



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2344537 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 16/22 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.06.30
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.01.29
(86)	Europeisk søknadsnr	09736830.2
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.10.07
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.07.20
(30)	Prioritet	2008.10.08, EP, 08017607 2008.12.16, EP, 08021834
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
	Utpekte samarbeidende stater	RS
(73)	Innehaver	F. Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Sveits
(72)	Oppfinner	BAEHNER, Monika, Rotbuchenstr. 17, 81547 München, Tyskland BRINKMANN, Ulrich, Feichtlstr. 12, 82362 Weilheim, Tyskland GEORGES, Guy, Am Berggraben 11, 82392 Habach, Tyskland GRIEP, Remko Albert, Odalsveien 31B, 3470 Slemmestad Norge IMHOF-JUNG, Sabine, Egenhofenstrasse 26b, 82152 Planegg, Tyskland KAVLIE, Anita, Stromsborgveien 39H, 0287 Oslo Norge KETTENBERGER, Hubert, Passauer Strasse 30, 81369 Muenchen, Tyskland KLEIN, Christian, Chruezacherweg 41, 8906 Bonstetten, Sveits REGULA, Joerg, Thomas, Lierstrasse 15, 80639 München, Tyskland SCHAEFER, Wolfgang, Tannhaeuserring 190, 68199 Mannheim, Tyskland SCHANZER, Juergen Michael, Metzstr. 26, 81667 München, Tyskland SCHEUER, Werner, Primelstrasse 3, 82377 Penzberg, Tyskland SEEBER, Stefan, Mitterweg 2, 82404 Sindelsdorf, Tyskland THOMAS, Markus, Saalangerstr. 5, 82377 Penzberg, Tyskland
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Bispesifikke anti-VEGF/anti-ANG-2 antistoffer
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-2005/044853 WO-A-2006/031370 LU DAN ET AL: "A fully human recombinant IgG-like bispecific antibody to both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor for enhanced antitumor activity", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 280, no. 20, 20 May 2005 (2005-05-20) , pages 19665-19672, XP002516978, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M500815200 [retrieved on 2005-03-09] WO-A-2006/045049 , WO-A-2007/068895 ,WO-A2-03/030833 WO-A2-2007/089445 ,WO-A2-2008/077077,US-A1- 2006 280 747

COXON ANGELA ET AL: "Combined treatment of angiopoietin and VEGF pathway antagonists enhances antitumor activity in preclinical models of colon carcinoma" PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 49, April 2008 (2008-04), pages 262-263, XP002517789 & 99TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH; SAN DIEGO, CA, USA; APRIL 12 -16, 2008 ISSN: 0197-016X JENDREYKO N ET AL: "Simultaneous, phenotypic knockout of VEGF-R2 and Tie-2 with an intradiabody enhances antiangiogenic effects in vivo." KLINISCHE PÄDIATRIE 2006 MAY-JUN, vol. 218, no. 3, May 2006 (2006-05), pages 143-151, XP008102910 ISSN: 0300-8630 FISCHER NICOLAS ET AL: "Bispecific antibodies: Molecules that enable novel therapeutic strategies" PATHOBIOLOGY, KARGER, BASEL, CH, vol. 74, no. 1, 1 May 2007 (2007-05-01), pages 3-14, XP008102855 ISSN: 1015-2008 SCHAEFER W ET AL: "Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES,, vol. 108, no. 27, 5 July 2011 (2011-07-05) , pages 11187-11192, XP002654289, LU D ET AL: "Simultaneous blockade of both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor signaling pathways in cancer cells with a fully human recombinant bispecific antibody", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 279, no. 4, 23 January 2004 (2004-01-23), pages 2856-2865, XP002316541, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M310132200

Foreliggende oppfinnelse vedrører bispesifikke antistoffer mot human vaskulær endotelvekstfaktor (VEGF/VEGF-A) og mot humant angiopoietin-2 (ANG-2), fremgangsmåte for fremstilling av dem, farmasøytiske preparater inneholdende nevnte antistoffer, og anvendelse derav.

5

Bakgrunn for oppfinnelsen.

Angiogenese er implisert i patogenesen ved mange forskjellige lidelser som innbefatter faste tumorer, intraokulære neovaskulære syndromer, så som proliferativ retinopati eller aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD), revmatoid artritt og psoriasis (Folkman, J., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M., et al., Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; og Garner, A., Vascular diseases, in: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., og Klintworth, G. K. (eds.), 2. utg., Marcel Dekker, New York (1994), s. 1625-1710). I tilfelle av faste tumorer, tillater neovaskulariseringen tumorcellene å oppnå en vekstfordel og proliferativ autonomi sammenlignet med de normale cellene. Følgelig er det blitt observert en sammenheng mellom tettheten av mikrokår i tumorsnitt og pasient-overlevelse ved brystkreft, så vel som i forskjellige andre tumorer (Weidner, N., et al., N Engl J Med. 324 (1991) 1-8; Horak, E.R., et al., Lancet 340 (1992) 1120-1124; og Macchiarini, P., et al., Lancet 340 (1992) 145-146).

20

VEGF- og anti-VEGF-antistoffer.

Human vaskulær endotelvekstfaktor (VEGF/VEGF-A) (SEKV ID NR: 105) er beskrevet i for eksempel Leung, D.W., et al., Science 246 (1989) 1306-9; Keck, P.J., et al., Science 246 (1989) 1309-12 og Connolly, D.T., et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 20017-24. VEGF er involvert i reguleringen av normal og unormal angiogenese og neovaskularisering forbundet med tumorer og intraokulære lidelser (Ferrara, N., et al., Endocr. Rev. 18 (1997) 4-25; Berkman, R.A., et al., J. Clin. Invest. 91 (1993) 153-159; Brown, L.F., et al., Human Pathol. 26 (1995) 86-91; Brown, L.F., et al., Cancer Res. 53 (1993) 4727-4735; Mattern, J., et al., Brit. J. Cancer. 73 (1996) 931-934; og Dvorak, H., et al., Am. J. Pathol. 146 (1995) 1029-1039). VEGF er et homodimert glykoprotein som er blitt isolert fra forskjellige kilder. VEGF viser sterkt spesifikk mitogen aktivitet overfor endotelceller. VEGF har viktige regulatoriske funksjoner i dannelsen av nye blodkar under embryonisk vaskulogenese og i angiogenese i løpet av voksenlivet (Carmeliet, P., et al., Nature, 380 (1996) 435-439; Ferrara, N., et al., Nature, 380 (1996) 439-442; redegjort for i Ferrara og Davis-Smyth, Endocrine Rev., 18 (1997) 4-25. Betydningen av rollen som VEGF spiller er blitt demonstrert i studier som viser at inaktivering av ett enkelt VEGF-allel resulterer i embryonisk dødelighet på

35

grunn av manglende utvikling av vaskulaturen (Carmeliet, P., et al., Nature, 380 (1996) 435-439; Ferrara, N., et al., Nature, 380 (1996) 439-442. I tillegg har VEGF sterk kjemotiltrekkende aktivitet overfor monocytter, kan indusere plasminogenaktivatoren og plasminogenaktivator-hemmeren i endotelceller, og kan også indusere

5 mikrovaskulær permeabilitet. På grunn av sistnevnte aktivitet, refereres den noen ganger til som vaskulær permeabilitetsfaktor (VPF). Isoleringen av og egenskapene til VEGF er blitt redegjort for; se Ferrara, N., et al., J. Cellular Biochem., 47 (1991) 211-218, og Connolly, J. Cellular Biochem., 47 (1991) 219-223. Alternativ mRNA-spleising av ett enkelt VEGF-gen gir opphav til fem isoformer av VEGF.

10 Anti-VEGF-nøytraliserende antistoffer undertrykker veksten av mange forskjellige humane tumorcellelinjer i mus (Kim, I., et al., Nature 362 (1993) 841-844; Warren, S.R., et al., J. Clin. Invest. 95 (1995) 1789-1797; Borgstrom, P., et al., Cancer Res. 56 (1996) 4032-4039; og Melnyk, O., et al., Cancer Res. 56 (1996) 921-924). WO 94/10202, WO 98/45332, WO 2005/00900 og WO 00/35956 vedrører anti-

15 stoffer mot VEGF. Humanisert monoklonalt antistoff bevacizumab (solgt under handelsnavnet Avastin®) er et anti-VEGF-antistoff anvendt ved tumor-terapi WO 98/45331).

Ranibizumab (handelsnavn Lucentis®) er et monoklonalt antistoff-fragment avledet fra det samme murine stam-antistoff som bevacizumab (Avastin). Det er mye

20 mindre enn stam-molekylet og er blitt affinitetsmodnet for å gi en sterkere binding til VEGF-A (WO 98/45331). Det er et anti-angiogent middel som er blitt godkjent for å behandle den «våte» typen av aldersrelatert makuladegenerasjon (ARMD), en alminnelig form for aldersrelatert synstap. Et annet anti-VEGF-antistoff er for eksempel HuMab G6-31, beskrevet for eksempel i US 2007/0141065.

25 ANG-2- og anti-ANG-2-antistoffer.

Humant angiopoietin-2 (ANG-2) (alternativt forkortet til ANGPT2 eller ANG2) (SEKV ID NR: 106) er beskrevet i Maisonpierre, P.C., et al, Science 277 (1997) 55-60 og Cheung, A.H., et al., Genomics 48 (1998) 389-91. Angiopoietin-1 og -2 (ANG-1

30 (SEKV ID NR: 107) og ANG-2 (SEKV ID NR: 106)) ble oppdaget som ligander for Ties'ene, en familie av tyrosinkinaser som blir selektivt uttrykt inne i det vaskulære endotel. Yancopoulos, G.D., et al., Nature 407 (2000) 242-48. Det finnes nå fire sikre medlemmer av angiopoietin-familien. Angiopoietin-3 og -4 (Ang-3 og Ang-4) kan representere vidt forskjellige motstykker av det samme genlokus hos mus og

35 menneske. Kim, I., et al., FEBS Let, 443 (1999) 353-56; Kim, I., et al., J Biol Chem 274 (1999) 26523-28. ANG-1 og ANG-2 ble opprinnelig identifisert i vevskulturforsøk som henholdsvis agonist og antagonist (se, for ANG-1: Davis, S., et al., Cell 87 (1996)

1161-69; og for ANG-2: Maisonpierre, P.C., et al., *Science* 277 (1997) 55-60). Alle de kjente angiopoietinene binder seg primært til Tie2, og både Ang-1 og -2 binder til Tie2 med en affinitet på 3 nM (Kd). Maisonpierre, P.C., et al., *Science* 277 (1997) 55-60. Ang-1 ble vist å støtte EC-overlevelse og å fremme endotel-integritet, Davis, S., et al., *Cell* 87 (1996) 1161-69; Kwak, H.J., et al., *FEBS Lett* 448 (1999) 249-53; Suri, C., et al., *Science* 282 (1998) 468-71; Thurston, G., et al., *Science* 286 (1999) 251 1-14; Thurston, G., et al., *Nat. Med.* 6 (2000) 460-63, mens ANG-2 hadde motsatt effekt og fremmet destabilisering og tilbakedannelse av blodkar i fravær av overlevelsese-faktorene VEGF eller basisk fibroblast-vekstfaktor. Maisonpierre, P.C., et al., *Science* 277 (1997) 55-60. Imidlertid har mange studier av ANG-2-funksjon antydnet en mer kompleks situasjon. ANG-2 kan være en kompleks regulator av vaskulær remodellering som spiller en rolle både ved knoppskyting av kar og tilbakedannelse av kar. Noe som støtter slike roller for ANG-2, er at ekspresjonsanalyse avslører at ANG-2 hurtig blir induisert, sammen med VEGF, i tilfeller med angiogen knoppskyting hos voksne, mens ANG-2 blir induert i fravær av VEGF i tilfeller med vaskulær tilbakedannelse. Holash, J., et al., *Science* 284 (1999) 1994-98; Holash, J., et al., *Oncogene* 18 (1999) 5356-62. Overensstemmende med en kontekst-avhengig rolle, binder ANG-2 seg spesifikt til den samme endotel-spesifikke reseptor, Tie-2, som aktiveres av Ang-1, men har kontekst-avhengige effekter på dens aktivering. Maisonpierre, P.C., et al., *Science* 277 (1997) 55-60.

Analysen av angiogenese i kornea har vist at både ANG-1 og ANG-2 hadde like effekter og virket synergistisk med VEGF og fremmet vekst av nye blodkar. Asahara, T., et al., *Circ. Res.* 83 (1998) 233-40. Muligheten for at det var en dose-avhengig endotelrespons ble innsett på grunn av observasjonen av at ANG-2, *in vitro*, i høy konsentrasjon, også kan være pro-angiogen. Kim, I., et al., *Oncogene* 19 (2000) 4549-52. I høy konsentrasjon tjener ANG-2 som en apoptose-overlevelseseffektor for endotelceller under serumdeprivasjonsapoptose gjennom aktivering av Tie2 via PI-3 Kinase og Akt-banen. Kim, I., et al., *Oncogene* 19 (2000) 4549-52.

Andre *in vitro*-forsøk antydnet at under vedvarende eksponering kan effekten av ANG-2 progressivt skifte fra den til en antagonist til en agonist av Tie2, og på et senere tidspunkt kan det bidra direkte til vaskulær rørdannelse og stabilisering av nye kar. Teichert-Kuliszewska, K., et al., *Cardiovasc. Res.* 49 (2001) 659-70. Videre, hvis EC'er ble dyrket på fibrinogel ble aktivering av Tie2 med ANG-2 også observert, noe som kanskje antyder at virkningen av ANG-2 kunne være avhengig av differensieringstilstanden til EC. Teichert-Kuliszewska, K., et al., *Cardiovasc. Res.* 49 (2001) 659-70. I mikrovaskulær EC dyrket i en tredimensjonal kollagen gel, kan ANG-2 også induere Tie2-aktivering og fremme dannelse av kapillærlignende strukturer.

Mochizuki, Y., et al., *J. Cell. Sci.* 115 (2002) 175-83. Anvendelse av en 3-D sfæroidal ko-kultur som en in-vitro-modell av karmodning, viste at direkte kontakt mellom EC'er og mesenkymale celler motvirker evnen til å respondere på VEGF, mens nærværet av VEGF og ANG-2 induserte knoppskyting. Korff, T., et al., *Faseb J.* 15 (2001) 447-57.

