex, каталожний № 171-304011). На наступній стадії додавали 500 мкл свіжоприготованого буфера для лізису клітин і очі подрібнювали за допомогою 1,5-мілілітрового пестика для подрібнення тканин (фірма Kimble Chase, 1,5-мілілітровий пестик, артикул № 749521-1500). Потім суміш 5 разів піддавали заморожуванню і відтаванню і знову подрібнювали. Для відділення лізату від решти тканини зразки центрифугували протягом 4 хв. при 4500 × g. Після центрифугування супернатант збирали і зберігали при -20 °C для додаткового аналізу за допомогою кількісного ELISA.

#### Аналіз

Концентрації антитіл <VEGF/ANG2> у сироватці і лізатах очей мишей визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA).

Для кількісної оцінки антитіл <VEGF/ANG2> у зразках сироватки і лізатах очей мишей здійснювали стандартний твердофазний серійний сендвіч-імуноаналіз із застосуванням біотинільованого і дігіоксигенованого моноклональних антитіл в якості іммобілізованого ("захоплюючого") і ідентифікуючого антитіл. Підтвердженням збереження біспецифічності аналізованої сполуки повинно бути те, що біотинільоване "захоплююче" антитіло розпізнає анти-VEGF-зв'язуючий сайт, у той час як дігіоксигеноване ідентифікуюче антитіло зв'язується з анти-Ang2-зв'язуючим сайтом аналізованої сполуки. Зв'язаний імунний комплекс, що включає "захоплююче" антитіло, аналізовану сполуку і ідентифікуюче антитіло, на твердій фазі сенсibiliзованого стрептавідином тітраційного мікропланшету (SA-MTP) потім виявляли за допомогою зшитого з пероксидазою із хрому антитіла до дігіоксигеніну. Після відмивання незв'язаного матеріалу з SA-MTP і додавання ABTS-субстрату одержаний сигнал пропорційний кількості аналізованої сполуки, пов'язаної з твердою фазою SA-MTP. Потім здійснювали кількісну оцінку шляхом перетворення вимірних сигналів зразків у концентрації, визначені відносно калібраторів, аналізованих паралельно.

На першій стадії SA-MTP сенсibiliзували, використовуючи 100 мкл/лунку розчину біотинільованого "захоплюючого" антитіла (Mat<Id<VEGF>>M-2.45.51-IgG-Bi(DDS)) у концентрації 1 мкг/мл протягом 1 год. при 500 об./хв. на MTP-шейкері. Тим часом готували калібратори, QC-зразки (зразки для контролю якості) і зразки. Калібратори і QC-зразки розводили до 2 % сироватковою основою; зразки розводили до тих пір, поки сигнали не потрапляли у лінійну ділянку калібраторів.

Після сенсibiliзації SA-MTP "захоплюючим" антитілом планшет промивали тричі промивальним буфером, використовуючи 300 мкл/лунку. Потім за допомогою піпетки вносили по 100 мкл/лунку калібраторів, QC-зразків і зразків у SA-MTP і знову інкубували протягом 1 год. при 500 об./хв. При цьому аналізована сполука пов'язувалося з допомогою її анти-VEGF-зв'язуючого сайту через "захоплююче" антитіло з твердою фазою SA-MTP. Після інкубації і видалення непов'язаної аналізованої сполуки шляхом промивання планшета у SA-MTP

додавали по 100 мкл/лунку першого ідентифікуючого антитіла (МАт<Id-<Ang2>>M-2.6.81-IgG-Dig(XOSu)) в концентрації 250 нг/мл. І в цьому випадку планшет інкубували протягом 1 год. при 500 об./хв. на шейкері. Після промивання у лунки SA-MTP додавали по 100 мкл/лунку другого ідентифікуючого антитіла (ПАТ <дигоксігенін> S-Fab-POD (поли)) у концентрації 50 мед./мл і планшет знову інкубували протягом 1 год. при 500 об./хв. Після кінцевої стадії промивки для видалення ідентифікуючого антитіла додавали по 100 мкл/лунку субстрату (ABTS). Кон'югат антитіло-фермент каталізував кольорову реакцію ABTS®-субстрату. Потім сигнал вимірювали за допомогою рідера для ELISA при довжині хвилі 405 нм (довжина референс-хвилі: 490 нм ([405/490] нм)).

Оцінка фармакокінетики

Фармакокінетичні параметри розраховували за допомогою некомпартментального аналізу, використовуючи програму для оцінки фармакокінетичних параметрів WinNonlin™ (фірма Pharsight), версія 5.2.1.

Результати: А) Концентрації у сироватці

Результати визначення концентрацій у сироватці представлені в таблицях 13-16 і на фіг. 7Б-7В.

Таблица 13

VEGFAng2-0015 (без AAA-мутації): порівняння концентрацій  
в сироватці після інтравітреального і внутрішньовенного введення

	Концентрація у сироватці після інтравітреального введення	Концентрація у сироватці після внутрішньовенного введення
Час	Середня конц. [мкг/мл]	Середня конц. [мкг/мл]
1 г		17,7
2 г	9,8	
7 г	10,4	12,1
24 г	6,4	8,3
48 г	6,5	6,9
96 г	3,4	4,1
168 г	2,9	2,7

Таблица 14

VEGFAng2-0016 (з AAA-мутацією): порівняння концентрацій  
у сироватці після інтравітреального і внутрішньовенного введення

	Концентрація у сироватці після інтравітреального введення	Концентрація у сироватці після внутрішньовенного введення
Час	Середня конц. [мкг/мл]	Середня конц. [мкг/мл]
1 г		18,4
2 г	7,0	
7 г	8,7	10,0
24 г	2,2	3,3
48 г	1,0	1,0
96 г	0,1	0,1
168 г	0,0	0,0

Таблиця 15

VEGFang2-0015 (без AAA-мутації) і VEGFang2-0016  
(з AAA-мутацією): порівняння концентрацій у сироватці після інтравітреального введення

	VEGFang2-0015 (без AAA-мутації)	VEGFang2-0016 (з AAA-мутацією)
Час	Середня конц. [мкг/мл]	Середня конц. [мкг/мл]
2 г	9,8	7,0
7 г	10,4	8,7
24 г	6,4	2,2
48 г	6,5	1,0
96 г	3,4	0,1
168 г	2,9	0,0

Таблиця 16

VEGFang2-0015 (без AAA-мутації) і VEGFang2-0016  
(з AAA-мутацією): порівняння концентрацій у сироватці після внутрішньовенного

	VEGFang2-0015 (без AAA-мутації)	VEGFang2-0016 (з AAA-мутацією)
Час	Середня конц. [мкг/мл]	Середня конц. [мкг/мл]
1 г	17,7	18,4
7 г	12,1	10,0
24 г	8,3	3,3
48 г	6,9	1,0
96 г	4,1	0,1
168 г	2,7	0,0

- 5 Результати: Б) Концентрації в очних лізатах лівих і правих очей  
Результати визначення концентрацій в очних лізатах представлені в таблицях 17-18 і на фіг. 7Г-7Д.

