



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121754** (13) **C2**  
(51) МПК (2020.01)

**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 7/10** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)  
**A61P 43/00**  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**C12N 1/15** (2006.01)  
**C12N 1/19** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)  
**C12P 21/08** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2017 01407</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Камохара Масадзумі (JP),</b> <b>Ягі Сігенорі (JP),</b> <b>Ісії Йосінорі (JP),</b> <b>Нара Хіромі (JP)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>14.07.2015</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>АСТЕЛЛАС ФАРМА ІНК.,</b> 5-1, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 1038411, Japan (JP)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>27.07.2020</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Бочаров Максим Анатолійович, реєстр.</b> <b>№367</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>2014-145135</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2010233803 A1, 16.09.2010 EP 2281845 A1, 09.02.2011 WO 0177342 A1, 18.10.2001 WO 2013028442 A1, 28.02.2013 WO 2012047966 A2, 12.04.2012 MOSS ANDREW et al. The angiopoietin: Tie 2 interaction: A potential target for future therapies in human vascular disease. Cytokine and growth factor reviews, 2013, Vol. 24, no. 6, P. 579 – 592 GERSHONI JONATHAN M et al. Epitope mapping - The first step in developing epitope- based vaccines. BIOD, ADIS international LTD, NZ, 2007, Vol. 21, no. 3, P. 145 – 156
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>15.07.2014</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>JP</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>10.04.2017, Бюл.№ 7</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>27.07.2020, Бюл.№ 14</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>РСТ/JP2015/070089,</b> <b>14.07.2015</b>	

## (54) АТИТІЛО ПРОТИ TIE2 ЛЮДИНИ

### (57) Реферат:

Винахід стосується антитіла проти Tie2 людини, що містить чотири варіабельні ділянки важкого ланцюга і чотири варіабельні ділянки легкого ланцюга, в якому варіабельна ділянка важкого ланцюга складається з амінокислот 1-122 амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2,

UA 121754 C2

варіабельна ділянка легкого ланцюга складається з амінокислот 1-113 амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 4, одна варіабельна ділянка важкого ланцюга і одна варіабельна ділянка легкого ланцюга складають одну антигензв'язувальну ділянку, і антитіло містить чотири антигензв'язувальних ділянки.

Галузь техніки

[0001]

Наданий винахід належить до нового антитіла проти Tie-2 людини.

Рівень техніки

5 [0002]

Тирозинкіназа з доменом Ig та доменами гомології з EGF 2 (Tie2) являє собою тирозинкіназу рецепторного типу. Відомо, що Tie2 в основному експресується в клітинах ендотелію судин. Як ліганд відомі ангіопетин-1 (Ang-1) і ангіопетин-2 (Ang-2), що являють собою глікопротеїни мультимерного типу, що секретуються.

10 [0003]

Ang-1 функціонує як агоніст для Tie2. Виявлено, що коли Tie2 зв'язується з Ang-1, він піддається аутофосфорилуванню за допомогою формування мультимера і передає сигнал до клітини, таким чином стимулюючи антиапоптотичну дію на клітини ендотелію судин, стабілізацію судин за допомогою інгібувальної проникнення дії на кровоносні судини, дозрівання і ремоделювання судин (Cell, 1996, Vol. 87, pp. 1171-1180; Genes Dev., 1994, Vol. 8, pp. 1897-1909; Science, 1999, Vol. 286, pp. 2511-2514; та Nat. Struct. Biol., 2003, Vol. 10, pp. 38-44). Крім того, відомо також, що Ang-1 володіє судинорозширювальною і підсилюючою кровотік дією за допомогою продукування оксиду азоту за допомогою активації Tie2 (Pharmacol. Res., 2014, Vol. 80, pp. 43-51). Крім того, вважають, що Ang-1 робить внесок у стабілізацію кровоносних судин за допомогою інгібування інтерналізації кадгерину ендотелію судин за допомогою активації Tie2 (Dev. Cell, 2008, Vol. 14, pp. 25-36). З іншого боку, вважають, що Ang-2 є здатним активувати Tie2 на клітинах ендотелію судин, але вважають, що його активація є частковою у порівнянні з Ang-1 (Mol. Cell Biol., 2009, Vol. 29, pp. 2011-2022). Ang-2 зв'язується з тією самою ділянкою Tie2 фактично з такою самою афінністю, як Ang-1, і в результаті, припускають, що Ang-2 функціонує як ендогенний антагоніст Tie2 з тієї точки зору, що активація Tie2 за допомогою Ang-1 замінюється частковою активацією Ang-2 (Science, 1997, Vol. 277, pp. 55-60).

[0004]

Опубліковано збільшення концентрації Ang-2 у крові при захворюванні, індуційованим чутливістю судин, яку вважають однією з причин таких захворювань як діабет, діабетична ретинопатія, сепсис і гостра ниркова недостатність (Atherosclerosis, 2005, Vol. 180, pp. 113-118; Br. J. Ophthalmol., 2004, Vol. 88, pp. 1543-1546; Critical Care, 2009, Vol. 13, p. 207; та Intensive Care Med., 2010, Vol. 36, pp. 462-470).

[0005]

Стосовно важливості для діабетичної ретинопатії і діабетичного набряку жовтої плями опубліковано, що концентрація Ang-2 у плазмі крові або склоподібному тілі пацієнтів збільшена (Br. J. Ophthalmol., 2004, Vol. 88, pp. 1543-1546; та Br. J. Ophthalmol., 2005, Vol. 89, pp. 480-483). Крім того, відомо також, що у кровоносних судинах сітківки пацієнтів з діабетичною ретинопатією втрата перичитів, які є основними продукуючими Ang-1 клітинами (Cell, 1996, Vol. 87, pp. 1161-1169), є одним з характерних уражень (Retina, 2013, Fifth edition, pp. 925-939). Відомо, що діабетичний набряк жовтої плями є однією з умов потовщення жовтої плями, проте, опубліковано також, що у пацієнтів зі збільшенням внутрішньоочної концентрації Ang-1 у зв'язку з хірургічним видаленням склоподібного тіла потовщення жовтої плями зменшується (Br. J. Ophthalmol., 2005, Vol. 89, pp. 480-483). Крім того, з тих точок зору, що в моделях набряку сітківки на мишах з втратою перичитів у кровоносних судинах в сітківці спостерігають набряк сітківки та крововилив у сітківку, і початок патології інгібують за допомогою введення в склоподібне тіло Ang-1 (J. Clin. Invest., 2002, Vol. 110, pp. 1619-1628), і що в тесті з використанням моделі діабетичної ретинопатії на мишах порушення клітин ендотелію судин в сітківці інгібують за допомогою введення аденовірусу, що містить ген, що кодує Ang-1 (Am. J. Pathol., 2002, Vol. 160, pp. 1683-1693), припустили, що Ang-1 володіє дією для поліпшення цих станів. У той же час, опубліковано, що у генетично модифікованих мишах, що володіють Ang-2, специфічно зверхекспресований у сітківці, пошкодження клітин сітківки збільшено (Acta Diabetol. 2010, Vol. 47, pp. 59-64).

[0006]

Опубліковано, що стосовно критичної ішемії кінцівок кількість Ang-2 у плазмі крові збільшена у пацієнтів із захворюваннями периферичних артерій, і кількість Ang-2, експресованого у м'язах ішемізованої кінцівки або тканинах шкіри у пацієнтів з критичною ішемією кінцівок, є високою (J. Am. Coll. Cardiol., 2008, Vol. 52, pp. 387-393; та Int. Angiol., 2011, Vol. 30, pp. 25-34). Більш того, у тесті з використанням моделі ішемії задніх кінцівок на щурах відновлення кровотоку та антиапоптотичний ефект в ішемізованій кінцівці стимулюють за допомогою введення вірусного вектора, що містить ген, що кодує Ang-1 (Angiogenesis, 2009, Vol. 12, pp. 243-249). З тієї точки

зору, яка опублікована, впливає, що кількість зрілих кровоносних судин, покритих гладком'язовими клітинами, збільшують у пограничній зоні ділянки інфаркту за допомогою введення вірусу, що містить ген, що кодує Ang-1, у моделі літування коронарної артерії у мишах db/db як модель діабету типу 2 на тваринах (Diabetes, 2008, Vol. 57, pp. 3335-3343), можна очікувати ефекту стимуляції дозрівання нестабільних неоваскулярних судин за допомогою активації сигналів Tie2.

[0007]

Опубліковано антитіло, що володіє агоністичною дією на Tie2 людини, мишине моноклональне антитіло 15B8 (Патентний документ 1). Опубліковано, що 15B8 зв'язує Tie2 людини для індукції антиапоптотичної дії у клітинах ендотелію судин людини HUVEC (Патентний документ 1).

Пов'язана область  
Патентний документ

[0008]

[Патентний документ 1] WO 2000/018804

Опис винаходу

Проблеми, що підлягають вирішенню за допомогою винаходу

Мета наданого винаходу полягає у наданні антитіла проти Tie2 людини для запобігання або лікування діабетичного набряку жовтої плями, діабетичної ретинопатії або критичної ішемії кінцівок за допомогою зв'язування Tie2 людини для активації Tie2 людини.

Засоби для вирішення проблем

[0010]

Автори наданого винаходу нещодавно багаторазово проводили масштабні і винахідницькі дослідження для отримання антитіла проти Tie2 людини, і у результаті виявили, що отримано тетравалентне антитіло проти Tie2 людини, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-122 з SEQ ID NO: 2 і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності амінокислот номер 1-113 з SEQ ID NO: 4 (приклади 1-8), і таким чином, антитіло проти Tie2 людини зв'язує Tie2 людини (приклад 12), індукуює антиапоптотичну дію в експресуючих Tie2 людини клітинах BaF3 (приклади 9 і 11), і інгібує підвищену проникність судин у моделі підвищеної проникності судин на щурах (приклади 10 і 13). В результаті вони отримали це антитіло проти Tie2 людини, таким чином завершивши наданий винахід.

[0011]

Таким чином, наданий винахід може включати наступний винахід як матеріал або спосіб, який володіє медичною або промисловою придатністю.

[1] Антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, що містять чотири варіабельні ділянки важкого ланцюга і чотири варіабельні ділянки легкого ланцюга, де варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR1, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 31-35 з SEQ ID NO: 2, CDR2, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 50-66 з SEQ ID NO: 2, і CDR3, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 99-111 з SEQ ID NO: 2;

варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR1, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 24-39 з SEQ ID NO: 4, CDR2, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 55-61 з SEQ ID NO: 4, і CDR3, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 94-102 з SEQ ID NO: 4; та одна варіабельна ділянка важкого ланцюга і одна варіабельна ділянка легкого ланцюга складають одну антигензв'язувальну ділянку, і антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить чотири антигензв'язувальних ділянки.

[2] Антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент з [1], обрані з (1) або (2) нижче:

(1) антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, що містять чотири варіабельні ділянки важкого ланцюга і чотири варіабельні ділянки легкого ланцюга, в яких варіабельна ділянка важкого ланцюга складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-122 з SEQ ID NO: 2,

варіабельна ділянка легкого ланцюга складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-113 з SEQ ID NO: 4; та

одна варіабельна ділянка важкого ланцюга і одна варіабельна ділянка легкого ланцюга складають одну антигензв'язувальну ділянку, і антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить чотири антигензв'язувальних ділянки; та

(2) антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, що являють собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, отримані у результаті посттрансляційної модифікації антитіла проти Tie2 людини або його антигензв'язувального фрагмента з (1).

[3] Антитіло проти Tie2 людини з [1], де

антитіло містить два важкі ланцюги і чотири легкі ланцюги; кожен важкий ланцюг містить дві структури, що складаються з варіабельної ділянки важкого ланцюга, що містить CDR1, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 31-35 з SEQ ID NO: 2, CDR2, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 50-66 з SEQ ID NO: 2, і CDR3, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 99-111 з SEQ ID NO: 2, і ділянки CH1, ділянки CH2 і ділянки CH3, і карбокси-кінець (C-кінець) однієї з структур зв'язаний з аміно-кінцем (N-кінцем) іншої структури через лінкер; та кожен легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR1, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 24-39 з SEQ ID NO: 4, CDR2, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 55-61 з SEQ ID NO: 4, і CDR3, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 94-102 з SEQ ID NO: 4, і константну ділянку легкого ланцюга.

[4] Антитіло проти Tie2 людини з [3], вибране з (1) або (2) нижче:

(1) антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги і чотири легкі ланцюги, в якому

кожен важкий ланцюг містить дві структури, що складаються з варіабельної ділянки важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-122 з SEQ ID NO: 2, і ділянки CH1, ділянки CH2 та ділянки CH3, і C-кінець однієї зі структур зв'язаний з N-кінцем іншої структури через лінкер; та

кожен легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-113 з SEQ ID NO: 4, і константну ділянку легкого ланцюга; та

(2) антитіло проти Tie2 людини, що являє собою антитіло, отримане в результаті посттрансляційної модифікації антитіла проти Tie2 людини з (1).

[5] Антитіло проти Tie2 людини з [4], де

антитіло проти Tie2 людини містить два важкі ланцюги і чотири легкі ланцюги;

кожен важкий ланцюг містить дві структури, що складаються з

варіабельної ділянки важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-122 з SEQ ID NO: 2, і ділянки CH1, ділянки CH2 і ділянки CH3, і C-кінець однієї зі структур зв'язаний з N-кінцем іншої структури через лінкер; та

кожен легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-113 з SEQ ID NO: 4, і константну ділянку легкого ланцюга.

[6] Антитіло проти Tie2 людини, що являє собою антитіло, отримане в результаті посттрансляційної модифікації антитіла проти Tie2 людини з [5].

[7] Антитіло проти Tie2 людини з [6], де посттрансляційна модифікація являє собою піроглутамілірування на N-кінці варіабельної ділянки важкого ланцюга та/або делецію лізину на C-кінці важкого ланцюга.

[8] Антитіло проти Tie2 людини за будь-яким з [3]-[7], що містить константну ділянку важкого ланцюга, що являє собою константну ділянку Igγ1 людини або константну ділянку Igγ4 людини.

[9] Антитіло проти Tie2 людини з [8], в якому константна ділянка Igγ1 людини являє собою константну ділянку Igγ1 людини, що володіє варіантами амінокислот L234A, L235A і P331S, або константну ділянку Igγ1 людини, що володіє варіантами амінокислот L234A, L235A, P331S і I253A.

[10] Антитіло проти Tie2 людини з [8], в якому константна ділянка Igγ4 людини являє собою константну ділянку Igγ4 людини, що володіє варіантами амінокислот S228P і L235E.

[11] Антитіло проти Tie2 людини за будь-яким з [3]-[7], що містить константну ділянку легкого ланцюга, що являє собою константну ділянку Igκ людини.

[12] Антитіло проти Tie2 людини за будь-яким з [3]-[7], що містить константну ділянку важкого ланцюга, що являє собою константну ділянку Igγ1 людини або константну ділянку Igγ4 людини, і константну ділянку легкого ланцюга, що являє собою константну ділянку Igκ людини.

[13] Антитіло проти Tie2 людини з [12], в якому константна ділянка Igγ1 людини являє собою константну ділянку Igγ1 людини, що володіє варіантами амінокислот L234A, L235A і P331S, або константну ділянку Igγ1 людини, що володіє варіантами амінокислот L234A, L235A, P331S і I253A.

[14] Антитіло проти Tie2 людини з [12], в якому константна ділянка Igγ4 людини являє собою константну ділянку Igγ4 людини, що володіє варіантами амінокислот S228P і L235E.

[15] Антитіло проти Tie2 людини за будь-яким з [3]-[7], в якому лінкер являє собою пептидний лінкер, що містить 5-70 амінокислот.

5 [16] Антитіло проти Tie2 людини з [15], в якому лінкер містить амінокислотну послідовність шарнірної ділянки або її частину.

[17] Антитіло проти Tie2 людини з [16], в якому лінкер містить амінокислотну послідовність, вказану у SEQ ID NO: 13.

10 [18] Антитіло проти Tie2 людини з [4], що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

[19] Антитіло проти Tie2 людини з [4], що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 6, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

15 [20] Антитіло проти Tie2 людини з [4], що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 10, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

[21] Антитіло проти Tie2 людини, що являє собою антитіло, отримане в результаті посттрансляційної модифікації антитіла проти Tie2 людини за будь-яким з [18]-[20].

20 [22] Антитіло проти Tie2 людини з [21], де посттрансляційна модифікація являє собою піроглутамілірування на N-кінці варіабельної ділянки важкого ланцюга та/або делецію лізину на C-кінці важкого ланцюга.

25 [23] Антитіло проти Tie2 людини з [21], що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-678 з SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

[24] Тетравалентне антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, що зв'язується з тим самим епітопом Tie2 людини, що і антитіло проти Tie2 людини з [18] або [23].

30 [25] Тетравалентне антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент з [24], де епітоп Tie2 людини являє собою епітоп Tie2 людини, що містить амінокислоти з амінокислотних номерів 192, 195 і 197 з No. доступу NP 000450.2.

[26] Полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент з [2].

35 [27] Полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент з [2].

[28] Полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за будь-яким з [18]-[20].

[29] Полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за будь-яким з [18]-[20].

40 [30] Експресуючий вектор, що містить полінуклеотид з [26] та/або [27].

[31] Експресуючий вектор, що містить полінуклеотид з [28] та/або [29].

[32] Клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором з [30], яка обрана з групи, що складається з (a)-(d) нижче:

45 (a) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент з [2], і полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла або її антигензв'язувальний фрагмент;

50 (b) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент з [2], і експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла або її антигензв'язувальний фрагмент;

55 (c) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент з [2]; та

(d) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент з [2].

60 [33] Клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором з [31], який обрана з групи, що складається з (a)-(d) нижче:

(а) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за будь-яким з [18]-[20], і полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг антитіла;

5 (b) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за будь-яким з [18]-[20], і експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг антитіла;

10 (c) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за будь-яким з [18]-[20], та

(d) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за будь-яким з [18]-[20].

15 [34] Спосіб отримання антитіла проти Tie2 людини або його антигензв'язувального фрагмента, що включає культивування клітини-хазяїна (клітин-хазяїв), вибраних з групи, що складається з (а)-(с) нижче, для експресії тетравалентного антитіла проти Tie2 людини або його антигензв'язувального фрагмента:

20 (а) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент з [2], і полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла або її антигензв'язувальний фрагмент;

25 (b) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент з [2], і експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла або її антигензв'язувальний фрагмент; та

30 (c) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент з [2], і клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла або її антигензв'язувальний фрагмент.

[35] Спосіб отримання антитіла проти Tie2 людини, що включає культивування клітини-хазяїна (клітин-хазяїв), вибраних з групи, що складається з (а)-(с) нижче, для експресії антитіла проти Tie2 людини:

35 (а) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за будь-яким з [18]-[20], і полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг антитіла;

40 (b) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за будь-яким з [18]-[20], і експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг антитіла; та

45 (c) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за будь-яким з [18]-[20], і клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини.

[36] Антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, отримані способом за [34].

[37] Антитіло проти Tie2 людини, отримане способом за [35].

50 [38] Фармацевтична композиція, яка містить антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з [1]-[23], [36] і [37], і фармацевтично прийнятний наповнювач.

[39] Фармацевтична композиція, яка містить антитіло проти Tie2 людини з [5], антитіло проти Tie2 людини з [6] та фармацевтично прийнятний наповнювач.

55 [40] Фармацевтична композиція, яка містить антитіло проти Tie2 людини з [18], антитіло проти Tie2 людини з [23], та фармацевтично прийнятний наповнювач.

[41] Фармацевтична композиція за будь-яким з [38]-[40], що являє собою фармацевтичну композицію для запобігання або лікування діабетичного набряку жовтої плями, діабетичної ретинопатії або критичної ішемії кінцівок.

60 [42] Спосіб запобігання або лікування діабетичного набряку жовтої плями, діабетичної ретинопатії або критичної ішемії кінцівок, що включає введення терапевтично ефективної

кількості антитіла проти Tie2 людини або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з [1]-[23], [36] і [37].

[43] Антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з [1]-[23], [36] і [37], для запобігання або лікування діабетичного набряку жовтої плями, діабетичної ретинопатії або критичної ішемії кінцівок.

[44] Застосування антитіла проти Tie2 людини або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з [1]-[23], [36] і [37] для виготовлення фармацевтичної композиції для запобігання або лікування діабетичного набряку жовтої плями, діабетичної ретинопатії або критичної ішемії кінцівок.

[0012]

Антитіло проти Tie-2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент включає антитіло, злите з іншим пептидом або білком, і модифікацію, що має злитий з ним модифікуючий засіб.

Ефекти винаходу

[0013]

Антитіло проти Tie2 людини наданого винаходу можна використовувати як засіб для запобігання або лікування діабетичного набряку жовтої плями, діабетичної ретинопатії або критичної ішемії кінцівок за допомогою зв'язування з Tie2 людини для активації Tie2 людини.

Короткий опис фігур

[0014]

На фіг. 1 зображений приклад формату тетравалентного антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом.

[0015]

На фіг. 2 зображена інгібуюча дія на проникність судин

повністю людського 2-16A2 і TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT у моделі проникності судин на щурах. На вертикальній осі зазначений рівень просочування синього барвника Еванса (\*\*\*\*:  $p < 0,0001$  у порівнянні з групою носія).

[0016]

На фіг. 2 зображена інгібуюча дія на проникність судин TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA у моделі проникності судин на щурах. На вертикальній осі зазначений рівень просочування синього барвника Еванса (\*\*\*\*:  $p < 0,0001$  у порівнянні з групою носія).

[0017]

На фіг. 4 зображена інгібуюча дія на набряк сітківки TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA в моделі на мишах з втратою перичитів у кровоносних судинах сітківки. На вертикальній осі вказана сума площі шару нервових волокон сітківки і шару гангліозних клітин сітківки (##:  $p < 0,005$  у порівнянні з контрольною групою, \*:  $p < 0,05$  у порівнянні з групою носія).

[0018]

На фіг. 5 зображено поліпшуючу кровотік дію TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA в моделі на мишах з ішемією задніх кінцівок. На вертикальній осі зазначений рівень кровотоку. (\*:  $p < 0,05$  у порівнянні з контрольною групою, \*\*:  $p < 0,01$  у порівнянні з контрольною групою).

[0019]

На фіг. 6 наведений репрезентативний приклад результатів феномена поверхневого плазмонного резонансу як аналіз епітопів TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA. На вертикальній осі вказано відповідь зв'язування (Резонансних одиниць: RU) та на горизонтальній осі вказано час (секунд).

[0020]

На фіг. 7 наведені результати ELISA як аналіз епітопів TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA. На вертикальній осі вказана інтенсивність люмінесценції, і на горизонтальній осі вказана концентрація TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA (нг/мл).

Варіанти реалізації винаходу

[0021]

Далі у наданому документі, наданий винахід описаний докладно.

[0022]

У антитіл існує п'ять класів IgG, IgM, IgA, IgD та IgE. Основна структура молекули антитіла володіє спільною для кожного з класів конфігурацією з важких ланцюгів, що володіють молекулярною масою 50000-70000, і легких ланцюгів, що володіють молекулярною масою 20000-30000. Важкий ланцюг, як правило, складається з поліпептидного ланцюга, що містить приблизно 440 амінокислот, володіє відмінною структурою для кожного з класів і позначений як Ig $\gamma$ , Ig $\mu$ , Ig $\alpha$ , Ig $\delta$  та Ig $\epsilon$ , що відповідають IgG, IgM, IgA, IgD та IgE, відповідно. Крім того, чотири підкласи IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4 присутні в IgG, і важкі ланцюги, що їм відповідають, відповідно, позначають як Ig $\gamma$ 1, Ig $\gamma$ 2, Ig $\gamma$ 3 та Ig $\gamma$ 4. Легкий ланцюг, як правило, складається з поліпептидного ланцюга, що містить приблизно 220 амінокислот, з якого відомі два типи - тип L і



тип К - і їх позначають як Igλ та Igκ. У пептидній конфігурації основної структури молекул антитіл два гомологічні важкі ланцюги і два гомологічні легкі ланцюга зв'язані дисульфідними зв'язками (зв'язками S-S) і нековалентними зв'язками, і їх молекулярна маса становить 150000-190000. Два види легких ланцюгів можуть спаровуватися з будь-яким важким ланцюгом.