5 Etoh, T.H. et al., viste at EC'er som konstitutivt uttrykker Tie2, ekspresjonen av MMP-1, -9 og u-PA, ble sterkt oppregulert av ANG-2 i nærvær av VEGF. Etoh, T., et al., *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53. Med en in vivo pupillmembranmodell viste Lobov, I.B. et al. at ANG-2 i nærvær av endogen VEGF fremmer en hurtig økning av kapillærdiameter, remodellering av basal-lamina, proliferasjon og migrasjon av endotelceller,

10 og stimulerer knoppskyting av nye blodkar. Lobov, I.B., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11205-10. I motsetning til dette fremmer ANG-2 endotelcelledød og tilbakedannelse av kar uten endogen VEGF. Lobov, I.B., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11205-10. Likeledes viste Vajkoczy, P., et al., med en in vivo tumormodell, at multicellulære aggregater igangsetter vaskulær vekst ved angiogen knoppskyting via den samtidige ekspresjonen av VEGFR-2 og ANG-2 av verts- og tumor-

15 endotel. Vajkoczy, P., et al., *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 777-85. Denne modellen illustrerte at den etablerte mikrovaskulaturen i voksende tumorer er kjennetegnet ved en kontinuerlig remodellering, formodentlig mediert av ekspresjonen av VEGF og ANG-2. Vajkoczy, P., et al., *J Clin. Invest.* 09 (2002) 777-85.

20 Knock-out-musestudier av Tie-2 og angiopoietin-1 viser lignende fenotyper og antyder at angiopoietin-1-stimulert Tie-2-fosforylering medierer remodellering og stabilisering av kar under utvikling, fremmer modning av blodkar under angiogenese og opprettholdelse av endotelcelle/støttecelleadhesjon (Dumont, J., et al., *Genes & Development*, 8 (1994) 1897-1909; Sato, T.N., *Nature*, 376 (1995) 70-74; (Thurston, G., et al., *Nature Medicine*: 6 (2000) 460-463). Rollen til angiopoietin-1 antas å være

25 bevart hos voksne, hvor det uttrykkes i vidt omfang og konstitutivt (Hanahan, D., *Science*, 277 (1997) 48-50; Zagzag, D., et al., *Exp Neurology*, 159:391-400 (1999)). I motsetning til dette er angiopoietin-2-ekspresjon primært begrenset til seter for vaskulær remodellering hvor det er antatt å blokkere den konstitutive stabiliserings-

30 eller modningsfunksjonen til angiopoietin-1, noe som tillater kar å falle tilbake til, og forbli i, en plastisk tilstand som kan være mer responderende overfor knoppskytingssignaler (Hanahan, D., 1997; Holash, J., et al., *Orzcogerze* 18 (199) 5356-62; Maisonpierre, P.C., 1997). Under studier av angiopoietin-2-ekspresjon ved patologisk angiogenese er det funnet at mange tumortyper viser vaskulær

35 angiopoietin-2-ekspresjon (Maisonpierre, P.C., et al., *Science* 277 (1997) 55-60). Funksjonelle studier antyder at angiopoietin-2 er involvert i tumor-angiogenese og forbinder angiopoietin-2-overekspresjon med økt tumorvekst i en xenotransplantat-

modell i mus (Ahmad, S.A., et al., *Cancer Res.*, 61 (2001) 1255-1259). Andre studier har forbundet angiopoietin-2-overekspresjon med tumor-hypervaskularitet (Etoh, T., et al., *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53; Tanaka, F., et al., *Cancer Res.* 62 (2002) 124-29).

5 I de senere år har angiopoietin-1, angiopoietin-2 og/eller Tie-2 blitt foreslått som mulige mål for anti-kreft-terapi. For eksempel beskriver US 6.166.185, US 5.650.490 og US 5.814.464 hver anti-Tie-2-ligand og reseptor-antistoffer. Studier som anvender løselig Tie-2 ble rapportert å redusere antallet av og størrelsen på tumorer hos gnagere (Lin, 1997; Lin 1998). Siemester, G., et al., Siemeister, G., et
10 al., *Cancer Res.* 59 (1999) 3185-91, frembragte humant melanom-cellelinjer som uttrykker det ekstracellulære domene av Tie-2, injiserte disse i nakenmus og rapporterte at løselig Tie-2 resulterte i signifikant hemming av tumorvekst og tumor-angiogenese. Gitt at både angiopoietin-1 og angiopoietin-2 binder til Tie-2, er det uklart ut fra disse studiene hvorvidt angiopoietin-1, angiopoietin-2 eller Tie-2 ville
15 være et attraktivt mål for anti-kreft-terapi. Imidlertid antas effektiv anti-angiopoietin-2-terapi å være fordelaktig ved behandling av sykdommer så som kreft, hvor progresjonen er avhengig av avvikende angiogenese hvor blokkering av prosessen kan føre til at sykdommens utvikling kan forhindres (Follunan, J., *Nature Medicine.* 1 (1995) 27-31).

20 I tillegg har noen grupper rapportert anvendelse av antistoffer og peptider som binder til angiopoietin-2. Se for eksempel US 6.166.185 og US 2003/10124129. WO 03/030833, WO 2006/068953, WO 03/057134 eller US 2006/0122370.

Studie av effekten av fokal ekspresjon av angiopoietin-2 har vist at antagonisering av angiopoietin-1/Tie-2-signalet løser den tette vaskulære strukturen, og
25 eksponerer derved EC'er for aktiverende signaler fra angiogenese-indusere, for eksempel VEGF (Hanahan, D., *Science*, 277 (1997) 48-50). Denne pro-angiogene effekten, som er et resultat av hemming av angiopoietin-1, indikerer at anti-angiopoietin-1-terapi ikke ville være en effektiv anti-kreftbehandling.

ANG-2 blir uttrykt under utvikling på seter hvor remodellering av blodkar
30 forekommer. Maisonpierre, P.C., et al., *Science* 277 (1997) 55-60. Hos voksne individer er ANG-2-ekspresjon begrenset til seter for vaskulær remodellering så vel som i sterkt vaskulariserte tumorer, innbefattende gliom, Osada, H., et al., *Int. J. Oncol.* 18 (2001) 305-09; Koga, K., et al., *Cancer Res.* 61 (2001) 6248-54, hepatocellulært karsinom, Tanaka, S., et al., *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 341-45,
35 gastrisk karsinom, Etoh, T., et al., *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53; Lee, J.H., et al., *Int. J. Oncol.* 18 (2001) 355-61, thyreoideatumor, Bunone, G., et al., *Am J Pathol* 155 (1999) 1967-76, ikke-småcellet lungekreft, Wong, M.P., et al., *Lung Cancer* 29 (2000)

11-22, og kreft i tykktarmen, Ahmad, S.A., et al., Cancer 92 (2001) 1138-43, og prostata, Wurmbach, J.H., et al., Anticancer Res. 20 (2000) 5217-20. Noen tumorceller er funnet å uttrykke ANG-2. For eksempel påviste Tanaka, S., et al., J. Clin. Invest. 103 (1999) 341-45 ANG-2-mRNA i 10 av 12 prøver av humant

5 hepatocellulært karsinom (HCC). Ellis gruppe rapporterte at ANG-2 blir uttrykt ubikvitært i tumorepitel. Ahmad, S.A., et al., Cancer 92 (2001) 1138-43. Andre forskere rapporterte om lignende funn. Chen, L., et al., J. Tongji Med. Univ. 21 (2001) 228-35. Ved å påvise ANG-2-mRNA-nivåer i arkiverte prøver av human brystkreft, rapporterte Sfiligoi, C., et al., Int. J. Cancer 103 (2003) 466-74, at ANG-2-mRNA

10 signifikant er forbundet med auksiliær innvekst i lymfeknutene, kort sykdomsfri tid og dårlig overlevelse generelt. Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-29 gjennomgikk totalt 236 pasienter med ikke-småcellet lungekreft (NSCLC) med henholdsvis patologisk trinn -I til -IIIA. Ved anvendelse av immunhistokjemi fant de at 16,9% av NSCLC-pasientene var ANG-2-positive. Mikrokar-tettheten for ANG-2-positiv

15 tumor er signifikant høyere enn den til ANG-2-negative. En slik angiogen effekt av ANG-2 ble kun sett når VEGF-ekspresjonen var høy. Videre var positiv ekspresjon av ANG-2 en signifikant faktor for å forutsi dårlig postoperativ overlevelse. Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-29. Imidlertid fant de ingen signifikant sammenheng mellom Ang-1-ekspresjon og mikrokar-tettheten. Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62

20 (2002) 7124-29. Disse resultatene antyder at ANG-2 er en indikator på dårlig prognose for pasienter med forskjellige typer av kreft.

Nylig rapporterte Yancopoulos' gruppe, ved anvendelse av en ANG-2 knockout-musemodell, at ANG-2 kreves for postnatal angiogenese. Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23. De viste at den utviklingsmessig programmerte tilbakedannelsen av

25 den hyaloide vaskulaturen i øyet ikke forekommer hos ANG-2 knockout-mus, og deres retinablodkar knoppskyter ikke ut fra den sentrale retina-arterien. Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23. De fant også at delesjon av ANG-2 resulterer i konstitutive defekter i mønsterdannelsen og funksjonen av den lymfatiske vaskulaturen. Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (200) 411-23. Genetisk redning med Ang-1 korrigerer de

30 lymfatiske, men ikke angiogenese-defektene. Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23.

Peters og hans kolleger rapporterte at løselig Tie2, når levert enten som rekombinant protein eller i en virus ekspresjonsvektor, hemmet vekst in vivo av murint brystkarsinom og melanom i muse-modeller. Lin, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 8829-34; Lin, P., et al., J. Clin. Invest. 100 (1997) 2072-78.

35 Vaskulær tetthet i tumorvev behandlet på denne måten ble i stor grad redusert. I tillegg blokkerte løselig Tie2 angiogenese i kornea hos rotter stimulert av tumorcelle-

kondisjonerte medier. Lin, P., et al., J. Clin. Invest. 100 (1997) 2072-78. Videre viste Isner og hans team at tilsetning av ANG-2 til VEGF fremmet signifikant lengre og mer perifer neovaskularisering enn VEGF alene. Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40. Overskudd av løselig Tie2-reseptor utelukket modulering av VEGF-indusert

5 neovaskularisering med ANG-2. Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40. Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59 (1999) 3185-91, viste med naken-mus-xenotransplantater at overekspresjon av de ekstracellulære ligand-bindingsdomenene til enten Flt-1 eller Tie2 i xenotransplantatene resulterer i signifikant hemming av

10 bane kunne ikke kompenseres for av den andre, noe som antyder at VEGF-reseptorbanen og Tie2-banen bør betraktes som to uavhengige mediatorer som er vesentlige for prosessen med angiogenese in vivo. Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59:3 (1999) 3185-91. Dette er bevist av en nyere publikasjon av White, R., R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 5028-33. I deres studie ble det vist at en nuklease-resistent RNA-aptamer som spesifikt binder og hemmer ANG-2, signifikant

15 hemmet neovaskularisering induert av bFGF i kornea-mikrolokulament-angiogenese-modell i rotte.

Bispesifikke antistoffer.

Mange forskjellige rekombinante antistoff-formater har blitt utviklet i den

20 senere tid, for eksempel tetravalente bispesifikke antistoffer ved fusjon av for eksempel et IgG-antistoff-format og enkeltkjededomener (se for eksempel Coloma, M.J., et al., Nature Biotech 15 (1997) 159-163; WO 2001/077342; og Morrison, S.L., Nature Biotech 25 (2007) 1233-1234).

Også flere andre nye formater hvor antistoff-kjernestrukturen (IgA, IgD, IgE, IgG eller IgM) ikke lenger er beholdt, så som dia-, tria- eller tetrabodies, minibodies, forskjellige enkeltkjedeformater (scFv, Bis-scFv), som er i stand til å binde to eller flere antigener, har blitt utviklet (Holliger, P., et al., Nature Biotech 23 (2005) 1126-1136; Fischer, N., Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14; Shen, J., et al., Journal of Immunological Methods 318 (2007) 65-74; Wu, C., et al., Nature Biotech. 25 (2007)

30 1290-1297).

Alle slike formater anvender bindingsdeler, enten til å fusjonere antistoff-kjernen (IgA, IgD, IgE, IgG eller IgM) til et ytterligere bindingsprotein (for eksempel scFv), eller til å fusjonere for eksempel to Fab-fragmenter eller scFv'er (Fischer, N., Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14). Det må holdes i minne at et kan være

35 ønskelig å beholde effektorfunksjoner, så som for eksempel komplement-avhengig cytotoxicitet (CDC) eller antistoff-avhengig cellulær cytotoxicitet (ADCC), som

medieres gjennom Fc-reseptorbindingen, ved å opprettholde en høy grad av likhet med naturlig forekommende antistoffer.

I WO 2007/024715 er det rapportert om immunglobuliner med dobbelt variable domener som konstruerte multivalente og multispesifikke bindingsproteiner. En fremgangsmåte for fremstilling av biologisk aktive antistoff-dimerer er rapportert i US 6.897.044. En multivalent F_v-antistoff-konstruksjon som har minst fire variable domener som er bundet med hverandre via peptidbindingsdeler er rapportert i US 7.129.330. Dimere og multimere antigenbindende strukturer er rapportert i US 2005/0079170. Tri- eller tetravalent monospesifikt antigenbindende protein som omfatter tre eller fire Fab-fragmenter bundet kovalent til hverandre med en bindingsstruktur, idet dette proteinet ikke er et naturlig immunoglobulin, er rapportert i US 6.511.663. I WO 2006/020258 er det rapportert om tetravalente bispesifikke antistoffer som effektivt kan uttrykkes i prokaryote og eukaryote celler, og er nyttige ved terapeutiske og diagnostiske metoder. En metode for å skille eller fortrinnsvis syntetisere dimerer som er bundet via minst én intrakjede-disulfidbinding fra dimerer som ikke er bundet via minst én intrakjede-disulfidbinding fra en blanding som omfatter de to typene av polypeptid-dimerer, er rapportert i US 2005/0163782. Bispesifikke tetravalente reseptorer er rapportert i US 5.959.083. Konstruerte antistoffer med tre eller flere funksjonelle antigenbindings seter er rapportert i WO 2001/077342.

Multispesifikke og multivalente antigenbindende polypeptider er rapportert i WO 1997/001580. WO 1992/004053 rapporterer om at homokonjugater, typisk fremstilt fra monoklonale antistoffer av IgG-klassen som binder til den samme antigendeterminanten er kovalent bundet ved syntetisk kryssbinding. Oligomere monoklonale antistoffer med sterk aviditet til antigen er rapportert i WO 1991/06305, hvorved oligomerene, typisk av IgG-klassen, blir utskilt og har to eller flere immunglobulinmonomerer bundet sammen og danner tetravalente eller heksavalente IgG-molekyler. Saue-avledede antistoffer og konstruerte antistoff-konstruksjoner er rapportert i US 6.350.860, som kan anvendes til å behandle sykdommer hvor interferongamma-aktiviteten er patogen. I US 2005/0100543 er det rapportert om målsøkbare konstruksjoner som er multivalente bærere av bispesifikke antistoffer, det vil si at hvert molekyl av en målsøkbar konstruksjon kan tjene som en bærer av to eller flere bispesifikke antistoffer. Genetisk konstruerte bispesifikke tetravalente antistoffer er rapportert i WO 1995/009917. I WO 2007/109254 er det rapportert om stabiliserte bindingsmolekyler som består av eller omfatter et stabilisert scFv.

Kombinasjon av VEGF og ANG-2-hemmere.