Таблиця 17а

Концентрації VEGFang2-0015 (без AAA-мутації)  
в очних лізатах після інтравітреального введення в праве око

Середні величини конц. для n=6 мишей		
Час		Середня конц. [нг/мл]
96 г	ліве око	8,7
	праве око	46,1
168 г	ліве око	4,3
	праве око	12,9

Таблиця 176

Концентрації VEGFang2-0015 (без AAA-мутації)  
в очних лізатах після внутрішньовенного введення

Середні величини конц. для n=5 мишей		
Час		Середня конц. [нг/мл]
96 г	ліве око	4,2
	праве око	7,5
168 г	ліве око	3,4
	праве око	6,1

Таблиця 18a

Концентрації VEGFang2-0016 (з AAA-мутаціями)  
в очних лізатах після інтравітреального введення в праве око

Середні величини конц. Для n=5 мишей		
Час		Середня конц. [нг/мл]
96 г	ліве око	0,3
	праве око	34,5
168 г	ліве око	0,1
	праве око	9,0

5

Таблиця 186

Концентрації VEGFang2-0016 (з AAA-мутаціями)  
в очних лізатах після внутрішньовенного введення

Середні величини конц. Для n=5 мишей		
Час		Середня конц. [нг/мл]
96 г	ліве око	0,0
	праве око	0,1
168 г	ліве око	0,0
	праве око	0,1

Узагальнення результатів:

Після інтравітреального введення біспецифічного антитіла <VEGF/ANG2>, запропонованого у винаході, такого як VEGFang2-0016 (з AAA-мутацією), в очних лізатах виявлені його концентрації (через 96 і 168 ч), близькі до концентраціями біспецифічного антитіла <VEGF/ANG2> без AAA-мутації, такого як VEGFang2-0015.

Крім того, після інтравітреального введення біспецифічного антитіла <VEGF/ANG2>, запропонованого у винаході, такого як VEGFang2-0016 (з AAA-мутацією), виявлені також більш швидкий кліренс і більш короткий час напівжиття в сироватці в порівнянні з біспецифічним антитілом <VEGF/ANG2> без AAA-мутації, таким як VEGFang2-0015.

Приклад 7

Аналіз ангіогенезу в мікрокишені рогівки мишей

Для оцінки антиангіогенної дії біспецифічного антитіла <VEGF/ANG2> з відповідними послідовностями анти-VEGF VH і VL SEQ ID NO: 7 та 8 і анти-ANG2 VH і VL SEQ ID NO: 15 і 16 щодо індукованого VEGF ангіогенезу in vivo, при створенні винаходу здійснювали аналіз ангіогенезу в рогівці мишей. При здійсненні цього аналізу насичений VEGF Nylafo-диск імплантували в кишеню з безсудинної рогівки на фіксованій відстані від судин лімба. У відповідь на створення градієнта VEGF в рогівці відразу починався ріст судин. Дослідження проводили на самках мишей лінії Balb/c віком 8-10 тижнів, яких купували у фірми Charles River, Сульцфельд,

Німеччина. Протокол модифікували згідно методу, описаного у Rogers MS та ін., Nat. Protoc. 2, 2007, сс. 2545-2550. В цілому, метод полягав у наступному: у анестезованих мишей створювали під мікроскопом мікрокишені глибиною приблизно 500 мкм на відстані приблизно 1 мм від лімба до верхньої частини рогівки, використовуючи хірургічне лезо і гострі пінцети. Імплантували диск (Nylaflo®, фірма Pall Corporation, шт. Мічиган) діаметром 0,6 мм і поверхню ділянки імплантації вирівнювали. Диски інкубували у відповідному факторі зростання або наповнювачі протягом щонайменше 30 хв. Через 3, 5 і 7 днів (або в іншому варіанті тільки після 3, 5 або 7 днів) очі фотографували і оцінювали судинну відповідь. Результати аналізу висловлювали кількісно, розраховуючи відсоток ділянки нових судин щодо загальної площі рогівки.

Диски просочували 300 нг VEGF або ЗФР в якості контролю та імпантували на 7 днів. Вирости судин з лімба в диск оцінювали в день 3, 5 і/або 7. За 1 день до імплантації диска внутрішньовенно вводили антитіло в дозі 10 мг/кг (завдяки тому, що при внутрішньовенному застосуванні стабільне в сироватці антитіло VEGFang2-0015 (без AAA-мутації), яке відрізнялося від VEGFang2-0016 тільки AAA-мутацією і мало такі ж анти-VEGF і анти-ANG2 VH- і VL-ділянки, що опосередковують ефективність, його застосовували в якості замісника зазначеного антитіла) для тестування антиангіогенної дії відносно індукованого VEGF ангіогенезу in vivo. Тварин у контрольній групі обробляли наповнювачем. Застосовуваний обсяг становив 10 мл/кг.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Роше Глікарт АГ

<120> Біспецифічні антитіла до VEGF/до ANG-2 та їх застосування  
для лікування судинних очних захворювань

<130> 31094 WO

<150> EP12176299.1

<151> 2012-07-13

<160> 50

<170> PatentIn, версія 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> CDR3H важкого ланцюга, <VEGF>ранібізумаб

<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> Штучна

<220>

<223> CDR2H важкого ланцюга, <VEGF>ранібізумаб

<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> Штучна

<220>  
 <223> CDR1H важкого ланцюга, <VEGF>ранібізумаб

<400> 3

His Tyr Gly Met Asn  
 1 5

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

<220>  
 <223> CDR3L легкого ланцюга, <VEGF>ранібізумаб

<400> 4

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr  
 1 5

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

<220>  
 <223> CDR2L легкого ланцюга, <VEGF>ранібізумаб

<400> 5

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser  
 1 5

<210> 6  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

<220>

<223> CDR1L легкого ланцюга, <VEGF>ранібізумаб

<400> 6

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

<210> 7

<211> 123

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, <VEGF>ранібізумаб

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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



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

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> варіабельний домен легкого ланцюга VL, <VEGF>ранібізумаб

<400> 8

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> Штучна

<220>

<223> CDR3H важкого ланцюга, <ANG-2> варіант 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> Штучна

<220>

<223> CDR2H важкого ланцюга, <ANG-2> варіант 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> Штучна

<220>

<223> CDR1H важкого ланцюга, <ANG-2> варіант Ang2i\_LC10

<400> 11

Gly Tyr Tyr Met His  
1 5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> CDR3L легкого ланцюга, <ANG-2> варіант 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> Штучна

<220>

<223> CDR2L легкого ланцюга, <ANG-2> варіант Ang2i\_LC10

<400> 13

Asp	Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ser
1				5		

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> CDR1L легкого ланцюга, <ANG-2> варіант 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> Штучна

<220>

<223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, <ANG-2> варіант 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> Штучна

<220>

<223> варіабельний домен легкого ланцюга VL, <ANG-2> варіант  
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  
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  
100 105 110

<210> 17

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly  
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18

<211> 496

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Trp Gln Ile Val Phe Phe Thr Leu Ser Cys Asp Leu Val Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Ala Tyr Asn Asn Phe Arg Lys Ser Met Asp Ser Ile Gly Lys Lys  
20 25 30

Gln Tyr Gln Val Gln His Gly Ser Cys Ser Tyr Thr Phe Leu Leu Pro  
35 40 45

Glu Met Asp Asn Cys Arg Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Val Ser Asn Ala  
50 55 60

Val Gln Arg Asp Ala Pro Leu Glu Tyr Asp Asp Ser Val Gln Arg Leu  
65 70 75 80

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

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

Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn Gln Thr Ala Val Met Ile Glu Ile Gly  
115 120 125

Thr Asn Leu Leu Asn Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys Leu Thr Asp  
130 135 140

Val Glu Ala Gln Val Leu Asn Gln Thr Thr Arg Leu Glu Leu Gln Leu  
145 150 155 160

Leu Glu His Ser Leu Ser Thr Asn Lys Leu Glu Lys Gln Ile Leu Asp  
165 170 175

Gln Thr Ser Glu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Lys Asn Ser Phe Leu Glu  
180 185 190