5 [0023]

Що стосується внутрішньоланцюгових зв'язків S-S, чотири зв'язки зі зв'язків S-S присутні у важкому ланцюзі (п'ять в Igμ та Igε) і два з них присутні у легкому ланцюзі; одна петля сформована з 100-110 амінокислотних залишків, і ця стерична структура є подібною серед петель і позначена як структурна одиниця або домен. Домен, локалізований з аміно-кінцевого боку (N-кінцевого боку) як у важкому ланцюзі, так і в легкому ланцюзі, амінокислотна послідовність якого не є постійною навіть у випадку зразка з одного і того ж класу (підкласу) з однієї і тієї ж тварини, позначений як варіабельна ділянка, і відповідні домени позначені як варіабельна ділянка важкого ланцюга і варіабельна ділянка легкого ланцюга. Амінокислотна послідовність з карбокси-кінцевого боку (C-кінцевого боку) від варіабельної ділянки є майже постійною у кожному класі або підкласі і позначена як константна ділянка.

15 [0024]

Конфігурація антигензв'язувальної ділянки антитіла складена з варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) і варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL), і специфічність зв'язування залежить від амінокислотної послідовності цієї ділянки. З іншого боку, такі види біологічної активності, як зв'язування з компонентами комплемента і різними клітинами, відображають відмінності в структурах константної ділянки між кожним класом Ig. Зрозуміло, що мінливість варіабельних ділянок легких ланцюгів і важких ланцюгів здебільшого обмежена трьома невеликими гіперваріабельними ділянками, присутніми в обох ланцюгах, і ці ділянки позначені як ділянки, що визначають компліментарність (CDR: CDR1, CDR2 і CDR3 з N-кінцевого боку).

25 Частина варіабельної ділянки, що залишилася, позначена як каркасна ділянка (FR) і є відносно сталою.

[0025]

Що стосується константної ділянки, то константна ділянка важкого ланцюга складається з трьох ділянок, кожна з яких названа ділянкою CH1, ділянкою CH2 і ділянкою CH3 по порядку з боку варіабельної ділянки. Константна ділянка легкого ланцюга складається з однієї ділянки. Пептидна послідовність, що називається шарнірною ділянкою, присутня між ділянкою CH1 і ділянкою CH2. Шарнірна ділянка впливає на рухливість структури, що складається з варіабельної ділянки важкого ланцюга і ділянки CH1.

[0026]

35 Крім того, різні види антигензв'язувальних фрагментів, що містять VH і VL антитіла, володіють антигензв'язувальною активністю. Наприклад, одноланцюговий фрагмент варіабельної ділянки (scFv), Fab, Fab' та F(ab')<sub>2</sub> є прикладами типових антигензв'язувальних фрагментів. Fab являє собою одновалентний антигензв'язувальний фрагмент, що складається з легкого ланцюга і фрагмента важкого ланцюга, що містить VH, ділянку CH1 і частину шарнірної ділянки. Fab' являє собою одновалентний антигензв'язувальний фрагмент, що складається з легкого ланцюга і фрагмента важкого ланцюга, що містить VH, ділянку CH1 і частину шарнірної ділянки, і залишки цистеїну, що складають зв'язок S-S між важкими ланцюгами, містяться в частині шарнірної ділянки. F(ab')<sub>2</sub> являє собою двовалентний антигензв'язувальний фрагмент, що володіє димерною структурою, в якій два Fab' фрагменти зв'язані один з одним через зв'язок S-S між важкими ланцюгами у шарнірній ділянці. scFv являє собою одновалентний антигензв'язувальний фрагмент, що складається з VH і VL, з'єднаних лінкерним пептидом.

[0027]

Антитіло, яке має дві або більше антигензв'язувальних ділянки, позначено як мультивалентне антитіло. Серед них антитіло, яке має чотири антигензв'язувальних ділянки, позначено як тетравалентне антитіло. Для тетравалентного антитіла опубліковані різні формати (структури) (Nat. Rev. Immunol. 2010, Vol. 10, pp. 301-316; J. Immunol., 2003, Vol. 170, pp. 4854-4861; Mol. Immunol., 2000, Vol. 37, pp. 1067-1077; Biochem. J., 2007, Vol. 406, pp. 237-246; та J. Immunol. Methods, 2003, Vol. 279, pp. 219-232). Наприклад, опубліковано тетравалентне антитіло, в якому кожен з N-кінців варіабельної ділянки важкого ланцюга і варіабельної ділянки легкого ланцюга двовалентного антитіла зв'язані з C-кінцями варіабельної ділянки важкого ланцюга і варіабельної ділянки легкого ланцюга через лінкер; тетравалентне антитіло, що містить два важкі ланцюги і чотири легкі ланцюги, в якому кожен важкий ланцюг містить дві структури, що складаються з варіабельної ділянки важкого ланцюга і ділянки CH1; тетравалентне антитіло, в якому C-кінці scFv зв'язані з кожним стрептавідином з тетрамерного стрептавідину один за одним; тетравалентне антитіло, в якому C-кінці scFv зв'язані з кожним

p53 з тетрамерного p53 один за одним; і тетравалентне антитіло, в якому N-кінці ділянки CH3 зв'язані з C-кінцями димерного scFv через лінкер.

[0028]

<Антитіло проти Tie2 людини за наданим винаходом>

5 Антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом включає антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, що володіють такою характеристикою.

Антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, що містять чотири варіабельні ділянки важкого ланцюга і чотири варіабельні ділянки легкого ланцюга, в яких варіабельна ділянка важкого ланцюга складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-122 з SEQ ID NO: 2,

варіабельна ділянка легкого ланцюга складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-113 з SEQ ID NO: 4; та

15 одна варіабельна ділянка важкого ланцюга і одна варіабельна ділянка легкого ланцюга складають одну антигензв'язувальну ділянку, і антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містять чотири антигензв'язувальних ділянки.

[0029]

Антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом не є конкретно обмеженим за умови, що вони являють собою тетравалентне антитіло, і різні формати тетравалентного антитіла, описані, наприклад, в Nat. Rev. Immunol. 2010, Vol. 10, pp. 301-316; J. Immunol., 2003, Vol. 170, pp. 4854-4861; Мої. Immunol., 15 2000, Vol. 37, pp. 1067-1077; Biochem. J., 2007, Vol. 406, pp. 237-246; J. Immunol. Methods, 2003, Vol. 279, pp. 219-232; і т.п., можна використовувати для антитіла проти Tie2 людини або його антигензв'язувального фрагмента за наданим винаходом.

[0030]

25 Переважно, антитіло проти Tie2 людини за наданим винаходом містить два важкі ланцюги і чотири легкі ланцюги, кожен важкий ланцюг містить дві структури, що складаються з варіабельної ділянки важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-122 з SEQ ID NO: 2 і ділянки CH1, ділянки CH2 і ділянки CH3, і C-кінець однієї зі структур зв'язаний з N-кінцем іншої структури через лінкер, та кожен легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-113 з SEQ ID NO: 4, і константну ділянку легкого ланцюга.

Далі в наданому документі, тетравалентне антитіло у цьому форматі позначено як тандемне антитіло, і його приклад наведений на фіг. 1.

[0031]

35 У випадку, коли антитіло проти Tie2 людини за наданим винаходом являє собою тандемне антитіло, константну ділянку (наприклад, константну ділянку з Igγ1, Igγ2, Igγ3 або Igγ4 як константна ділянка важкого ланцюга, і константну ділянку з Igλ або Igκ як константна ділянка легкого ланцюга) з будь-якого підкласу можна обирати як константну ділянку. Константна ділянка важкого ланцюга (у тому числі ділянка CH1, ділянка CH2 і ділянка CH3) переважно являє собою константну ділянку Igγ1 людини або константну ділянку Igγ4 людини. Константна ділянка легкого ланцюга переважно являє собою константну ділянку Igκ людини.

[0032]

45 У випадку, коли константну ділянку Igγ1 людини використовують як константну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом, приклади ділянки CH1, ділянки CH2 і ділянки CH3 константної ділянки Igγ1 людини включають ділянку CH1, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 350-447 з SEQ ID NO: 8, ділянку CH2, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 4 63-572 з SEQ ID NO: 8, і ділянку CH3, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 573-679 з SEQ ID NO: 8.

[0033]

55 У випадку, коли константну ділянку Igγ1 людини використовують як константну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом, константну ділянку Igγ1 людини, що володіє введеними варіантами амінокислот, такими як L234A (що володіє заміною лейцину в 234-му амінокислотному положенні на аланін відповідно до індексу EU такого як Kabat), L235A (що володіє заміною лейцину в 235-му амінокислотному положенні на аланін відповідно до індексу EU такого як Kabat) та P331S (що володіє заміною проліну в 331-му амінокислотному положенні на серин відповідно до індексу EU такого як Kabat), також можна використовувати, щоб зменшити активність антитіла в антитілозалежній клітинній цитотоксичності або комплементзалежній цитотоксичності (Мої. Immunol., 1992, Vol. 29, No.5,

pp. 633-639). Крім того, з точки зору фармакокінетики, константну ділянку Ig $\gamma$ 1 людини, в яку введені варіанти амінокислот, такі як L253A (що володіє ізолейцином заміною в 253-му амінокислотному положенні на аланін відповідно до індексу EU такого як Kabat), також можна використовувати для досягнення швидкого виведення з крові (J. Immunol., 1997, Vol. 158, pp. 2211-2217). Номери залишків відносно введення варіанта амінокислоти у константну ділянку антитіла, які використовуються в наданому описі, знаходяться у відповідності з індексом EU (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda).

[0034]

У випадку, коли константну ділянку Ig $\gamma$ 1 людини використовують як константну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини за даним винаходом, константна ділянка Ig $\gamma$ 1 людини переважно являє собою константну ділянку Ig $\gamma$ 1 людини, що володіє варіантами амінокислот з L234A, L235A, та P331S, або L234A, L235A, P331S та I253A. Приклади ділянки CH1, ділянки CH2 і ділянки CH3 з константної ділянки Ig $\gamma$ 1 людини, що володіє варіантами амінокислот з L234A, L235A і P331S, включають ділянку CH1, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 350-447 з SEQ ID NO: 2, ділянку CH2, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 463-572 з SEQ ID NO: 2, і ділянку CH3, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 573-679 з SEQ ID NO: 2. Приклади ділянки CH1, ділянки CH2 і ділянки CH3 з константної ділянки Ig $\gamma$ 1 людини, що володіє варіантами амінокислот з L234A, L235A, P331S та I253A, включають ділянку CH1, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 350-447 з SEQ ID NO: 8, ділянку CH2, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 463-572 з SEQ ID NO: 6, і ділянку CH3, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 573-679 з SEQ ID NO: 6.

[0035]

У випадку, коли константну ділянку Ig $\gamma$ 4 людини використовують як константну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом, константну ділянку Ig $\gamma$ 4 людини, що володіє введеними варіантами амінокислот, такими як S228P (що володіє заміною серину в 228-му амінокислотному положенні на пролін відповідно до індексу EU такого як Kabat) і L235E (що володіє заміною лейцину в 235-му амінокислотному положенні на глутамінову кислоту відповідно до індексу EU такого як Kabat) також можна використовувати, щоб інгібувати обмін Fab-фрагментами (Drug Metab. Dispos., 2010, Vol. 38, No.1, pp. 84-91).

[0036]

У випадку, коли константну ділянку Ig $\gamma$ 4 людини використовують як константну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом, константна ділянка Ig $\gamma$ 4 людини переважно являє собою константну ділянку Ig $\gamma$ 4 людини, що володіє варіантами амінокислот S228P та L235E. Приклади ділянки CH1, ділянки CH2 і ділянки CH3 з константної ділянки Ig $\gamma$ 4 людини, що володіє варіантами амінокислот з S228P та L235E, включають ділянку CH1, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 350-447 з SEQ ID NO: 10, ділянку CH2, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 460-569 з SEQ ID NO: 10, і ділянку CH3, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 570-676 з SEQ ID NO: 10.

[0037]

Приклади константної ділянки Ig $\kappa$  людини включають константну ділянку Ig $\kappa$  людини, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 114-219 з SEQ ID NO: 4.

[0038]

Переважно, у випадку коли антитіло проти Tie2 людини за даним винаходом являє собою тандемне антитіло, константна ділянка важкого ланцюга являє собою константну ділянку Ig $\gamma$ 1 людини або константну ділянку Ig $\gamma$ 4 людини, і константна ділянка легкого ланцюга являє собою константну ділянку Ig $\kappa$  людини. У випадку, коли константна ділянка важкого ланцюга являє собою константну ділянку Ig $\gamma$ 1 людини, константна ділянка Ig $\gamma$ 1 людини переважно являє собою константну ділянку Ig $\gamma$ 1 людини, що володіє варіантами амінокислот з L234A, L235A і P331S, або константну ділянку Ig $\gamma$ 1 людини, що володіє варіантами амінокислот з L234A, L235A, P331S і I253A. У випадку, коли константна ділянка важкого ланцюга являє собою константну ділянку Ig $\gamma$ 4 людини, константна ділянка Ig $\gamma$ 4 людини переважно являє собою константну ділянку Ig $\gamma$ 4 людини, що володіє варіантами амінокислот з S228P і L235E.

[0039]

У випадку, коли антитіло проти Tie2 людини за даним винаходом являє собою тандемне антитіло, як лінкер, що з'єднує структури, що складаються з варіабельної ділянки важкого

ланцюга і ділянки CH1, можна використовувати будь-який пептид (пептидний лінкер) за умови, що антитіло володіє такою функцією. Довжину і амінокислотну послідовність пептидного лінкера може належним чином обирати фахівець в даній галузі. Пептидний лінкер переважно володіє довжиною 5-70 амінокислот. Пептидний лінкер переважно містить амінокислотну послідовність шарнірної ділянки або її частину. Шарнірна ділянка означає ділянку, що існує між ділянкою CH1 і ділянкою CH2 антитіла, і приклади шарнірної ділянки, яка підлягає використанню, включають шарнірну ділянку IgG1 або IgG3. Частина шарнірної ділянки означає ділянку, що володіє щонайменше 5 послідовними амінокислотами у шарнірній ділянці, і переважно, означає ділянку, яка володіє щонайменше 5 послідовними амінокислотами від N-кінця шарнірної ділянки. Приклади частини шарнірної ділянки включають ділянку, яка володіє 5 послідовними амінокислотами від N-кінця (що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-5 з SEQ ID NO: 13) у випадку шарнірної ділянки IgG1 і ділянка, що володіє 12 послідовними амінокислотами від N-кінця (що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-12 з SEQ ID NO: 14) у випадку шарнірної ділянки IgG3. В одному варіанті реалізації винаходу лінкер містить амінокислотну послідовність ділянки, що володіє щонайменше 5 послідовними амінокислотами від N-кінця шарнірної ділянки і містить амінокислотну послідовність GlySer на C-кінці лінкера.

Приклади такого лінкера включають пептидний лінкер, що складається з амінокислотної послідовності, вказаної в будь-який з SEQ ID NO: 13-20, і лінкер переважно складається з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 13.

[0040]

В одному варіанті реалізації антитіло проти Tie2 людини за наданим винаходом являє собою антитіло проти Tie2 людини, що володіє будь-якою з наступних характеристик i)-iv).

i) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

ii) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 6, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

iii) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 8, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

iv) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 10, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

[0041]

Відомо, що коли антитіло експресується в клітинах, антитіло модифікується після трансляції. Приклади посттрансляційної модифікації включають відщеплення лізину на C-кінці важкого ланцюга за допомогою карбоксипептидази; модифікація глутаміну або глутамінової кислоти на N-кінці важкого ланцюга і легкого ланцюга до піроглутамінової кислоти за допомогою піроглутамілірування; глікозилювання; окислення; дезамінування; і глікірування, і відомо, що такі посттрансляційні модифікації виникають у різних антитілах (Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, Vol. 97, p. 2426-2447).

[0042]

Антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом включають антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, які зазнали посттрансляційної модифікації. Приклади антитіла проти Tie2 людини або його антигензв'язувального фрагмента за наданим винаходом, які зазнали посттрансляційної модифікації, включають антитіла проти Tie2 людини або їх антигензв'язувальні фрагменти, які зазнали піроглутамілірування на N-кінці варіабельної ділянки важкого ланцюга та/або делеції лізину на C-кінці важкого ланцюга. У даній галузі відомо, що така посттрансляційна модифікація, обумовлена піроглутаміліруванням на N-кінці і делецією лізину на C-кінці, жодним чином не впливає на активність антитіла (Analytical Biochemistry, 2006, Vol. 348, p. 24-39).

[0043]

В одному варіанті реалізації антитіло проти Tie2 людини за наданим винаходом являє собою антитіло проти Tie2 людини, що володіє будь-якою з наступних характеристик (1)-(4).

(1) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 2, в якій глутамінова кислота з амінокислотного номера 1 з SEQ ID NO: 2 модифікована до піроглутамінової кислоти, та/або

лізин з амінокислотного номера 679 з SEQ ID NO: 2 делетований, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

(2) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 6, в якій глутамінова кислота з амінокислотного номера 1 з SEQ ID NO: 6 модифікована до піроглутамінової кислоти, та/або лізин з амінокислотного номера 679 з SEQ ID NO: 6 делетований, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

(3) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 8, в якій глутамінова кислота з амінокислотного номера 1 з SEQ ID NO: 8 модифікована до піроглутамінової кислоти, та/або лізин з амінокислотного номера 679 з SEQ ID NO: 8 делетований, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

(4) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 10, в якій глутамінова кислота з амінокислотного номера 1 з SEQ ID NO: 10 модифікована до піроглутамінової кислоти, та/або лізин з амінокислотного номера 679 з SEQ ID NO: 10 делетований, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

[0044]

В одному варіанті реалізації антитіло проти Tie2 людини за даним винаходом являє собою антитіло проти Tie2 людини, що володіє наступними характеристиками. Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-678 з SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

[0045]

Наданий винахід, крім того, належить до антитіла проти Tie2 людини або його антигензв'язувального фрагмента, що володіє наступними характеристиками. Антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, що містять чотири варіабельні ділянки важкого ланцюга і чотири варіабельні ділянки легкого ланцюга, в яких варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR1, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 31-35 з SEQ ID NO: 2, CDR2, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 50-66 з SEQ ID NO: 2, і CDR3, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 99-111 з SEQ ID NO: 2, варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR1, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 24-39 з SEQ ID NO: 4, CDR2, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 55-61 з SEQ ID NO: 4, і CDR3, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 94-102 з SEQ ID NO: 4; та одна варіабельна ділянка важкого ланцюга і одна варіабельна ділянка легкого ланцюга складають одну антигензв'язувальну ділянку, і антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містять чотири антигензв'язувальних ділянки.

[0046] Також наданий винахід належить до антитіла проти Tie2 людини, що володіє наступними характеристиками. Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги і чотири легкі ланцюги, в якому кожен важкий ланцюг містить дві структури, що складаються з варіабельної ділянки важкого ланцюга, що містить CDR1, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 31-35 з SEQ ID NO: 2, CDR2, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 50-66 з SEQ ID NO: 2, і CDR3, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 99-111 з SEQ ID NO: 2, і ділянки CH1, ділянки CH2 і ділянки CH3, і карбокси-кінець однієї із структур зв'язаний з амінокінцем іншої структури через лінкер; та кожен легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR1, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 24-39 з SEQ ID NO: 4, CDR2, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 55-61 з SEQ ID NO: 4, і CDR3, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 94-102 з SEQ ID NO: 4, і константної ділянки легкого ланцюга.

[0047]

Антитіло проти Tie2 людини за наданим винаходом являє собою антитіло, яке зв'язується з Tie2 людини. Чи зв'язується антитіло з Tie2 людини (No. доступу NP\_000450.2) можна підтверджувати з використанням відомого способу вимірювання активності зв'язування. Приклади способу вимірювання активності зв'язування включають спосіб твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA) або т.п. У випадку використання ELISA в ілюстративному способі, білок, сформований за допомогою злиття Tie2 людини з Fc людини, іммобілізують на планшеті для ELISA, і протестоване антитіло додають до них для реакції. Проводять реакцію

вторинного антитіла, такого як мічене біотином антитіло проти IgG, з продуктом реакції, промивають, і потім проводять реакцію з стрептавідином, з яким зв'язаний фермент, такий як лужна фосфатаза. Після промивання, можна підтверджувати, чи зв'язується тестоване антитіло з Tie2 людини, за допомогою проведення вимірювання активності з використанням детектуючого активність реагента (наприклад, у випадку лужної фосфатази хемілюмінесцентного Ultra Sensitive AP Microwell та/або мембранного субстрату (450 нм) (BioFX, APU4-0100-01) або т.п.)). Як конкретний спосіб оцінки активності можна використовувати, наприклад, такий самий спосіб як спосіб, описаний у прикладі 12, як описано далі.

[0048]

Антитіло проти Tie2 людини за наданим винаходом, крім того, включає антитіло, що зв'язується з Tie2, що походить з інших тварин (наприклад, Tie2 мавпи) на додаток до зв'язування з Tie2 людини, за умови, що воно являє собою антитіло, що зв'язується з Tie2 людини.

[0049]

Переважно, антитіло проти Tie2 людини за наданим винаходом зв'язується з Tie2 людини і, крім того, володіє антиапоптотичною активністю відносно експресуючих Tie2 людини клітин. Як конкретний спосіб для оцінки того, чи володіє антитіло антиапоптотичною активністю відносно експресуючих Tie2 людини клітин, можна використовувати, наприклад, такий самий спосіб, як описаний у прикладі 4, як описано далі.

[0050]

Антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом включають тетравалентне антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, що зв'язується з таким самим епітопом Tie2 людини, як антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4, або як антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-678 з SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4. У наданому документі, епітоп належить до ділянки антигена, яку впізнає антитіло.

[0051]

Антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом включають тетравалентне антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, що зв'язується з епітопом, що містить щонайменше одну амінокислоту з амінокислот з амінокислотних номерів 192, 195 і 197 Tie2 людини (No. доступу NP\_000450.2).

[0052]

Більш того, антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом включають тетравалентне антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, що зв'язується з епітопом, що містить амінокислоти з амінокислотних номерів 192, 195 і 197 Tie2 людини (No. доступу NP 000450,2).

[0053]

Тетравалентне антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, що зв'язується з таким самим епітопом Tie2 людини, як антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4, або як антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-678 з SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4, можна отримати з використанням відомого способу визначення епітопа. Приклади способу визначення епітопа включають мас-спектрометрію з обміном водню/дейтерію, рентгенівський аналіз кристалічної структури, ELISA та феномен поверхневого плазмонного резонансу з використанням мутанта Tie2 людини з заміною амінокислот, часткового пептиду Tie2 людини або т.д., і т.п.

[0054]

Можна перевіряти, чи зв'язується тестоване антитіло з таким самим епітопом Tie2 людини, як антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4, або як антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-678 з SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності,

вказаної в SEQ ID NO: 4 з використанням добре відомого способу для визначення епітопа, як описано вище. У випадку використання мас-спектрометрії з обміном водню/дейтерію кожен з Tie2 людини з заміною на дейтерій за відсутності тестованого антитіла і Tie2 людини з заміною на дейтерій у присутності тестованого антитіла поділяють на пептиди, і вимірюють кількість молекул кожного пептиду для розрахунку відношення заміни на дейтерій. Епітоп Tie2 людини для тестованого антитіла можна визначати з відмінності відношень заміни на дейтерій в Tie2 людини відповідно до присутності або відсутності тестованого антитіла. У випадку використання ELISA отримують Tie2 людини з точковою мутацією. Мутантний Tie2 людини іммобілізують, і тестоване антитіло додають до нього, щоб піддати реакції. Після реакції вторинне антитіло, таке як мічене біотином антитіло проти легкого ланцюга каппа людини, піддають реакції і відмиванню. Потім, мічений лужною фосфатазою стрептавідин (Thermo Fisher Scientific, 21324) піддають реакції з ним і відмиванню. Потім, можна ідентифікувати, зв'язується чи ні тестоване антитіло з мутантом Tie2 людини, за допомогою проведення вимірювання активності з використанням хемілюмінесцентного Ultra Sensitive AP Microwell та/або мембранного субстрату (450 нм), або т.п. Можна визначати епітоп тестованого антитіла за допомогою оцінки активності зв'язування з різними типами мутантного Tie2 людини. У випадку, коли епітоп тестованого антитіла містить щонайменше одну амінокислоту в епітопі антитіла проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4, або антитіла проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-678 з SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4, можна перевіряти, що тестоване антитіло зв'язується з таким самим епітопом Tie2 людини, як антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4, або як антитіло проти Tie2 людини, що містить важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-678 з SEQ ID NO: 1, і легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

[0055]

Антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом може легко отримати фахівець в даній галузі, використовуючи спосіб, відомий в цій галузі, на підставі інформації про послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга і варіабельної ділянки легкого ланцюга антитіла за наданим винаходом, як описано у цьому описі. Антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом не є конкретно обмеженими, але їх можна отримувати у відповідності зі способом, описаним у <Спосіб отримання антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом і антитіло проти Tie2 людини, отримане цим способом>, наприклад, як описано далі.