WO 2007/068895 angår en kombinasjon av en ANG-2-antagonist og en VEGF-, KDR- og/eller FLT-antagonister. WO 2007/089445 angår ANG-2 og VEGF-hemmer-kombinasjoner.

5 WO 2003/106501 angår fusjonsproteiner som binder til angiopoietin og inneholder et multimerisasjonsdomene. WO 2008/132568 fusjonsproteiner som binder til angiopoietin og VEGF.

Jendreyko et al. (Klinische Pädiatrie, bind 218 (2006) 143-151) beskriver et bispesifikt enkeltkjede-Fv-antistoff mot VEGF-R2 og Tie-2, reseptoren for angiopoietin-
10 2.

Oppsummering av oppfinnelsen.

Et første aspekt ved foreliggende oppfinnelse er et bispesifikt antistoff som definert i kravene som spesifikt binder til human vaskulær endotelvekstfaktor (VEGF)
15 og humant angiopoietin-2 (ANG-2), som omfatter et første antigenbindingssete som spesifikt binder til human VEGF og et andre antigenbindingssete som spesifikt binder til humant ANG-2.

Det bispesifikke antistoffet i henhold til oppfinnelsen er kjennetegnet ved at:

- ii) nevnte første antigenbindingssete som spesifikt binder til VEGF i tung
20 kjede variabelt domenet omfatter en CDR3-region med SEKV ID NR: 1, en CDR2-region med SEKV ID NR: 2 og en CDR1-region med SEKV ID NR:3, og i lett kjede variabelt domenet en CDR3-region med SEKV ID NR: 4, en CDR2-region med SEKV ID NR:5 og en CDR1-region med SEKV ID NR:6; og
- iii) nevnte andre antigenbindingssete som spesifikt binder til ANG-2 i tung
25 kjede variabelt domenet omfatter en CDR3-region med SEKV ID NR: 46, en CDR2-region med SEKV ID NR: 47 og en CDR1-region med SEKV ID NR: 48, og i lett kjede variabelt domenet en CDR3-region med SEKV ID NR: 49, en CDR2-region med SEKV ID NR: 50 og en CDR1-region med SEKV ID NR: 51.

30 Det bispesifikke antistoffet i henhold til oppfinnelsen er bivalent.

Et ytterligere aspekt ved oppfinnelsen er et nukleinsyremolekyl som koder for en kjede av nevnte bispesifikke antistoff.

Oppfinnelsen tilveiebringer videre ekspresjonsvektorer inneholdende nevnte nukleinsyre i henhold til oppfinnelsen som er i stand til å uttrykke nevnte nukleinsyre i
35 en prokaryot eller eukaryot vertscelle, og vertsceller inneholdende slike vektorer for rekombinant fremstilling av et antistoff i henhold til oppfinnelsen.

Oppfinnelsen omfatter videre en prokaryot eller eukaryot vertscelle som omfatter en vektor i henhold til oppfinnelsen.

Oppfinnelsen omfatter videre en metode for fremstilling av et bispesifikt antistoff i henhold til oppfinnelsen, kjennetegnet ved ekspresjon av en nukleinsyre i
 5 henhold til oppfinnelsen i en prokaryot eller eukaryot vertscelle og gjenvinning av nevnte bispesifikke antistoff fra nevnte celle eller cellkultursupernatant. Oppfinnelsen omfatter videre antistoffet oppnådd ved en slik rekombinant metode.

Enda ytterligere aspekter ved oppfinnelsen er et farmasøytisk preparat som omfatter nevnte bispesifikke antistoff, nevnte preparat for behandling av kreft,
 10 anvendelse av nevnte bispesifikke antistoff for fremstilling av et medikament for behandling av kreft, en metode for behandling av en pasient som lider av kreft ved å administrere nevnte bispesifikke antistoff til en pasient med behov for slik behandling.

De bispesifikke antistoffene i henhold til oppfinnelsen viser fordeler for humane pasienter med behov for en VEGF- og ANG-2-målsøkende terapi. Antistoffene i
 15 henhold til oppfinnelsen har nye og oppfinneriske egenskaper som gir en fordel for en pasient som lider av en slik sykdom, spesielt en som lider av kreft. Det er overraskende blitt funnet at de bispesifikke antistoffene i henhold til oppfinnelsen er mer effektive ved tumorvekst og/eller hemming av tumor-angiogenese, sammenlignet med en kombinasjon av de respektive monospesifikke stam-antistoffene.

20

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen.

Oppfinnelsen tilveiebringer et bispesifikt antistoff som definert i kravene, som spesifikt binder til human VEGF og humant ANG-2, som omfatter et første antigenbindingssete som spesifikt binder til human VEGF og et andre antigen-
 25 bindingssete som spesifikt binder til humant ANG-2, kjennetegnet ved at:

i) nevnte antigenbindingsseter er hvert et par av et antistoff tung kjede variabelt domene og et antistoff lett kjede variabelt domene;

ii) nevnte første antigenbindingssete som spesifikt binder til VEGF omfatter, i tung kjede variabelt domenet, en CDR3-region med SEKV ID NR: 1, en
 30 CDR2-region med SEKV ID NR: 2 og en CDR1-region med SEKV ID NR:3, og i lett kjede variabelt domenet en CDR3-region med SEKV ID NR: 4, en CDR2-region med SEKV ID NR:5 og en CDR1-region med SEKV ID NR:6; og

iii) nevnte andre antigenbindingssete som spesifikt binder til ANG-2 omfatter, i tung kjede variabelt domenet, en CDR3-region med SEKV ID NR: 46, en CDR2-region
 35 med SEKV ID NR: 47 og en CDR1-region med SEKV ID NR: 48, og i lett kjede variabelt domenet en CDR3-region med SEKV ID NR: 49, en CDR2-region med SEKV ID NR: 50 og en CDR1-region med SEKV ID NR: 51.

Stam-antistoffet, Ang2i_LC06, binder seg spesifikt til humant ANG-2, men ikke til humant ANG-1.

Bispesifikke antistoffer som spesifikt binder til human vaskulær endotelvekstfaktor (VEGF) og humant angiopoietin-2 (ANG-2), men ikke til humant ANG-1, kan ha forbedrede egenskaper, så som for eksempel biologisk eller farmakologisk aktivitet, mindre toksisitet, eller farmakokinetisk profil, sammenlignet med bispesifikke antistoffer som spesifikt binder til human vaskulær endotelvekstfaktor (VEGF) og humant angiopoietin-2 (ANG-2) så vel som til humant ANG-1.

Således er en foretrukket utførelsesform et bispesifikt antistoff som spesifikt binder til human VEGF og humant ANG-2 som omfatter et første antigenbindingssete som spesifikt binder til human VEGF og et andre antigenbindingssete som spesifikt binder til humant ANG-2, kjennetegnet ved at det andre antigenbindingssetet som ikke spesifikt binder til humant angiopoietin 1 (ANG-1).

En utførelsesform av oppfinnelsen er et bispesifikt antistoff som spesifikt binder til human vaskulær endotelvekstfaktor (VEGF) og humant angiopoietin-2 (ANG-2) som omfatter et første antigenbindingssete som spesifikt binder til human VEGF og et andre antigenbindingssete som spesifikt binder til humant ANG-2, kjennetegnet ved at forholdet bindingsaffiniteten KD (antigenbindingssete spesifikt for VEGF) / KD (antigenbindingssete spesifikt for ANG-2) er 1,0 : 10,0, fortrinnsvis 1,5 : 8,0 (i én utførelsesform 5,0 : 8,0), og fortrinnsvis er den absolutte KD-verdien i området 10^{-8} - 10^{-13} mol/l. KD-verdiene blir bestemt med et ANG-2/VEGF-bindings-BIACORE (se eksempel 2 og fig. 15A). Siden begge proteiner human VEGF og humant ANG-2 begge er til stede som løselige reseptorligander i humant serum i tilnærmet samme konsentrasjon, kan blokkering av begge de nevnte reseptorligander med et bispesifikt kjennetegnet ved at forholdet bindingsaffiniteten KD (antigenbindingssete spesifikt for VEGF) / KD (antigenbindingssete spesifikt for ANG-2) er 1,0 : 10,0, fortrinnsvis 1,5 : 8,0, og i én utførelsesform 5,0 : 8,0, føre til forbedrede egenskaper med hensyn til de anti-angiogene effektene, hemming av tumorvekst eller resistensmekanisme under behandling av kreft eller vaskulære sykdommer med et slikt bispesifikt antistoff. Fortrinnsvis er nevnte bispesifikke antistoff kjennetegnet ved at forholdet bindingsaffinitet KD (antigenbindingssete spesifikt for VEGF) / KD (antigenbindingssete spesifikt for ANG-2) er 1,0 : 10,0, fortrinnsvis 1,5 : 8,0 (i én utførelsesform 5,0 : 8,0) og nevnte bispesifikke antistoff omfatter som første antigenbindingssete som spesifikt binder til VEGF, et tung kjede variabelt domene med SEKV ID NR: 7 og et lett kjede variabelt domene med SEKV ID NR: 8, og omfatter som nevnte andre antigen-

bindingssete som spesifikt binder til ANG-2 a) enten et tung kjede variabelt domene med SEKV ID NR: 52 og et lett kjede variabelt domene med SEKV ID NR: 53, eller b) et tung kjede variabelt domene med SEKV ID NR: 84 og et lett kjede variabelt domene med SEKV ID NR: 85.

5 Som anvendt her, refererer "antistoff" til et bindingsprotein som omfatter antigenbindingsseter. Betegnelsene "bindingssete" eller "antigenbindingssete", som anvendt her, betyr regionen(e) av et antistoffmolekyl som en ligand faktisk binder til. Betegnelsen "antigenbindingssete" innbefatter antistoff tung kjede variable domener (VH) og/eller et antistoff lett kjede variable domener (VL), eller par av VH/VL, og kan
10 avledes fra hele antistoffer eller antistoff-fragmenter, så som enkeltkjede-Fv, et VH-domene og/eller et VL-domene, Fab eller (Fab)₂. I én utførelsesform av foreliggende oppfinnelse, omfatter hvert av antigenbindingssettene et antistoff tung kjede variabelt domene (VH) og/eller et antistoff lett kjede variabelt domene (VL), og er fortrinnsvis dannet av et par som består av et antistoff lett kjede variabelt domene (VL) og et
15 antistoff tung kjede variabelt domene (VH).

Antigenbindingssettet, og spesielt tung kjede variable domener (VH) og/eller antistoff lett kjede variable domener (VL), som spesifikt binder til human vaskulær endotelvekstfaktor (VEGF), kan avledes a) fra kjente anti-VEGF-antistoffer, så som Kim et al., Nature 362 (1993) 841-844; Warren, R.S., et al., J. Clin. Invest. 95 (1995)
20 1789-1797; Borgstrom, P., et al., Cancer Res. 56 (1996) 4032-4039; Melnyk, O., et al., Cancer Res. 56 (1996) 921-924). WO 94/10202, WO 98/45332, WO 2005/00900, WO 00/35956 og US 2007/0141065, eller b) fra nye anti-VEGF-antistoffer oppnådd ved de novo-immuniseringsmetoder ved anvendelse av blant annet enten det humane VEGF-protein eller -nukleinsyre eller fragmenter derav, eller ved fag-display.

25 Antigenbindingssettet, og spesielt tung kjede variable domener (VH) og/eller antistoff lett kjede variable domener (VL), som spesifikt binder til humant angiopoietin-2 (ANG-2), kan avledes a) fra kjente anti-ANG-2-antistoffer, så som WO 03/030833, WO 2006/068953, WO 2006/045049 eller US 6.166.185; eller b) fra nye anti-ANG-2-antistoffer oppnådd for eksempel ved de novo-immuniseringsmetoder ved
30 anvendelse blant annet enten av det humane ANG-2-protein- eller -nukleinsyre eller fragmenter derav, eller ved fag-display.

Antistoff-spesifisitet refererer til selektiv gjenkjennelse hos antistoffet av en viss epitop av et antigen. Naturlige antistoffer, for eksempel, er monospesifikke.

"Bispesifikke antistoffer" i henhold til oppfinnelsen, er antistoffer som har to
35 forskjellige antigenbindings-spesifisiteter. Når et antistoff har mer enn én spesifisitet, kan de gjenkjente epitopene forbindes med ett enkelt antigen eller med mer enn ett

antigen. Antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse er spesifikke for to forskjellige antigener, det vil si VEGF som første antigen og ANG-2 som andre antigen.

Betegnelsen "monospesifikt" antistoff, som anvendt her, refererer til et antistoff som har ett eller flere bindingssteder, idet hvert av disse binder til den samme epitopen på det samme antigenet. Betegnelsen "valent", som anvendt i foreliggende søknad, betyr nærvær av et spesifisert antall bindingssteder i et antistoffmolekyl. Som sådan betyr betegnelsene "bivalent", "tetravalent" og "heksavalent" nærvær av henholdsvis to bindingssteder, fire bindingssteder og seks bindingssteder, på et antistoffmolekyl. De bispesifikke antistoffene i henhold til oppfinnelsen er minst "bivalent", og kan være "trivalent" eller "multivalent" (for eksempel «tetravalent» eller "heksavalent"). Det bispesifikke antistoffet i henhold til oppfinnelsen er bivalent.

Human vaskulær endotelvekstfaktor (VEGF/VEGF-A) (SEKV ID NR: 105) er beskrevet i for eksempel Leung, D.W., et al., Science 246 (1989) 1306-9; Keck, P.J., et al., Science 246 (1989) 1309-12 og Connolly, D.T., et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 20017-24. VEGF er involvert i reguleringen av normal og unormal angiogenese og neovaskularisering forbundet med tumorer og intraokulære lidelser (Ferrara, N., et al., Endocr. Rev. 18 (1997) 4-25; Berkman, R.A., et al., J. Clin. Invest. 91 (1993) 153-159; Brown, L.F., et al., Human Pathol. 26 (1995) 86-91; Brown, L.F., et al., Cancer Res. 53 (1993) 4727-4735; Mattern, J., et al., Brit. J. Cancer. 73 (1996) 931-934; og Dvorak, H., et al., Am. J. Pathol. 146 (1995) 1029-1039). VEGF er et homodimert glykoprotein som er blitt isolert fra forskjellige kilder. VEGF viser sterkt spesifikk mitogen aktivitet overfor endotelceller.