Lys Lys Val Leu Ala Met Glu Asp Lys His Ile Ile Gln Leu Gln Ser  
195 200 205

Ile Lys Glu Glu Lys Asp Gln Leu Gln Val Leu Val Ser Lys Gln Asn  
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



370 375 380  
 Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg  
 385 390 395 400  
 Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile  
 405 410 415  
 Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys  
 420 425 430  
 Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp  
 435 440 445  
 Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln  
 450 455 460  
 Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser  
 465 470 475 480  
 Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala Asp Phe  
 485 490 495  
 <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
Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser		
180	185	190
Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu		
195	200	205
Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr		
210	215	220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Phe

<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

Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser  
145 150 155 160

Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val  
165 170 175

His Leu Pro His Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg  
180 185 190

Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val  
195 200 205

Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn His Leu Cys  
210 215 220

Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys  
225 230 235 240

Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu  
245 250 255

Leu His Thr Phe Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu  
260 265 270

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

Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys His Pro  
290 295 300

Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly  
305 310 315 320

Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln  
325 330 335

Gly Leu Gln Cys Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Thr Pro Lys Ile  
340 345 350

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

Ile Cys Lys Ala Ser Gly Trp Pro Leu Pro Thr Asn Glu Glu Met Thr  
370 375 380

Leu Val Lys Pro Asp Gly Thr Val Leu His Pro Lys Asp Phe Asn His  
385 390 395 400

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

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

Val Glu Lys Pro Phe Asn Ile Ser Val Lys Val Leu Pro Lys Pro Leu

435	440	445
Asn Ala Pro Asn Val Ile Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Val Ile Asn		
450	455	460
Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Pro Ile Lys Ser Lys Lys		
465	470	475 480
Leu Leu Tyr Lys Pro Val Asn His Tyr Glu Ala Trp Gln His Ile Gln		
485	490	495
Val Thr Asn Glu Ile Val Thr Leu Asn Tyr Leu Glu Pro Arg Thr Glu		
500	505	510
Tyr Glu Leu Cys Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly Gly Glu Gly		
515	520	525
His Pro Gly Pro Val Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro		
530	535	540
Pro Pro Arg Gly Leu Asn Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Thr Leu Asn		
545	550	555 560
Leu Thr Trp Gln Pro Ile Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Val		
565	570	575
Glu Val Glu Arg Arg Ser Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys		
580	585	590
Val Pro Gly Asn Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu His Pro Arg		
595	600	605
Glu Gln Tyr Val Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu		
610	615	620

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

Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val  
645 650 655

Ile Ser Trp Thr Ile Leu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Thr Ile  
660 665 670

Arg Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Val Asp Val Lys  
675 680 685

Ile Lys Asn Ala Thr Ile Thr Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro  
690 695 700

Glu Thr Ala Tyr Gln Val Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser  
705 710 715 720

Ser Asn Pro Ala Phe Ser His Glu Leu Val Thr Leu Pro Glu Ser Gln  
725 730 735

Ala Pro Ala Asp Leu Gly Gly Gly Lys Met Leu Leu Ile Ala Ile Leu  
740 745 750

Gly Ser Ala Gly Met Thr Cys Leu Thr Val Leu Leu Ala Phe Leu Ile  
755 760 765

Ile Leu Gln Leu Lys Arg Ala Asn Val Gln Arg Arg Met Ala Gln Ala  
770 775 780

Phe Gln Asn Val Arg Glu Glu Pro Ala Val Gln Phe Asn Ser Gly Thr  
785 790 795 800

Leu Ala Leu Asn Arg Lys Val Lys Asn Asn Pro Asp Pro Thr Ile Tyr  
805 810 815



Pro Val Leu Asp Trp Asn Asp Ile Lys Phe Gln Asp Val Ile Gly Glu  
820 825 830

Gly Asn Phe Gly Gln Val Leu Lys Ala Arg Ile Lys Lys Asp Gly Leu  
835 840 845

Arg Met Asp Ala Ala Ile Lys Arg Met Lys Glu Tyr Ala Ser Lys Asp  
850 855 860

Asp His Arg Asp Phe Ala Gly Glu Leu Glu Val Leu Cys Lys Leu Gly  
865 870 875 880

His His Pro Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Glu His Arg Gly  
885 890 895

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

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

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

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

<213> Штучна

<220>

<223> важкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями  
(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
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

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Важкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями  
(VEGFang2-0012)

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met 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

<211> 214

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Легкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями  
(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> Штучна

<220>

<223> Легкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями  
(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

<210> 25

<211> 453

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Важкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями  
і P329G LALA-мутаціями (VEGFang2-0016)

<400> 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					
	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

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> Штучна

<220>

<223> Важкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями  
і P329G LALA-мутаціями (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

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

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> Штучна

<220>

<223> Легкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями  
і P329G LALA-мутаціями (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

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> Штучна

<220>

<223> Леркий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 з AAA-мутаціями  
і P329G LALA-мутаціями (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

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> Штучна

<220>
<223> Важкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 з AAA-мутаціями
і з SPLE-мутаціями

<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
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

# UA 120029 C2

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> Штучна

<220>

<223> Важкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 з AAA-мутаціями  
і з SPLE-мутаціями

<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  
385 390 395 400

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

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu  
420 425 430

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
450 455 460

<210> 31

<211> 214

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Легкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 з AAA-мутаціями  
і з SPLE-мутаціями

<400> 31

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> 32

<211> 213

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Легкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 з AAA-мутаціями і  
з SPLE-мутаціями

<400> 32

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 Cys Ser Arg Ser Thr  
115 120 125

Ser Glu Ser 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 Lys Thr Tyr Thr  
180 185 190

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

Glu Ser Lys Tyr Gly  
210

<210> 33  
<211> 453  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> Важкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 з AAA-мутаціями

<400> 33

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 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 Va					
	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					
	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> Штучна

<220>  
<223> Важкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 з AAA-мутаціями  
<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
Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala		
	165	170
Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser		
	180	185
Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val		
	195	200
Ala Pro Thr Glu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
	210	215
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
	225	230
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu		
	245	250
Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly		
	260	265
Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly		
	275	280
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr		
	290	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  
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 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
450 455 460

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
465 470 475 480

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
485 490 495



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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
515 520 525

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
530 535 540

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

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
580 585 590

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

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> Штучна

<220>

<223> Легкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 з AAA-мутаціями

<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  
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> Штучна

<220>

<223> Важкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 з AAA-мутаціями  
і з SPLE-мутаціями

<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  
 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

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> 37

<211> 702

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Важкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 з AAA-мутаціями і  
з SPLE-мутаціями

<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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His

## UA 120029 C2

				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  
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> Штучна

<220>

<223> Легкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 с AAA мутаціями і  
з SPLE-мутаціями

<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> Штучна

<220>  
<223> Важкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 дикого типу  
без AAA-мутацій) (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				
	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> Штучна

<220>

<223> Важкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 дикого типу  
(без AAA-мутацій) (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  
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val 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> Штучна

<220>

<223> Легкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 дикого типу  
(без AAA-мутацій) (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

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> Штучна

<220>  
<223> Легкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 дикого типу  
(без AAA-мутацій) (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

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> Штучна

<220>

<223> Важкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 тільки з P329G

LALA-

мутаціями (без AAA-мутацій) (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

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

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> Штучна

<220>

<223> Важкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 тільки з P329G  
LALA-  
мутаціями (без AAA-мутацій) (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

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

# UA 120029 C2

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> Штучна

<220>

<223> Легкий ланцюг 1 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 тільки з P329G LALA-  
мутаціями (без AAA-мутацій) (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> Штучна