[0056]

Антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом потім очищують за потреби, і складають відповідно до загальноприйнятого способу. Його можна використовувати для запобігання або лікування захворювань, що стосуються кровоносних судин, таких як діабетична ретинопатія, діабетичний набряк жовтої плями, сепсис, гострі ушкодження печінки, гострі ушкодження нирок, гострі ушкодження легенів, синдром системної запальної реакції, оклюзійне захворювання периферичних артерій або критична ішемія кінцівок.

[0057]

<Полінуклеотид за наданим винаходом>

Полінуклеотид за наданим винаходом включає полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом, і полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом.

[0058]

В одному варіанті реалізації полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом, являє собою полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-122 з SEQ ID NO: 2.

[0059]

Приклади полінуклеотиду, що містить послідовність основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга, вказану в амінокислотній послідовності з амінокислот номер 1-122 з SEQ ID NO: 2, включають полінуклеотид з послідовністю основ з основ номер 1-366 з SEQ ID NO: 1.

[0060]

В переважному варіанті реалізації полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом, являє собою полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 2, полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 6, полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 8, або полінуклеотид, що містить послідовність основ, що кодує важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 10.

[0061]

Приклади полінуклеотиду, що містить послідовність основ, що кодує важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 2, включають полінуклеотид з послідовністю основ, вказану в SEQ ID NO: 1. Приклади полінуклеотиду, що містить послідовність основ, що кодує важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 6, включають полінуклеотид з послідовністю основ, вказану в SEQ ID NO: 5. Приклади полінуклеотиду, що містить послідовність основ, що кодує важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 8, включають полінуклеотид з послідовністю основ, вказану в SEQ ID NO: 7. Приклади полінуклеотиду, що містить послідовність основ, що кодує важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 10, включають полінуклеотид з послідовністю основ, вказану в SEQ ID NO: 9.

[0062]

В одному варіанті реалізації полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом, являє собою полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-113 з SEQ ID NO: 4.

[0063]

Приклади полінуклеотиду, що містить послідовність основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга, вказану в амінокислотній послідовності з амінокислот номер 1-113 з SEQ ID NO: 4, включають полінуклеотид з послідовністю основ з основ номер 1-339 з SEQ ID NO: 3.

[0064]

У переважному варіанті реалізації полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом, являє собою полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 4.

[0065]

Приклади полінуклеотиду, що містить послідовність основ, що кодує легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4, включають полінуклеотид з послідовністю основ, вказану в SEQ ID NO: 3.

[0066]

Полінуклеотид за наданим винаходом може легко отримувати фахівець в даній галузі з використанням відомого у даній галузі способу на основі послідовності основ. Наприклад, полінуклеотид за наданим винаходом можна синтезувати з використанням відомого у даній галузі способу синтезу генів. Як спосіб синтезу генів можна використовувати різні способи, такі як спосіб синтезу генів антитіл, описаний у WO90/07861, що відомі фахівцям у даній галузі. Крім того, після отримання полінуклеотиду за наданим винаходом, можна отримувати інші полінуклеотиди за наданим винаходом за допомогою введення варіантів у попередньо визначену ділянку полінуклеотиду. Як такий спосіб введення варіантів можна використовувати різні способи, відомі фахівцям в даній галузі, такі як спосіб сайт-специфічного мутагенезу (Current Protocols in Molecular Biology edit., 1987, John Wiley & Sons Section 8.1-8.5).

[0067]

<Експресуючий вектор за наданим винаходом>

Експресуючий вектор за наданим винаходом включає полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її



антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом, та/або полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом. Тетравалентні антитіла в різних форматах і способи їх отримання добре відомі в даній галузі, і експресуючий вектор за наданим винаходом може легко отримати фахівець в даній галузі відповідно до таких способів отримання або форматів тетравалентних антитіл, які підлягають експресії.

[0068]

Переважні приклади експресуючого вектора за наданим винаходом включають експресуючий вектор, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом, експресуючий вектор, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом, і експресуючий вектор, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом, і полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг антитіла.

[0069]

Експресуючий вектор, який використовується для експресії полінуклеотида за наданим винаходом, не є конкретно обмеженим за умови, що полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальних фрагмент за наданим винаходом, та/або полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом, можна експресувати у різних клітинах-хазяїх з еукаріотичних клітин (наприклад, клітин тварин, клітин комах, клітин рослин і дріжджів) та/або прокаріотичних клітин (наприклад, *Escherichia coli*), і можна отримувати кодовані ними поліпептиди. Приклади експресуючого вектора включають плазмідні вектори, вірусні вектори (наприклад, аденовірус, аденоасоційований вірус, вірус Сендай або ретровірус) і т.п. Переважно, можна використовувати pEE6.4 або pEE12.4 (Lonza, Inc.). Крім того, гени антитіл можна експресувати з використанням експресуючих векторів, які заздалегідь містять гени константної ділянки Ід людини, таких як AG-γ1 або AG-κ (наприклад, див. WO94/20632).

[0070]

Експресуючий вектор за наданим винаходом може містити промотор, функціонально зв'язаний з полінуклеотидом за наданим винаходом. Приклади промотору для експресії полінуклеотида за винаходом за допомогою клітин тварин включають промотор, що походить з вірусу, такого як CMV, RSV або SV40, промотор актину, промотор EF (фактора елонгації) Іα та промотор теплового шоку. Приклади промоторів для експресії за допомогою бактерій (наприклад, *Escherichia*) включають промотор *trp*, промотор *lac*, промотор APL та промотор *tac*. Крім того, приклади промоторів для експресії за допомогою дріжджів включають промотор GAL1, промотор GAL10, промотор PH05, промотор PGK, промотор GAP і промотор ADH.

[0071]

У випадку використання клітин тварин, клітин комах або дріжджів як клітин-хазяїх, експресуючий вектор за наданим винаходом може містити ініціюючий кодон і термінуючий кодон. У цьому випадку, експресуючий вектор за наданим винаходом може містити енхансерну послідовність, нетрансльовану ділянку з 5'-сторони і з 3'-сторони від генів, що кодують антитіло за наданим винаходом або варіабельну ділянку важкого ланцюга, або варіабельну ділянку легкого ланцюга, секреторну сигнальну послідовність, ділянку стикування у випадку сплайсингу, ділянку поліаденілювання або одиницю, що піддається реплікації. Коли *Escherichia coli* використовують як клітини-хазяїна, експресуючий вектор за наданим винаходом може містити ініціюючий кодон, термінуючий кодон, термінаторну ділянку і одиницю, що піддається реплікації. У цьому випадку, експресуючий вектор за наданим винаходом може містити селективний маркер (наприклад, гени стійкості до тетрацикліну, гени стійкості до ампіциліну, гени стійкості до канаміцину, гени стійкості до неоміцину або гени дигідрофолатредуктази), який, як правило, використовують за потребою.

[0072]

<Трансформована клітина-хазяїн за наданим винаходом>

Трансформована клітина-хазяїн за наданим винаходом включає клітину-хазяїна, трансформовану експресуючим вектором за наданим винаходом, обрану з групи, що складається з (a)-(d) нижче:

(a) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором,

що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент за наданим

винаходом, і полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла або її антигензв'язувальний фрагмент;

(b) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом, і експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла або її антигензв'язувальний фрагмент;

(c) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом; та

(d) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом.

[0073]

В одному варіанті реалізації трансформована клітина-хазяїн за наданим винаходом являє собою клітину-хазяїна, трансформовану експресуючим вектором за наданим винаходом, обрану з групи, що складається з (a)-(d) нижче:

(a) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом, і полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг антитіла;

(b) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом, і експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг антитіла;

(c) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом; та

(d) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом.

[0074]

Переважні приклади трансформованої клітини-хазяїна за наданим винаходом включають клітину-хазяїна, трансформовану експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом, і полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг антитіла, і клітину-хазяїна, трансформовану експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом, і експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг антитіла.

[0075]

Трансформована клітина-хазяїн не є конкретно обмеженою за умови, що клітина-хазяїн є придатною для експресуючого вектора, що використовується, трансформована експресуючим вектором, і може експресувати антитіло. Приклади трансформованої клітини-хазяїна включають різні клітини, такі як природні клітини або штучно отримані клітини, які є загальноприйнятими в галузі винаходу (наприклад, клітини тварин (наприклад, клітини CHO-K1SV), клітини комарів (наприклад, Sf9), бактерії (наприклад, Escherichia), дріжджі (наприклад, Saccharomyces або Pichia) або т.п.). Переважно, можна використовувати культивовані клітини, такі як клітини CHO (клітини CHO-K1 SV, клітини CHO-DG 44 або т.п.), клітини 293 або клітини NS0.

[0076]

Спосіб трансформації клітини-хазяїна не є конкретно обмеженим, проте можна використовувати, наприклад, спосіб з фосфатом кальцію або спосіб електропорації.

[0077]

<Спосіб отримання антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом і антитіло проти Tie2 людини, отримане цим способом>

Приклади способу отримання антитіла проти Tie2 людини або його антигензв'язувального фрагмента за наданим винаходом включають спосіб отримання антитіла проти Tie2 людини або його антигензв'язувального фрагмента, що включає культивування клітини-хазяїна (клітин-хазяїв), обраної з групи, що складається з (a)-(c) нижче, для експресії тетравалентного антитіла проти Tie2 людини або його антигензв'язувального фрагмента:

(а) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом, і полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла або його антигензв'язувальний фрагмент;

(b) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом, і експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла або її антигензв'язувальний фрагмент; та

(с) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини або її антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом, і клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла або її антигензв'язувальний фрагмент.

[0078]

В одному варіанті реалізації приклади способу отримання антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом включають спосіб отримання антитіла проти Tie2 людини, що включає культивування клітини-хазяїна (клітин-хазяїв), обраної з групи, що складається з (а)-(с) нижче, для експресії антитіла проти Tie2 людини:

(а) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом, і полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг антитіла;

(b) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом, і експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг антитіла; та

(с) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом, і клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид з послідовністю основ, що кодує легкий ланцюг антитіла.

[0079]

Спосіб отримання антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом не є конкретно обмеженим за умови, що він включає стадію культивування трансформованих клітин-хазяїв за наданим винаходом для експресії антитіла проти Tie2 людини. Приклади переважних клітин-хазяїв для застосування в способі включають переважні трансформовані клітини-хазяї за наданим винаходом, як описано вище.

[0080]

Трансформовану клітину-хазяїна можна культивувати відомими способами. Умови культивування, наприклад, температуру, рН середовища для культивування і час культивування обирають відповідним чином. У випадку, коли клітина-хазяїн являє собою клітину тварини, приклади середовища для культивування включають середовище для культивування MEM, доповнене приблизно від 5 % до 20 % ембріональної бичачої сироватки (Science, 1959, Vol. 130, No. 3373, p. 432 to 7), середовище для культивування DMEM (Virology, 1959, Vol. 8, p. 396) і середовище для культивування RPMI1640 (J. Am. 25 Med. Assoc, 1967, Vol. 199, p. 519), середовище для культивування 199 (Exp. Biol. Med., 1950, Vol. 73, p. 1 to 8). рН середовища для культивування переважно становить приблизно від 6 до 8, і культивування, як правило, проводять при приблизно 30 °C-40 °C протягом приблизно 15 годин -72 годин при повітряній вентиляції і перемішуванні, за необхідністю. У випадку, коли клітина-хазяїн являє собою клітину комах, як середовище для культивування можна використовувати, наприклад, середовище для культивування Грейса (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, Vol. 82, p. 8404), доповнене ембріональною бичачою сироваткою. рН середовища для культивування переважно становить приблизно від 5 до 8, і культивування, як правило, проводять при приблизно 20 °C-40 °C протягом приблизно 15 годин -100 годин при повітряній вентиляції і перемішуванні, за необхідністю. У випадку, коли клітина-хазяїн являє собою Escherichia coli або дріжджі, як середовище для культивування підходить, наприклад, рідке середовище для культивування, доповнене джерелом живильних речовин. Є переважним, щоб живильне середовище для культивування містило джерело вуглецю, неорганічне джерело азоту або органічне джерело азоту, що необхідні для росту трансформованої клітини-хазяїна. Приклади джерела вуглецю включають глюкозу, декстран, розчинний крохмаль і сахарозу, і приклади неорганічного

джерела азоту або органічного джерела азоту включають солі амонію, солі нітрати, амінокислоти, рідкий кукурудзяний екстракт, пептон, казеїн, м'ясний екстракт, макуху соєвих бобів і картопляний екстракт. Інші живильні речовини (наприклад, неорганічні солі (наприклад, хлорид кальцію, дигідрофосфат натрію і хлорид магнію), вітаміни) і антибіотики (наприклад, тетрациклін, неоміцин, ампіцилін і канаміцин) можна додавати за бажанням. рН середовища для культивування переважно становить приблизно від 5 до 8. У випадку, коли клітина-хазяїн являє собою *Escherichia coli*, переважні приклади середовища для культивування включають середовище для культивування LB і середовище для культивування M9 (Moї. Cio., Cold Spring Harbor Laboratory, Vol. 3, A2.2). Культивування, як правило, проводять при приблизно 14 °C-39 °C протягом приблизно 3 годин - 24 годин при повітряній вентиляції і перемішуванні, за необхідністю. У випадку, коли клітина-хазяїн являє собою дріжджі, як середовище для культивування, можна використовувати, наприклад, мінімальне середовище Буркхолдера (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, Vol. 77, p. 4505). Культивування, як правило, проводять при приблизно 20 °C-35 °C протягом приблизно 14 годин - 144 годин при повітряній вентиляції і перемішуванні, за необхідністю. За допомогою проведення культивування описаним вище способом можна експресувати антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом.

[0081]

Спосіб отримання антитіла проти Tie2 людини або його антигензв'язувального фрагмента за наданим винаходом може включати екстракцію, переважно, виділення або очищення, антитіла проти Tie2 людини або його антигензв'язувального фрагмента з трансформованої клітини-хазяїна на додаток до культивування трансформованої клітини-хазяїна за наданим винаходом для експресії антитіла проти Tie2 людини або його антигензв'язувального фрагмента. Приклади способу виділення або очищення включають способи з використанням розчинності, такі як висолювання і спосіб осадження розчинником, способи з використанням відмінностей у молекулярній масі, такі як діаліз, ультрафільтрація і гель-фільтрація, способи з використанням електричного заряду, такі як іонообмінна хроматографія і хроматографія на гідроксилапатиті, способи з використанням специфічної афінності, такі як афінна хроматографія, способи з використанням відмінностей у гідрофобності, такі як обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія, і способи з використанням відмінностей в ізоелектричній точці, такі як форец з ізоелектричним фокусуванням. Переважно, антитіло, накопичене в культуральному супернатанті, можна очищати за допомогою різних видів хроматографії, наприклад, хроматографії на колонці з використанням колонки з білком А або колонки з білком G.

[0082]

Антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом включають також антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, отримані способом отримання антитіла проти Tie2 людини або його антигензв'язувального фрагмента за наданим винаходом.

[0083]

<Фармацевтична композиція за наданим винаходом>

Фармацевтичні композиції за наданим винаходом включають фармацевтичну композицію, яка містить антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом і фармацевтично прийнятні наповнювачі. Фармацевтичну композицію за наданим винаходом можна отримувати загальноприйнятим способом, з використанням загальноприйнятих в даній галузі наповнювачів, тобто, наповнювачів для медицини або носіїв для медицини. Приклади лікарських форм фармацевтичних композицій включають парентеральний лікарський засіб, такий як лікарський засіб для ін'єкції і лікарський засіб для інфузії, і їх можна вводити за допомогою внутрішньовенного введення, підшкірного введення, внутрішньоочного введення або т.п. При отриманні лікарського засобу наповнювачі, носії і домішки відповідно до лікарських форм можна використовувати в межах фармацевтично прийнятного діапазону.

[0084]

Фармацевтичні композиції за наданим винаходом можуть містити множину видів антитіл проти Tie2 людини або їх антигензв'язувальних фрагментів за наданим винаходом. Наприклад, наданий винахід включає фармацевтичну композицію, яка містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, які не піддавалися посттрансляційній модифікації, і антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, отримані в результаті посттрансляційної модифікації антитіла або його антигензв'язувального фрагмента.

[0085]

В одному варіанті реалізації фармацевтична композиція за наданим винаходом, що містить антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, включає фармацевтичну композицію, як описано нижче.

Фармацевтична композиція, яка містить антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, в якій антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент містить чотири варіабельні ділянки важкого ланцюга і чотири варіабельні ділянки легкого ланцюга, варіабельна ділянка важкого ланцюга складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-122 з SEQ ID NO: 2, варіабельна ділянка легкого ланцюга складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-113 з SEQ ID NO: 4, одна варіабельна ділянка важкого ланцюга і одна варіабельна ділянка легкого ланцюга складають одну антигензв'язувальну ділянку, і антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить чотири антигензв'язувальні ділянки, і антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, отримані в результаті посттрансляційної модифікації антитіла або його антигензв'язувального фрагмента.

[0086]

В одному варіанті реалізації фармацевтична композиція, що містить антитіло проти Tie2 людини за наданим винаходом, включає фармацевтичну композицію, як описано нижче.

Фармацевтична композиція, яка містить антитіло проти Tie2 людини, що являє собою антитіло проти Tie2 людини, і антитіло сформовано за допомогою посттрансляційної модифікації антитіла, що містить два важкі ланцюги і чотири легкі ланцюги, в якому кожен важкий ланцюг містить дві структури, що складаються з варіабельної ділянки важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-122 з SEQ ID NO: 2, і ділянки CH1, ділянки CH2 і ділянки CH3, і С-кінець однієї з структур зв'язаний з N-кінцем іншої структури через лінкер, і кожен легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-113 з SEQ ID NO: 4, і константну ділянку легкого ланцюга, і антитіло містить чотири антигензв'язувальні ділянки, і антитіло, отримане в результаті посттрансляційної модифікації антитіла.

[0087]

Фармацевтичні композиції за наданим винаходом включають також фармацевтичну композицію, яка містить антитіло, в якому лізин на С-кінці важкого ланцюга делетований, антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент з посттрансляційною модифікацією N-кінця, антитіло, в якому лізин на С-кінці важкого ланцюга делетований і виконана посттрансляційна модифікація N-кінця, та/або антитіло, яке має лізин на С-кінці важкого ланцюга і не має посттрансляційної модифікації на N-кінці.

[0088]

В одному варіанті реалізації фармацевтична композиція за наданим винаходом, що містить антитіло проти Tie2 людини, включає фармацевтичну композицію, що містить щонайменше два види антитіл проти Tie2 людини, обраних з (1)-(4) нижче.

(1) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-678 з SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

(2) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 2, в якій глутамінова кислота з амінокислотного номера 1 модифікована до піроглутамінової кислоти, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

(3) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-678 з SEQ ID NO: 2, в якій глутамінова кислота з амінокислотного номера 1 модифікована до піроглутамінової кислоти, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

(4) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

[0089]

В одному варіанті реалізації фармацевтична композиція за наданим винаходом, що містить антитіло проти Tie2 людини, включає фармацевтичну композицію, що містить щонайменше два види антитіл проти Tie2 людини, обраних з (1)-(4) нижче.

(1) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-678 з SEQ ID NO: 6, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

(2) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 6, в якій глутамінова кислота з амінокислотного номера 1 модифікована до піроглутамінової кислоти, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

5 (3) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-678 з SEQ ID NO: 6, в якій глутамінова кислота з амінокислотного номера 1 модифікована до піроглутамінової кислоти, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

10 (4) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 6, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

[0090]

15 В одному варіанті реалізації фармацевтична композиція за наданим винаходом, що містить антитіло проти Tie2 людини, включає фармацевтичну композицію, що містить щонайменше два види антитіл проти Tie2 людини, обраних з (1)-(4) нижче.

(1) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-678 з SEQ ID NO: 8, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

20 (2) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 8, в якій глутамінова кислота з амінокислотного номера 1 модифікована до піроглутамінової кислоти, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

25 (3) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-678 з SEQ ID NO: 8, в якій глутамінова кислота з амінокислотного номера 1 модифікована до піроглутамінової кислоти, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

(4) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 8, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

30 [0091]

В одному варіанті реалізації фармацевтична композиція за наданим винаходом, що містить антитіло проти Tie2 людини, включає фармацевтичну композицію, що містить щонайменше два види антитіл проти Tie2 людини, обраних з (1)-(4) нижче.

35 (1) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-675 з SEQ ID NO: 10, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

40 (2) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 10, в якій глутамінова кислота з амінокислотного номера 1 модифікована до піроглутамінової кислоти, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

(3) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-675 з SEQ ID NO: 10, в якій глутамінова кислота з амінокислотного номера 1 модифікована до піроглутамінової кислоти, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

45 (4) Антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 10, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4.

50 [0092] В одному варіанті реалізації фармацевтична композиція за наданим винаходом, що містить антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, також включає фармацевтичну композицію, як описано нижче.

Фармацевтична композиція, що містить антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної у SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4, антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-678 з SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 4, і фармацевтично прийнятний наповнювач.

60 [0093] Кількість антитіла проти Tie2 людини або його антигензв'язувального фрагмента за наданим винаходом, доданого до складу, змінюється залежно від ступеня симптомів і віку пацієнта, лікарської форми препарату, що підлягає використанню, титру зв'язування антитіла

або т.п., і можна використовувати, наприклад, кількість, додану від приблизно 0,001 мг/кг до 100 мг/кг.

[0094]

5 Фармацевтичну композицію за наданим винаходом можна використовувати як засіб для запобігання або лікування захворювань, що відносяться до кровоносних судин, наприклад, діабетичної ретинопатії, діабетичного набряку жовтої плями, сепсису, гострих ушкоджень печінки, гострих ушкоджень нирок, гострих ушкоджень легень, синдрому системної запальної реакції, оклюзійного захворювання периферичних артерій або критичної ішемії кінцівок.

[0095]

10 Наданий винахід належить до фармацевтичної композиції для запобігання або лікування діабетичного набряку жовтої плями, діабетичної ретинопатії або критичної ішемії кінцівок, що містить антитіло проти Tie2 людини за наданим винаходом. Крім того, наданий винахід належить до способу для запобігання або лікування діабетичного набряку жовтої плями, діабетичної ретинопатії, або критичної ішемії кінцівок, що включає введення терапевтично ефективного кількості антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом. Крім того, наданий винахід належить до антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом для застосування для запобігання або лікування діабетичного набряку жовтої плями, діабетичної ретинопатії або критичної ішемії кінцівок. Крім того, наданий винахід належить до застосування антитіла проти Tie2 людини за наданим винаходом для отримання фармацевтичної композиції для запобігання або лікування діабетичного набряку жовтої плями, діабетичної ретинопатії, або критичної ішемії кінцівок.