Humant angiopoietin-2 (ANG-2) (alternativt forkortet til ANGPT2 eller ANG2) (SEKV ID NR: 106) er beskrevet i Maisonpierre, P.C., et al, Science 277 (1997) 55-60 og Cheung, A.H., et al., Genomics 48 (1998) 389-91. Angiopoietinene-1 og -2 (ANG-1 (SEKV ID NR: 107) og ANG-2 (SEKV ID NR: 106)) ble oppdaget som ligander for Ties'ene, en familie av tyrosinkinaser som blir selektivt uttrykt i det vaskulære endotel. Yancopoulos, G.D., et al., Nature 407 (2000) 242-48. Det er nå fire sikre medlemmer av angiopoietin-familien. Angiopoietin-3 og -4 (Ang-3 og Ang-4) kan representere vidt forskjellige motstykker av det samme genlokus hos mus og menneske. Kim, I., et al., FEBS Lett, 443 (1999) 353-56; Kim, I., et al., J Biol Chem 274 (1999) 26523-28. ANG-1 og ANG-2 ble opprinnelig identifisert i vevskulturforsøk som henholdsvis agonist og antagonist (se, for ANG-1: Davis, S., et al., Cell 87 (1996) 1161-69; og for ANG-2: Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60). Alle de kjente angiopoietinene binder seg primært til Tie2, og både Ang-1 og -2 binder til Tie2 med en affinitet på 3 nM (Kd). Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60.

Et antigenbindingssete på et antistoff ifølge oppfinnelsen inneholder seks komplementaritetsbestemmende regioner (CDR'er) som i varierende grad bidrar til bindingssetets affinitet til antigen. Det finnes tre tung kjede variabelt domene-CDR'er (CDRH1, CDRH2 og CDRH3) og tre lett kjede variabelt domene-CDR'er (CDRL1, CDRL2 og CDRL3). Omfanget av CDR og rammeverkregioner (FR'er) bestemmes ved sammenligning med en kompilert database over aminosyresekvenser, i hvilke disse regionene er blitt definert i henhold til variabilitet i sekvensene.

I visse utførelsesformer omfatter antistoffer ifølge oppfinnelsen videre konstante immunglobulin-regioner av én eller flere immunglobulinklasser. Immunglobulinklasser innbefatter IgG, IgM, IgA, IgD og IgE-isotyper og, i tilfelle av IgG og IgA, deres subtyper.

Betegnelsene "monoklonalt antistoff" eller "monoklonalt antistoff-sammensetning som anvendt her, refererer til et preparat av antistoffmolekyler av en enkelt aminosyre-sammensetning.

Betegnelsen "kimært antistoff" refererer til et antistoff som omfatter en variabel region, det vil si bindingsregion, fra én kilde eller art, og minst en del av en konstant region avledet fra en annen kilde eller art, vanligvis fremstilt ved rekombinant DNA-teknikk. Kimære antistoffer som omfatter en murin variabel region og en human konstant region er foretrukket. Andre foretrukne former for "kimære antistoffer" omfattet av foreliggende oppfinnelse, er slike hvor den konstante regionen er blitt modifisert eller endret fra den til det opprinnelige antistoffet for å frembringe egenskapene i henhold til oppfinnelsen, særlig med hensyn til Clq-binding og/eller Fc-receptor- (FcR) binding. Slike kimære antistoffer er også referert til som "klassebyttede antistoffer". Kimære antistoffer er produktet av uttrykte immunglobulingener omfattende DNA-segmenter som koder for variable immunglobulin-regioner og DNA-segmenter som koder for konstante immunglobulin-regioner. Metoder for fremstilling av kimære antistoffer innebærer konvensjonelt rekombinant DNA og gen-transfeksjonsteknikker er vel kjent på fagområdet. Se for eksempel Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5.202.238 og US 5.204.244.

Betegnelsen "humanisert antistoff" refererer til antistoffer hvor rammeverket eller "komplementaritetsbestemmende regioner" (CDR) har blitt modifisert for å omfatte CDR av et immunglobulin med annen spesifisitet sammenlignet med den til stam-immunglobulinet. I en foretrukket utførelsesform blir en murin CDR transplantert til rammeverkregionen av et humant antistoff for å fremstille det "humaniserte antistoff." Se for eksempel Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; og Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270. Spesielt foretrukne CDR'er tilsvarer slike som representerer sekvenser som gjenkjenner antigenene nevnt ovenfor

for kimære antistoffer. Andre former for "humaniserte antistoffer" omfattet av foreliggende oppfinnelse, er slike hvor den konstante regionen er blitt ytterligere modifisert eller endret fra den til det opprinnelige antistoffet for å frembringe egenskapene i henhold til oppfinnelsen, spesielt med hensyn til Clq-binding og/eller Fc-reseptor- (FcR) binding.

Betegnelsen "humant antistoff", som anvendt her, er ment å innbefatte antistoffer som har variable og konstante regioner avledet fra immunglobulin-sekvenser med human kimlinje. Humane antistoffer er vel kjent på fagområdet (van Dijk, M.A., og van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Humane antistoffer kan også produseres i transgene dyr (for eksempel mus) som, etter immunisering, er i stand til å produsere et fullt repertoar eller et utvalg av humane antistoffer i fravær av endogen immunglobulinproduksjon. Overføring av immunglobulingen-serien med human kimlinje i slike kimlinje-mutante mus, vil resultere i produksjon av humane antistoffer ved antigen-utfordring (se for eksempel Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40). Humane antistoffer kan også produseres i fag-display-bibliotek (Hoogenboom, H.R., og Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). Teknikken til Cole, A., et al. og Boerner, P., et al., er også tilgjengelig for fremstilling av humane monoklonale antistoffer (Cole, A., et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Liss, A.L., s. 77 (1985); og Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Som allerede nevnt for kimære og humaniserte antistoffer i henhold til oppfinnelsen, omfatter betegnelsen "humant antistoff", som anvendt her, også slike antistoffer som er modifisert i den konstante region for å frembringe egenskapene i henhold til oppfinnelsen, spesielt med hensyn til Clq-binding og/eller FcR-binding, for eksempel ved "klasse-bytting", det vil si endring eller mutasjon av Fc-deler (for eksempel fra IgG 1 til IgG4 og/eller IgG1/IgG4-mutasjon).

Betegnelsen "rekombinant humant antistoff", som anvendt her, er ment å innbefatte alle humane antistoffer som blir fremstilt, uttrykt, skapt eller isolert på rekombinant måte, så som antistoffer isolert fra en vertscelle, så som en NS0- eller CHO-celle eller fra et dyr (for eksempel en mus) som er transgent for humane immunglobulingener eller antistoffer uttrykt ved anvendelse av en rekombinant ekspresjonsvektor transfektert inn i en en vertscelle. Slike rekombinante humane antistoffer har variable og konstante regioner i omgrupperte former. De rekombinante humane antistoffene i henhold til oppfinnelsen er blitt utsatt for somatisk hypermutasjon in vivo. Således er aminosyresekvensene i VH- og VL-regionene på de rekombinante antistoffene sekvenser som, selv om de er avledet fra og beslektet med VH- og

VL-sekvenser med human kimlinje, ikke nødvendigvis kan eksistere naturlig i det humane antistoff-kimlinje-repertoaret in vivo.

Det "variable domene" (variabelt domene på en lett kjede (VL), variabel region på en tung kjede (VH), som anvendt her, betyr hvert av parene av lette og tunge kjeder som er direkte involvert i bindingen av antistoffet til antigenet. Domenene på variable humane lette og tunge kjeder har den samme generelle struktur, og hvert domene omfatter fire rammeverk- (FR) regioner hvis sekvenser er vidt konserverte, forbundet med tre "hypervariable regioner" (eller komplementaritetsbestemmende regioner, CDR'er). Rammeverkregionene inntar en β -flak-form og CDR'ene kan danne sløyfer som forbinder β -flak-strukturen. CDR'ene i hver kjede holdes i sin tredimensjonale struktur av rammeverkregionene og danner, sammen med CDR'ene fra den andre kjeden, antigenbindingssetet. Antistoff tung og lett kjede CDR3-regionene spiller en særlig viktig rolle i bindingsspesifisiteten/affiniteten til antistoffene i henhold til oppfinnelsen, og tilveiebringer derfor et ytterligere formål ifølge oppfinnelsen.

Betegnelsene "hypervariable region" eller "antigenbindende del av et antistoff", når anvendt her, vedrører aminosyrerestene av et antistoff som er ansvarlig for antigenbinding. Den hypervariable regionen omfatter aminosyrerester fra de "komplementaritetsbestemmende regionene" eller "CDR'ene". "Rammeverk"- eller "FR"-regioner er de variabelt domene-regionene forskjellig fra de hypervariable region-restene som definert her. Derfor omfatter de lette og tunge kjedene på et antistoff fra N- to C-terminus domeneene FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 og FR4. CDR'er på hver kjede er adskilt av slike rammeverk-aminosyrer. Spesielt er CDR3 på den tunge kjeden den regionen som bidrar mest til antigenbinding. CDR- og FR-regioner blir bestemt i henhold til standarddefinisjonen til Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utg., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

De bispesifikke antistoffene i henhold til oppfinnelsen innbefatter, i tillegg, slike antistoffer som har "konservative sekvensmodifikasjoner" (det som menes med "varianter" av de bispesifikke antistoffene). Dette betyr nukleotid- og aminosyre-sekvensmodifikasjoner som ikke påvirker eller endrer de ovennevnte kjennetegnene til antistoffet i henhold til oppfinnelsen. Modifikasjoner kan innføres ved standard teknikker kjent på fagområdet, så som seterettet mutagenese og PCR-mediert mutagenese. Konservative aminosyresubstitusjoner innbefatter slike hvor aminosyre-resten blir erstattet med en aminosyrerest som har en lignende sidekjede. Familier av aminosyrerester som har lignende sidekjeder er blitt definert på fagområdet. Disse familiene innbefatter aminosyrer med basiske sidekjeder (for eksempel lysin, arginin, histidin), sure sidekjeder (for eksempel asparaginsyre, glutaminsyre), uladete polare

sidekjeder (for eksempel glycin, asparagin, glutamin, serin, treonin, tyrosin, cystein, tryptofan), ikke-polare sidekjeder (for eksempel alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, metionin), beta-forgrenede sidekjeder (for eksempel treonin, valin, isoleucin) og aromatiske sidekjeder (for eksempel tyrosin, fenylalanin, tryptofan, histidin). Således kan en forutsagt, ikke-essensiell aminosyrerest i et bispesifikt <VEGF-ANG-2>-antistoff fortrinnsvis erstattes med en annen aminosyrerest fra den samme sidekjede-familien. Et "variant" («variant») bispesifikt <VEGF-ANG-2>-antistoff refererer derfor her til et molekyl som skiller seg med hensyn til aminosyresekvens fra en "stam"-bispesifikt <VEGF-ANG-2>-antistoff-aminosyresekvens med opptil ti, fortrinnsvis fra omtrent to til omtrent fem, addisjoner, delesjoner og/eller substitusjoner i én eller flere variable regioner eller konstante regioner av stam-antistoffet. Aminosyresubstitusjoner kan utføres ved mutagenese, basert på molekylær modellering, som beskrevet av Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327 og Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033. Et "variant" bispesifikt <VEGF-ANG-2>-antistoff i henhold til oppfinnelsen innbefatter også bispesifikke antistoff-formater hvor bindingsdelen (hvis den eksisterer) ble modifisert eller erstattet med en annen bindingsdel.

Som anvendt her, refererer uttrykket "binding" eller "spesifikk binding" til bindingen av antistoffet til en epitop på antigenet (enten human VEGF eller humant ANG-2) i en in vitro-analyse, fortrinnsvis i en plasmonresonansanalyse (BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Sverige) (eksempel 2) med renset villtype-antigen. Affiniteten til bindingen er definert av betegnelsene k_a (rate-konstant for bindingen av antistoffet fra antistoff/antigenkomplekset), k_D (dissosiasjonskonstant), og K_D (k_D/k_a). Binding eller spesifikk binding betyr en bindingsaffinitet (K_D) på 10^{-8} mol/l eller mindre, fortrinnsvis 10^{-9} M to 10^{-13} mol/l.

Binding av antistoffet til FcγRIII kan undersøkes med en BIAcore-analyse (GE-Healthcare Uppsala, Sverige). Affiniteten til bindingen er definert av betegnelsene k_a (rate-konstant for bindingen av antistoffet fra antistoff/antigenkomplekset), k_D (dissosiasjonskonstant), og K_D (k_D/k_a).

Som anvendt her, betyr uttrykket "som ikke binder til ANG-1" eller "som ikke spesifikt binder til ANG-1", at antistoffet har en EC50-verdi på over 8000 ng/ml i en in-vitro ANG-1-bindings-ELISA-analyse (i henhold til eksempel 9).

Betegnelsen "epitop" innbefatter en hvilken som helst polypeptid-determinant som er i stand til spesifikt å binde seg til et antistoff. I visse utførelsesformer innbefatter epitop-determinant kjemisk aktive overflategrupperinger av molekyler, så som aminosyrer, sukker-sidekjeder, fosforyl eller sulfonyl, og kan, i visse utførelsesformer, ha spesifikke, tredimensjonale, strukturelle kjennetegn og/eller spesifikke

ladnings-karakteristikker. En epitop er en region på et antigen som er bundet av et antistoff.

I visse utførelsesformer sies et antistoff å spesifikt binde et antigen når det fortrinnsvis gjenkjenner sitt mål-antigen i en kompleks blanding av proteiner og/eller
5 makromolekyler.

I én utførelsesform av oppfinnelsen omfatter det bispesifikke antistoffet et full-lengde stam-antistoff som skaffold.

Betegnelsen "full-lengde antistoff" betyr et antistoff som består av to "full-lengde antistoff tunge kjeder" og to "full-lengde antistoff lette kjeder". En "full-lengde antistoff tung kjede" er et polypeptid som i N-terminal til C-terminal retning består av
10 et antistoff tung kjede variabelt domene (VH), et antistoff tung kjede konstant domene 1 (CH1), en antistoff-hengselregion (HR), et antistoff tung kjede konstant domene 2 (CH2), og et antistoff tung kjede konstant domene 3 (CH3), forkortet som VH-CH1-HR-CH2-CH3; og eventuelt et antistoff tung kjede konstant domene 4 (CH4) i
15 tilfelle av et antistoff av underklassen IgE. Fortrinnsvis er "full-lengde antistoff tung kjede" et polypeptid som i N-terminal til C-terminal retning består av VH, CH1, HR, CH2 og CH3. En "full-lengde antistoff lett kjede" er et polypeptid som i N-terminal til C-terminal retning består av et antistoff lett kjede variabelt domene (VL), og et antistoff lett kjede konstant domene (CL), forkortet som VL-CL. Antistoff lett kjede
20 konstant domene (CL) kan være κ (kappa) eller λ (lambda). De to full-lengde antistoff-kjedene er bundet sammen via inter-polypeptid-disulfidbindinger mellom CL-domenet og CH1-domenet og mellom hengselsregionene på full-lengde antistoff tunge kjeder. Eksempler på typiske full-lengde antistoffer, er naturlige antistoffer så som IgG (for eksempel IgG 1 og IgG2), IgM, IgA, IgD, og IgE.

Således er et monospesifikt divalent (= full-lengde) antistoff som omfatter et
25 første antigenbindingssete og som består av to antistoff lette kjeder og to antistoff tunge kjeder, et full-lengde antistoff. C-terminus på den tunge eller lette kjeden til nevnte full-lengde antistoff betyr den siste aminosyren ved C-terminus på nevnte tunge eller lette kjede. N-terminus på den tunge eller lette kjeden til nevnte full-lengde antistoff betyr den siste aminosyren ved N-terminus på nevnte tunge eller lette
30 kjede.