<220>

<223> Легкий ланцюг 2 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 тільки з P329G LALA-

мутаціями (без AAA-мутацій) (VEGFang2-0015)

<400> 46

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Pro Lys Ser Cys  
210

<210> 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

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  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 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 ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб зниження в'язкості антитіла, в якому антитіло містить константну ділянку важкого ланцюга людського підкласу IgG1, де цей спосіб включає модифікацію константної ділянки важкого ланцюга людського підкласу IgG1 за допомогою мутацій I253A, H310A і H435A, нумерація згідно EU-індексу Кебота, і де антитіло являє собою біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і
- 10 другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, в якому:
  - I) зазначений перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з VEGF, містить в варіабельному домені важкого ланцюга CDR3H-ділянку, що має SEQ ID NO: 1, CDR2H-ділянку, що має SEQ ID NO: 2, і CDR1H-ділянку, що має SEQ ID NO: 3, і у варіабельному домені легкого ланцюга CDR3L-ділянку, що має SEQ ID NO: 4, CDR2L-ділянку, що має SEQ ID NO: 5, і CDR1L-ділянку, що має SEQ ID NO: 6; і
  - 15 II) зазначений другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з ANG-2, містить в варіабельному домені важкого ланцюга CDR3H-ділянку, що має SEQ ID NO: 9, CDR2H-ділянку, що має SEQ ID NO: 10, і CDR1H-ділянку, що має SEQ ID NO: 11, і у варіабельному домені легкого ланцюга CDR3L-ділянку, що має SEQ ID NO: 12, CDR2L-ділянку, що має SEQ ID NO: 13, і CDR1L-ділянку, що має SEQ ID NO: 14.
- 20 2. Спосіб за п. 1, в якому біспецифічне антитіло додатково модифікують за допомогою мутацій L234A, L235A і P329G, нумерація згідно з EU-індексу Кебота.
3. Біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, в якому:
- 25

I) зазначений перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з VEGF, містить у варіабельному домені важкого ланцюга CDR3H-ділянку, що має SEQ ID NO: 1, CDR2H-ділянку, що має SEQ ID NO: 2, і CDR1H-ділянку, що має SEQ ID NO: 3, і у варіабельному домені легкого ланцюга CDR3L-ділянку, що має SEQ ID NO: 4, CDR2L-ділянку, що має SEQ ID NO: 5, і CDR1L-ділянку, що має SEQ ID NO: 6; і

II) зазначений другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з ANG-2, містить в варіабельному домені важкого ланцюга CDR3H-ділянку, що має SEQ ID NO: 9, CDR2H-ділянку, що має SEQ ID NO: 10, і CDR1H-ділянку, що має SEQ ID NO: 11, і у варіабельному домені легкого ланцюга CDR3L-ділянку, що має SEQ ID NO: 12, CDR2L-ділянку, що має SEQ ID NO: 13, і CDR1L-ділянку, що має SEQ ID NO: 14, і де

III) біспецифічне антитіло містить константну ділянку важкого ланцюга людського підкласу IgG1, що містить мутації I253A, H310A і H435A, нумерація згідно з EU-індексу Кебота.

4. Біспецифічне антитіло, за п. 3, в якому:

I) зазначений перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з VEGF, містить як варіабельний домен важкого ланцюга VH амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7 і в як варіабельний домен легкого ланцюга VL амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8 і

II) зазначений другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з ANG-2, містить як варіабельний домен важкого ланцюга VH амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15 і як варіабельний домен легкого ланцюга VL амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16.

5. Біспецифічне антитіло за п. 3, в якому константна ділянка важкого ланцюга IgG1-підкласу додатково містить мутації L234A, L235A і P329G, нумерація згідно EU-індексу Кебота.

6. Фармацевтична композиція, що містить антитіло за одним з пп. 3-5.

7. Біспецифічне антитіло за одним з пп. 3-5, для застосування для лікування судинних захворювань очей.

8. Біспецифічне антитіло для застосування за п. 7, де антитіло застосовують за допомогою інтравітреального введення.

9. Нуклеїнова кислота, що кодує біспецифічне антитіло за одним з пп. 3-5.

10. Експресійний вектор, що містить зазначену нуклеїнову кислоту за п. 9, який має здатність експресувати зазначену нуклеїнову кислоту в прокаріотичній або еукаріотичній клітині-хазяїні.

11. Прокаріотична або еукаріотична клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 10.

12. Спосіб отримання біспецифічного антитіла за одним з пп. 3-5, що включає 10 стадій, на яких:

а) трансформують клітину-хазяїна векторами, що містять молекули нуклеїнових кислот, які кодують вказане антитіло;

б) культивують клітину-хазяїна в умовах, що забезпечують синтез зазначеної молекули антитіла; і

в) виділяють зазначену молекулу антитіла із зазначеної культури.

13. Біспецифічне двовалентне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, яке **відрізняється** тим, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 і SEQ ID NO: 28.

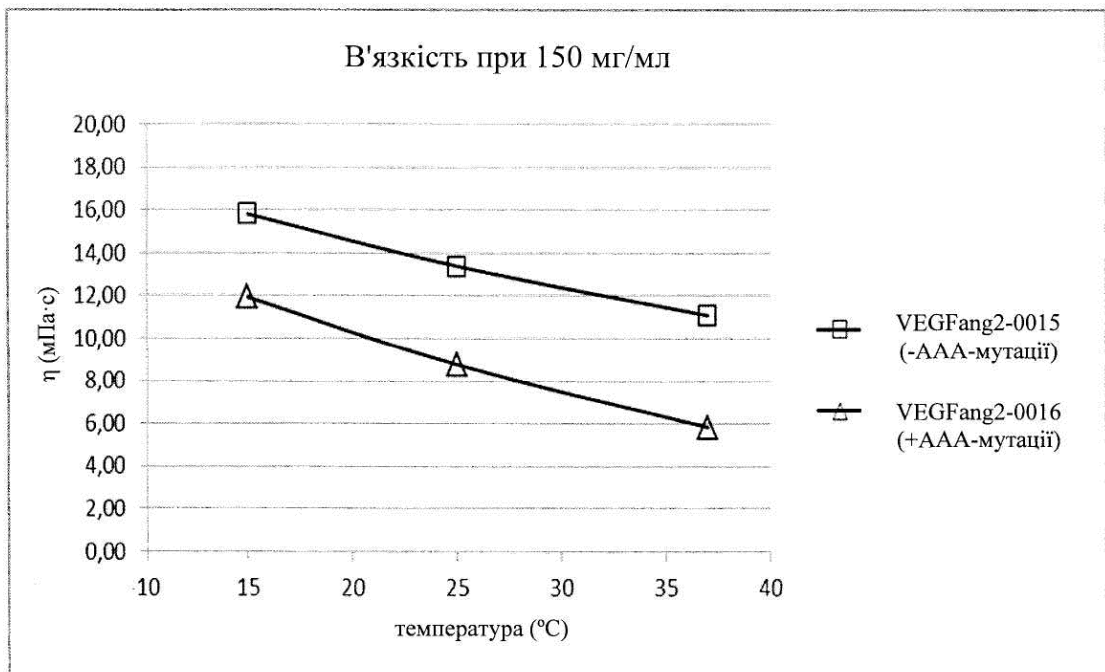
14. Біспецифічне двовалентне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським VEGF, і другий антигензв'язуючий центр, який специфічно зв'язується з людським ANG-2, яке **відрізняється** тим, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 і SEQ ID NO: 24.