[0096]

<Злите антитіло і модифікація антитіла>

25 Будь-який фахівець в даній галузі може отримати злите антитіло, в якому антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент злиті з іншим пептидом або білком, і може також отримати модифікацію антитіла, в якій модифікуючий засіб зв'язаний з використанням відомого в даній галузі способу. Антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом включає антитіло і його антигензв'язувальний фрагмент у формі такого злитого білка або модифікації. Наприклад, антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, що містять чотири варіабельні ділянки важкого ланцюга і чотири варіабельні ділянки легкого ланцюга, в яких варіабельна ділянка важкого ланцюга складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-122 з SEQ ID NO: 2, варіабельна ділянка легкого ланцюга складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-113 з SEQ ID NO: 4, одна варіабельна ділянка важкого ланцюга і одна варіабельна ділянка легкого ланцюга складають одну антигензв'язувальну ділянку, і антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містять чотири антигензв'язувальні ділянки, включає антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, злиті з іншим пептидом або білком, і антитіло проти Tie2 людини або його антигензв'язувальний фрагмент, що володіють зв'язаними з ними модифікуючим засобом. Інший пептид або білок для застосування в злитті не є конкретно обмеженим за умови, що антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом у формі злитого білка володіють активністю зв'язування з Tie2 людини, і їх приклади включають людський сироватковий альбумін, різні пептиди-мітки, штучні пептиди з мотивом спіралі, білок, що зв'язує мальтозу, глутатіон-S-трансферазу, різні токсини, і інші пептиди або білки, здатні стимулювати мультиміризацію. Модифікуючий засіб для застосування в модифікації не є конкретно обмеженим за умови, що антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за наданим винаходом у формі модифікованого антитіла володіють активністю зв'язування з Tie2 людини, і його приклади включають поліетиленгліколь, цукрові ланцюги, фосфоліпіди, ліпосоми і низькомолекулярні сполуки.

[0097]

50 Наданий винахід описаний, і представлені конкретні приклади, зазначені для кращого розуміння, але вони являють собою лише приклади, і наданий винахід не обмежується ними.

Приклади

[0098]

55 Що стосується аспектів з використанням комерційно доступних наборів або реагентів, експерименти проводили відповідно до описаного способу, якщо конкретно не вказано інше. Для зручності, концентрація в моль/л представлена як М. Наприклад, 1 М водний розчин оксиду натрію означає водний розчин оксиду натрію 1 моль/л.

[0099]

60 (Приклад 1: Отримання гібридоми, яка продукує антитіло проти Tie2 людини)  
Антитіло отримували з використанням мишей "Velocimmune"

(Технологія антитіл Velocimmune: Regeneron, Inc. (Патент США № 6596541)) - технологія розробки людських моноклональних антитіл. Рекombінантний химерний білок Tie2-Fc людини (R&D, 313-TI-100) ін'єктували миші Velocimmune разом з ад'ювантом для виклику імунної відповіді, так щоб провести імунізацію. Відповідно до звичайного способу, лімфовузл імунізованої миші виділяли, лімфоцити збирали і проводили злиття клітин з клітинами мієломи мишиного походження SP2/0 (ATCC: CRL-1581), таким чином отримуючи гібридому. Отримували моноклони гібридами, і кожен клон культивували в середовищі для гібридом CD (Invitrogen), що являє собою безсировотне середовище для культивування. Антитіло очищали з отриманого культурального супернатанту з використанням колонки з білком G (GE Healthcare). Антитіло, отримане з використанням технології Velocimmune, являє собою антитіло, що володіє варіабельною ділянкою людського антитіла і константною ділянкою мишиного антитіла (позначено також як химерне антитіло).

[0100]

(Приклад 2: Аналіз ELISA клітин)

Для вимірювання антигензв'язувальної активності антитіла, зв'язування антитіла з кожним з Tie2 людини, Tie2 мавпи, Tie2 щура і Tie2 миші оцінювали за допомогою аналізу ELISA клітин з використанням експресуючих Tie2 людини клітин CHO, експресуючих Tie2 мавпи клітин CHO, експресуючих Tie2 щура клітин CHO і експресуючих Tie2 миші клітин CHO.

[0101]

(Приклад 3: Оцінка конкурентної активності з використанням модифікованого Ang-1)

Для оцінки активності антитіла в конкуренції з Ang-2, оцінювали інгібування зв'язування модифікованого Ang-1 (Proc. Natl. Acad. Sci., 2004, Vol. 101, pp. 5547-5552, також позначається як COMP-Ang1.) з Tie2. COMP-Ang1 являє собою модифікований Ang-1, в якому ділянка, яка не бере участі у зв'язуванні з Tie2, модифікована, і конкурентну дію проти Ang-2 можна оцінювати за допомогою оцінки конкурентної дії проти COMP-Ang1 з тієї точки зору, що здатність COMP-Ang1 зв'язуватися з Tie2 зберігається (Proc. Natl. Acad. Sci. 2004, Vol. 101, pp. 5547-5552), і Ang-1 і Ang-2 зв'язуються з тією самою ділянкою Tie2 з таким самим рівнем афінності (Science, 1997, Vol. 277, pp. 55-60).

[0102]

Вектор, що експресує COMP-Ang1, вводили в клітину HEK293. COMP-Ang1 очищали з культурального супернатанту клітин HEK293 і мітили біотином. Мічений біотином COMP-Ang1 і очищене антитіло, отримане у прикладі 1, змішували, і суміш додавали в планшет з іммобілізованим рекombінантним химерним білком Tie2-Fc людини. Для детекції міченого біотином COMP-Ang1, зв'язаного таким чином, використовували мічену стрептавідином HRP. До цього додавали реагент TMB для прояву забарвлення (Dako, S1599) і залишали стояти. Потім, до цього додавали 2 М сірчану кислоту для зупинки реакції і вимірювали оптичну щільність при 450 нм. Таким чином, оцінювали конкурентну дію антитіла проти COMP-Ang1.

[0103]

(Приклад 4: Оцінка антиапоптотичної активності з використанням експресуючих Tie2 людини клітин BaF3)

Лінію про-В-клітин миші BaF3, стабільно експресуючих Tie2 людини (далі в цьому документі також позначають експресуючі Tie2 людини клітини BaF3), отримували за допомогою введення плазмиди, що містить ген Tie2 людини, вказаний в SEQ ID NO: 21, в клітини способом електропорації, описаним в Immunity, 1998, Vol. 9, pp. 677-686. Далі в цьому документі антиапоптотичну активність антитіла оцінювали з використанням таких самих клітин.

[0104]

Експресуючі Tie2 людини клітини BaF3 суспендували в середовищі RPMI1640 (Life Technologies), доповненому 0,05 % фетальним бичачим сироватковим альбуміном, при  $2 \times 10^5$  клітин/мл, і розподіляли в кількості 80 мкл на ямку в 96-ямковий планшет для плаваючих клітин (Sumitomo Bakelite Co., Ltd., MS-8096R). Потім до цього додавали 20 мкл очищеного антитіла, отриманого в прикладі 1, або Ang-1. Після культивування протягом 72 годин в інкубаторі з CO<sub>2</sub>, встановленому на 37 °C, 50 мкл суспензії клітин переносили в білий 96-ямковий планшет (Nunc, 236108). Відповідно до опису набору реагентів для визначення кількості внутрішньоклітинного АТФ CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Kit (Promega), за допомогою додавання до суспензії клітин 50 мкл розчину субстрату, розведеного буфером, що додається, вимірювали життєздатність клітин, таким чином оцінюючи антиапоптотичну активність.

[0105]

За результатами прикладів 2-4 виявлені антитіла проти Tie2 людини, що володіють активністю зв'язування з Tie2 людини, Tie2 мавпи, Tie2 щура і Tie2 миші, активністю конкуренції з COMP-Ang1 і антиапоптотичною активністю. Розчин очищених антитіл, що містить антитіло



проти Tie2 людини, позначене 2-16, описане нижче, володів по суті такою самою антиапоптотичною активністю, як Ang-1 у прикладі 4, проте розчин очищених антитіл, що містить антитіло миші проти Tie2 людини 15B8 (Патентний документ 1), володів тільки приблизно 60 % від максимальної активності Ang-1.

5 [0106]

(Приклад 5: Аналіз розчину очищених антитіл з використанням ексклюзійної хроматографії і електрофорезу)

10 Розчини очищених антитіл, ідентифікованих в прикладах 2-4 вище, аналізували за допомогою ексклюзійної хроматографії. В результаті, три фракції детектували у відповідних розчинах очищених антитіл. В результаті аналізу розчинів відповідних фракцій за допомогою електрофорезу було виявлено, що відповідні фракції включають мономери, димери, тримери або мультимери антитіл, що володіють вищою валентністю, відповідно.

[0107]

15 Потім, розчини відповідних фракцій оцінювали відносно антиапоптотичної активності способом, описаним у прикладі 4. В результаті у фракціях, що містять димери, і у фракціях, що містять тримери або мультимери з більш високою валентністю, виявлена сильна антиапоптотична активність. З іншого боку, у фракціях, що містять мономери відповідних антитіл, антиапоптотична активність по суті не виявлена. 15B8 аналізували також за допомогою ексклюзійної хроматографії, як описано вище, і в результаті детектували фракції, які володіють димерами або мультимерами з більш високою валентністю, але фракцій, що містять мономери, фактично не детектували.

20 [0108]

З вказаного вище, виявлено, що в будь-якому антитілі, ідентифікованому в прикладах 2-4, фракції, що містять антитіла, сформовані в димери або мультимери більш високого порядку, володіли сильною антиапоптотичною активністю. Вважають, що антитіла, які мають валентність чотири і більше, володіють сильною антиапоптотичною активністю за допомогою активації Tie2, оскільки димер являє собою тетравалентне антитіло.

[0109]

30 (Приклад 6: Оцінка антиапоптотичної активності за допомогою перехресно зшитого антитіла) З досліджень у прикладі 5, зробили висновок, що доведення валентності антитіла проти Tie2 людини до 4 або вище є важливим для індукції антиапоптотичної активності за допомогою Tie2. Таким чином, оцінювали антиапоптотичну активність антитіла проти Tie2 людини, яке піддавали мультимеризації за допомогою проведення перехресного зв'язування з антитілом проти IgG миші. Як клітини, використовували експресуючі Tie2 людини клітини BaF3 і клітини ендотелію судин людини HUVEC, ендогенно експресуючі Tie2 людини.

35 [0110]

Експресуючі Tie2 людини клітини BaF3 і HUVEC культивували в середовищі RPMI1640 і в безсировотковому середовищі EBM-2 (Lonza), відповідно, до них додавали розчин антитіл, що містить антитіло проти Tie2 людини, ідентифіковані в прикладах 2-4. До цього додавали антитіло проти IgG миші для перехресного зшивання антитіл. З використанням люмінесцентного аналізу життєздатності клітин CellTiter Glo Luminescent Viability вимірювали життєздатність клітин. За допомогою вимірювання життєздатності оцінювали антиапоптотичну активність.

40 [0111]

В результаті виявлено, що перехресно зшите антитіло з антитілом проти Tie2 людини (хімерне антитіло), позначене 2-16, володіє сильною антиапоптотичну активність відносно Tie2 людини. [0112]

(Приклад 7: Секвенування двовалентного антитіла проти Tie2 людини)

50 Ген, що кодує важкий і легкий ланцюги антитіла, клонували з гібридами, яка продукує антитіло проти Tie2 людини 2-16, і секвенували.

[0113]

Після секвенування антитіла, каркасну ділянку (FR) легкого та важкого ланцюгів 2-16 замінили на FR з іншого людського антитіла, щоб покращити фізичні властивості і стабільність антитіла, таким чином отримуючи модифіковану варіабельну ділянку антитіла проти Tie2 людини 2-16A2.

55 [0114]

Ген, що кодує сигнальну послідовність (Protein Engineering, 1987, Vol. 1, No. 6, pp. 499-505), і ген константної ділянки Igγ1 людини (що складається з послідовності основ з основ номер 367-1356 з SEQ ID NO: 11), приєднували з 5'-сторони і 3'-сторони, відповідно, до гену варіабельної ділянки важкого ланцюга 2-16A2, і ген важкого ланцюга вставляли в вектор GS pEE6.4. Потім

ген, що кодує сигнальну послідовність (Protein Engineering, 1987, Vol. 1, No.6, pp. 499-505), і ген константної ділянки (що складається з послідовності основ з основ номер 340-657 з SEQ ID NO: 3) ланцюга к людини, приєднували з 5'-сторони і 3'-сторони, відповідно, до гену варіабельної ділянки легкого ланцюга. Цей ген легкого ланцюга вставляли в вектор GS рEE12.4.

5 Послідовність гена важкого ланцюга і послідовність гена легкого ланцюга отриманого антитіла аналізували з використанням секвенатора.

[0115]

Послідовність основ важкого ланцюга повністю людського антитіла 2-16A2 (повністю людського 2-16A2) та амінокислотна послідовність, що кодується послідовністю основ, вказані в SEQ ID NO: 11 і 12, відповідно. Крім того, послідовність основ легкого ланцюга антитіла і амінокислотна послідовність, що кодується послідовністю основ, вказані в SEQ ID NO: 3 і 4, відповідно. Варіабельна ділянка важкого ланцюга, вказаного в SEQ ID NO: 12, складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-122 з SEQ ID NO: 12, і варіабельна ділянка легкого ланцюга, вказаного в SEQ ID NO: 4, складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-113 з SEQ ID 5 NO: 4.

15

[0116]

З використанням вектора GS, як описано вище, в який вставлені кожен з генів важкого ланцюга і легкого ланцюга повністю людського 2-16A2, проводили експресію антитіла з використанням двох типів способів, тобто, транзиторної експресії і стабільної експресії. Що стосується транзиторної експресії, клітини Freestyle 293 (Invitrogen), культивовані в середовищі для експресії FreeStyle 293 (Invitrogen) при приблизно 1000000 клітин/мл, трансфікували обома експресуючими векторами для важкого ланцюга і легкого ланцюга, як описано вище, з використанням набору для трансфекції 2 93 Fectin (Invitrogen) і культивували протягом 5 діб. Альтернативно, клітини Expi 293 (Invitrogen), культивовані в середовищі для експресії Expi 293 (Invitrogen) при приблизно 3000000 клітин/мл, трансфікували обома експресуючими векторами для важкого ланцюга і легкого ланцюга, як описано вище, з використанням набору для трансфекції ExpiFectamine 293 (Invitrogen), і культивували протягом 7 діб. Альтернативно, клітини CHO-K1 SV (Lonza), культивовані в середовищі для експресії CD-CHO (Invitrogen) при приблизно 10000000 клітин/мл, трансфікували обома експресуючими векторами для важкого ланцюга і легкого ланцюга, як описано вище, з використанням способу електропорації, і культивували протягом 7 діб. Повністю людське антитіло очищали від кожного з культуральних супернатантів з використанням колонки з білком А або колонки з білком G (GE Healthcare). Що стосується стабільної експресії, вектор GS, як описано вище, в який вставлені кожен з генів важкого ланцюга і легкого ланцюга антитіла, розщеплювали за допомогою рестрикційних ферментів NotI і PvuI, і лігували з використанням Ligation-Convenience Kit (NIPPONGENE) як набір для лігування або реагенту для лігування Ligation high Ver. 2 (TOYOBO), таким чином конструюючи вектор GS, в який вставлені обидва гена важкого ланцюга і легкого ланцюга. Антитіло експресували за допомогою трансфекції експресуючим вектором клітин CHO-K1 SV. Повністю людське антитіло очищали з культуральних супернатантів за допомогою колонки з білком А, колонки з білком G або MabSelect SuRe (GE Healthcare, 17-5438-02).

20

25

30

35

40

[0117]

(Приклад 8: Отримання тетравалентного антитіла проти Tie2 людини)

Отримували тетравалентне антитіло проти Tie2 людини. Тетравалентне антитіло, отримане в цьому прикладі, містить два важкі ланцюги і чотири легкі ланцюги. Кожен важкий ланцюг містить дві структури, що складаються з варіабельної ділянки важкого ланцюга і ділянки CH1, і додатково містить ділянку CH2 і ділянку CH3, в яких С-кінець однієї з структур, що складається з варіабельної ділянки важкого ланцюга і ділянки CH1, зв'язаний з N-кінцем іншої структури через лінкер. Кожен легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга і константну ділянку легкого ланцюга. Формат справжнього тетравалентного антитіла представлений на фіг. 1.

45

[0118]

Отримували ген, що кодує важкий ланцюг тетравалентного антитіла проти Tie2 людини, в якому С-кінець структури (що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-220 з SEQ ID NO: 12), що складається з варіабельної ділянки важкого ланцюга і ділянки CH1 повністю людського 2-16A2, зв'язаний з N-кінцем важкого ланцюга повністю людського 2-16A2 через лінкер, що складається з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 13. Ген, що кодує сигнальну послідовність (Protein Engineering, 10 1987, Vol. 1, No. 6, pp. 499-505), приєднували з 5'-сторони до отриманого гену важкого ланцюга і вставляли у вектор GS рEE6.4. Вищевказаний вектор для важкого ланцюга і вектор GS рEE12.4, в який вставлений ген легкого ланцюга повністю людського антитіла 2-16A2, отриманий в прикладі 7, комбінували для отримання тетравалентного антитіла проти Tie2 людини з використанням такого самого способу

50

55

60

експресії і очищення антитіла, як описано в прикладі 7. Тетравалентне антитіло проти Tie2 людини позначено TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT.

[0119]

Отримували ген, що кодує важкий ланцюг тетравалентного антитіла проти Tie2 людини, що володіє константною ділянкою важкого ланцюга з TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT, замінену на константну ділянку Ig $\gamma$ 4 людини (що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 123-220 з SEQ ID NO: 10, і складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 350-676 з SEQ ID NO: 10) з амінокислотними мутаціями S228P і L235E. Ген, що кодує сигнальну послідовність (Protein Engineering, 1987, Vol. 1, No. 6, pp. 499-505), приєднували з 5'-сторони до отриманого гену важкого ланцюга і вставляли в вектор GS pEE6.4. Вищевказаний вектор для важкого ланцюга і вектор GS pEE12.4, в який був вставлений ген легкого ланцюга повністю людського 2-16A2, отриманого в прикладі 7, комбінували для отримання тетравалентного антитіла проти Tie2 людини з використанням такого ж способу експресії і очищення антитіл, як описано в прикладі 7. Тетравалентне антитіло проти Tie2 людини з IgG4 позначено як TIE-1-Ig $\gamma$ 4-PE.

[0120]

Послідовність основ важкого ланцюга TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT і амінокислотна послідовність, що кодується послідовністю основ, вказані в SEQ ID NO: 7 і 8, відповідно. Послідовність основ важкого ланцюга з TIE-1-Ig $\gamma$ 4-PE і амінокислотна послідовність, що кодується послідовністю основ, вказані в SEQ ID NO: 9 і 10, відповідно. Легкі ланцюги обох антитіл є такими ж, як легкий ланцюг повністю людського антитіла 2-16A2, і послідовність основ легкого ланцюга і амінокислотна послідовність, що кодується послідовністю основ антитіла, вказані в SEQ ID NO: 3 і 4, відповідно.

[0121]

З використанням такого самого способу отримували тетравалентне антитіло проти Tie2 людини, в якому амінокислотні варіанти L234A, L235A і P331S введені в константну ділянку важкого ланцюга TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT (позначене TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA), і тетравалентне антитіло проти Tie2 людини, в якому амінокислотні варіанти L234A, L235A, P331S і I253A введені в константну ділянку важкого ланцюга TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT (позначене TIE-1-Ig $\gamma$ 1-1253A).

[0122]

Послідовність основ важкого ланцюга і амінокислотна послідовність, що кодується послідовністю основ, для TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA вказані в SEQ ID NO: 1 і 2, відповідно. Послідовність основ важкого ланцюга і амінокислотна послідовність, що кодується послідовністю основ, для TIE-1-Ig $\gamma$ 1-1253A вказані в SEQ ID NO: 5 і 6, відповідно. Легкі ланцюги обох антитіл були такими самими як легкий ланцюг повністю людського 2-16A2, і послідовність основ легкого ланцюга і амінокислотна послідовність, що кодується послідовністю основ антитіла, вказані в SEQ ID NO: 3 і 4, відповідно.

[0123]

Варіабельні ділянки важких ланцюгів чотирьох видів тетравалентного антитіла проти Tie2 людини, вказаних в SEQ ID NO: 2, 6, 8 і 10, є спільними і складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-122 з SEQ ID NO: 2. Кожна з CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельних ділянок важкого ланцюга складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 31-35, 50-66 і 99-111 з SEQ ID NO: 2.

[0124]

Кожна з варіабельних ділянок легких ланцюгів чотирьох видів тетравалентного антитіла проти Tie2 людини, вказаних в SEQ ID NO: 4, складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-113 з SEQ ID NO: 4. CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельних ділянок легкого ланцюга складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 24-39, 55-61 і 94-102 з SEQ ID NO: 4, відповідно.

[0125]

В результаті аналізу амінокислотних модифікацій очищеного

TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA виявлено, що в більшості очищених антитіл відбувалася делеція лізину на C-кінці важкого ланцюга.

[0126]

Крім того, використовуючи такий самий спосіб, отримували тетравалентні антитіла проти Tie2 людини, в яких відносно TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT і TIE-1-Ig $\gamma$ 4-PE лінкер (що складається з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 13), замінювали іншими лінкерами (чотири види лінкерів, що складаються з амінокислотних послідовностей, вказаних в SEQ ID NO: 17-20 відносно TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT, і сім видів лінкерів, що складаються з амінокислотних послідовностей,

вказаних в SEQ ID NO: 14-20 відносно TIE-1-Ig $\gamma$ 4-PE), (всього 11 видів). Досліджували від лінкера, що має довжину 7 амінокислот (лінкер, що складається з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 13), до лінкера, що має довжину 64 амінокислоти (лінкер, що складається з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 20).

5 [0127]

В результаті досліджень TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT, TIE-1-Ig $\gamma$ 4-PE і 11 видів антитіл, в яких лінкер замінений, виявлено, що всі антитіла проти Tie2 людини володіли по суті однаковою антиапоптотичною активністю відповідно до способу з прикладу 4.

[0128]

10 (Приклад 9: Оцінка антиапоптотичної дії двовалентного антитіла проти Tie2 людини і тетравалентного антитіла проти Tie2 людини)

За результатами з прикладу 5 припустили, що тетравалентне антитіло або антитіло, що володіє більш високою валентністю, володіє антиапоптотичною активністю за допомогою активації Tie2 людини. Таким чином, ефективність двовалентного антитіла проти Tie2 людини порівнювали з ефективністю тетравалентного антитіла проти Tie2 людини за допомогою вимірювання антиапоптотичної дії на експресуючі Tie2 людини клітини BaF3 як показник.

[0129]

Відповідно до способу з прикладу 4, антиапоптотичну дію повністю людського 2-16A2, що являє собою двовалентне антитіло, і TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT, що являє собою тетравалентне антитіло, оцінювали з використанням експресуючих Tie2 людини клітин BaF3. Повністю людське 2-16A2 і TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT, що являють собою тестовані антитіла, очищали за допомогою MabSelect SuRe і фракціонували на мономерні фракції за допомогою ексклюзійної хроматографії, таким чином отримуючи чистоту мономерів 99,98 % і 99,74 %, відповідно. Відповідні антитіла розбавляли розчином фосфатно-сольового буфера (PBS) від 5 нг/мл до 5000 нг/мл з приблизно 3-кратним знаменником за сім стадій, і додавали в кількості 20 мкл на ямку. Як контроль, отримували PBS або Ang-1, розведений в PBS (R&D, 923-AN-025/CF, кінцева концентрація 1 нг/мл - 1000 нг/мл, розведений з приблизно 3-кратним знаменником за 7 стадій), додані замість тестованих антитіл, відповідно. Для розрахунку антиапоптотичної активності для кожної з концентрацій тестованих антитіл, значення, виміряне в ямці, в яку додавали PBS замість тестованого антитіла, встановлювали на 0 %, і середнє значення із значень, виміряних в ямках, в які замість тестованого антитіла додавали Ang-1 в концентрації 300 нг/мл і 1000 нг/мл, відповідно, встановлювали на 100 %. Значення EC<sub>50</sub> тестованого антитіла розраховували за допомогою аналізу розрахованої антиапоптотичної активності з використанням нелінійного регресійного аналізу сигмоїдної моделі Емакс.

35 Таблиця 1: Антиапоптотична активність двовалентного антитіла проти Tie2 людини і тетравалентного антитіла проти Tie2 людини

[Таблиця 1]

	Значення EC <sub>50</sub>	Максимум активності для антиапоптотичної активності
TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT	7,10 нг/мл	104%
Повністю людське 2-16A2	37,6 нг/мл	22%

40 [0130]

В результаті виявлено, що TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT, що являє собою тетравалентне антитіло, володіє сильною антиапоптотичною дією. З вказаного вище, виявлено, що тетравалентне антитіло володіє чудовою антиапоптотичною активністю у порівнянні з двовалентним антитілом.