De bispesifikke antistoffene som spesifikt binder til human vaskulær endotelvekstfaktor (VEGF) og humant angiopoietin-2 (ANG-2) i henhold til oppfinnelsen, er bivalente antistoffer med to forskjellige spesifisiteter, som for
35 eksempel a) beskrevet i WO 2009/080251, WO 2009/080252 eller WO 2009/080253 (domene-utvekslede antistoffer - se eksempel 13) eller b) basert på et scFab-Fc-fusjonsantistoff hvor ett enkeltkjede-Fab-fragment (etter hvert disulfidstabilisert) er

spesifikt for VEGF og det andre enkeltkjede-Fab-fragmentet (etter hvert disulfidstabilisert) for ANG-2 (se eksempel 14), eller c) beskrevet in Ridgway, J.B., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; WO 96/027011; Merchant, A.M., et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35 og EP 1 870 459A1.

I én utførelsesform er det bispesifikke antistoffet i henhold til oppfinnelsen kjennetegnet ved at det omfatter som aminosyre sekvenser med SEKV ID NR: 121, SEKV ID NR: 122, SEKV ID NR: 123 og SEKV ID NR: 124, eller varianter derav.

I én utførelsesform er det bispesifikke antistoffet i henhold til oppfinnelsen kjennetegnet ved at det omfatter som aminosyre sekvenser med SEKV ID NR: 125, SEKV ID NR: 126, SEKV ID NR: 127 og SEKV ID NR: 128, eller varianter derav.

I én utførelsesform er det bispesifikke antistoffet i henhold til oppfinnelsen kjennetegnet ved at det omfatter som aminosyre sekvenser med SEKV ID NR: 129, SEKV ID NR: 130, SEKV ID NR: 131 og SEKV ID NR: 132, eller varianter derav.

I én utførelsesform er det bispesifikke antistoffet i henhold til oppfinnelsen kjennetegnet ved at det omfatter som aminosyre sekvenser med SEKV ID NR: 133 og SEKV ID NR: 134, eller varianter derav.

I én utførelsesform er det bispesifikke antistoffet i henhold til oppfinnelsen kjennetegnet ved at det omfatter som aminosyre sekvenser med SEKV ID NR: 135 og SEKV ID NR: 136, eller varianter derav.

Disse aminosyresekvensene er basert på de tung kjede variable domenene med SEKV ID NR: 7, og de lett kjede variable domenene med SEKV ID NR: 8 (avledet fra bevacizumab (Avastin)) som første antigenbindingssete som binder til VEGF, og på de tung kjede variable domenene med SEKV ID NR: 52 og de lett kjede variable domenene med SEKV ID NR: 53 (avledet fra Ang2i_LC06)) som andre antigenbindingssete som binder til ANG-2.

Bindingssetene på et antistoff i henhold til oppfinnelsen, blir hvert dannet av et par av to variable domener, det vil si av ett tung kjede variabelt domene og ett lett kjede variabelt domene. Den minste bindingssetedeterminanten i et antistoff er tung kjede CDR3-regionen.

I en ytterligere utførelsesform er nevnte bispesifikke antistoff kjennetegnet ved at den konstante regionen avledet er av human opprinnelse.

I en ytterligere utførelsesform er nevnte bispesifikke antistoff kjennetegnet ved at den konstante regionen av det bispesifikke antistoffet i henhold til oppfinnelsen er av human IgG1-underklasse, eller av human IgG1-underklasse med mutasjonene L234A og L235A.

I en ytterligere utførelsesform er nevnte bispesifikke antistoff kjennetegnet ved at den konstante regionen av det bispesifikke antistoffet i henhold til oppfinnelsen antistoff er av human IgG2-underklasse.

5 I en ytterligere utførelsesform er nevnte bispesifikke antistoff kjennetegnet ved at den konstante regionen av det bispesifikke antistoffet i henhold til oppfinnelsen antistoff er av human IgG3-underklasse.

I en ytterligere utførelsesform er nevnte bispesifikke antistoff kjennetegnet ved at den konstante regionen på det bispesifikke antistoffet i henhold til oppfinnelsen er av human IgG4-underklasse, eller av human IgG4-underklasse med den ytterligere
10 mutasjonen S228P.

Det er nå blitt funnet at de bispesifikke antistoffene mot human VEGF og humant ANG-2 i henhold til foreliggende oppfinnelse har forbedrede karakteristikk, så som biologisk eller farmakologisk aktivitet, farmakokinetiske egenskaper eller toksisitet. De viser økt in vivo tumorveksthemming og/eller hemming av tumor-
15 angiogenese sammenlignet med de monospesifikke stam-antistoffene mot VEGF og ANG-2 (se eksempler 16, 17 og 18: sammenligning av forskjellige bispesifikke <VEGF-ANG-2>-antistoffer bevacizumab-ANG2i-LC06 med de monospesifikke antistoffene Avastin (bevacicicumb) alene, ANG21-LC06 alene, eller begge i kombinasjon).

Videre representerer mindre toksiske bivirkninger (noe som reflekteres i den
20 forbedrede kroppsvekten til forsøksdyrene, så vel som færre dødsfall hos forsøksdyrene under anvendelse in vivo), sammenlignet med anvendelse av to tilsvarende individuelle monospesifikke antistoffer mot VEGF og ANG-2 i kombinasjon, også en fordel ved de bispesifikke antistoffene i henhold til oppfinnelsen.

Videre kan de bispesifikke antistoffene i henhold til foreliggende oppfinnelse
25 tilveiebringe fordeler, så som redusert dose og/eller hyppighet av administrering og ledsagende kostnadsbesparelser.

Betegnelsen "konstant region", som anvendt i foreliggende søknad, betyr summen av domenene på et antistoff forskjellig fra den variable regionen. Den konstante regionen er ikke direkte involvert i bindingen av et antigen, men oppviser
30 forskjellige effektorfunksjoner. Avhengig av aminosyresekvensen til den konstante regionen på deres tunge kjeder, blir antistoffer inndelt i klassene IgA, IgD, IgE, IgG og IgM, og flere av disse kan videre inndeles i underklasser, så som IgG1, IgG2, IgG3 og IgG4, IgA1 og IgA2. De tung kjede konstante regionene som tilsvarer de forskjellige klassene av antistoffer blir henholdsvis kalt α , δ , ϵ , γ og μ . De lett kjede konstante
35 regionene som er å finne i alle fem antistoffklassene, blir kalt κ (kappa) og λ (lambda).

Betegnelsen "konstant region avledet fra human opprinnelse", som anvendt i foreliggende oppfinnelse, betyr en konstant tung kjede-region på et humant antistoff av underklasse IgG1, IgG2, IgG3 eller IgG4, og/eller en konstant lett kjede kappa- eller lambda-region. Slike konstante regioner er vel kjent innen teknikkens stand, og
 5 for eksempel beskrevet av Kabat, E.A. (se for eksempel Johnson, G., og Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2785-2788).

Mens antistoffer av IgG4-underklassen viste redusert Fc-reseptor- (FcγRIIIa) binding, viste antistoffer av andre IgG-underklasser sterk binding. Imidlertid er
 10 Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (tap av Fc-karbohydrat), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434, og His435 rester som, hvis endret, også gir redusert Fc-reseptorbinding (Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; EP 0 307 434).

I én utførelsesform har et antistoff i henhold til oppfinnelsen en redusert FcR-binding sammenlignet med et IgG1-antistoff og det monospesifikke bivalente (full-lengde) stam-antistoffet er, med hensyn til FcR-binding, av IgG4-underklasse eller av IgG1- eller IgG2-underklasse med en mutasjon i S228, L234, L235 og/eller D265, og/- eller inneholder PVA236-mutasjonen. I én utførelsesform er mutasjonene i det
 20 monospesifikke bivalente (full-lengde) stam-antistoffet S228P, L234A, L235A, L235E og/eller PVA236. I en annen utførelsesform er mutasjonene i det monospesifikke bivalente (full-lengde) stam-antistoffet i IgG4 S228P og i IgG1 L234A og L235A. Konstante tung kjede-regioner er vist i SEKV ID NR: 35 og 36. I én utførelsesform er den konstante tung kjede-regionen på det monospesifikke bivalente (full-lengde)
 25 stam-antistoffet med SEKV ID NR: 35 med mutasjoner L234A og L235A. I en annen utførelsesform er den konstante tung kjede-regionen på det monospesifikke bivalente (full-lengde) stam-antistoffet med SEKV ID NR: 36 med mutasjon S228P. I en annen utførelsesform er den konstante lett kjede-regionen på det monospesifikke bivalente (full-lengde) stam-antistoffet en kappa lett kjede-region med SEKV ID NR: 37 eller
 30 lambda lett kjede-region med SEKV ID NR: 34. Fortrinnsvis er den konstante tung kjede-regionen på det monospesifikke bivalente (full-lengde) stam-antistoffet med SEKV ID NR: 35 eller med SEKV ID NR: 36 med mutasjon S228P.

Den konstante regionen av et antistoff er direkte involvert i ADCC (antistoff-avhengig celle-mediert cytotoksitet) og CDC (komplement-avhengig cytotoksitet).
 35 Komplementaktivering (CDC) blir initiert ved binding av komplementfaktor Clq til den konstante regionen på de fleste IgG-antistoff-underklassene. Binding av Clq til et antistoff blir forårsaket av definerte protein-protein-interaksjoner på det såkalte

bindingssetet. Slike konstant region-bindings seter er kjent innen teknikkens stand og beskrevet for eksempel av Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R. og Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; og EP 0 307 434. Slike konstant region-bindings seter er for eksempel kjennetegnet ved aminosyrene L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, og P329 (nummerering i henhold til EU-indeks i Kabat).

Betegnelsen "antistoff-avhengig cellulær cytotoxiskitet (ADCC)" refererer til lyse av humane målceller med et antistoff i henhold til oppfinnelsen, i nærvær av effektorceller. ADCC blir fortrinnsvis målt ved å behandle et preparat av CCR5-uttrykkende celler med et antistoff i henhold til oppfinnelsen i nærvær av effektorceller, så som nylig isolert PBMC eller rensede effektorceller fra buffycoats, så som monocytter eller naturlige dreper- (NK) celler eller en permanent voksende NK-celllinje.

Betegnelsen "komplement-avhengig cytotoxiskitet (CDC)" betyr en prosess initiert ved binding av komplementfaktor Clq til Fc-delen av de fleste IgG-antistoff- underklasser. Binding av Clq til et antistoff blir forårsaket av definerte protein-protein-interaksjoner på det såkalte bindingssete. Slike Fc-del-bindings seter er kjent innen teknikkens stand (se ovenfor). Slike Fc-del-bindings seter er for eksempel kjennetegnet ved aminosyrene L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 og P329 (nummerering i henhold til EU-indeks i Kabat). Antistoffer av underklasse IgG1, IgG2 og IgG3 viser vanligvis komplementaktivering innbefattende Clq- og C3-binding, mens IgG4 ikke aktiverer komplementsystemet og binder ikke Clq og/eller C3.

Antistoffet i henhold til oppfinnelsen blir fremstilt på rekombinant måte. Således er ett aspekt ved foreliggende oppfinnelse en nukleinsyre som koder for antistoffet i henhold til oppfinnelsen, og et ytterligere aspekt er en celle omfattende nevnte nukleinsyre som koder for et antistoff i henhold til oppfinnelsen. Metoder for rekombinant produksjon er viden kjent innen teknikkens stand og omfatter proteinekspresjon i prokaryote og eukaryote celler, med påfølgende isolasjon av antistoffet og vanligvis rensing til en farmasøytisk akseptabel renhet. For ekspresjon av antistoffene som nevnt foran i en vertscelle, blir nukleinsyrer som koder for de respektive modifiserte lette og tunge kjeder satt inn i ekspresjonsvektorer ved hjelp av standard metoder. Ekspresjon blir utført i passende prokaryote eller eukaryote vertsceller, så som CHO-celler, NS0-celler, SP2/0-celler, HEK293-celler, COS-celler, PER.C6-celler, gjær- eller E.coli-celler, og antistoffet blir gjenvunnet fra cellene

(supernatant eller celler etter lyse). Generelle metoder for rekombinant fremstilling av antistoffer er velkjente innen teknikkens stand og for eksempel beskrevet i de undersøkende artiklene til Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.

De bispesifikke antistoffene blir passende skilt fra dyrkningsmediet ved hjelp av konvensjonelle immunglobulinrenseprosedyrer, så som for eksempel protein A-Sepharose, hydroksylapatitt-kromatografi, gel-elektroforese, dialyse eller affinitets-kromatografi. DNA og RNA som koder for de monoklonale antistoffene blir lett isolert og sekvensert ved anvendelse av konvensjonelle prosedyrer. Hybridomcellene kan tjene som en kilde til slikt DNA og RNA. Så snart det er isolert, kan DNA settes inn i ekspresjonsvektorer, som deretter blir transfektert inn i vertsceller, så som HEK 293-celler, CHO-celler, eller myelomceller som ellers ikke produserer immunglobulin-protein, for å oppnå syntese av rekombinante monoklonale antistoffer in vertscellene.

Aminosyresekvensvarianter (eller mutanter) av det bispesifikke antistoffet blir fremstilt ved å innføre passende nukleotidendringer i antistoffets DNA, eller ved hjelp av nukleotidsyntese. Slike modifikasjoner kan imidlertid utføres kun i et meget begrenset omfang, for eksempel som beskrevet ovenfor. For eksempel endrer modifikasjonene ikke de ovenfor nevnte antistoff-karakteristikkene, så som IgG-isotype og antigenbinding, men kan forbedre utbyttet av den rekombinante fremstillingen, proteinstabilitet eller lette rensingen.

Betegnelsen "vertscelle", som anvendt i foreliggende søknad, betyr en hvilken som helst type av et cellulært system som kan konstrueres for å frembringe antistoffene i henhold til foreliggende oppfinnelse. I én utførelsesform anvendes HEK293-celler og CHO-celler som vertsceller. Som anvendt her, anvendes uttrykkene "celle", "cellelinje" og "cellekultur" om hverandre, og alle slike benevnelser innbefatter avkom. Således innbefatter ordene "transformanter" og "transformerte celler" den primære aktuelle cellen og kulturer avledet derfra, uten hensyn til antallet overføringer. Det skal også forstås at alt avkom ikke nødvendigvis er nøyaktig identisk med hensyn til DNA-innhold, på grunn av bevisste eller utilsiktede mutasjoner. Variant-avkom som har den samme funksjonen eller biologiske aktiviteten som screenet for i den opprinnelig transformerte cellen, er innbefattet.

Ekspresjon i NSO-celler er beskrevet av for eksempel Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. Transient ekspresjon er beskrevet av for eksempel Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. Kloning av variable domener er beskrevet av Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; og Norderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87. Et foretrukket transient ekspressjonssystem (HEK 293) er beskrevet av Schlaeger, E.-J., og Christensen, K., i Cytotechnology 30 (1999) 71-83, og av Schlaeger, E.-J., i J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199.