15. Біспецифічне антитіло за п. 13 або 14 для застосування для лікування судинних очних захворювань.

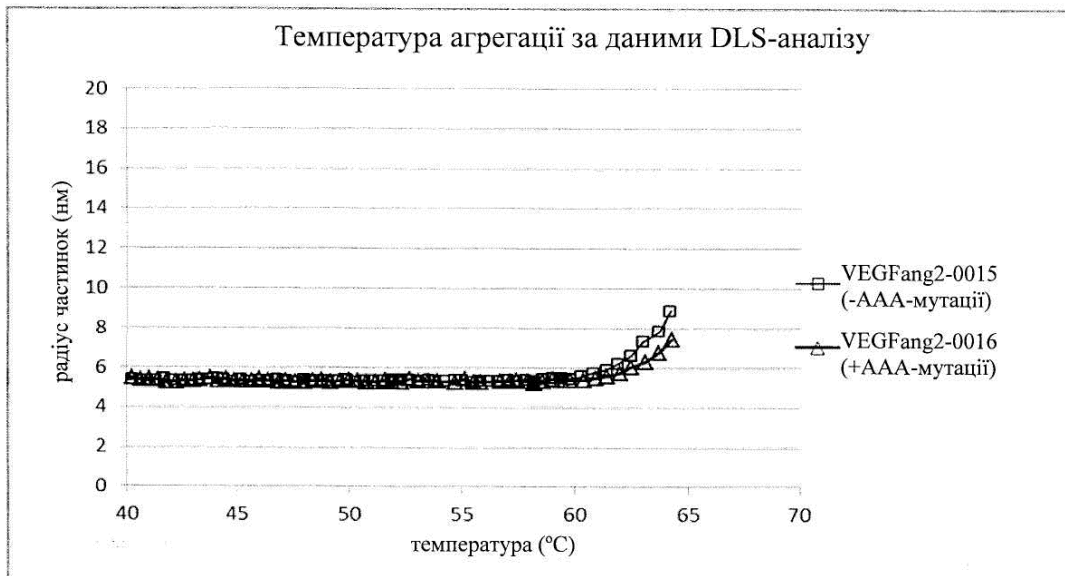
16. Біспецифічне антитіло для застосування за п. 15, де антитіло застосовують за допомогою інтравітреального введення.