[0131]

45 (Приклад 10: Оцінка інгібуючої проникності судин дії двовалентного антитіла проти Tie2 людини і тетравалентного антитіла проти Tie2 людини у щура)

Модель індукованої гірчичною олією проникності судин являє собою модель з модифікацією, введеною в аналіз Майлза (J. Physiol., 1952, Vol. 118, pp. 228-257), яку широко використовують як системи оцінки просочування плазми, і опубліковано, що Ang-1 інгібує підвищену проникність судин у цій моделі (Nature Medicine, 2000., Vol. 6, pp. 15 460-463). Відповідно, для порівняння

50

інгібуючої дії на проникність судин двовалентного антитіла проти Tie2 людини з дією тетравалентного антитіла проти Tie2 людини, повністю людське 2-16A2 і TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT оцінювали з використанням цієї моделі.

[0132]

5 Повністю людське 2-16A2 або TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT, розведені в PBS, підшкірно вводили щурам SD (самці, у віці 4-5 тижнів, Charles River Laboratories Japan, Inc.). Групи обробки встановлювали наступним чином.

[Групи обробки (6 щурів на групу)]

Група носія:

10 Група, в якій вводили PBS замість антитіла

Група введення повністю людського 2-16A2:

Група, в якій вводили повністю людське 2-16A2 (0,3 мг/кг)

Група введення TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT:

Група, в якій вводили TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT (0,3 мг/кг)

15 [0133]

Через 48 годин після введення антитіла, синій барвник Еванса, розведений у фізіологічному соловому розчині (45 мг/кг, Sigma-Aldrich Corporation, E2129) вводили внутрішньовенно, негайно 5 % алілізотіоціанат (також позначається як гірчична олія, Nacalai Tesque, Inc., 01415-92), розведений в мінеральному маслі (Sigma-Aldrich Corporation, M8410), вводили в одне вуха, в той час як мінеральне масло вводили в контралатеральне вуха, в кількості 20 мкл. Через 30 хвилин, відбирали зразки обох вух, зважували, потім занурювали в 1 мл формаміду, і інкубували при 70 °C протягом ночі для екстракції синього барвника Еванса з тканини вуха. Концентрацію синього барвника Еванса визначали за оптичною щільністю (при довжині хвилі вимірювання 620 нм і контрольній довжині хвилі 740 нм) екстракту для розрахунку кількості синього барвника Еванса в екстракті. Потім, за допомогою ділення кількості синього барвника Еванса на масу вуха, розраховували кількість барвника, що просочився, на масу вуха. Значення, отримане за допомогою вирахування кількості синього барвника Еванса, що просочився, в вусі, куди вводили мінеральне масло, з кількості синього барвника Еванса, що просочився, в вусі, куди вводили гірчичну олію, для одного і того ж індивідуума, розраховували як кінцеву кількість синього барвника Еванса, що просочився, для кожного індивідуума. Кількість синього барвника Еванса, що просочився, використовували як показник проникності судин. Результати наведені на фіг. 2.

[0134]

35 Визначали середнє значення і стандартну помилку для кожної групи. Т-критерій Стьюдента використовували для визначення значущої відмінності між групою носія і кожною групою, в якій вводили антитіло. Випадок з  $p < 0,05$  призначений для позначення того, що мала місце значуща відмінність.

[0135]

40 Як показано на фіг. 2, в порівнянні з групою носія, повністю людське 2-16A2, що являє собою двовалентне антитіло, не інгібувало просочування барвника, в той час як TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT, що являє собою тетравалентне антитіло, значно інгібувало просочування барвника. Виявлено, що TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT, що являє собою тетравалентне антитіло, інгібувало підвищену проникність судин. На зазначеного вище, виявлено, що тетравалентне антитіло володіє чудовою інгібуючою дією на гіперпроникність судин у порівнянні з двовалентним антитілом.

45 [0136]

За результатами прикладів 9 та 10 виявлено, що тетравалентне антитіло проти Tie2 сильно індукує дію за допомогою Tie2.

[0137]

(Приклад 11: Оцінка антиапоптотичної дії тетравалентного антитіла проти Tie2 людини (2))

50 Для TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA і TIE-1-Ig $\gamma$ 1-1253A, способом з прикладу 9 оцінювали антиапоптотичну активність антитіла на експресуючих Tie2 людини клітинах BaF3. У такому ж діапазоні концентрацій, як у прикладі 9, проводили оцінку кожного тетравалентного антитіла проти Tie2 людини. Відносно цього, коли середнє значення з виміряних значень для ямок, в кожному з яких додавали 100 нг/мл, 300 нг/мл і 1000 нг/мл Ang-1, брали за 100 %, оцінювали значення EC<sub>50</sub> і максимальну активність з антиапоптотичної активності кожного антитіла.

55 Таблиця 2: Антиапоптотична активність кожного тетравалентного антитіла проти Tie2 людини

[Таблиця 2]

	Значення EC <sub>50</sub>	Максимум активності для антиапоптотичної активності
TIE-1-Igγ1-LALA	3,65 нг/мл	88%
TIE-1-Igγ1-I253A	5,06 нг/мл	94%

[0138]

В результаті виявлено, що як TIE-1-Igγ1-LALA, так і TIE-1-Igγ1-1253A володіли  
5 антиапоптотичною активністю, по суті еквівалентною активності Ang-1.

[0139]

(Еталонний приклад 1: Оцінка антиапоптотичної дії 15B8)

Для 15B8, способом з прикладу 9 оцінювали антиапоптотичну активність експресуючих Tie2  
людини клітин BaF3. Оцінку 15B8 (Патентний документ 1) проводили в такому ж діапазоні  
10 концентрацій антитіла, як у прикладі 9. Оцінку Ang-2 (R&D, 623-AN-025) проводили таким самим  
способом, як для Ang-1. Відносно цього, коли середнє значення із значень, виміряних в ямках, в  
які додавали 1000 нг/мл Ang-1, брали за 100 %, оцінювали значення EC<sub>50</sub> і максимальну  
активність з антиапоптотичної активності.

Таблиця 3: Антиапоптотична активність 15B8

15

[Таблиця 3]

	Значення EC <sub>50</sub>	Максимальна активність з антиапоптотичної активності
15B8	26,6 нг/мл	64%
Ang-2	39,3 нг/мл	67%

[0140]

В результаті виявлено, що антиапоптотична активність 15B8 становила приблизно 64 % від  
20 активності Ang-1, і вона володіла антиапоптотичною активністю, по суті еквівалентною  
активності Ang-2.

[0141]

У поєднанні з результатами з прикладу 11, виявлено, що TIE-1-Igγ1-LALA володіло  
антиапоптотичною активністю, по суті еквівалентною активності Ang-1, в той час як 15B8  
25 володіло частковою антиапоптотичною активністю, по суті еквівалентною активності Ang-2.

[0142]

(Приклад 12: Оцінка активності зв'язування TIE-1-Igγ1-LALA з Tie2)

Для TIE-1-Igγ1-LALA оцінювали активність зв'язування з білком Tie2 кожного виду.  
Отримували рекомбінантний химерний білок Tie2-Fc людини (R&D, 313-TI-100), рекомбінантний  
30 химерний білок Tie2 мавпи - Fc (Sino Biological Inc., 90292-C02H), рекомбінантний химерний  
білок Tie2 щура - Fc (R&D, 3874-T2-100) або рекомбінантний химерний білок Tie2 миші - Fc  
(R&D, 7 62-T2-100) в PBS при 1 мкг/мл, додавали в білий 384-ямковий планшет Maxisorp (Nunc,  
460372) в кількості 20 мкл на ямку, і інкубували при 4 °C протягом ночі для проведення  
іммобілізації. На наступну добу розчин для іммобілізації видаляли, і 20 % блокуючий реагент  
35 Blocking One (Nacalai Tesque Inc., 03953-95), що містить Tris-сольовий буфер (TBS) - 0,05 %  
Tween (Wako, 310-7375) (далі в цьому документі позначений як розчин TBS-T) додавали до  
цього в кількості 50 мкл на ямку, і залишали стояти при кімнатній температурі протягом 1  
години. TIE-1-Igγ1-LALA як тестоване антитіло розбавляли розчином TBS-T, що містить 5 %  
40 блокуючий реагент Blocking One, від 0,03 нг/мл до 100 нг/мл з приблизно 3-кратним  
знаменником за 8 стадій, і додавали в кількості 20 мкл на ямку. Як контроль, отримували ямку, в  
яку розчин TBS-T додавали замість тестованого антитіла. Отриманий планшет інкубували при  
кімнатній температурі протягом 1,5 годин, і потім промивали розчином TBS-T. Як вторинне  
антитіло, мічене біотином антитіло проти легкого ланцюга каппа людини (Immuno-Biological  
Laboratories Co., Ltd., 17249), яке розводили до 0,1 мкг/мл розчином TBS-T, що містить 5 %

блокуючий реагент Blocking One, додавали до цього в кількості 20 мкл на ямку. Отриманий планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години і потім промивали розчином TBS-T, і мічений лужною фосфатазою стрептавідин (Thermo Fisher Scientific Inc., 21324), який розводили до 0,1 мкг/мл розчином TBS-T, що містить 5 % блокуючий реагент Blocking One, додавали до цього в кількості 20 мкл на ямку. Отриманий планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години і потім промивали розчином TBS-T, і хемілюмінесцентний Ultra Sensitive AP Microwell та/або мембранний субстрат (450 нм) (BioFX, APU4-0100-01), розведений в 5 разів 20 мМ TBS, що містить 1 мМ MgCl<sub>2</sub> (pH 9,8), як субстрат додавали до цього в кількості 20 мкл. Отриманий планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин, і потім його хемілюмінесценцію вимірювали за допомогою лічильника для множини міток EnVision™ (PerkinElmer, Inc.). Значення EC<sub>50</sub> тестованого антитіла розраховували за допомогою аналізу розрахованої активності зв'язування з використанням нелінійного регресійного аналізу сигмоїдної моделі Емакс.

Таблиця 4: Активність зв'язування TIE-1-Igγ1-LALA

[Таблиця 4]

	Значення EC <sub>50</sub> (нг/мл)			
	Людина	Мавпа	Щур	Миша
TIE-1-Igγ 1-LALA	0,565	0,545	0,633	0,696

[0143]

В результаті виявлено, що TIE-1-Igγ1-LALA володіє по суті такою самою високою активністю зв'язування, як Tie2 людини, Tie2 мавпи, Tie2 щура і Tie2 миші.

[0144]

(Еталонний приклад 2: Оцінка активності зв'язування 15B8 з Tie2)

Відповідно до способу з прикладу 12 оцінювали активність зв'язування 15B8 з білками Tie2 кожного виду. Відносно цього, оптичну щільність при 450 нм вимірювали з використанням міченого HRP антитіла проти легкого ланцюга каппа миші (SouthernBiotech, 1050-05) як вторинне антитіло, яке проявляє забарвлення реагенту TMB як субстрат і зчитувач для множини міток ARVO (PerkinElmer Inc.) як пристрій для вимірювання. Крім того, концентрацію антитіла 15B8 доводили від 1000 нг/мл до 0,3 нг/мл з приблизно 3-кратним знаменником (з розведенням за вісім стадій), як тестоване антитіло. Значення EC<sub>50</sub> тестованого антитіла розраховували за допомогою аналізу розрахованої активності зв'язування з використанням нелінійного регресійного аналізу сигмоїдної моделі Емакс (таблиця 5). Таблиця 5: Активність зв'язування 15B8

[Таблиця 5]

	Значення EC <sub>50</sub> (нг/мл)			
	Людина	Мавпа	Щур	Миша
15B8	218,7	224,3	> 1000	> 1000

[0145]

В результаті спостерігали, що 15B8 володіє активністю зв'язування з Tie2 людини і Tie2 мавпи, але виявлено, що 15B8 володіє низькою активністю зв'язування з Tie2 щура і Tie2 миші.

[0146]

За результатами з прикладу 12 спостерігали, що TIE-1-Igγ1-LALA володіло високою активністю зв'язування з Tie2 людини, Tie2 мавпи, Tie2 щура і Tie2 миші без відмінностей для видів в активності зв'язування. З іншого боку, спостерігали, що 15B8 володів відмінністю для видів в активності зв'язування. З вказаного вище, припустили, що епітоп Tie2 людини для TIE-1-Igγ1-LALA був відмінним від епітопу для 15B8.

[0147]

(Приклад 13: Оцінка інгібуючої проникності судин дії TIE-1-Igγ1-LALA у щурів)

Відповідно до способу з прикладу 10 оцінювали інгібуючу проникність судин дію TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA у щурів. Відносно цього, TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA використовували як тестоване антитіло, і дозу антитіла доводили до 0,1 мг/кг і 0,3 мг/кг. Результати наведені на фіг. 3.

[0148]

- 5 Визначали середнє значення і стандартну помилку для кожної групи. Тест множинних порівнянь Даннетта застосовували для визначення значущих відмінностей між групою носія і кожною групою, в якій вводили антитіло. Випадок з  $p < 0,05$  призначений для позначення того, що мала місце значуща відмінність.

[0149]

- 10 Як показано на фіг. 3, в порівнянні з групою носія, TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA значущо інгібувало просочування барвника. З зазначеного вище, виявлено, що TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA інгібувало підвищену проникність судин.

[0150]

(Приклад 14: Інгибуюча дія на набряк сітківки у мишей з втратою перицитів)

- 15 У кровоносних судинах сітківки пацієнтів з діабетичною ретинопатією втрата перицитів є одним з характерних уражень (Retina, 2013, Fifth edition, pp. 925-939). Хоча моделі на щурах з індукованим стрептозотоцином діабетом широко використовують в дослідженнях діабетичної ретинопатії, існує обмеження в корисності моделей в таких аспектах: проходить період у кілька місяців, поки не спостерігають втрати перицитів, мікроаневризми сітківки, яка, як вважається, спричиняється втратою перицитів, не спостерігають, ставлення перицитів до ендотеліальних клітин відрізняється від ставлення у людини (Retina, 2013, Fifth edition, pp. 925-939), і очевидного набряку сітківки не спостерігають (Diabetes Metab. J., 2013, Vol. 37, pp.217-224). З іншого боку, у мишей, що володіють кровоносними судинами сітківки з втратою перицитів, за допомогою введення антитіла проти рецептора  $\beta$  PDGF (PDGFR  $\beta$ ), спостерігають ураження, подібні до уражень, які спостерігаються при діабетичній ретинопатії і діабетичному набряку жовтої плями, такими як розширення кровоносних судин сітківки, набряк сітківки та крововилив, що дозволяє припускати, що кровоносні судини ослаблені, як при діабетичній ретинопатії і діабетичному набряку жовтої плями у зв'язку з втратою перицитів, хоча гіперглікемії не спостерігають (J. Clin. Invest., 2002 Vol. 110, pp. 1619-1628). Таким чином, оцінку інгібуючої дії на набряк сітківки з використанням моделі в умовах втрати перицитів, яка є характерним ураженням у пацієнта з діабетичною ретинопатією, можна використовувати для оцінки ефективності при діабетичній ретинопатії і діабетичному набряку жовтої плями.

[0151]

- 35 Набряк сітківки, індукований втратою перицитів, отримували з невеликої модифікації способом, опублікованими в J. Clin. Invest., 2002 Vol. 110, pp. 1619-1628. Тобто моноклональне антитіло 1B3 проти PDGFR $\beta$  (WO 2008/130704), розведене в PBS, вводили підшкірно при 25 мг/кг на мишу C57BL/6J (Charles River Laboratories Japan, Inc.) на 2-гу добу після народження для індукції втрати перицитів у кровоносних судинах сітківки.

[Групи обробки]

- 40 Контрольна група (також позначається як контр. група): 17 мишей  
Група, в якій не вводили антитіло проти PDGFR  $\beta$  і вводили PBS  
Група носія (також позначається як група нос.): 24 миші  
Група, в якій вводили антитіло проти PDGFR  $\beta$  і вводили PBS замість TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA  
TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA (0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг і 1 мг/кг): в кожній 23 миші, 21 миша і 21 миша  
45 Група, в якій вводили антитіло проти PDGFR  $\beta$  і вводили кожну дозу TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA

[0152]

- За 90 хвилин до введення антитіла проти PDGFR  $\beta$ , TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA, розведений в PBS, вводили підшкірно при 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг і 1 мг/кг. Через 1 тиждень після введення антитіла, оцінювали набряк сітківки. Якщо конкретніше, то видаляли очне яблуко і фіксували його розчинами, що містять 1 %-й глутаральдегід і 2,5 %-й формалін, і потім отримували занурені в парафін зрізи. Забарвлені гематоксиліном-еозином зразки сканували для конвертації даних зображень з використанням сканера віртуальних зрізів (NanoZoomer XR, Hamamatsu Photonics K. K.). У цій моделі опублікований набряк сітківки в шарі нервових волокон сітківки (NFL) (J. Clin. Invest., 2002 Vol. 110, pp. 1619-1628), таким чином, кількісну оцінку набряку сітківки проводили за допомогою вимірювання ділянок NFL і сусіднього шару гангліозних клітин сітківки з проекцією NPD 2 (Hamamatsu Photonics K. K.). Результати наведені на фіг. 4.

[0153]

- 60 Визначали середнє значення і стандартну помилку для кожної групи. Тест множинних порівнянь Даннетта застосовували для визначення значущих відмінностей між групою носія і кожною групою, в якій вводили TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA. Т-критерій Стьюдента використовували для



визначення значущої відмінності між контр. групою і групою носія. Випадок з  $p < 0,05$  призначений для позначення того, що мала місце значуща відмінність в кожному випадку.

[0154]

Як показано на фіг. 4, було виявлено, що в групі TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA (1 мг/кг) значно інгібований набряк сітківки за наявності кровоносних судин сітківки з втратою перицитів в порівнянні з групою носія. З цієї точки зору, що TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA інгібувало набряк сітківки, обумовлений кровоносними судинами сітківки з втратою перицитів, припустили, що TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA є ефективним у випадку діабетичного набряку жовтої плями і діабетичної ретинопатії.

[0155]

(Приклад 15: Дія, що покращує кровотік у випадку ішемії кінцівок у мишей з ішемією задніх кінцівок)

Модель з ішемією задніх кінцівок являє собою модель, що володіє ішемією в тканинах задніх кінцівок, індукованою за допомогою лігування і вирізання кровоносної судини у задній кінцівки на одній стороні, і є також репрезентативною моделлю для оцінки покращення симптомів ішемії (J. 35 Vase. Surg., 2012, Vol. 56, pp. 1669-1679).

[0156]

Пахову ділянку стегнової артерії і вени, і підшкірну артерію і вену лівої задньої кінцівки лігували у 10-тижневих мишах C57BL/6J (CLEA Japan, Inc.). Потім, судини після розгалуження між ними лігували, і кровоносну судину між точками лігування вирізали. Хірургічну операцію проводили під анестезією з використанням пентобарбіталу натрію (60 мг/кг, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.). Через один тиждень після вирізання судини кровотік в задній кінцівки вимірювали з використанням лазерного доплерівського візуалізатора перфузії MoorLDI2 (Moor Instruments Inc.) під анестезією з використанням пентобарбіталу. Після підтвердження зменшення кровотоку в кінцівці, що підлягає обробці, групи обробки встановлювали в такий спосіб.

[Групи обробки (10 мишей на групу)]

Контрольна група:

Група, в якій вводили PBS замість антитіла

Група TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA (1 мг/кг):

Група, в якій вводили TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA

[0157]

TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA, розведений в PBS, вводили підшкірно при 1 мг/кг, і рівень кровотоку в шкірі нормальної кінцівки і ішемізованої кінцівки вимірювали через один тиждень після введення антитіла. Якщо конкретніше, то пентобарбітал натрію (60 мг/кг) вводили внутрішньочеревинно з подальшим встановленням на підігріту плиту, щоб вимірювати кровотік в шкірі лапи через 15 хвилин після введення анестезії. Результати вимірювання кровотоку за допомогою прийняття нижньої частини кінцівки як ділянки (ROI), яка представляє інтерес, наведені на фіг. 5.

[0158]

Визначали середнє значення і стандартну помилку для кожної групи. Т-критерій Стюдента використовували для визначення значущої відмінності між контрольною групою і групою TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA. Випадок з  $p < 0,05$  призначений для позначення того, що мала місце значуща відмінність.

[0159]

Як показано на фіг. 5, виявлено, що в порівнянні з контрольною групою, в групі TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA значно покращувався рівень кровотоку у нормальній кінцівці і ішемізованій кінцівці. Відповідно, було зроблено припущення про ефективність TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA у випадку захворювань периферичних артерій, таких як критична ішемія кінцівок.

[0160]

(Приклад 16: Оцінка епітопа для TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA: мас-спектрометрія з обміном водню на дейтерій)

Для ідентифікації епітопа впізнавання TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA отримували Fab повністю людського 2-16A2 в прикладі 7 (далі в цьому документі позначеного як повністю людський 2-16A2-Fab). Оскільки повністю людський 2-16A2-Fab володіє такою ж варіабельною ділянкою як TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA, ці антитіла впізнають такий самий епітоп. Як антиген, отримували білок Tie2 людини, що складається з амінокислот номер 1-452 з No. доступу NP 000450.2 (далі в цьому документі зазначено як Tie2 людини (1-452)). Амінокислотна послідовність являє собою таку саму ділянку, яку використовували, коли ідентифікували ділянку зв'язування Tie2 на Ang-2 (Nat. Struct. Mol. Biol., Vol. 13, pp. 524-532).

[0161]

Конкретно, повністю людський 2-16A2-Fab отримували за допомогою комбінації вектора GS рEE6.4, в який вставлений ген важкого ланцюга, що кодує структуру (що складається з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-221 з SEQ ID NO: 12), що складається з варіабельної ділянки важкого ланцюга і ділянки CH1 з повністю людського 2-16A2, і вектора GS рEE12.4, в який вставлений ген легкого ланцюга повністю людського 2-16A2, і з використанням такого самого способу як спосіб експресії і спосіб очищення антитіла, що описані в прикладі 7,

[0162]

Для отримання Tie2 людини (1-452), спочатку отримували Tie2 людини (1-452), отриманий за допомогою злиття Fc людини (що складається з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 23), з послідовністю впізнавання тромбіну (що складається з амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 22) як лінкер (далі в цьому документі позначений як химерний білок Tie2 людини (1-452)-Fc). Конкретно, за допомогою вставляння гена, що кодує химерний білок Tie2 людини (1-452)-Fc, в вектор GS рEE12.4, і з використанням такого ж способу експресії і способу очищення, як описані в прикладі 7, отримували химерний білок Tie2 людини (1-452)-Fc. Потім, отриманий химерний білок Tie2 людини (1-452)-Fc інкубували з тромбіном (GE Healthcare, 27-0846-01) при 22 °C протягом 16 годин для відрізання частини Fc, і тромбін і Fc людини видаляли за допомогою колонок з бензамидинсефарозою 4 Fast Flow (high sub) (GE Healthcare) і MabSelect SuRe, таким чином отримуючи Tie2 людини (1-452).

[0163]

З метою ідентифікації епітопної ділянки, здійснювали мас-спектрометрії з обміном водню/дейтерію (далі в цьому документі позначеної як мас-спектрометрія з обміном H/D, Anal. Bioanal. Chem., 2010, Vol. 397, pp. 967-979) за допомогою використання систем NanoAQUITY UPLC HDX (Waters).

[0164]

Конкретно, змішані рідкі повністю людський 2-16A2-Fab і Tie2 людини (1-452) (кінцева концентрація 50 мкМ і 25 мкМ, відповідно) отримували з використанням буфера 20 мМ лимонної кислоти (pH 6), що містить 120 мМ хлорид натрію, і інкубували при 37 °C впродовж ночі. Як контроль, отримували розчин тільки Tie2 людини (1-452) з використанням буфера 20 мМ лимонної кислоти (pH 6), що містить 120 мМ хлорид натрію. Потім розчин додавали в розчин буфера PBS, отриманого з використанням дейтерієвої води (Kanto Chemical Co., Inc.), і інкубували протягом 20 секунд, 1 хвилини, 10 хвилин, 60 хвилин і 120 хвилин, відповідно, і проводили дейтерування. Потім водний розчин (pH 2,5), що містить 100 мМ дітіотреїтолу (Nacalai Tesque) і 4 М гідрохлорид гуанідину (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) додавали до цього при 0 °C, і потім проводили розщеплення з використанням колонки з пепсином (Prozyme (zareєстроване торгове найменування) Immobilized Pepsin Cartridge, Applied Biosystems), і відщеплений пептид зв'язували з використанням предколонки (ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm VanGuard Pre-Column, Waters). Потім проводили розділення за допомогою обернено-фазової хроматографії з використанням колонки C18 (AQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm, Waters), і молекулярну масу вимірювали за допомогою мас-спектрометра (SynaptG2-Si, Waters). Розраховували центроїдне значення ізотопного розподілу всіх детектованих пептидів і порівнювали з центроїдним значенням ізотопного розподілу тільки Tie2 людини (1-452), що зазнало дейтерієвого обміну, і зміну кількості з виникненням дейтерієвого обміну розраховували відносно кожного періоду дейтерування.