5 Kontrollsekvensene som er egnet for prokaryoter, for eksempel, innbefatter en promoter, eventuelt en operatør-sekvens, og et ribosom-bindingssete. Eukaryote celler er kjent for å nyttiggjøre seg promotere, enhancere og polyadenyleringssignaler.

En nukleinsyre er "operativt bundet" når den er plassert i et funksjonelt forhold med en annen nukleinsyresekvens. For eksempel er DNA for en presekvens eller
10 sekretorisk leder operativt bundet til DNA for et polypeptid hvis det blir uttrykt som et pre-protein som deltar i sekresjonen av polypeptidet; en promoter eller enhancer er operativt bundet til en kodende sekvens hvis den påvirker transkripsjonen av sekvensen; eller et ribosom-bindingssete er operativt bundet til en kodende sekvens hvis det er posisjonert slik at det letter translasjon. Generelt betyr "operativt bundet"
15 at DNA-sekvensene som blir bundet er tilstøtende og, i tilfelle av en sekretorisk leder, tilstøtende og i leseramme. Imidlertid må enhancere ikke være tilstøtende. Binding fullføres ved ligering på passende restriksjonsseter. Hvis slike seter ikke eksisterer, blir de syntetiske oligonukleotid-adaptorene eller bindingsdelene anvendt i overensstemmelse med konvensjonell praksis.

20 Rensing av antistoffer blir utført for å eliminere cellulære bestanddeler eller andre forurensninger, for eksempel andre cellulære nukleinsyrer eller proteiner, ved hjelp av standard teknikker, innbefattende alkali/SDS-behandling, CsCl-bånddannelse, kolonnekromatografi, agarosegelelektroforese, og andre som er vel kjent på fagområdet. Se Ausubel, F., et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene
25 Publishing, og Wiley Interscience, New York (1987). Forskjellige metoder er godt etablert og anvendt i vidt omfang for proteinrensing, så som affinitetskromatografi med mikrobielle proteiner (for eksempel protein A- eller protein G-affinitetskromatografi), ionebytterkromatografi (for eksempel kationbytting (karboksymethylharpikser), anionbytting (aminoethylharpikser) og mixed-mode bytting), tiofil adsorpsjon (for
30 eksempel med beta-merkaptetanetanol og andre SH-ligander), hydrofobisk interaksjons- eller aromatisk adsorpsjonskromatografi (for eksempel med fenyl-sepharose, aza-arenofile harpikser, eller m-aminofenylboronsyre), metallchelate-affinitetskromatografi (for eksempel med Ni(II)- og Cu(II)-affinitetsmateriale), størrelseseksklusionskromatografi og elektroforesemetoder (så som gel-elektroforese, kapillær-
35 elektroforese) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

Ett aspekt ved oppfinnelsen er et farmasøytisk preparat som omfatter et antistoff i henhold til oppfinnelsen. Et annet aspekt ved oppfinnelsen er anvendelse av

et antistoff i henhold til oppfinnelsen for fremstilling av et farmasøytisk preparat. Et ytterligere aspekt ved oppfinnelsen er en metode for fremstilling av et farmasøytisk preparat som omfatter et antistoff i henhold til oppfinnelsen. I et annet aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et preparat, for eksempel et farmasøytisk preparat, som inneholder et antistoff i henhold til foreliggende oppfinnelse, formulert sammen med en farmasøytisk bærer.

Én utførelsesform av oppfinnelsen er det bispesifikke antistoffet i henhold til oppfinnelsen, for behandling av kreft.

Et annet aspekt ved oppfinnelsen er nevnte farmasøytiske preparat for behandling av kreft.

Et annet aspekt ved oppfinnelsen er anvendelse av et antistoff i henhold til oppfinnelsen, for fremstilling av et medikament for behandling av kreft.

Et annet aspekt ved oppfinnelsen er en metode for behandling av en pasient som lider av kreft, ved å administrere et antistoff i henhold til oppfinnelsen til en pasient med behov for slik behandling.

Som anvendt her, innbefatter "farmasøytisk bærer" et hvilket som helst og alle løsningsmidler, dispersjonsmedier, belegg, antibakterielle og antisoppmidler, isotoniske og absorpsjonsforsinkende midler og lignende, som er fysiologisk forlikelige. Fortrinnsvis er bæreren egnet for intravenøs, intramuskulær, subkutan, parenteral, spinal eller epidermal administrering (for eksempel ved injeksjon eller infusjon).

Et preparat ifølge foreliggende oppfinnelse kan administreres på mange forskjellige måter kjent på fagområdet. Som en fagperson vil vite, vil veien og/eller måten for administrering variere, avhengig av de ønskede resultater. For å administrere en forbindelse ifølge oppfinnelsen via visse administreringsveier, kan det være nødvendig å belegge forbindelsen med, eller samtidig administrere forbindelsen med, et materiale for å forhindre inaktivering av den. For eksempel kan forbindelsen administreres til et individ i en passende bærer, for eksempel liposomer eller et fortynningsmiddel. Farmasøytisk akseptable fortynningsmidler innbefatter saltoppløsning og vandige bufferløsninger. Farmasøytiske bærere innbefatter sterile vandige løsninger eller dispersjoner og sterile pulvere for ekstemperert fremstilling av sterile injiserbare løsninger eller dispersjon. Anvendelse av slike medier og midler for farmasøytisk aktive substanser er kjent på fagområdet.

Frasene "parenteral administrering" og "administrert parenteralt", som anvendt her, betyr måter for administrering forskjellig fra enterisk og topisk administrering, vanligvis ved injeksjon, og innbefatter, uten begrensning, intravenøs, intramuskulær, intra-arteriell, intratekal, intrakapsulær, intraorbital, intrakardiell, intradermal,

intraperitoneal, transtrakeal, subkutan, subkutikulær, intra-artikulær, subkapsulær, subarachnoid, intraspinal, epidural og intrasternal injeksjon og infusjon.

Betegnelsen kreft, som anvendt her, refererer til proliferative sykdommer, så som lymfomer, lymfocytiske leukemier, lungekreft, ikke-småcellet lunge- (NSCL) kreft, bronkoalveolær celle-lungekreft, benkreft, pankreatisk kreft, hudkreft, kreft i hode eller hals, kutant eller intraokulært melanom, livmorkreft, eggstokk-kreft, rektal kreft, kreft i analområdet, magekreft, gastrisk kreft, tykktarmskreft, brystkreft, livmorkreft, karsinom i egglederne, karsinom i endometriet, karsinom i cervix, karsinom i vagina, karsinom i vulva, Hodgkins sykdom, kreft i øsofagus, kreft i tyntarmen, kreft i det endokrine system, kreft i thyreoideakjertelen, kreft i parathyreoideakjertelen, kreft i binyrene, sarkom i bløtvev, kreft i uretra, kreft i penis, prostatakreft, kreft i blæren, kreft i nyre eller ureter, nyrecellekarsinom, karsinom i nyrebekkenet, mesoteliom, hepatocellulær kreft, biliær kreft, neoplasmer i sentralnervesystemet (SNS), spinal axis-tumorer, hjernestammegliom, glioblastoma multiforme, astrocytomer, schwannomer, ependymer, medulloblastomer, meningiomer, platecellekarsinomer, hypofyseadenom og Ewings sarkom, innbefattende motstandsdyktige versjoner av en hvilken som helst av krefttypene ovenfor, eller en kombinasjon av en eller flere av krefttypene ovenfor.

Et annet aspekt ved oppfinnelsen er det bispesifikke antistoff i henhold til oppfinnelsen eller nevnte farmasøytiske preparat som anti-angiogent middel. Slike anti-angiogene midler kan anvendes for behandling av kreft, spesielt faste tumorer, og andre vaskulære sykdommer.

En utførelsesform av oppfinnelsen er det bispesifikke antistoff i henhold til oppfinnelsen, for behandling av vaskulære sykdommer.

Et annet aspekt ved oppfinnelsen er nevnte farmasøytiske preparat, for behandling av vaskulære sykdommer.

Et annet aspekt ved oppfinnelsen er anvendelse av et antistoff i henhold til oppfinnelsen, for fremstilling av et medikament for behandling av vaskulære sykdommer.

Et annet aspekt ved oppfinnelsen er en metode for behandling av en pasient som lider av vaskulære sykdommer, ved å administrere et antistoff i henhold til oppfinnelsen til en pasient med behov for slik behandling.

Betegnelsen "vaskulære sykdommer" innbefatter kreft, inflammatoriske sykdommer, aterosklerose, iskemi, traume, sepsis, KOLS, astma, diabetes, AMD, retinopati, slag, fedme, akutt lungeskade, blødning, vaskulær lekkasje, for eksempel cytokinindusert, allergi, Graves sykdom, Hashimotos autoimmune thyreoiditt, primær immun trombocytopeni, kjempecelleartritt, revmatoid artritt, systemic lupus

erythematosus (SLE), lupusnefritt, Crohns sykdom, multippel sklerose, ulcerøs kolitt, spesielt faste tumorer, intraokulære neovaskulære syndromer, så som proliferativ retinopati eller aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD), revmatoid artritt og psoriasis (Folkman, J., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M., et al., Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; og Garner, A., Vascular diseases, In: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., og Klintworth, G.K., (eds.), 2. utg., Marcel Dekker, New York (1994), s. 1625-1710).

Disse preparatene kan også inneholde adjuvanser, så som konserveringsmidler, fuktemidler, emulgeringsmidler og dispergeringsmidler. Forebygging av nærvær av mikroorganismer kan sikres både ved steriliseringsprosedyrer, supra, og ved å inkludere forskjellige antibakterielle og antisoppmidler, for eksempel paraben, klorbutanol, fenol, sorbinsyre og lignende. Det kan også være ønskelig å inkludere isotoniske midler, så som sukker, natriumklorid og lignende i preparatene. I tillegg kan forlenget absorpsjon av den injiserbare farmasøytiske formen sørges for ved å inkludere midler som forsinker absorpsjon, så som aluminum-monostearat og gelatin.

Uten hensyn til veien for administrering valgt, blir forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse, som kan anvendes i en passende, hydratisert form, og/eller de farmasøytiske preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse, formulert som farmasøytisk akseptable doseringsformer ved konvensjonelle metoder kjent for dem med kunnskap på fagområdet.

Faktiske doseringsnivåer av de aktive ingrediensene i de farmasøytiske preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse kan varieres, slik at det oppnås en mengde av den aktive ingrediensen som er effektiv til å oppnå den ønskede terapeutiske respons hos en spesiell pasient, preparat og administreringsmåte, uten å være toksisk for pasienten. Det valgte doseringsnivå vil avhenge av mange forskjellige farmakokinetiske faktorer, innbefattende aktiviteten til de spesielle preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse som anvendes, administreringsveien, tiden for administrering, utskillingsraten for den spesielle forbindelsen som anvendes, varigheten av behandlingen, andre medikamenter, forbindelser og/eller materialer anvendt i kombinasjon med de spesielle preparatene anvendt, alder, kjønn, vekt, tilstand, generell helse og tidligere medisinsk historie til pasienten som blir behandlet, og lignende faktorer som er vel kjent på det medisinske fagområde.

Preparatet må være sterilt og fluid i den grad at preparatet kan gis med sprøyte. I tillegg til vann er bæreren fortrinnsvis en isotonisk bufret saltoppløsning.

Riktig fluiditet kan for eksempel opprettholdes ved anvendelse av belegning, så som lecitin, ved opprettholdelse av partikkelstørrelsen som kreves i tilfelle av dispersjon og ved anvendelse av overflateaktive midler. I mange tilfeller er det

foretrukket å innbefatte isotoniske midler, for eksempel sukker, polyalkoholer, så som mannitol eller sorbitol, og natriumklorid i preparatet.

Som anvendt her, anvendes uttrykkene "celle", "cellelinje" og "cellekultur" om hverandre, og alle slike benevnelser innbefatter avkom. Således innbefatter ordene "transformanter" og "transformerte celler" den primære aktuelle cellen og kulturene avledet derfra, uten hensyn til antallet overføringer. Det skal også forstås at alt avkom ikke nødvendigvis er nøyaktig identisk med hensyn til DNA-innhold, på grunn av bevisste eller utilsiktede mutasjoner. Variant avkom som har den samme funksjonen eller biologiske aktiviteten som screenet for i den opprinnelig transformerte cellen er innbefattet. Når særskilte benevnelser er ment, vil det være klart ut fra sammenhengen.

Betegnelsen "transformasjon", som anvendt her, refererer til prosessen med overføring av en vektor/nukleinsyre inn i en vertscelle. Hvis celler uten formidable celleveggbarrierer anvendes som vertsceller, utføres transfeksjon for eksempel ved hjelp av kalsiumfosfat-utfellingsmetoden som beskrevet av Graham, F.L., van der Eb, A.J., Virology 52 (1978) 546ff. Imidlertid kan andre metoder for innføring av DNA i celler, så som ved hjelp av injeksjon i kjernen eller ved protoplastfusjon, også anvendes. Hvis prokaryote celler eller celler som inneholder vesentlige celleveggkonstruksjoner anvendes, er for eksempel én metode for transfeksjon kalsiumbehandling ved anvendelse av kalsiumklorid, som beskrevet av Cohen, S.N., et al., PNAS. 69 (1972) 2110-2114.

Som anvendt her, refererer "ekspresjon" til prosessen der en nukleinsyre blir transkribert til mRNA og/eller til prosessen der det transkriberte mRNA (også referert til som transkript) i det påfølgende blir translatert til peptider, polypeptider eller proteiner. Transkriptene og polypeptidene kodet for blir kollektivt referert til som genprodukt. Hvis polynukleotidet er avledet fra genomisk DNA, kan ekspresjon i en eukaryot celle innbefatte spleising av mRNA. En "vektor" er et nukleinsyremolekyl, særlig selv-replikerende, som overfører et innsatt nukleinsyremolekyl i og/eller mellom vertsceller. Betegnelsen innbefatter vektorer som primært fungerer for innsettelse av DNA eller RNA i en celle (for eksempel kromosomal integrasjon), replikering av vektorer som primært fungerer for replikering av DNA eller RNA, og ekspresjonsvektorer som fungerer for transkripsjon og/eller translasjon av DNA eller RNA. Også innbefattet er vektorer som tilveiebringer mer enn én av funksjonene som beskrevet.

En "ekspresjonsvektor" er et polynukleotid som, når innført i en passende vertscelle, kan transkriberes og translateres til et polypeptid. Et "ekspresjonssystem"

refererer vanligvis til en passende vertscelle som omfatter en ekspresjonsvektor som kan fungere til å gi et ønsket ekspresjonsprodukt.

Beskrivelse av aminosyresekvensene.