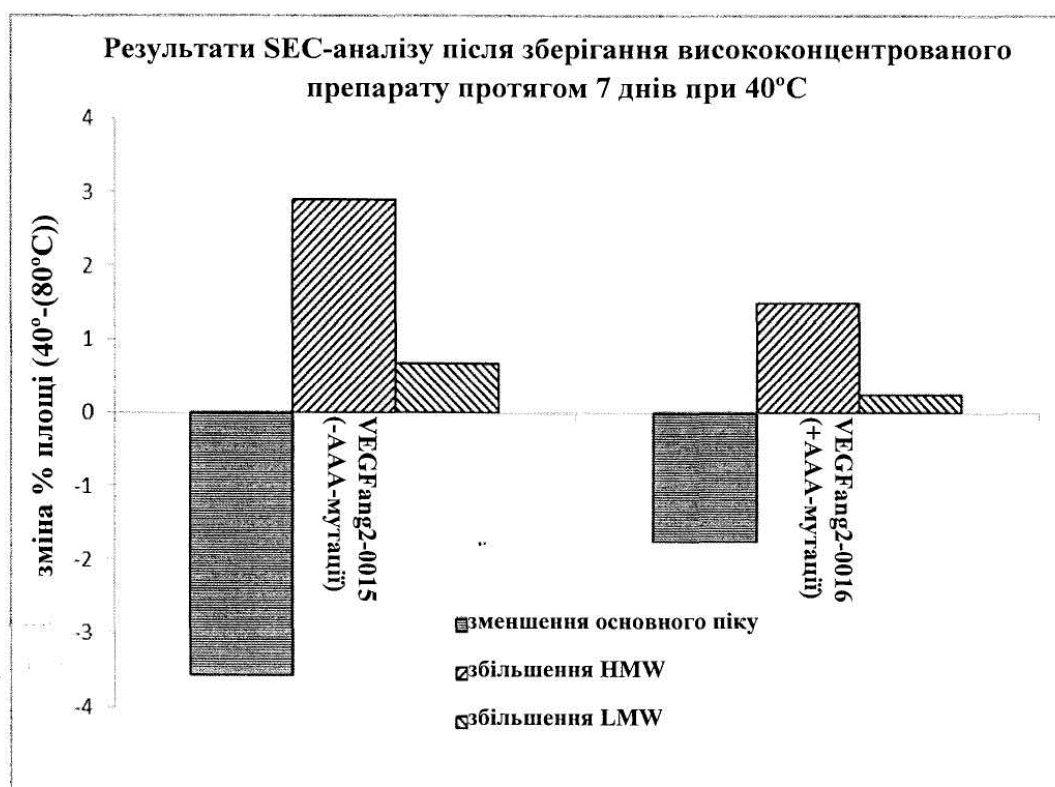
Фіг. 1



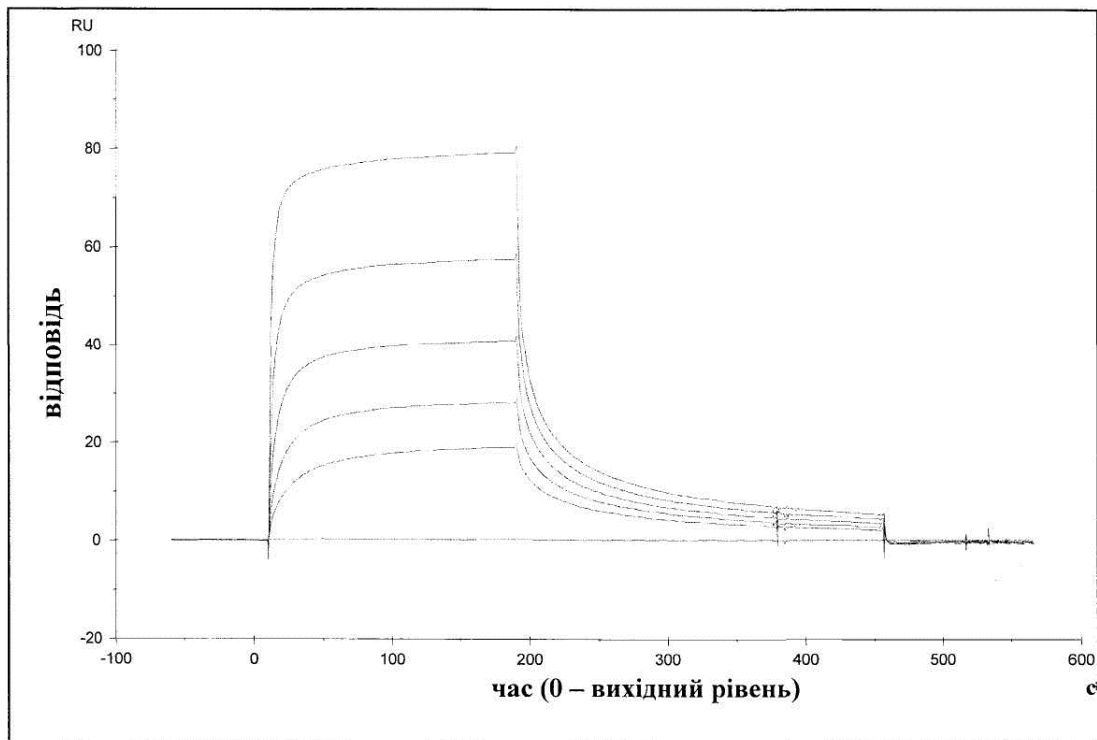
Фіг. 2



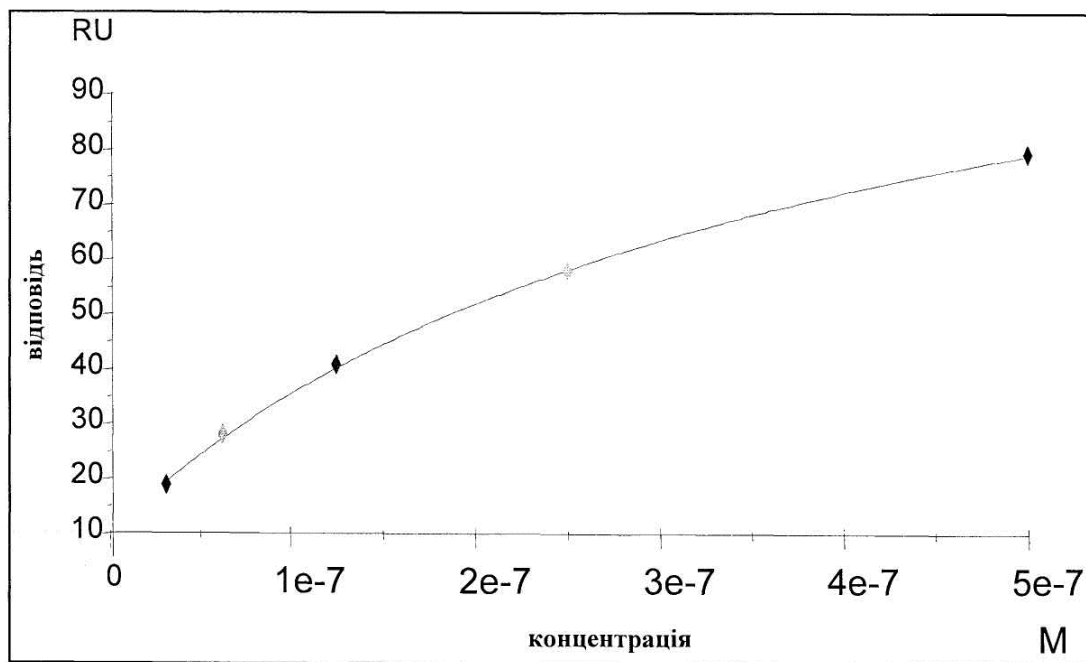
Фіг. 3



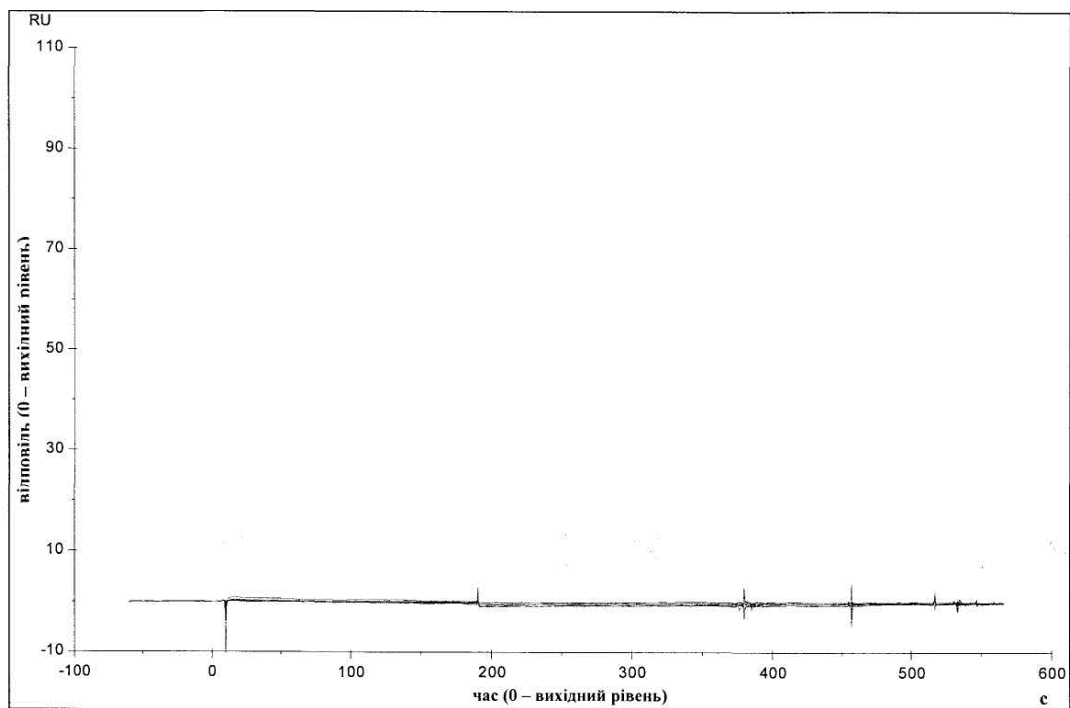
Фіг. 4



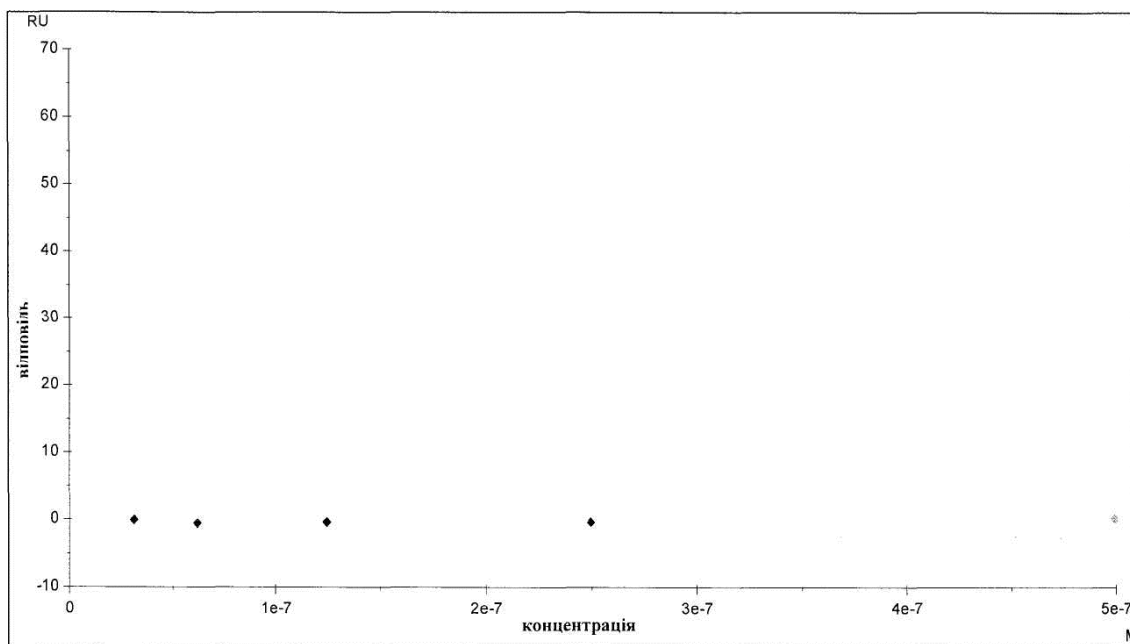