[0165]

В результаті мас-спектрометрії з обміном H/D, демонстрували, що пептиди з номерами амінокислот 27-37, 29-37, 29-38, 43-60, 82-100, 98-107, 111-124, 116-125, 116-129, 119-129, 189-198 і 190-198 з No. доступу NP 000450.2 володіли інгібованим дейтеруванням за умови спільної присутності з антитілом. Повторювані домени цих пептидів аранжували, потім до цього додавали інформацію про пептиди з неінгібованим дейтеруванням і, беручи до уваги те, що дві амінокислоти на N-кінці легко піддаються зворотному обміну (Proteins, 1993, Vol. 17, 75-86), виявили п'ять ділянок з інгібуванням дейтерієвого обміну, тобто, амінокислоти номер 29-38, 84-102, 113-120, 126-129 і 191-198 з No. доступу NP 000450.2 як ділянки-кандидати на епітоп. Потім, в результаті мас-спектрометрії з обміном H/D, виявили, що у випадку, коли TIE-1-Igγ1-LALA взаємодіє з ділянкою, що складається з цих п'яти амінокислотних ділянок, або коли відбувається зміна в просторовій структурі або алостеричний ефект за допомогою зв'язування антитіла, ці залишки захищені від обміну водню/дейтерію.

[0166]

(Приклад 17: Оцінка епітопа TIE-1-Igγ1-LALA: аналіз поверхневого плазмонного резонансу та ELISA)

Епітопи-кандидати з Tie2 людини для TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA ідентифікували за мас-спектрометрією з обміном H/D з прикладу 16. Щоб детально передбачити частину епітопа, отримували амінокислотні мутанти химерного білка Tie2 людини (1-452)-Fc, і активність зв'язування оцінювали з використанням аналізу поверхневого плазмонного резонансу (аналізу SPR) та ELISA.

[0167]

На основі результату мас-спектрометрії з обміном H/D і публікації ділянки, в якій Ang-1 і Ang-2 зв'язуються з Tie2 (Nat. Struct. Moī. Biol., 2006, Vol. 13, pp. 524-532. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013, Vol. 110, 7205-7210), отримували 23 білка з мутаціями амінокислот, в яких від однієї до чотирьох амінокислот замінювали на аланін (в одному випадку на глутамінову кислоту) з Tie2 людини (1-452) в химерному білку Tie2 людини (1-452)-Fc як білків Tie2 людини (1-452) з мутаціями амінокислот (таблиця 6). Різні мутанти отримували за допомогою такого ж способу, як для отримання химерного білка Tie2 людини (1-4 52)-Fc в прикладі 16.

Таблиця 6: Мутантні химерні білки Tie2 людини (1-452)-Fc

[Таблиця 6]

Найменування мутанта	Ділянка варіанта амінокислоти
Tie2 людини (1-452)r1-Fc	R167A, H168A, E169A
Tie2 людини (1-452)r2-Fc	D172A, I173A
Tie2 людини (1-452)r3-Fc	R167A
Tie2 людини (1-452)r4-Fc	H168A
Tie2 людини (1-452)r5-Fc	E169A
Tie2 людини (1-452)r6-Fc	D172A
Tie2 людини (1-452)r7-Fc	I173A
Tie2 людини (1-452)g1 -Fc	I194A, N197A, L198A
Tie2 людини (1-452)g2-Fc	R192A
Tie2 людини (1-452)g3-Fc	I194A
Tie2 людини (1-452)g4-Fc	G195E
Tie2 людини (1-452)g5-Fc	N197A
Tie2 людини (1-452)g6-Fc	L198A
Tie2 людини (1-452) m1-Fc	W82A, K84A
Tie2 людини (1-452)m3-Fc	S94A, K95A
Tie2 людини (1-452)y1-Fc	D37A
Tie2 людини (1-452)c1-Fc	R50A, H52A, E53A, P54A
Tie2 людини (1-452)A1-Fc	E151A
Tie2 людини (1-452)A2-Fc	V154A
Tie2 людини (1-452)A3-Fc	Y156A
Tie2 людини (1-452)A4-Fc	F161A
Tie2 людини (1-452)A5-Fc	S164A
Tie2 людини (1-452)A6-Fc	P166A

[0168]

Аналіз SPR проводили для оцінки активності зв'язування химерного білка Tie2 людини (1-452)-Fc і 23 мутантних білків з нього з повністю людським 2-16A2-Fab.

[0169]

Для аналізу SPR, використовували Biacore T200 (GE Healthcare). Антитіло проти IgG людини (Fc) (Human Antibody Capture Kit, GE Healthcare) фіксували на сенсорному чипі CM5. Дозволяли іммобілізацію кожного химерного білка Tie2 людини (1-452)-Fc і 23 мутантних білків з нього, розведених в HBS-EP (GE Healthcare) при 5 мкг/мл, і вимірювали рівень зв'язування. Потім, для повністю людського 2-16A2-Fab, розведеного в HBS-EP до 50 нМ, вимірювали рівень його зв'язування з химерним білком Tie2 людини (1-452)-Fc і 23 мутантними білками з нього. Потім, за допомогою ділення зв'язаної кількості на іммобілізовану кількість, розраховували зв'язану кількість антитіла на одиницю іммобілізованого антигену (далі в цьому документі позначене як коефіцієнт зв'язування). Середнє арифметичне для трьох експериментів і відносне значення коефіцієнта зв'язування для кожного з мутантних білків, коли коефіцієнт зв'язування химерного білка Tie2 людини (1-452)-Fc брали за 100 %, наведені в таблиці 7. Крім того, репрезентативні дані вимірювання показані на фіг. 6. Спосіб відносного порівняння зв'язаних кількостей на Biacore описаний, наприклад, в Analytical Biochemistry, 2003 Vol. 312, pp. 113-124.

[0170]

В результаті виявлено, що зв'язування повністю людського 2-16 A2-Fab було зменшеним для Tie2 людини (1-452)g1-Fc, Tie2 людини (1-452)g2-Fc, Tie2 людини (1-452)g3-Fc, Tie2 людини (1-452)g4-Fc, Tie2 людини (1-452)g5-Fc, Tie2 людини (1-452)m3-Fc, Tie2 людини (1-452)A1-Fc, Tie2 людини (1-452)A2-Fc, Tie2 людини (1-452)A3-Fc і Tie2 людини (1-452)A4-Fc, в порівнянні з химерним білком Tie2 людини (1-452)-Fc.

Таблиця 7: Результати аналізу SPR

[Таблиця 7]

	Коефіцієнт зв'язування	Відносне значення (%)
Химерний білок Tie2 людини (1-452)-Fc	0,29	100
Tie2 людини (1-452)r1-Fc	0,29	102
Tie2 людини (1-452)r2-Fc	0,28	98
Tie2 людини (1-452)r3-Fc	0,34	119
Tie2 людини (1-452)r4-Fc	0,33	113
Tie2 людини (1-452)r5-Fc	0,29	99
Tie2 людини (1-452)r6-Fc	0,29	100
Tie2 людини (1-452)r7-Fc	0,30	106
Tie2 людини (1-452)g1-Fc	0,00	0
Tie2 людини (1-452)g2-Fc	0,03	9
Tie2 людини (1-452)g3-Fc	0,06	23
Tie2 людини (1-452)g4-Fc	0,02	7
Tie2 людини (1-452)g5-Fc	0,03	9
Tie2 людини (1-452)g6-Fc	0,38	131
Tie2 людини (1-452)m1-Fc	0,31	107
Tie2 людини (1-452)m3-Fc	0,04	12
Tie2 людини (1-452)y1-Fc	0,25	87

Tie2 людини (1-452) c1-Fc	0,54	189
Tie2 людини (1-452) A1-Fc	0,10	34
Tie2 людини (1-452) A2-Fc	0,08	29
Tie2 людини (1-452) A3-Fc	0,17	59
Tie2 людини (1-452) A4-Fc	0,13	44
Tie2 людини (1-452) A5-Fc	0,39	135
Tie2 людини (1-452) A6-Fc	0,31	109

[0171]

ELSA здійснювали способом, як в прикладі 12, щоб оцінити активність зв'язування TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA з химерним білком Tie2 людини (1-452)-Fc і 23 мутантними білками з нього.

[0172]

Химерний білок Tie2 людини (1-452)-Fc і 23 мутантних білки з нього, розбавлені в PBS до 1 мкг/мл, додавали в білий 384-ямковий планшет Maxisorp в кількості 20 мкл на ямку, і інкубували при 4 °C впродовж ночі для проведення іммобілізації. На наступну добу, розчин для іммобілізації видаляли, і планшет промивали розчином TBS-T і інкубували протягом 60 хвилин з додаванням 50 мкл блокуючого реагенту Blocker™ з казеїном в TBS (Thermo Fisher Scientific Inc., 37532) для проведення блокування. Отриманий планшет промивали розчином TBS-T, і TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA, розведене у блокуючому реагенті Blocker™ з казеїном в TBS від 0,03 нг/мл до 100 нг/мл за вісім стадій, що містить 0,05 % Tween 20 (Nacalai Tesque Inc., 28353-85), додавали до цього у кількості 20 мкл на ямку. Отриманий планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 90 хвилин і потім промивали розчином TBS-T три рази, і до цього додавали 20 мкл міченого біотином антитіла проти легкого ланцюга каппа людини, розведеного до 0,1 мкг/мл в блокуючому реагенті Blocker™ з казеїном в TBS, що містить 0,05 % Tween 20. Отриманий планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 60 хвилин і потім промивали розчином TBS-T три рази, і до цього додавали 20 мкл міченого лужною фосфатазою стрептавідину, розведеного до 0,1 мкг/мл в блокуючому реагенті Blocker™ з казеїном в TBS, що містить 0,05 % Tween 20. Отриманий планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 60 хвилин і потім промивали розчином TBS-T три рази, і до цього додавали 50 мкл хемілюмінесцентного Ultra Sensitive AP Microwell та/або мембранного субстрату (450 нм), розведених в 5 разів в 20 mM TBS (pH 9,8), що містить 1 mM MgCl<sub>2</sub>, як субстрат. Отриманий планшет інкубували при кімнатній температурі з захистом від світла протягом 40 хвилин, і потім інтенсивність люмінесценції вимірювали за допомогою лічильника для множини міток Envision™. Розраховували значення EC<sub>50</sub> TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA відносно химерного білка Tie2 людини (1-452)-Fc і 23 мутантних білків з нього. Розраховували відносне значення інтенсивності люмінесценції для 100 нг/мл TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA як максимальну точку концентрації відносно химерного білка Tie2 людини (1-452)-Fc і 23 мутантних білків з нього, коли значення збіжності сигмоїдної кривої зв'язування TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA з химерним білком Tie2 людини (1-452)-Fc брали за 100 % (таблиця 8 і таблиця 9). Крім того, значення EC<sub>50</sub> і значення збіжності розраховували за допомогою нелінійного регресійного аналізу сигмоїдної моделі Емакс. Результати ELISA наведені на фіг. 7.

[0173]

В результаті виявлено, що в порівнянні з химерним білком Tie2 людини (1-452)-Fc, TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA володів значно зменшеним відносним значенням відносно Tie2 (1-452)g1-Fc, Tie2 (1-452)g2-Fc і Tie2 (1-452)g4-Fc, які являють собою мутантні білки. Крім того, виявлено, що в порівнянні з химерним білком Tie2 людини (1-452)-Fc, TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA володіли зменшеним відносним значенням і збільшеним значенням EC<sub>50</sub> відносно Tie2 (1-452)g5-Fc, що являє собою мутантний білок. В результаті виявлено, що TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA володіє зменшеною активністю зв'язування з Tie2 (1-452)g1-Fc, 35 Tie2 (1-452)g2-Fc, Tie2 (1-452)g4-Fc, і Tie2 (1-452)g5-Fc, на відміну від химерного білка Tie2 людини (1-452)-Fc. Оскільки TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA володів зменшеним відносним значенням і подібним значенням EC<sub>50</sub> відносно Tie2 (1-452) A1-Fc, визначили, що TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA не мав змін в активності зв'язування з Tie2 (1-452)A1-Fc.

Таблиця 8: Результати ELISA

[Таблиця 8]

	Відносне значення (%) інтенсивності люмінесценції	Значення EC <sub>50</sub> (нг/мл)
Химерний білок Tie2 людини (1-452)-Fc	97	1,1
Tie2 людини (1-452)r1-Fc	97	1,1
Tie2 людини (1-452)r2-Fc	96	0,9
Tie2 людини (1-452)r3-Fc	102	1,0
Tie2 людини (1-452)r4-Fc	101	1,0
Tie2 людини (1-452)r5-Fc	102	1,0
Tie2 людини (1-452)r6-Fc	100	1,0
Tie2 людини (1-452)r7-Fc	100	1,1
Tie2 людини (1-452)g1-Fc	3	12,3
Tie2 людини (1-452)g2-Fc	72	5,5
Tie2 людини (1-452)g3-Fc	96	1,1
Tie2 людини (1-452)g4-Fc	53	18
Tie2 людини (1-452)g5-Fc	91	2,2
Tie2 людини (1-452)g6-Fc	105	1,3
Tie2 людини (1-452)m1-Fc	104	1,0
Tie2 людини (1-452)m3-Fc	103	1,0
Tie2 людини (1-452)y1-Fc	109	1,0
Tie2 людини (1-452)c1-Fc	104	1,0

Таблиця 9: Результати ELISA

[Таблиця 9]

	Відносне значення (%) інтенсивності люмінесценції	Значення EC <sub>50</sub> (нг/мл)
Химерний білок Tie2 людини (1-452)-Fc	98	1,0
Tie2 людини (1-452)A1-Fc	90	1,3
Tie2 людини (1-452)A2-Fc	95	1,3
Tie2 людини (1-452)A3-Fc	98	1,0
Tie2 людини (1-452)A4-Fc	100	1,0
Tie2 людини (1-452)A5-Fc	98	0,9
Tie2 людини (1-452)A6-Fc	99	1,1

[0174]

- 5 За результатами двох незалежних експериментів, ELISA і аналізу SPR, Tie2 (1-452)g1-Fc, Tie2 (1-452)g2-Fc, Tie2 (1-452)g4-Fc і Tie2 (1-452)g5-Fc ідентифіковані як мутантні білки, активність зв'язування з якими TIE-1-Igγ1-LALA або повністю людського 2-16A2-Fab була зменшеною в обох експериментах. Виявлено, що амінокислоти номер 192, 194, 195, 197 і 198 в чотирьох мутантних білках є дуже важливими епітопами-кандидатами для зв'язування TIE-1-Igγ1-LALA з Tie2 людини. У наданому документі активність зв'язування Tie2 (1-452)g1-Fc, що володіє варіантами амінокислот I194A, N197A і L198A, була зменшеною в аналізі ELISA, в той час як активність зв'язування Tie2 (1-452)g3-Fc, що володіє варіантом амінокислоти I194A, з TIE-1-Igγ1-LALA не змінювалася в аналізі ELISA. Активність зв'язування Tie2 (1-452)g6-Fc, що являє
- 10

собою амінокислотний варіант L198A, не змінювалася ні в аналізі ELISA, ні в аналізі SPR. Ці результати свідчать про те, що мутація амінокислоти номер 197 в Tie2 (1-452) $\gamma$ 1-Fc була найбільш критичною амінокислотою як епітоп. Нарешті, виявлено, що TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA зв'язується з амінокислотами номер 192, 195 і 197 з No. доступу NP 000450.2 як епітопи.

5 Промислова придатність [0175]

Антитіло проти Tie2 людини за наданим винаходом можна застосовувати для попередження або лікування різних захворювань, що належать до кровоносних судин. Крім того, полінуклеотид, експресуючі вектори, трансформовану клітину-хазяїн і способи отримання антитіла за наданим винаходом можна застосовувати для отримання антитіла проти Tie2

10 людини.

Текст списку послідовностей довільного формату  
[0176]

У пункті, позначеним номером <223> списку послідовностей нижче, наведено опис "Штучна послідовність". А саме послідовність основ, вказана в SEQ ID NO: 1 у списку послідовностей, являє собою послідовність основ важкого ланцюга з TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA, та амінокислотна послідовність, вказана в SEQ ID NO: 2, являє собою амінокислотну послідовність важкого ланцюга, кодовану SEQ ID NO: 1. Послідовність основ, вказана в SEQ ID NO: 3 у списку послідовностей, являє собою послідовність основ легкого ланцюга з TIE-1-Ig $\gamma$ 1-LALA, TIE-1-Ig $\gamma$ 1-1253A, TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT, TIE-1-Ig $\gamma$ 4-PE і повністю людського 2-16A2, і амінокислотна послідовність, вказана в SEQ ID NO: 4, являє собою амінокислотну послідовність легкого ланцюга, кодовану SEQ ID NO: 3. Послідовність основ, вказана в SEQ ID NO: 5 у списку послідовностей, являє собою послідовність основ важкого ланцюга з TIE-1-Ig $\gamma$ 1-1253A, та амінокислотна послідовність, вказана в SEQ ID NO: 6, являє собою амінокислотну послідовність важкого ланцюга, кодовану SEQ ID NO: 5. Послідовність основ, вказана в SEQ ID NO: 7 у списку послідовностей, являє собою послідовність основ важкого ланцюга з TIE-1-Ig $\gamma$ 1-WT, та амінокислотна послідовність, вказана в SEQ ID NO: 8, являє собою амінокислотну послідовність важкого ланцюга, кодовану SEQ ID NO: 7. Послідовність основ, вказана в SEQ ID NO: 9 у списку послідовностей, являє собою послідовність основ важкого ланцюга з TIE-1-Ig $\gamma$ 4-PE, та амінокислотна послідовність, вказана в SEQ ID NO: 10, являє собою амінокислотну послідовність важкого ланцюга, кодованої SEQ ID NO: 9. Послідовність основ, вказана в SEQ ID NO: 11 у списку послідовностей, являє собою послідовність основ важкого ланцюга з повністю людського 2-16A2, та амінокислотна послідовність, вказана в SEQ ID NO: 12, являє собою амінокислотну послідовність важкого ланцюга, кодованого SEQ ID NO: 11. Амінокислотні послідовності, вказані в SEQ ID NO: 13-20 у списку послідовностей, являють собою амінокислотні послідовності лінкера. Амінокислотна послідовність, вказана в SEQ ID NO: 22 у списку послідовностей, являє собою ділянку впізнання тромбіну.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Astellas Pharma Inc.

<120> Нове антитіло проти Tie2 людини

<130> A15017A00

<150> JP2014-145135

<151> 2014-07-15

<160> 23

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 2037

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Н-ланцюг антитіла проти Tie2 людини

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2037)

<400> 1

gaa gtg cag ctg gtg gaa tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct ggc gga  
48  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

tct ctg aga ctg tct tgt gcc gcc tcc ggc ttc acc ttc gac gac tac  
96  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
20 25 30

gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct ggc aag gga ctg gaa tgg gtg  
144  
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

gcc ggc atc tcc tgg aac tcc ggc tct atc gtg tac gcc gac tcc gtg  
192  
Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac aac tcc aag aac acc ctg tac  
240  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

ctg cag atg aac tcc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc  
288  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

gct aag gac atc cgg gaa cag ctg gtg gaa gat gcc ttc gac atc tgg  
336



Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
100 105 110

ggc cag ggc acc ctc gtg acc gtg tcc tct gct tct acc aag ggc ccc  
384

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

tcc gtg ttc cct ctg gcc cct tcc agc aag tct acc tct ggc ggc aca  
432

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

gcc gct ctg ggc tgc ctc gtg aag gac tac ttc ccc gag ccc gtg aca  
480

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

gtg tct tgg aac tct ggc gcc ctg aca tct ggc gtg cac acc ttc cct  
528

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

gct gtg ctg cag tcc tcc ggc ctg tac tcc ctg tcc tcc gtc gtg act  
576

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

gtg ccc tcc agc tct ctg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aac  
624

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

cac aag ccc tcc aac acc aag gtg gac aag aag gtg gaa ccc aag tcc  
672

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

tgc ggc agc gag gtg cag ctg gtg gaa agt ggg gga ggc ctg gtg cag  
720

Cys Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
225 230 235 240

cca ggt gga agc ctg aga ctg agc tgc gcc gct tct ggc ttt acc ttt  
768

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
245 250 255

gat gat tat gcc atg cat tgg gtg cgc cag gct cca ggg aaa ggc ctg  
816

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
260 265 270

gaa tgg gtg gca ggg atc agc tgg aac agc ggc agc atc gtg tat gct  
864

Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala  
275 280 285

gat agc gtg aag ggg cgc ttt aca atc agc aga gac aac agc aag aat  
912

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

290	295	300
act ctg tac ctg cag atg aat agc ctg cgc gct gag gat aca gct gtg 960		
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val 305 310 315 320		
tat tac tgt gcc aag gat att cgc gag cag ctg gtg gaa gat gct ttt 1008		
Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe 325 330 335		
gat att tgg ggg cag ggt aca ctc gtg aca gtg tct agc gcc tcc acc 1056		
Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 340 345 350		
aag ggc cca agc gtg ttc cca ctg gct ccc agc tcc aag agc acc tcc 1104		
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser 355 360 365		
ggt gga act gct gcc ctg ggc tgt ctc gtg aaa gat tat ttt cct gag 1152		
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 370 375 380		
cct gtg act gtg tcc tgg aat agc ggc gct ctg acc agc gga gtg cat 1200		
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 385 390 395 400		
acc ttt cca gcc gtg ctg cag agc agc ggc ctg tat agc ctg tcc agc 1248		
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 405 410 415		
gtc gtg acc gtg cct tcc tct agc ctg gga aca cag aca tat atc tgt 1296		
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 420 425 430		
aat gtg aat cat aag ccc agt aat acc aaa gtg gat aag aaa gtg gaa 1344		
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu 435 440 445		
cct aag agc tgc gac aag acc cac acc tgt ccc cct tgt cct gcc cct 1392		
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 450 455 460		
gaa gct gct ggc ggc cct tct gtg ttt ctg ttc ccc cca aag cct aag 1440		
Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 465 470 475 480		
gac acc ctg atg atc tcc cgg acc ccc gaa gtg acc tgc gtg gtg gtg 1488		
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 485 490 495		

gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg aag ttc aat tgg tac gtg gac  
1536  
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
500 505 510

ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc aag cct aga gag gaa cag tac  
1584  
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
515 520 525

aac tcc acc tac cgg gtg gtg tcc gtg ctg aca gtg ctg cat cag gac  
1632  
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
530 535 540

tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac aag gcc ctg  
1680  
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
545 550 555 560

ccc gcc tcc atc gaa aag acc atc tcc aag gcc aag ggc cag ccc cgg  
1728  
Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
565 570 575

gaa ccc cag gtg tac aca ctg ccc cct agc agg gac gag ctg acc aag  
1776  
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
580 585 590

aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg aag ggc ttc tac ccc tcc gat  
1824  
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
595 600 605

atc gcc gtg gaa tgg gag tcc aac ggc cag cct gag aac aac tat aag  
1872  
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
610 615 620

acc acc ccc cct gtg ctg gac tcc gac ggc tca ttc ttt ctg tac tcc  
1920  
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
625 630 635 640

aag ctg acc gtg gac aag tcc cgg tgg cag cag ggc aac gtg ttc tcc  
1968  
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
645 650 655

tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc cag aag tcc  
2016  
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
660 665 670

ctg tcc ctg agc ccc ggc aaa  
2037  
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
675

<210> 2  
 <211> 679  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетична конструкція

<400> 2

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Cys Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
225 230 235 240