SEKV ID NR:	1	tung kjede CDR3, <VEGF>bevacizumab
SEKV ID NR:	2	tung kjede CDR2, <VEGF>bevacizumab
SEKV ID NR:	3	tung kjede CDR1, <VEGF>bevacizumab
SEKV ID NR:	4	lett kjede CDR3, <VEGF>bevacizumab
SEKV ID NR:	5	lett kjede CDR2, <VEGF>bevacizumab
SEKV ID NR:	6	lett kjede CDR1, <VEGF>bevacizumab
SEKV ID NR:	7	tung kjede variabelt domene, <VEGF>bevacizumab
SEKV ID NR:	8	Lett kjede variabelt domene, <VEGF>bevacizumab
SEKV ID NR:	9	tung kjede CDR3, <VEGF>ranibizumab
SEKV ID NR:	10	tung kjede CDR2, <VEGF>ranibizumab
SEKV ID NR:	11	tung kjede CDR1, <VEGF>ranibizumab
SEKV ID NR:	12	lett kjede CDR3, <VEGF>ranibizumab
SEKV ID NR:	13	lett kjede CDR2, <VEGF>ranibizumab

SEKV ID NR:	14	lett kjede CDR1, <VEGF>ranibizumab
SEKV ID NR:	15	tung kjede variabelt domene, <VEGF>ranibizumab
SEKV ID NR:	16	lett kjede variabelt domene, <VEGF>ranibizumab
SEKV ID NR:	17	tung kjede CDR3, <VEGF>HuMab G6-31
SEKV ID NR:	18	tung kjede CDR2, <VEGF> HuMab G6-31
SEKV ID NR:	19	tung kjede CDR1, <VEGF> HuMab G6-31
SEKV ID NR:	20	lett kjede CDR3, <VEGF> HuMab G6-31
SEKV ID NR:	21	lett kjede CDR2, <VEGF> HuMab G6-31
SEKV ID NR:	22	lett kjede CDR1, <VEGF> HuMab G6-31
SEKV ID NR:	23	tung kjede variabelt domene, <VEGF> HuMab G6-31
SEKV ID NR:	24	lett kjede variabelt domene, <VEGF> HuMab G6-31
SEKV ID NR:	25	tung kjede CDR3, <ANG-2> Mab 536
SEKV ID NR:	26	tung kjede CDR2, <ANG-2> Mab 536
SEKV ID NR:	27	tung kjede CDR1, <ANG-2> Mab 536
SEKV ID NR:	28	lett kjede CDR3, <ANG-2> Mab 536
SEKV ID NR:	29	lett kjede CDR2, <ANG-2> Mab 536

SEKV ID NR:	30	lett kjede CDR1, <ANG-2> Mab 536
SEKV ID NR:	31	tung kjede variabelt domene, <ANG-2> Mab 536
SEKV ID NR:	32	lett kjede variabelt domene, <ANG-2> Mab 536
SEKV ID NR:	33	(G4S)4 bindingsdel
SEKV ID NR:	34	lambda lett kjede konstant region
SEKV ID NR:	35	human tung kjede konstant region avledet fra IgG1
SEKV ID NR:	36	human tung kjede konstant region avledet fra IgG4
SEKV ID NR:	37	kappa lett kjede konstant region
SEKV ID NR:	38	tung kjede CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEKV ID NR:	39	tung kjede CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEKV ID NR:	40	tung kjede CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEKV ID NR:	41	lett kjede CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEKV ID NR:	42	lett kjede CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEKV ID NR:	43	lett kjede CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEKV ID NR:	44	tung kjede variabelt domene, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEKV ID NR:	45	lett kjede variabelt domene, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

SEKV ID NR:	46	tung kjede CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEKV ID NR:	47	tung kjede CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEKV ID NR:	48	tung kjede CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEKV ID NR:	49	lett kjede CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEKV ID NR:	50	lett kjede CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEKV ID NR:	51	lett kjede CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEKV ID NR:	52	tung kjede variabelt domene, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEKV ID NR:	53	lett kjede variabelt domene, <ANG-2>Ang2i_LC06
SEKV ID NR:	54	tung kjede CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEKV ID NR:	55	tung kjede CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEKV ID NR:	56	tung kjede CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEKV ID NR:	57	lett kjede CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEKV ID NR:	58	lett kjede CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEKV ID NR:	59	lett kjede CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEKV ID NR:	60	tung kjede variabelt domene, <ANG-2>Ang2i_LC07
SEKV ID NR:	61	lett kjede variabelt domene, <ANG-2>Ang2i_LC07

SEKV ID NR:	62	tung kjede CDR3, <ANG-2>Ang2k_LC08
SEKV ID NR:	63	tung kjede CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEKV ID NR:	64	tung kjede CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEKV ID NR:	65	lett kjede CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEKV ID NR:	66	lett kjede CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEKV ID NR:	67	lett kjede CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEKV ID NR:	68	tung kjede variabelt domene, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEKV ID NR:	69	lett kjede variabelt domene, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEKV ID NR:	70	tung kjede CDR3, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEKV ID NR:	71	tung kjede CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEKV ID NR:	72	tung kjede CDR1, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEKV ID NR:	73	lett kjede CDR3, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEKV ID NR:	74	lett kjede CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEKV ID NR:	75	lett kjede CDR1, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEKV ID NR:	76	tung kjede variabelt domene, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEKV ID NR:	77	lett kjede variabelt domene, <ANG-2> Ang2s_LC09

SEKV ID NR:	78	tung kjede CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEKV ID NR:	79	tung kjede CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEKV ID NR:	80	tung kjede CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEKV ID NR:	81	lett kjede CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEKV ID NR:	82	lett kjede CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEKV ID NR:	83	lett kjede CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEKV ID NR:	84	tung kjede variabelt domene, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEKV ID NR:	85	lett kjede variabelt domene, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEKV ID NR:	86	tung kjede CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEKV ID NR:	87	tung kjede CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEKV ID NR:	88	tung kjede CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEKV ID NR:	89	lett kjede CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEKV ID NR:	90	lett kjede CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEKV ID NR:	91	lett kjede CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEKV ID NR:	92	tung kjede variabelt domene, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEKV ID NR:	93	lett kjede variabelt domene, <ANG-2> Ang2k_LC11

SEKV ID NR:	94	tung kjede CDR3, <VEGF>B20-4.1
SEKV ID NR:	95	tung kjede CDR2, <VEGF>B20-4.1
SEKV ID NR:	96	tung kjede CDR1, <VEGF>B20-4.1
SEKV ID NR:	97	lett kjede CDR3, <VEGF>B20-4.1
SEKV ID NR:	98	lett kjede CDR2, <VEGF>B20-4.1
SEKV ID NR:	99	lett kjede CDR1, <VEGF>B20-4.1
SEKV ID NR:	100	tung kjede variabelt domene, <VEGF>B20-4.1
SEKV ID NR:	101	lett kjede variabelt domene, <VEGF>B20-4.1
SEKV ID NR:	102	bevacizumab tung kjede Ang2i_LC06 scFv fusjonspeptid av <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC06
SEKV ID NR:	103	bevacizumab tung kjede Ang2i_LC08 scFv fusjonspeptid av <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC08
SEKV ID NR:	104	lett kjede av bevacizumab
SEKV ID NR:	105	Human vaskulær endotelvekstfaktor (VEGF)
SEKV ID NR:	106	Humant angiopoietin-2 (ANG-2)
SEKV ID NR:	107	Humant angiopoietin-1 (ANG-1)
SEKV ID NR:	108	Human Tie-2-reseptor
SEKV ID NR:	109	Tung kjede 1 av bispesifikt tetravalent enkeltkjede-Fab <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl scFAB-Avastin-LC06-2620

SEKV ID NR:	110	Lett kjede av bispesifikt tetravalent enkeltkjede-Fab <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl scFab-Avastin-LC06-2620
SEKV ID NR:	111	Tung kjede 1 av bispesifikt tetravalent enkeltkjede-Fab <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640
SEKV ID NR:	112	Lett kjede av bispesifikt tetravalent enkeltkjede-Fab <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640
SEKV ID NR:	113	Tung kjede 1 av bispesifikt tetravalent enkeltkjede-Fab <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641
SEKV ID NR:	114	Lett kjede av bispesifikt tetravalent enkeltkjede-Fab <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641
SEKV ID NR:	115	Tung kjede 1 av bispesifikt trivalent enkeltkjede-Fab <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-KiH-C-scFab
SEKV ID NR:	116	Tung kjede 2 av bispesifikt trivalent enkeltkjede-Fab <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-KiH-C-scFab
SEKV ID NR:	117	Lett kjede av bispesifikt trivalent enkeltkjede-Fab <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-KiH-C-scFab
SEKV ID NR:	118	Tung kjede 1 av bispesifikt trivalent <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-C-Fab-6CSS
SEKV ID NR:	119	Tung kjede 2 av bispesifikt trivalent <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-C-Fab-6CSS
SEKV ID NR:	120	Lett kjede av bispesifikt trivalent <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-C-Fab-6CSS
SEKV ID NR:	121	Tung kjede 1 av bispesifikt divalent domene-»utvekslede» <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-CH1-CL
SEKV ID NR:	122	Tung kjede 2 av bispesifikt bivalent domene-»utvekslede» <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-CH1-CL
SEKV ID NR:	123	Lett kjede 1 av bispesifikt divalent domene-»utvekslede» <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-CH1-CL
SEKV ID NR:	124	Lett kjede 2 av bispesifikt bivalent domene-»utvekslede» <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-CH1-CL
SEKV ID NR:	125	Tung kjede 1 av bispesifikt bivalent domene-»utvekslede» <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-VH-VL

SEKV ID NR:	126	Tung kjede 2 av bispesifikt bivalent domene-»utvekslede» <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-VH-VL
SEKV ID NR:	127	Lett kjede 1 av bispesifikt bivalent domene-»utvekslede» <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06- VH-VL
SEKV ID NR:	128	Lett kjede 2 av bispesifikt bivalent domene-»utvekslede» <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06- VH-VL
SEKV ID NR:	129	Tung kjede 1 av bispesifikt bivalent domene-»utvekslede» <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-VH-VL-SS
SEKV ID NR:	130	Tung kjede 2 av bispesifikt bivalent domene-»utvekslede» <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-VH-VL-SS
SEKV ID NR:	131	Lett kjede 1 av bispesifikt bivalent domene-»utvekslede» <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06- VH-VL-SS
SEKV ID NR:	132	Lett kjede 2 av bispesifikt bivalent domene-»utvekslede» <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06- VH-VL-SS
SEKV ID NR:	133	Tung kjede 1 av bispesifikt bivalent ScFab-Fc fusjon <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-N-scFab
SEKV ID NR:	134	Tung kjede 2 av bispesifikt bivalent ScFab-Fc fusjon <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-N-scFab
SEKV ID NR:	135	Tung kjede 1 av bispesifikt bivalent ScFab-Fc fusjon <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-N-scFabSS
SEKV ID NR:	136	Tung kjede 2 av bispesifikt bivalent ScFab-Fc fusjon <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-N-scFabSS

Følgende eksempler, sekvensliste og figurer er tilveiebragt for å hjelpe på forståelsen av foreliggende oppfinnelse, idet det sanne omfanget av denne er fremsatt i de vedlagte krav. Det skal forstås at modifikasjoner kan gjøres i prosedyrene fremsatt, uten å avvike fra oppfinnelsens ånd.

Beskrivelse av figurene.

Figur 1A: Skjematisk struktur av én tetravalent utførelsesform av et bispesifikt antistoff i henhold til oppfinnelsen som binder til VEGF og ANG-2, hvor ett av antigenene A eller B er VEGF, mens det andre er ANG-2. Fremstillingen er basert på et full-lengde antistoff som binder til antigen A, til hvilket to (eventuelt disulfid-

stabiliserte) enkeltkjede-Fv'er som binder til antigen B, er bundet via peptid-bindingsdelen.

Figur 1B: Skjematisk fremstilling av de frembragte bispesifikke tetravalente antistoffer ved anvendelse av TvAb-nomenklaturen (se eksemplene) – enten uten eller
5 med disulfid-stabilisering av scFv.

Figur 2A: Skjematisk fremstilling av disulfid-stabilisert <VEGF-ANG-2> bispesifikt tetravalent antistoff (= <VEGF-ANG-2> TvAb6; nr. 2331, se tabell 3).

Figur 2B: Plasmidkart over modifisert tung kjede og lett vektorene anvendt for ekspresjon av disulfid-stabilisert <VEGF-ANG-2> TvAb6.

Figur 3: SDS-PAGE av renset disulfid-stabilisert <VEGF-ANG-2> TvAb6
10 sammenlignet med "standard" humant IgG1-antistoff G6-31 (<VEGF> HuMab G6-31) under reduserende og ikke-reduserende betingelser.

Figur 4: Størrelseseksklusions-kromatografi av renset disulfid-stabilisert <VEGF-ANG-2> TvAb6 sammenlignet med «standard» humant IgG1-antistoff G6-31,
15 viser at disulfid-stabilisert TvAb6 ikke igjen danner aggregater etter rensing.

Figur 5: Skjematisk oversikt og resultater fra VEGF-bindings-ELISA. Disulfid-stabilisert <VEGF-ANG-2> TvAb6 binder til VEGF sammenlignbart med <VEGF> G6-31. <ANG-2> Mab536 binder seg ikke til VEGF.

Figur 6A: Skjematisk oversikt og resultater fra ANG-2-bindings-ELISA. Disulfid-stabilisert <VEGF-ANG-2> TvAb6 binder til ANG-2 sammenlignbart med
20 <ANG-2> Mab536. <VEGF> G6-31 binder seg ikke til ANG-2.

Figur 6B: Skjematisk oversikt og resultater fra ANG-2-bindingsanalyse ved hjelp av overflate-plasmonresonans (Biacore). Disulfid-stabilisert <VEGF-ANG-2> TvAb6 binder til ANG-2 med sammenlignbar affinitet som <ANG-2> Mab536.

Figur 7: Skjematisk oversikt og resultater fra VEGF-ANG-2-brodannende ELISA. Disulfid-stabilisert <VEGF-ANG-2> TvAb6 binder seg samtidig til VEGF og ANG-2, mens <VEGF> G6-31 og <ANG-2> Mab536 ikke er i stand til å binde seg samtidig til VEGF og ANG-2.

Figur 8a: Virkning av disulfid-stabilisert <VEGF-ANG-2> TvAb6
30 sammenlignet med <ANG-2> Mab536, <VEGF> G6-31 og kombinasjonen av Mab536 og G6-31 i den iscenesatte subkutane Colo205-xenotransplantatmodellen i Scid beige-mus (studie ANG2_Pz_Colo205_003).

Figur 8b: Virkning av disulfid-stabilisert <VEGF-ANG-2> TvAb6
35 sammenlignet med <ANG-2> Mab536, <VEGF> G6-31 og kombinasjonen av Mab536 og G6-31 i den iscenesatte subkutane Colo205-xenotransplantatmodellen i Scid beige-mus (studie ANG2_Pz_Colo205_005).

Figur 9: Blokkering av VEGF-indusert rørdannelse ved hjelp av det bispesifikke tetravalente antistoff <VEGF-ANG-2> TvAb6 - resultater.