Фіг. 5А



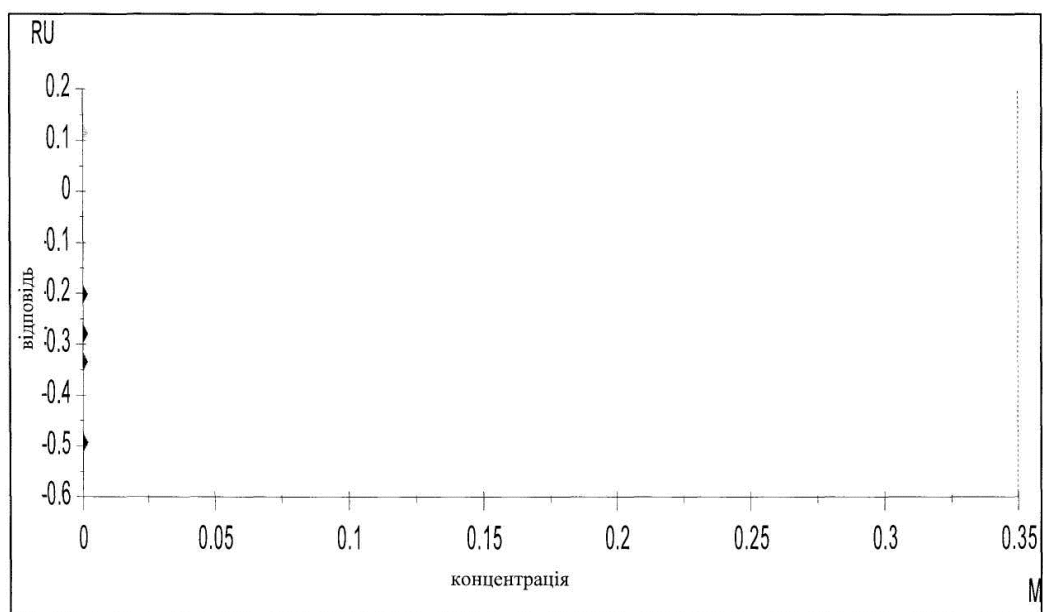
Фиг. 5Б



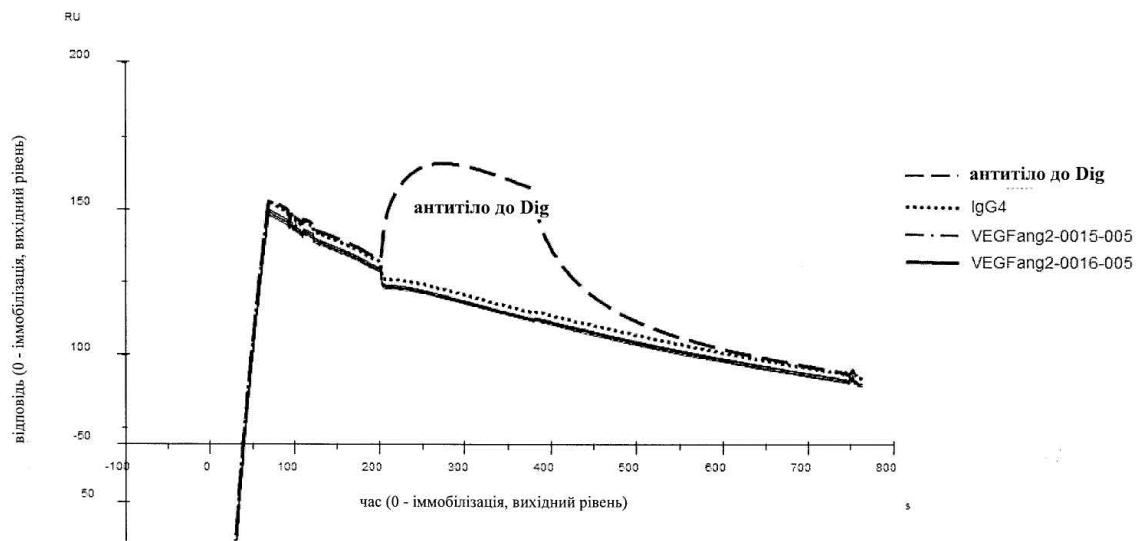
Фиг. 5В



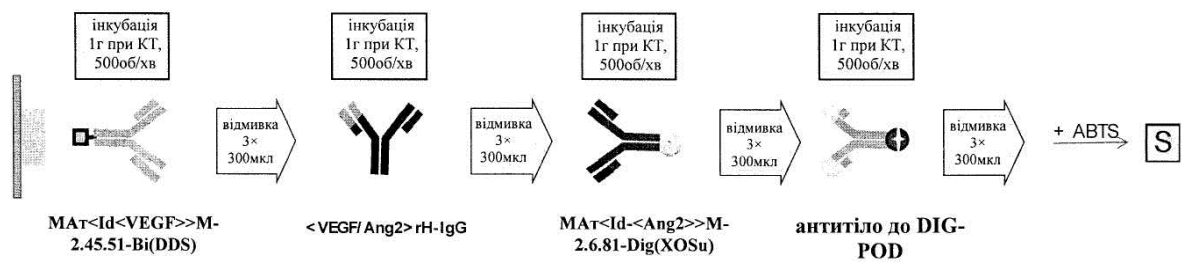
Фіг. 5Г



Фіг. 5Д

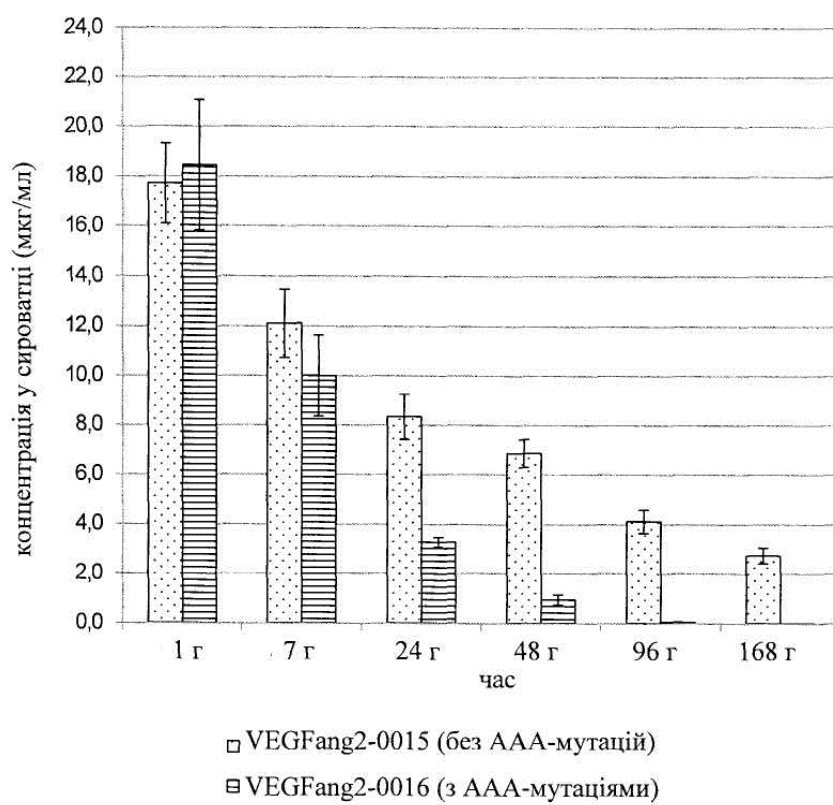


Фіг. 6