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
245 250 255

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
260 265 270

Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala  
275 280 285

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
290 295 300

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
305 310 315 320

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe  
325 330 335

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
340 345 350

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
355 360 365

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
370 375 380

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
385 390 395 400

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
405 410 415

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
420 425 430

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
435 440 445

Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
450						455					460				
Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
465					470					475					480
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
				485					490					495	
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
			500					505					510		
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
		515					520					525			
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
	530					535					540				
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
545					550					555					560
Pro	Ala	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
				565					570					575	
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
			580					585					590		
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
		595					600					605			
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
	610					615					620				
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
625					630					635					640
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
				645					650					655	
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
			660					665					670		
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
			675												

<210> 3  
 <211> 657  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> L-ланцюг антитіла проти Tie2 людини

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(657)

<400> 3  
 gac ata caa atg acc cag tct cca tcc tca ctt agt gcc tct gtt ggc  
 48  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 gat aga gta act atc aca tgc cgg tcc tcc caa tct ctg ctg cat tcc  
 96  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 cac cgc tac aac tac ctg gac tgg tat cag cag aaa ccc ggc aaa gct  
 144  
 His Arg Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
 35 40 45  
 ccc aag ctc ttg att tac ctg ggg tct aat agg gca agc ggt gtc cca  
 192  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 agt cga ttc agc gga agc ggg agc ggc aca gat ttt aca ctc act atc  
 240  
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 65 70 75 80  
 agt tca gtg cag cct gag gac ttc gcc acc tat tat tgt atg cag act  
 288  
 Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Met Gln Thr  
 85 90 95  
 ctg cag acc cct ctg acc ttt ggt cag gga acc aag gtg gaa atc aag  
 336  
 Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag  
 384  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 115 120 125  
 cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc  
 432  
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140  
 tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa  
 480

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

tgc ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc  
528

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

acc tac agc ctg agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag  
576

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

aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tgc  
624

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

ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt  
657

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

<210> 4

<211> 219

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

His Arg Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
35 40 45

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

<210> 5  
<211> 2037  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Н-ланцюг антитіла проти Tie2 людини

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(2037)

<400> 5  
gaa gtg cag ctg gtg gaa tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct ggc gga  
48  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

tct ctg aga ctg tct tgt gcc gcc tcc ggc ttc acc ttc gac gac tac  
96  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
20 25 30

gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct ggc aag gga ctg gaa tgg gtg  
144  
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

gcc ggc atc tcc tgg aac tcc ggc tct atc gtg tac gcc gac tcc gtg  
192  
Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala Asp Ser Val

50	55	60
aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac aac tcc aag aac acc ctg tac		
240		
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75 80
ctg cag atg aac tcc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc		
288		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90 95
gct aag gac atc cgg gaa cag ctg gtg gaa gat gcc ttc gac atc tgg		
336		
Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp		
	100	105 110
ggc cag ggc acc ctc gtg acc gtg tcc tct gct tct acc aag ggc ccc		
384		
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
	115	120 125
tcc gtg ttc cct ctg gcc cct tcc agc aag tct acc tct ggc ggc aca		
432		
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
	130	135 140
gcc gct ctg ggc tgc ctc gtg aag gac tac ttc ccc gag ccc gtg aca		
480		
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
145	150	155 160
gtg tct tgg aac tct ggc gcc ctg aca tct ggc gtg cac acc ttc cct		
528		
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
	165	170 175
gct gtg ctg cag tcc tcc ggc ctg tac tcc ctg tcc tcc gtc gtg act		
576		
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
	180	185 190
gtg ccc tcc agc tct ctg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aac		
624		
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
	195	200 205
cac aag ccc tcc aac acc aag gtg gac aag aag gtg gaa ccc aag tcc		
672		
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
	210	215 220
tgc ggc agc gag gtg cag ctg gtg gaa agt ggg gga ggc ctg gtg cag		
720		
Cys Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln		
225	230	235 240
cca ggt gga agc ctg aga ctg agc tgc gcc gct tct ggc ttt acc ttt		
768		
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
	245	250 255

gat gat tat gcc atg cat tgg gtg cgc cag gct cca ggg aaa ggc ctg  
816  
Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
260 265 270  
  
gaa tgg gtg gca ggg atc agc tgg aac agc ggc agc atc gtg tat gct  
864  
Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala  
275 280 285  
  
gat agc gtg aag ggg cgc ttt aca atc agc aga gac aac agc aag aat  
912  
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
290 295 300  
  
act ctg tac ctg cag atg aat agc ctg cgc gct gag gat aca gct gtg  
960  
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
305 310 315 320  
  
tat tac tgt gcc aag gat att cgc gag cag ctg gtg gaa gat gct ttt  
1008  
Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe  
325 330 335  
  
gat att tgg ggg cag ggt aca ctc gtg aca gtg tct agc gcc tcc acc  
1056  
Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
340 345 350  
  
aag ggc cca agc gtg ttc cca ctg gct ccc agc tcc aag agc acc tcc  
1104  
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
355 360 365  
  
ggt gga act gct gcc ctg ggc tgt ctc gtg aaa gat tat ttt cct gag  
1152  
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
370 375 380  
  
cct gtg act gtg tcc tgg aat agc ggc gct ctg acc agc gga gtg cat  
1200  
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
385 390 395 400  
  
acc ttt cca gcc gtg ctg cag agc agc ggc ctg tat agc ctg tcc agc  
1248  
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
405 410 415  
  
gtc gtg acc gtg cct tcc tct agc ctg gga aca cag aca tat atc tgt  
1296  
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
420 425 430  
  
aat gtg aat cat aag ccc agt aat acc aaa gtg gat aag aaa gtg gaa  
1344  
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
435 440 445

cct aag agc tgc gac aag acc cac acc tgt ccc cct tgt cct gcc cct  
1392  
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
450 455 460

gaa gct gct ggc ggc cct tct gtg ttt ctg ttc ccc cca aag cct aag  
1440  
Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
465 470 475 480

gac acc ctg atg gcc tcc cgg acc ccc gaa gtg acc tgc gtg gtg gtg  
1488  
Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
485 490 495

gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg aag ttc aat tgg tac gtg gac  
1536  
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
500 505 510

ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc aag cct aga gag gaa cag tac  
1584  
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
515 520 525

aac tcc acc tac cgg gtg gtg tcc gtg ctg aca gtg ctg cat cag gac  
1632  
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
530 535 540

tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac aag gcc ctg  
1680  
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
545 550 555 560

ccc gcc tcc atc gaa aag acc atc tcc aag gcc aag ggc cag ccc cgg  
1728  
Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
565 570 575

gaa ccc cag gtg tac aca ctg ccc cct agc agg gac gag ctg acc aag  
1776  
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
580 585 590

aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg aag ggc ttc tac ccc tcc gat  
1824  
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
595 600 605

atc gcc gtg gaa tgg gag tcc aac ggc cag cct gag aac aac tat aag  
1872  
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
610 615 620

acc acc ccc cct gtg ctg gac tcc gac ggc tca ttc ttt ctg tac tcc  
1920  
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
625 630 635 640

aag ctg acc gtg gac aag tcc cgg tgg cag cag ggc aac gtg ttc tcc  
1968

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
645 650 655

tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc cag aag tcc  
2016

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
660 665 670

ctg tcc ctg agc ccc ggc aaa  
2037

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
675

<210> 6

<211> 679

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 6

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
100 105 110

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

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

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

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
385 390 395 400

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
405 410 415

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
420 425 430

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
435 440 445

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
450 455 460

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
465 470 475 480

Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
485 490 495

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
500 505 510

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
515 520 525

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
530 535 540

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
545 550 555 560

Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
565 570 575

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
580 585 590

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
595 600 605

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
610 615 620

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

625                      630                      635                      640  
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
                                 645                      650                      655  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
                                 660                      665                      670  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                                 675  
 <210> 7  
 <211> 2037  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Н-ланцюг антитіла проти Tie2 людини  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(2037)  
 <400> 7  
 gag gtg cag ctg gtg gaa tcc ggc gga ggc ctg gtg cag cct ggc ggc  
 48  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                      5                      10                      15  
 tct ctg aga ctg tcc tgt gcc gcc tcc ggc ttc acc ttc gac gac tac  
 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
                                 20                      25                      30  
 gcc atg cac tgg gtc cga cag gcc cct ggc aag ggc ctg gaa tgg gtg  
 144  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                                 35                      40                      45  
 gcc ggc atc tcc tgg aac tcc ggc tcc atc gtg tac gcc gac tcc gtg  
 192  
 Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala Asp Ser Val  
                                 50                      55                      60  
 aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac aac tcc aag aac acc ctg tac  
 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 ctg cag atg aac tcc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc  
 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                                 85                      90                      95  
 gcc aag gac atc aga gag cag ctg gtc gag gac gcc ttc gac atc tgg  
 336



Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
100 105 110

ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtg tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca  
384  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
115 120 125

tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca  
432  
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
130 135 140

gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg  
480  
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160

gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg  
528  
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
165 170 175

gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctt agt agc gtg gtg acc  
576  
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
180 185 190

gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat  
624  
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
195 200 205

cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct  
672  
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
210 215 220

tgt gga tcc gag gtg cag ctg gtg gaa tcc ggc gga ggc ctg gtg cag  
720  
Cys Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
225 230 235 240

cct ggc ggc tct ctg aga ctg tcc tgt gcc gcc tcc ggc ttc acc ttc  
768  
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
245 250 255

gac gac tac gcc atg cac tgg gtc cga cag gcc cct ggc aag ggc ctg  
816  
Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
260 265 270

gaa tgg gtg gcc ggc atc tcc tgg aac tcc ggc tcc atc gtg tac gcc  
864  
Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala  
275 280 285

gac tcc gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac aac tcc aag aac  
912  
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

290	295	300
acc ctg tac ctg cag atg aac tcc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg 960		
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val 305 310 315 320		
tac tac tgc gcc aag gac atc aga gag cag ctg gtc gag gac gcc ttc 1008		
Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe 325 330 335		
gac atc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtg tcc tca gcc tcc acc 1056		
Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 340 345 350		
aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct 1104		
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser 355 360 365		
ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa 1152		
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 370 375 380		
ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac 1200		
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 385 390 395 400		
acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctt agt agc 1248		
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 405 410 415		
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc 1296		
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 420 425 430		
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag 1344		
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu 435 440 445		
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct 1392		
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 450 455 460		
gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag 1440		
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 465 470 475 480		
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg 1488		
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 485 490 495		

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac  
1536  
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
500 505 510

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag cgg cgg gag gag cag tac  
1584  
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
515 520 525

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac  
1632  
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
530 535 540

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc  
1680  
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
545 550 555 560

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga  
1728  
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
565 570 575

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag  
1776  
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
580 585 590

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac  
1824  
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
595 600 605

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag cgg gag aac aac tac aag  
1872  
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
610 615 620

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc  
1920  
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
625 630 635 640

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca  
1968  
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
645 650 655

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc  
2016  
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
660 665 670

ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa  
2037  
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
675

<210> 8  
 <211> 679  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетична конструкція

<400> 8

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 450 455 460  
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 465 470 475 480  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 485 490 495  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 500 505 510  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 515 520 525  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 530 535 540  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 545 550 555 560  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 565 570 575  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
 580 585 590  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 595 600 605  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 610 615 620  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 625 630 635 640  
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
 645 650 655  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 660 665 670  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 675

<210> 9  
 <211> 2028  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Н-ланцюг антитіла проти Tie2 людини

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(2028)

<400> 9  
 gag gtg cag ctg gtg gaa tcc ggc gga ggc ctg gtg cag cct ggc ggc  
 48  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 tct ctg aga ctg tcc tgt gcc gcc tcc ggc ttc acc ttc gac gac tac  
 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30  
 gcc atg cac tgg gtc cga cag gcc cct ggc aag ggc ctg gaa tgg gtg  
 144  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 gcc ggc atc tcc tgg aac tcc ggc tcc atc gtg tac gcc gac tcc gtg  
 192  
 Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac aac tcc aag aac acc ctg tac  
 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 ctg cag atg aac tcc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc  
 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 gcc aag gac atc aga gag cag ctg gtc gag gac gcc ttc gac atc tgg  
 336  
 Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
 100 105 110  
 ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtg tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca  
 384  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 115 120 125  
 tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca  
 432  
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
 130 135 140  
 gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg  
 480

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

gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg  
528

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

gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctt agt agc gtg gtg acc  
576

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

gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat  
624

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

cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct  
672

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

tgt gga tcc gag gtg cag ctg gtg gaa tcc ggc gga ggc ctg gtg cag  
720

Cys Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
225 230 235 240

cct ggc ggc tct ctg aga ctg tcc tgt gcc gcc tcc ggc ttc acc ttc  
768

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
245 250 255

gac gac tac gcc atg cac tgg gtc cga cag gcc cct ggc aag ggc ctg  
816

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
260 265 270

gaa tgg gtg gcc ggc atc tcc tgg aac tcc ggc tcc atc gtg tac gcc  
864

Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala  
275 280 285

gac tcc gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac aac tcc aag aac  
912

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
290 295 300

acc ctg tac ctg cag atg aac tcc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg  
960

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
305 310 315 320

tac tac tgc gcc aag gac atc aga gag cag ctg gtc gag gac gcc ttc  
1008

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe  
325 330 335

gac atc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtg tcc tca gcc agc acc  
1056

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr



340	345	350
aag ggg ccc tct gtg ttt ccc ctt gcc cct tgc agt agg tct acc agc 1104		
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser 355 360 365		
gaa agt act gcc gcc ctt ggc tgt ctg gtg aaa gat tat ttt cct gaa 1152		
Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 370 375 380		
cct gtc acc gtg tcc tgg aac tcc ggt gct ttg act tct ggc gtt cat 1200		
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 385 390 395 400		
act ttt cct gca gtc ctg caa agt tct ggc ctg tac agc ctt agc tcc 1248		
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 405 410 415		
gtg gta act gtg cct tcc tct tct ctg ggt acc aaa acc tat acc tgc 1296		
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys 420 425 430		
aat gtg gac cac aaa cct tct aat act aag gtc gac aag agg gtg gag 1344		
Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu 435 440 445		
tct aag tac gga cca cct tgt cct cca tgc ccc gcc ccc gag ttc gag 1392		
Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu 450 455 460		
ggc ggt cct agt gtg ttc ctg ttc cct cca aag ccc aag gac acc ttg 1440		
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 465 470 475 480		
atg ata agc agg act cct gag gtg aca tgt gtg gtt gta gac gtc tct 1488		
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 485 490 495		
cag gag gat ccc gaa gtg cag ttt aat tgg tac gtg gat gga gtc gag 1536		
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 500 505 510		
gtg cac aac gcc aaa acc aaa ccc cgc gag gag caa ttc aac tcc acc 1584		
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr 515 520 525		
tat cgc gtg gtg tct gtc ctg acc gtc ctg cac caa gat tgg ctg aac 1632		
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 530 535 540		

gga aaa gaa tat aag tgt aaa gta agc aat aag ggc ctg cct tca tcc  
1680  
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser  
545 550 555 560

att gag aag aca atc agc aag gca aag ggc cag cct aga gaa ccc caa  
1728  
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
565 570 575

gtg tac acc ctc cca ccc tct cag gag gaa atg acc aag aat cag gtt  
1776  
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
580 585 590

agc ctt act tgt ctc gta aag ggg ttc tac cct agc gac att gct gtc  
1824  
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
595 600 605

gag tgg gaa agc aat gga cag cct gag aat aac tat aaa acc act ccc  
1872  
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
610 615 620

cca gtg ctt gac tca gat ggc tct ttt ttc ctt tac tcc cgc ttg aca  
1920  
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr  
625 630 635 640

gtc gac aag agt aga tgg caa gag ggg aac gtg ttc agc tgc agt gtt  
1968  
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
645 650 655

atg cac gag gca ctc cat aac cat tat act cag aaa tcc ttg agc ctg  
2016  
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
660 665 670

tcc ctt gga aag  
2028  
Ser Leu Gly Lys  
675

<210> 10  
<211> 676  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Синтетична конструкція

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Cys Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
225 230 235 240

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
245 250 255

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

260	265	270
Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala		
275	280	285
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn		
290	295	300
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
305	310	315
Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe		
325	330	335
Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr		
340	345	350
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser		
355	360	365
Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu		
370	375	380
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His		
385	390	395
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser		
405	410	415
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys		
420	425	430
Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu		
435	440	445
Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu		
450	455	460
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
465	470	475
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
485	490	495
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
500	505	510

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr  
515 520 525

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
530 535 540

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser  
545 550 555 560

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
565 570 575

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
580 585 590

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
595 600 605

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
610 615 620

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr  
625 630 635 640

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
645 650 655

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
660 665 670

Ser Leu Gly Lys  
675

<210> 11

<211> 1356

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Н-ланцюг антитіла проти Tie2 людини

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1356)

<400> 11

gag gtg cag ctg gtg gaa tcc ggc gga ggc ctg gtg cag cct ggc ggc  
 48  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 tct ctg aga ctg tcc tgt gcc gcc tcc ggc ttc acc ttc gac gac tac  
 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30  
 gcc atg cac tgg gtc cga cag gcc cct ggc aag ggc ctg gaa tgg gtg  
 144  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 gcc ggc atc tcc tgg aac tcc ggc tcc atc gtg tac gcc gac tcc gtg  
 192  
 Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac aac tcc aag aac acc ctg tac  
 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 ctg cag atg aac tcc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc  
 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 gcc aag gac atc aga gag cag ctg gtc gag gac gcc ttc gac atc tgg  
 336  
 Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
 100 105 110  
 ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtg tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca  
 384  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 115 120 125  
 tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca  
 432  
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
 130 135 140  
 gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg  
 480  
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160  
 gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg  
 528  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175  
 gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctt agt agc gtg gtg acc  
 576  
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 180 185 190

gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat  
624  
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
195 200 205

cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct  
672  
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
210 215 220

tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg  
720  
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
225 230 235 240

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc  
768  
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
245 250 255

atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc  
816  
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
260 265 270

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag  
864  
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
275 280 285

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg  
912  
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
290 295 300

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat  
960  
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
305 310 315 320

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc  
1008  
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
325 330 335

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag  
1056  
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
340 345 350

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc  
1104  
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
355 360 365

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg  
1152  
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
370 375 380

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct  
1200

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

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc  
1248

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

gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg  
1296

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

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg  
1344

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

tct ccg ggt aaa  
1356

Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 12

<211> 452

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична конструкція

<400> 12

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp



## UA 121754 C2

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 13  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> лінкер

<400> 13

Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser  
1 5

<210> 14  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> лінкер

<400> 14

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Gly Ser  
1 5 10

<210> 15  
<211> 22  
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> лінкер

<400> 15

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Gly Gly Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
20

<210> 16

<211> 32

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> лінкер

<400> 16

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Gly Gly Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
20 25 30

<210> 17

<211> 42

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> лінкер

<400> 17

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Gly Gly Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
35 40

<210> 18

<211> 52

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> лінкер

<400> 18

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Gly Gly Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Gly Gly Gly Ser  
50

<210> 19

<211> 62

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> лінкер

<400> 19

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Gly Gly Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
35 40 45

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
50 55 60

<210> 20

<211> 64

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> лінкер

<400> 20

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Ser Pro Arg Ser  
1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp Thr Pro Pro Pro Ser Pro Arg Ser Pro

	20		25		30										
Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro	Arg	Ser	Pro	Glu
		35					40					45			
Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro	Arg	Ser	Pro	Gly	Ser
	50					55					60				

<210> 21  
 <211> 3369  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 21  
 atggactcct tagccagctt agttctctgt ggagtcagct tgctccttc tggaactgtg  
 60  
 gaaggtgcc tggacttgat ctgatcaat tccctacctc ttgtatctga tgctgaaaca  
 120  
 tctctcacct gcattgcctc tgggtggcgc ccccatgagc ccatcaccat aggaagggac  
 180  
 ttggaagcct taatgaacca gcaccaggat ccgctggaag ttactcaaga tgtgaccaga  
 240  
 gaatgggcta aaaaagttgt ttggaagaga gaaaaggcta gtaagatcaa tgggtgcttat  
 300  
 ttctgtgaag ggcgagttcg aggagaggca atcaggatac gaaccatgaa gatgcgtcaa  
 360  
 caagcttcc tctaccagc tactttaact atgactgtgg acaagggaga taacgtgaac  
 420  
 atatctttca aaaaggtatt gactaaagaa gaagatgcag tgatttaca aaatgggtcc  
 480  
 ttcatccatt cagtgcctcg gcatgaagta cctgatattc tagaagtaca cctgcctcat  
 540  
 gctcagcccc aggatgctgg agtgtactcg gccaggtata taggaggaaa cctcttcacc  
 600  
 tgggccttca ccaggctgat agtccggaga tgtgaagccc agaagtgggg acctgaatgc  
 660  
 aaccatctct gtactgcttg tatgaacaat ggtgtctgcc atgaagatac tggagaatgc  
 720  
 atttgcctc ctgggtttat gggaaggacg tgtgagaagg cttgtgaact gcacacgttt  
 780  
 ggcagaactt gtaaagaaag gtgcagtggg caagagggat gcaagtctta tgtgttctgt  
 840  
 ctccctgacc cctatgggtg ttccctgtgc acaggctgga aggtctgca gtgcaatgaa  
 900

gcattgccacc ctgggttttta cggggccagat tgtaagctta ggtgcagctg caacaatggg  
960

gagatgtgtg atcgcttcca aggatgtctc tgctctccag gatggcaggg gctccagtgt  
1020

gagagagaag gcataccgag gatgacccca aagatagtgg atttgccaga tcatatagaa  
1080

gtaaacagtg gtaaatttaa tcccatttgc aaagcttctg gctggccgct acctactaat  
1140

gaagaaatga ccctggtgaa gccggatggg acagtgtcc atccaaaaga ctttaaccat  
1200

acggatcatt tctcagtagc catattcacc atccaccgga tctctccccc tgactcagga  
1260

gtttgggtct gcagtgtgaa cacagtggct gggatgggtg aaaagccctt caacatttct  
1320

gttaaagtto ttccaaagcc cctgaatgcc ccaaactga ttgacactgg acataacttt  
1380

gctgtcatca acatcagctc tgagccttac tttggggatg gaccaatcaa atccaagaag  
1440

cttctataca aacccgtaa tcactatgag gcttggaac atattcaagt gacaaatgag  
1500

attgttacac tcaactattt ggaacctcgg acagaatatg aactctgtgt gcaactggtc  
1560

cgctcgtggag aggggtggga agggcatcct ggacctgtga gacgcttcac aacagcttct  
1620

atcggactcc ctccccaag aggtctaaat ctccctgccta aaagtcagac cactctaaat  
1680

ttgacctggc aaccaatatt tccaagctcg gaagatgact tttatgttga agtggagaga  
1740

aggtctgtgc aaaaaagtga tcagcagaat attaaagtc caggcaactt gacttcgggtg  
1800

ctacttaaca acttacatcc caggagagcag tacgtggtcc gagctagagt caacaccaag  
1860

gccagggggg aatggagtga agatctcact gcttggaacc ttagtgacat tcttctctct  
1920

caaccagaaa acatcaagat ttccaacatt acacactcct cagctgtgat ttcttgga  
1980

atattggatg gctattctat ttcttctatt actatccgtt acaaggttca aggcaagaat  
2040

gaagaccagc acgttgatgt gaagataaag aatgccacca tcaactcagta tcagctcaag  
2100

ggccatagagc ctgaaacagc ataccaggtg gacatttttg cagagaacaa catagggtca  
 2160  
 agcaaccag ccttttctca tgaactggtg accctcccag aatctcaagc accagcggac  
 2220  
 ctcgaggagg ggaagatgct gcttatagcc atccttggtc ctgctggaat gacctgcctg  
 2280  
 actgtgctgt tggcctttct gatcatattg caattgaaga gggcaaagt gcaaaggaga  
 2340  
 atggcccaag ccttccaaaa cagggaagaa ccagctgtgc agttcaactc agggactctg  
 2400  
 gccctaaaca ggaagggtcaa aaacaaccca gatcctacaa tttatccagt gcttgactgg  
 2460  
 aatgacatca aatttcaaga tgtgattggg gagggcaatt ttggccaagt tottaaggcg  
 2520  
 cgcacaaaga aggatgggtt acggatggat gctgccatca aaagaatgaa agaatatgcc  
 2580  
 tccaaagatg atcacaggga ctttgacgga gaactggaag ttctttgtaa acttgacac  
 2640  
 catccaaaca tcatcaatct cttaggagca tgtgaacatc gaggctactt gtacctggcc  
 2700  
 attgagtacg cgtcccatgg aaacctttct gacttccttc gcaagagccg tgtgctggag  
 2760  
 acggaccag catttgccat tgccaatagc accgcgtcca cactgtcttc ccagcagctc  
 2820  
 cttcacttcg ctgccgacgt ggcccggggc atggactact tgagccaaaa acagtttctc  
 2880  
 cacagggatc tggctgccag aaacatttta gttggtgaaa actatgtggc aaaaatagca  
 2940  
 gattttggat tgtcccagg tcaagaggtg tatgtgaaaa agacaatggg aaggctccca  
 3000  
 gtgcgctgga tggccatcga gtcaactgaat tacagtgtgt acacaaccaa cagtgatgta  
 3060  
 tggtcctatg gtgtgttact atgggagatt gttagcttag gaggcacacc ctactgcgga  
 3120  
 atgacttgtg cagaactcta cgagaagctg ccccagggtc acagactgga gaagcccttg  
 3180  
 aactgtgatg atgaggtgta tgatctaag agacaatgct ggcgaggaga gccttatgag  
 3240  
 aggccatcat ttgccagat attggtgtcc ttaaacagaa tgttagagga gcgaaagacc  
 3300

tacgtgaata ccacgcttta tgagaagttt acctatgcag gaattgactg ttctgctgaa  
3360

gaagcggcc  
3369

<210> 22  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> ділянка розщеплення тромбіном

<400> 22

Leu Val Pro Arg Gly Ser  
1 5

<210> 23  
<211> 231  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 23

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
1 5 10 15

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys



```

130                               135                               140
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145                               150                               155                               160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165                               170                               175

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
180                               185                               190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195                               200                               205

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                               230

```

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Антитіло проти Tie2 людини, яке містить чотири варіабельні ділянки важкого ланцюга і чотири варіабельні ділянки легкого ланцюга, вибране з (1) або (2) нижче:
  - (1) антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги і чотири легкі ланцюги, в якому кожний важкий ланцюг містить дві структури, що складаються з варіабельної ділянки важкого ланцюга, що складається з амінокислот 1-122 амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2, і області CH1, області CH2 і області CH3, і C-кінець однієї зі структур зв'язаний з N-кінцем іншої структури через лінкер; і кожний легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що складається з амінокислот 1-113 амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 4, і константну область легкого ланцюга; і
  - 10 (2) антитіло проти Tie2 людини, де антитіло піддавалось піроглутамілуванню на N-кінці варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини з (1).
2. Антитіло проти Tie2 людини за п. 1, вибране з (1) або (2) нижче:
  - (1) антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 4; або
  - 20 (2) антитіло проти Tie2 людини, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, в якій глутамінову кислоту в положенні 1 в SEQ ID NO: 2 модифікують до піроглутамінової кислоти і/або лізин в положенні 679 в SEQ ID NO: 2 делетують, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 4.
  - 25 3. Антитіло проти Tie2 людини за п. 2, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 4.
  4. Антитіло проти Tie2 людини за п. 2, що містить два важкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності з амінокислот номер 1-678 з SEQ ID NO: 2, і чотири легкі ланцюги, що складаються з амінокислотної послідовності, показаної в SEQ ID NO: 4.
  - 30 5. Полінуклеотид, який містить (a) і (b):
    - (a) полінуклеотид, який містить послідовність основ, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини за п. 1(1); і
    - 35 (b) полінуклеотид, який містить послідовність основ, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла проти Tie2 людини за п. 1(1).



експресуючий вектор, що містить полінуклеотид, який містить послідовність основ, що кодує легкий ланцюг антитіла; і

(с) клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який містить послідовність основ, що кодує важкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини за п. 3, і

5 клітина-хазяїн, трансформована експресуючим вектором, що містить полінуклеотид, який містить послідовність основ, що кодує легкий ланцюг антитіла проти Tie2 людини.

13. Фармацевтична композиція, що містить антитіло проти Tie2 людини за п. 3 і/або антитіло проти Tie2 людини за п. 4 і фармацевтично прийнятний наповнювач.

10 14. Фармацевтична композиція за п. 13, що являє собою фармацевтичну композицію для запобігання або лікування діабетичного набряку жовтої плями, діабетичної ретинопатії або критичної ішемії кінцівок.

15. Застосування антитіла проти Tie2 людини за п. 2 для запобігання або лікування діабетичного набряку жовтої плями.

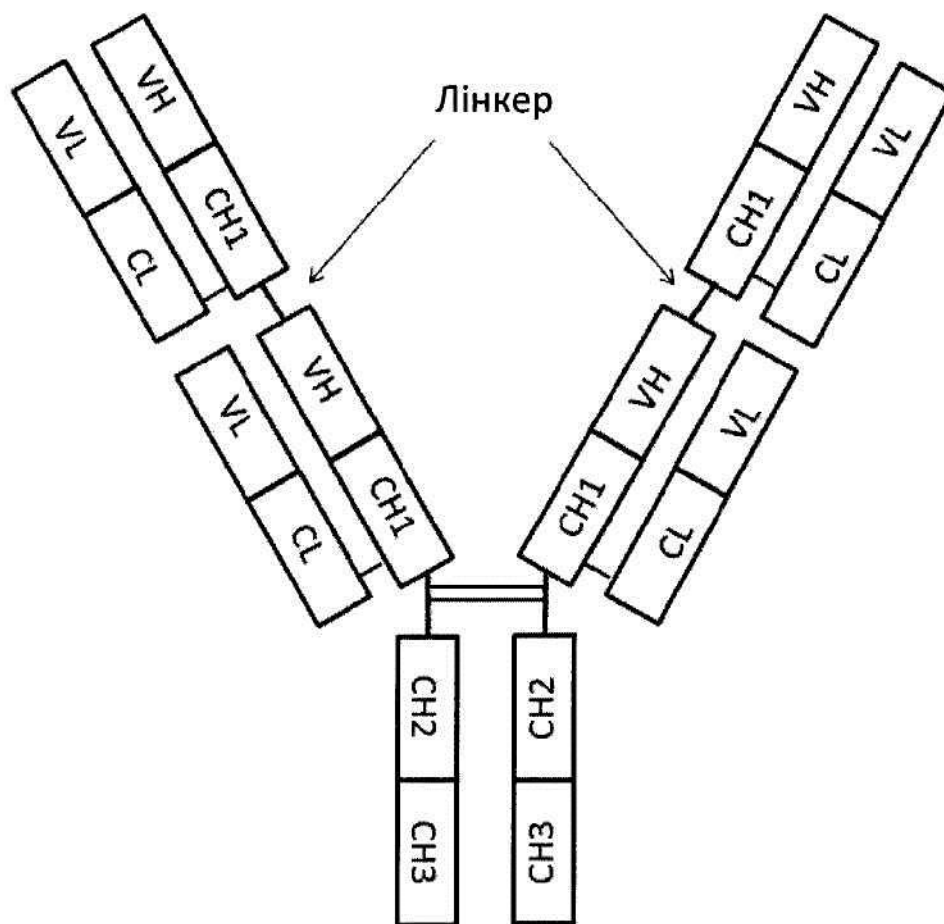
15 16. Застосування антитіла проти Tie2 людини за п. 2 для запобігання або лікування діабетичної ретинопатії.

17. Застосування антитіла проти Tie2 людини за п. 2 для запобігання або лікування критичної ішемії кінцівок.

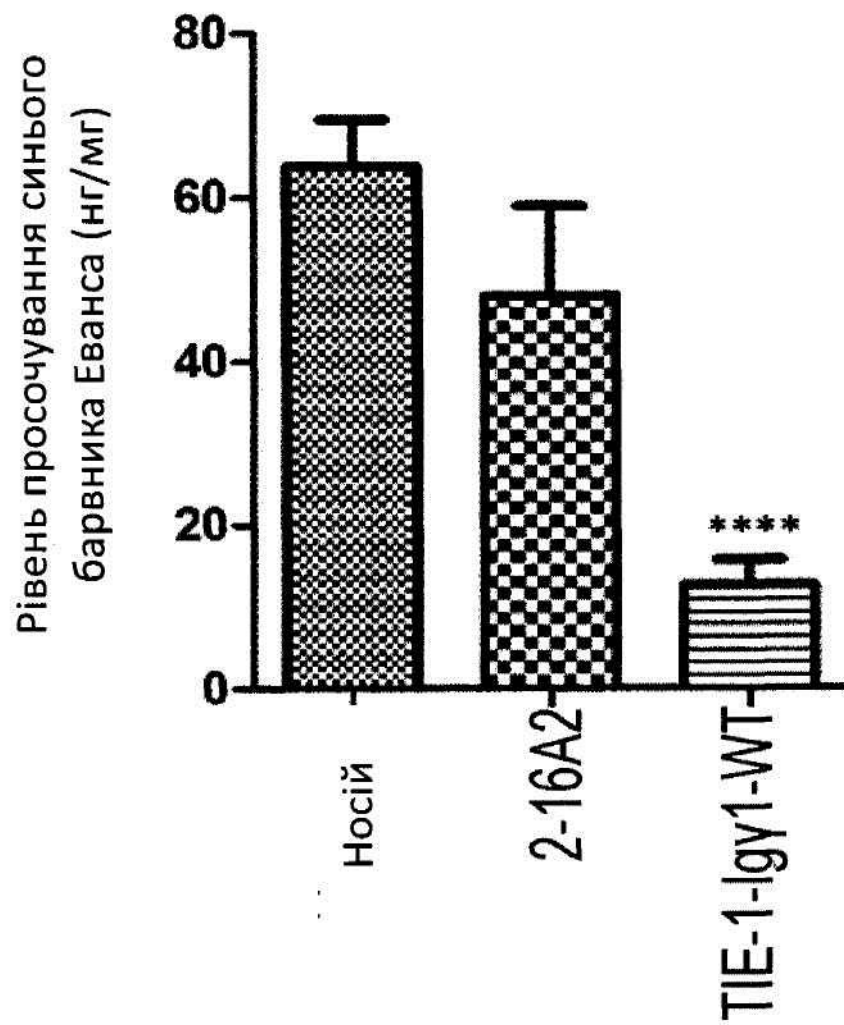
18. Застосування антитіла проти Tie2 людини за п. 2 для виготовлення фармацевтичної композиції для запобігання або лікування діабетичного набряку жовтої плями.

20 19. Застосування антитіла проти Tie2 людини за п. 2 для виготовлення фармацевтичної композиції для запобігання або лікування діабетичної ретинопатії.

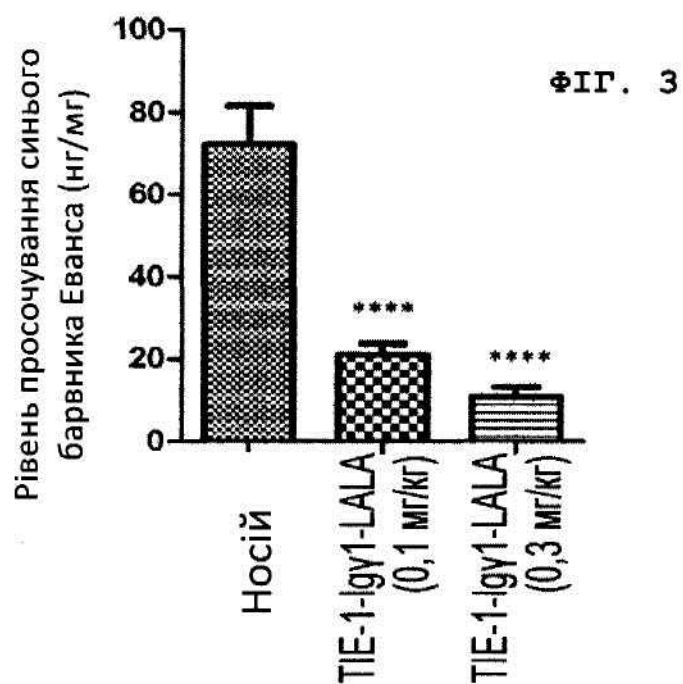
20. Застосування антитіла проти Tie2 людини за п. 2 для виготовлення фармацевтичної композиції для запобігання або лікування критичної ішемії кінцівок.



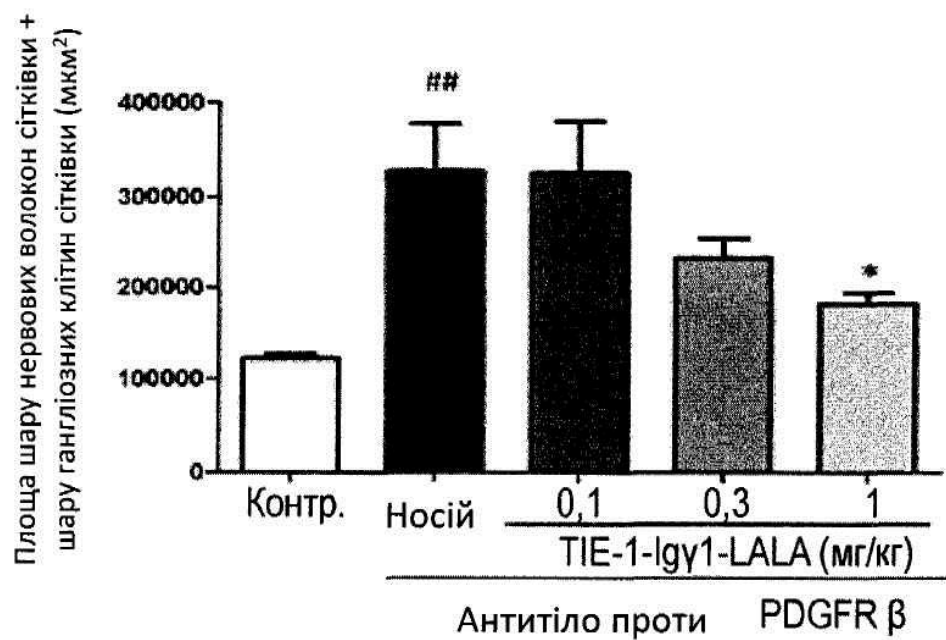
ФІГ. 1

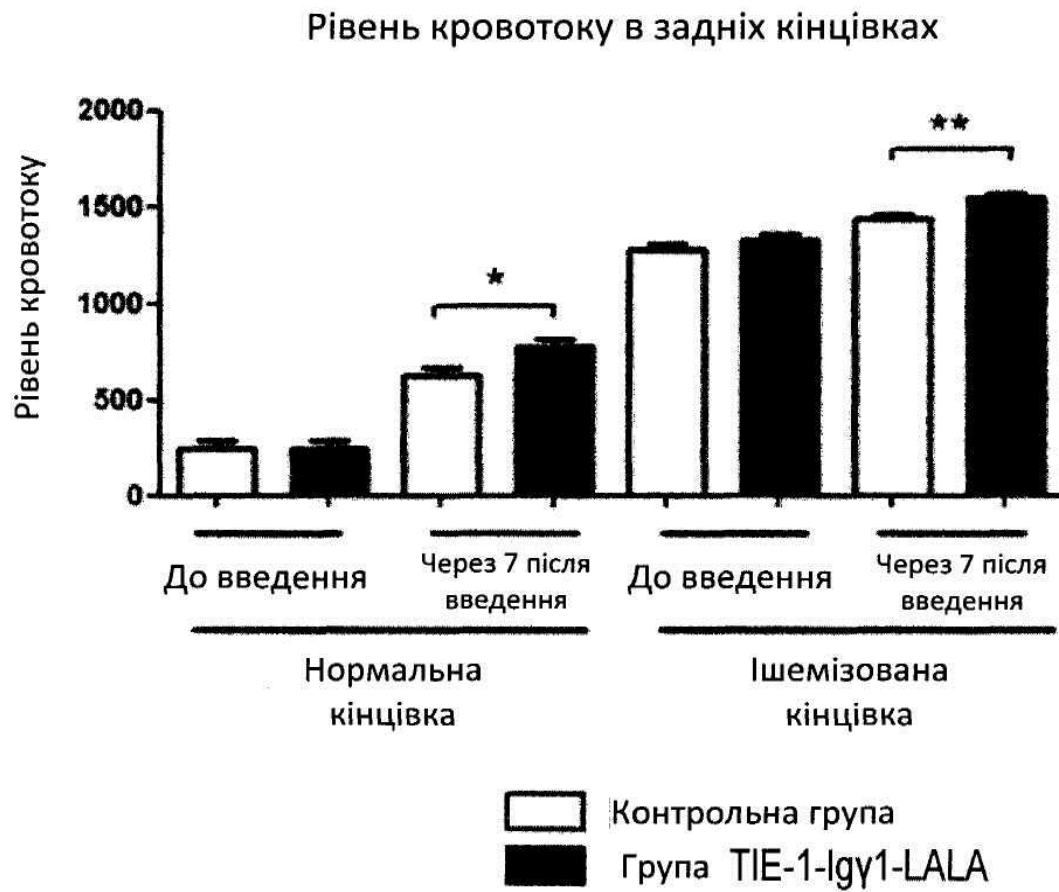


ФІГ. 2

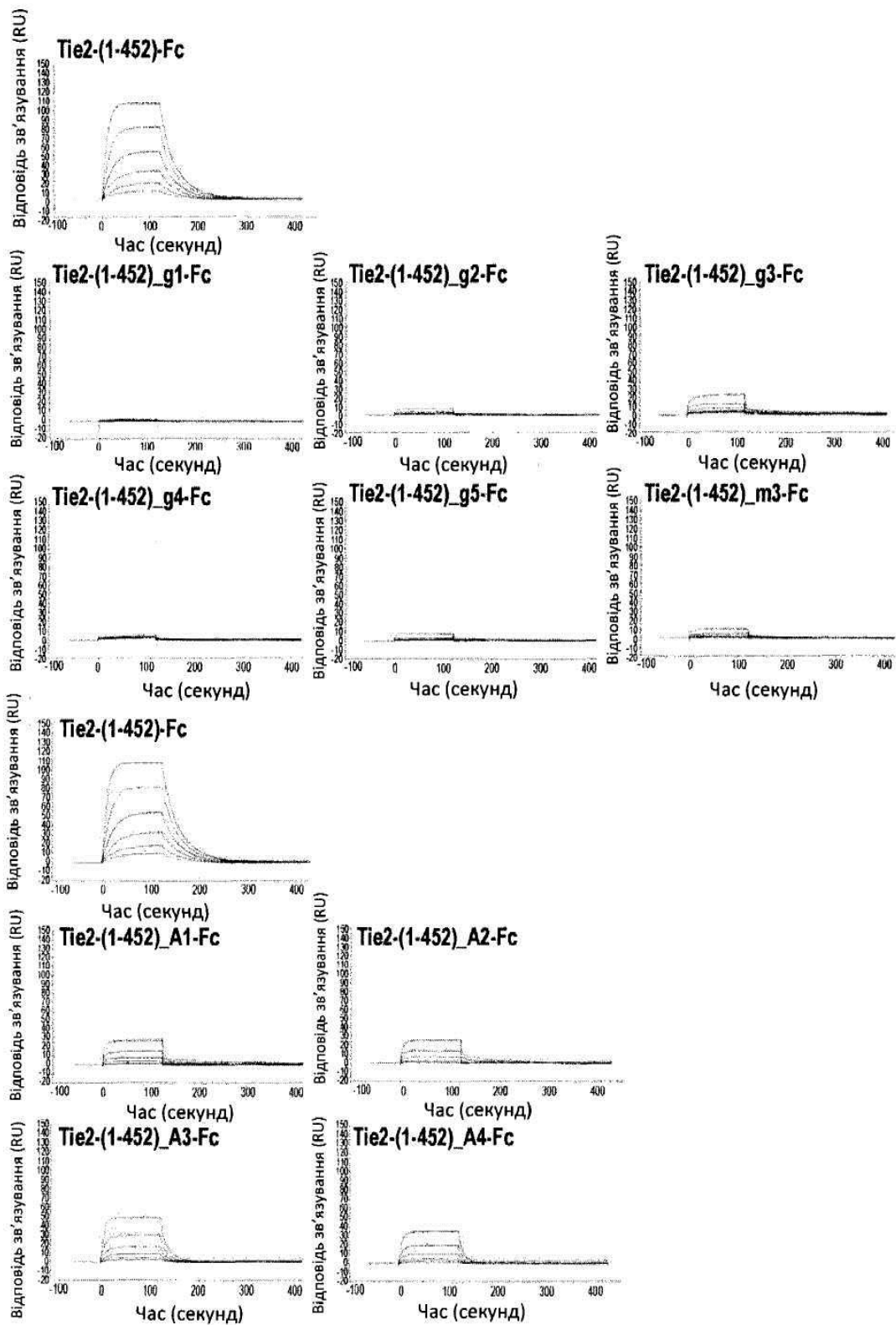


ФІГ. 4



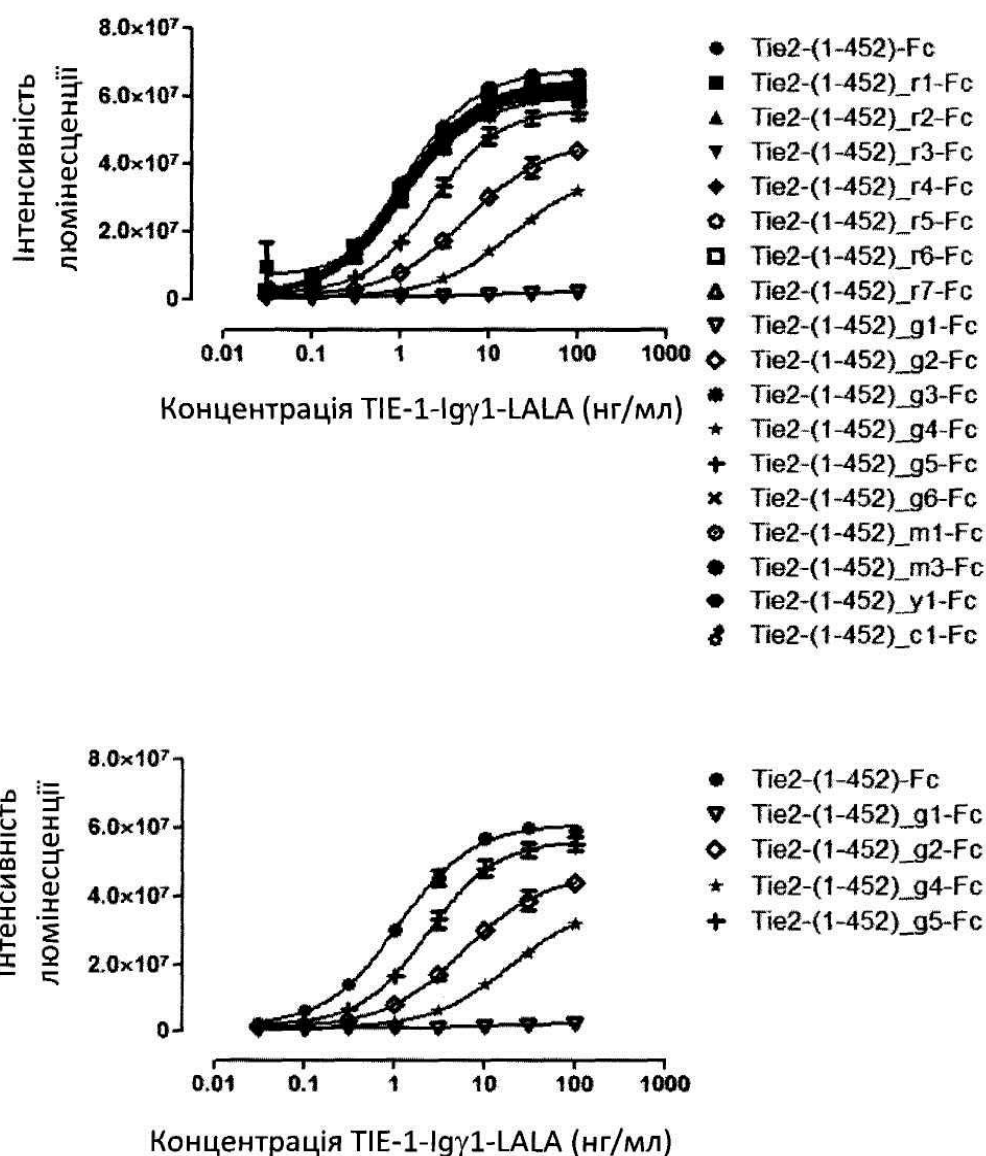


ФІГ. 5



ФІГ. 6





ФІГ. 7

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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