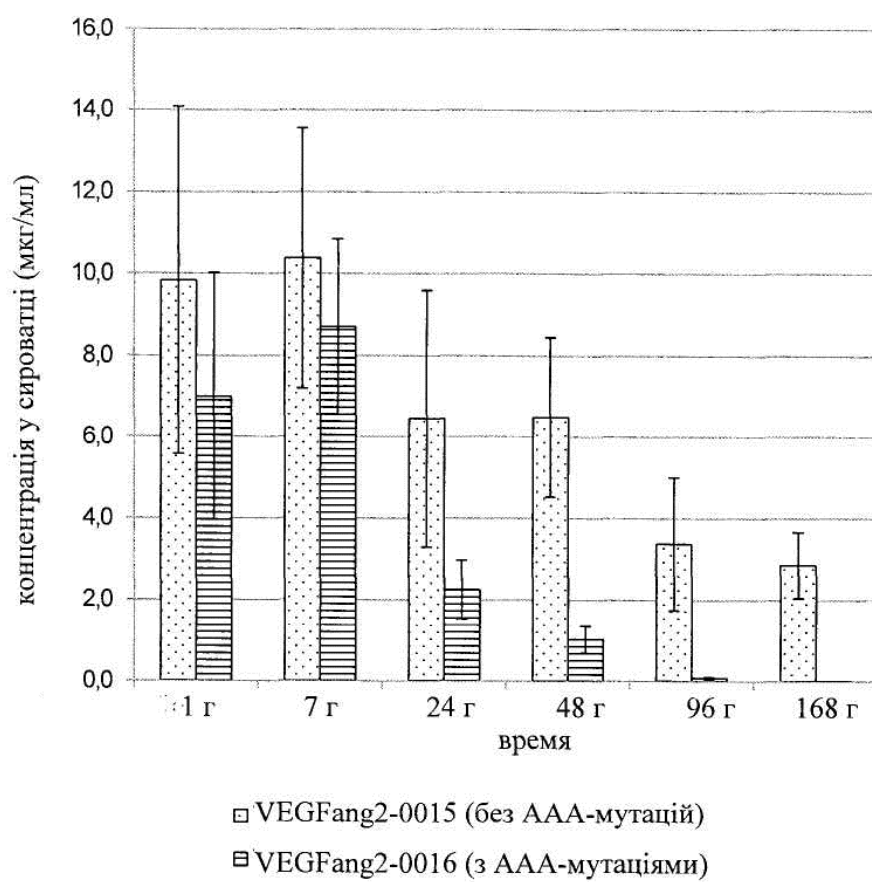


Фіг. 7A

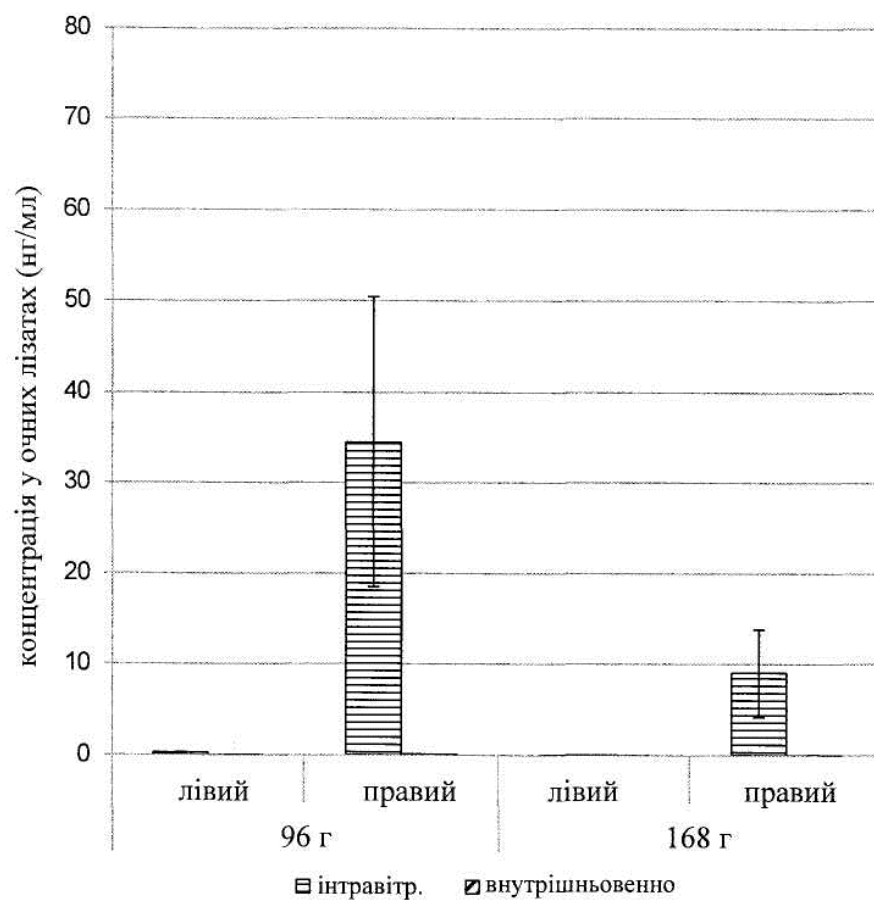




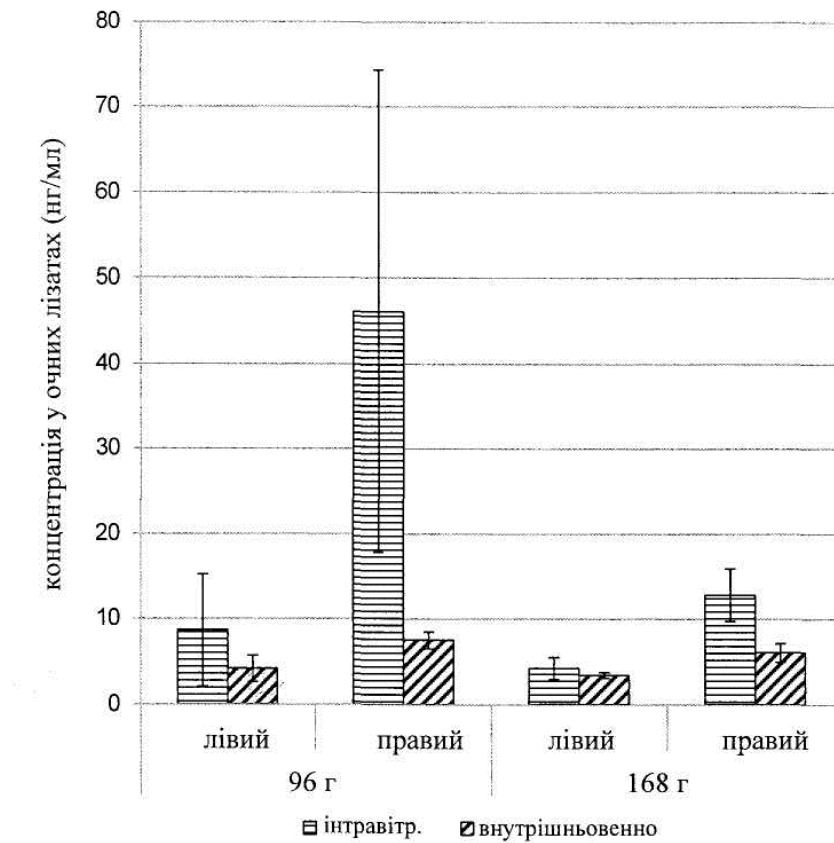
Фіг. 7Б



Фіг. 7В



Фіг. 7Г



Фіг. 7Д

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601