Figur 10A + B: Blokkering av VEGF-indusert rørdannelse ved hjelp av det b-disulfid-stabiliserte <VEGF-ANG-2> TvAb6 - kvantitativ analyse.

5 Figur 11: Skjematisk oversikt over VEGF-bindingsanalyse ved hjelp av overflate-plasmonresonans (Biacore).

Figur 12: Kinetisk karakteristikk av de to <VEGF>-antistoffene <VEGF-Ang-2> TvAb6 og <VEGF> G6-31 i en Ka-Kd-plotting.

Figur 13: Skjematisk oversikt over overflate-plasmonresonans- (Biacore) analyse for å påvise samtidig binding av ANGPT2 og VEGF til bispesifikke antistoffer.

Figur 14: Resultater fra overflate-plasmonresonans- (Biacore) forsøk som viser at TvAb6 binder seg samtidig til ANGPT2 og VEGF.

Figur 15A + B: A) Skjematisk fremstilling av den bispesifikke og samtidige Biacore-bindingsanalysen av <VEGF-ANG-2> bispesifikke antistoffer. B) Biacore-data som viser samtidig binding av ANG-2 og VEGF til TvAb-2441-bevacicumab_LC06.

Figur 16A +B: Tie2-fosforylering av de bispesifikke antistoffene <VEGF-ANG-2>TvAb-2441-bevacizumab-LC06 og <VEGF-ANG-2>TvAb-2441, sammenlignet med anti-Ang2-antistoffene <ANG-2>Ang2i_LC06 og < ANG-2>Ang2k_LC08.

Figur 17: Skjematisk fremstilling av humant angiopoietin-interaksjons-ELISA.

Figur 18: VEGF-indusert HUVEC-proliferasjon av <VEGF-ANG-2>TvAb-2441-bevacizumab-LC06 og <VEGF-ANG-2>TvAb-2441-bevacizumab-LC08 og bevacizumab.

Figur 19: In vivo anti-angiogen virkning av bispesifikt antistoff <VEGF-ANG-2> bevacizumab-LC06-antistoff sammenlignet med <ANG-2> ANG2i-LC06, og kombinasjonen av <ANG-2> ANG2i-LC06 og Avastin (bevacizumab) i Calu3 xenotransplantatmodell overvåket via merket anti-CD31-antistoff og den relative endring av CD31-signal under terapi.

30 Forsøksprosedyre.

Eksempler.

Materialer og generelle metoder.

Generell informasjon vedrørende nukleotidsekvensene til humane immunoglobuliner lette og tunge kjeder er gitt i: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utg., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Aminosyrer i antistoffkjeder er nummerert og referert til i henhold til EU-nummerering (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63

(1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utg., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)).

Rekombinant DNA-teknikk.

5 Standard metoder ble anvendt til å manipulere DNA som beskrevet i Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. De molekylære biologiske reagensene ble anvendt i henhold til produsentens instruksjoner.

Gensyntese.

10 Ønskede gensegmenter ble fremstilt fra oligonukleotider dannet ved kjemisk syntese. Gensegmentene, som er flankert av singulære restriksjonsendonuklease-spaltningsseter, ble satt sammen ved hybridisering og ligering av oligonukleotider innbefattende PCR-amplifisering og påfølgende klonet via de indikerte restriksjons-
 15 setene, for eksempel KpnI/ SacI eller AscI/PacI, i en pPCRScripT- (Stratagene) basert pGA4-kloningsvektor. DNA-sekvensene til de subklonede genfragmentene ble bekreftet ved hjelp av DNA-sekvensering. Gensyntesefragmenter ble bestilt i henhold til gitte spesifikasjoner hos Geneart (Regensburg, Tyskland). Alle gensegmenter som koder for lette og tunge kjeder på Ang-2/VEGF-bispesifikke antistoffer ble syntetisert
 20 med en 5'-ende-DNA-sekvens som koder for et leder-peptid (MGWSCILFLVATATGVHS), som målsøker proteiner for sekresjon i eukaryote celler, og 5'-BamHI- og 3'-XbaI-restriksjonsseter. DNA-sekvenser som har disulfid-stabiliserte "knobs-into-hole"-modifiserte tunge kjeder ble designet med S354C- og T366W-mutasjoner i "knobs" tung kjeden og Y349C-, T366S-, L368A- og Y407V-mutasjoner i
 25 "hole" tung kjeden.

Bestemmelse av DNA-sekvens.

DNA-sekvenser ble bestemt ved hjelp av dobbelttråd-sekvensering utført hos MediGenomix GmbH (Martinsried, Tyskland) eller Sequiserve GmbH (Vaterstetten,
 30 Tyskland).

DNA- og proteinsekvensanalyse og sekvensdata-håndtering.

GCGs (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) programvarepakke version 10.2 og Infomax's Vector NT1 Advance suite version 8.0 ble anvendt for å
 35 skape, kartlegge, analysere, kommentere og illustrere sekvens.

Ekspresjonsvektorer (for eksempel 1) (referanse).

For ekspresjon av de beskrevne antistoffer ble varianter av ekspresjons-plasmider for transiente ekspresjons- (for eksempel i HEK293 EBNA eller HEK293-F) celler eller for stabil ekspresjon (for eksempel i CHO-celler) basert enten på en cDNA-organisering med en CMV-Intron A-promoter eller på en genomisk organisering med en CMV-promoter (for eksempel figur 2B) anvendt.

Ved siden av antistoff-ekspresjonskassetten inneholdt vektoren:

- en replikasjonsopprinnelse som tillater replikering av dette plasmidet i *E. coli*,
- og
- et β -laktamase-gen som tilfører ampicillinresistens i *E. coli*.

Transkripsjonsenheten i antistoffgenet er sammensatt av følgende elementer:

- unikt restriksjonssete(r) på 5'-enden,
- umiddelbar tidlig enhancer og promoter fra humant cytomegalovirus,
- fulgt av Intron A-sekvensen i tilfelle av cDNA-organisering,
- en 5'-utranslatert region av et humant antistoffgen,
- en immunglobulin tung kjede signalsekvens,
- humant antistoff-kjede (tung kjede, modifisert tung kjede eller lett kjede)

enten som cDNA eller som genomisk organisering med immunglobulin-ekson-intron-organisering,

- en 3' utranslatert region med en polyadenylerings-signalsekvens, og
- unikt restriksjonssete(r) på 3'-enden.

Fusjonsgenene som omfatter tung kjede-sekvensene til det valgte antistoffet og den C-terminale scFv-fusjon som beskrevet nedenfor, ble frembragt ved PCR og/eller gensyntese og satt sammen med kjente rekombinante metoder og teknikker ved å binde de tilsvarende nukleinsyresegmentene, for eksempel ved anvendelse av unike NsiI- og EcoRI-seter i de genomiske tung kjede-vektorene. De subklonede nukleinsyresekvensene ble bekreftet ved DNA-sekvensering. For transiente og stabile transfeksjoner ble større mengder av plasmidene fremstilt ved plasmid-fremstilling fra transformerte *E. coli*-kulturer (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Ekspresjonsvektorer (for eksempel 10-14).

Det ble anvendt en ekspresjonsvektor som bestod av følgende elementer:

- et hygromycin-resistensgen som seleksjonsmarkør,
- en replikasjonsopprinnelse, oriP, av Epstein-Barr-virus (EBV),

- en replikasjonsopprinnelse fra vektoren pUC18 som tillater replikering av dette plasmidet i E. coli,
- et beta-laktamase-gen som tilfører ampicillin-resistens i E. coli,
- immediate tidlig enhancer og promoter fra humant cytomegalovirus (HCMV),
- 5 - human 1-immunglobulin-polyadenylerings- ("poly A") signalsekvens, og
- unike BamHI- og XbaI-restriksjonssteder.

Immunglobulin-fusjonsgenene som omfatter de tunge eller lette kjede-konstruksjonene så vel som "knobs-into-hole"-konstruksjonene med C-terminale VH- og VL-domener, ble fremstilt ved gensyntese og klonet inn i pGA 18- (ampR) plasmidene som beskrevet. pG18- (ampR) plasmidene som har de syntetiserte DNA-segmentene og Roche-ekspresjonsvektoren ble fordøyd med BamHI- og XbaI-restriksjonsenzymer (Roche Molecular Biochemicals) og utsatt for agarose-gel-elektroforese. Rensede tung og lett kjede-kodende DNA-segmenter ble deretter ligert til det isolerte Roche-ekspresjonsvektor-BamHI/XbaI-fragmentet, noe som resulterte i de endelige ekspresjonsvektorene. De endelige ekspresjonsvektorene ble transformert inn i E. coli-celler, ekspresjonsplasmid-DNA ble isolert (Miniprep) og utsatt for restriksjonsenzym-analyse og DNA-sekvensering. Korrekte kloner ble dyrket i 150 ml LB-Amp-medium, plasmid-DNA ble igjen isolert (Maxiprep) og sekvens-integritet bekreftet ved DNA-sekvensering.

Celledyrkningsteknikker.

Standard celledyrkningsteknikker ble anvendt som beskrevet i Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. og Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc..

Transiente transfeksjoner i HEK293-F-system (for eksempel 1) (referanse).

Antistoffer ble frembragt ved hjelp av transient transfeksjon av de to plasmidene som koder for henholdsvis tung eller modifisert tung kjede, og den tilsvarende lette kjede ved anvendelse av HEK293-F-system (Invitrogen) i henhold til produsentens instruksjoner. Kort fortalt ble HEK293-F-celler (Invitrogen) som vokser i suspensjon enten i en rystekolbe eller i en omrørt fermentor i serumfritt FreeStyle 293-ekspresjonsmedium (Invitrogen), transfektert med en blanding av de to respektive ekspresjonsplasmider og 293fectin eller fectin (Invitrogen). For eksempel 2 liter rystekolbe (Corning) ble HEK293-F-celler podet i en tetthet på $1,0 \times 10^6$ celler/ml i 600 ml og inkubert ved 120 rpm, 8% CO₂. Dagen etter ble cellene transfektert i en celletetthet på ca. $1,5 \times 10^6$ celler/ml med ca. 42 ml blanding av A) 20

ml Opti-MEM (Invitrogen) med 600 µg totalt plasmid-DNA (1 µg/ml) som koder for henholdsvis tung eller modifisert tung kjede og den tilsvarende lette kjede i et ekvimolart forhold, og B) 20 ml Opti-MEM + 1.2 ml 293fectin eller 293fectin (2 µl/ml). I henhold til glukosekonsumpsjon ble glukoseløsning tilsatt under forløpet av fermenteringen. Supernatanten inneholdende det utskilte antistoff ble høstet etter 5-10 dager og antistoffer ble enten direkte rensset fra supernatanten eller supernatanten ble fryst og lagret.

Transiente transfeksjoner i HEK293-F-system (for eksempel 10-14).

Rekombinante immunglobulinvarianter ble uttrykt ved hjelp av transient transfeksjon av humane embryoniske nyre 293-F-celler ved anvendelse av FreeStyle™ 293 Expression System i henhold til produsentens instruksjoner (Invitrogen, USA). Kort fortalt ble suspensjon FreeStyle™ 293-F-celler dyrket i FreeStyle™ 293 Expression-medium ved 37°C/8 % CO₂ og cellene podet i friskt medium i en tetthet på 1-2x10⁶ levedyktige celler/ml på dagen for transfeksjon. DNA-293fectin™-komplekser ble fremstilt i Opti-MEM® I-medium (Invitrogen, USA) ved anvendelse av 325 µl 293fectin™ (Invitrogen, Tyskland) og 250 µg tung og lett kjede-plasmid-DNA i et molart forhold på 1:1 for et 250 ml endelig transfeksjonsvolum. "Knobs-into-hole" DNA-293fectin-komplekser med to tunge kjeder og én lett kjede ble fremstilt i Opti-MEM® I-medium (Invitrogen, USA) ved anvendelse av 325 µl 293fectin™ (Invitrogen, Tyskland) og 250 µg "Knobs-into-hole" tung kjede 1 og 2 og lett kjede-plasmid-DNA i et molart forhold på 1:1:2 for et 250 ml endelig transfeksjonsvolum. "Knobs-into-hole" DNA-293fectin-komplekser med to tunge kjeder ble fremstilt i Opti-MEM® I-medium (Invitrogen, USA) ved anvendelse av 325 µl 293fectin™ (Invitrogen, Tyskland) og 250 µg "Knobs-into-hole" tung kjede 1- og 2-DNA i et molart forhold på 1:1 for et 250 ml endelig transfeksjonsvolum. CrossMab DNA-293fectin-komplekser ble fremstilt i Opti-MEM® I-medium (Invitrogen, USA) ved anvendelse av 325 µl 293fectin™ (Invitrogen, Tyskland) og 250 µg "Knobs-into-hole" tung kjede 1 og 2 og lett kjede plasmid-DNA i et molart forhold på 1:1:1:1 for et 250 ml endelig transfeksjonsvolum. Antistoff-inneholdende cellekultur-supernatanter ble høstet 7 dager etter transfeksjon ved hjelp av sentrifugering ved 14000 g i 30 minutter og filtrert gjennom et sterilt filter (0,22 µm). Supernatanter ble lagret ved -20° C inntil rensing.

Proteinbestemmelse.

Proteinkonsentrasjonen av rensede antistoffer og derivater ble bestemt ved hjelp av bestemmelse av den optiske tettheten (OD) ved 280 nm, ved anvendelse av den molare ekstinksjonskoeffisienten beregnet på basis av aminosyresekvensen i
 5 henhold til Pace et. al., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423.

Bestemmelse av antistoffkonsentrasjon i supernatanter.

Konsentrasjonen av antistoffer og derivater i cellekultur-supernatanter ble anslått ved hjelp av immunpresipitasjon med Protein A Agarose-kuler (Roche). 60 µl
 10 Protein A Agarose-kuler blir vasket tre ganger i TBS-NP40 (50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40). Deretter blir 1-15 ml cellekultursupernatant påført Protein A Agarose-kulene pre-ekvilibrert i TBS-NP40. Etter inkubering i 1 t. ved romtemperatur blir kulene vasket på en Ultrafree-MC-filterkolonne (Amicon] én gang med 0,5 ml TBS-NP40, to ganger med 0,5 ml 2x fosfatbufret saltoppløsning (2xPBS,
 15 Roche) og kortvarig fire ganger med 0,5 ml 100 mM Na-citrat, pH 5,0. Bundet antistoff blir eluert ved tilsetning av 35 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer (Invitrogen). Halvparten av prøven blir henholdsvis slått sammen med NuPAGE® Sample Reducing Agent eller fikk være uredusert, og oppvarmet i 10 min. ved 70°C. Følgelig blir 20 µl påført en 4-12% NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen) (med MOPS-buffer for
 20 ikke-redusert SDS-PAGE og MES-buffer med NuPAGE® Antioxidant rennende buffer-additiv (Invitrogen) for redusert SDS-PAGE) og farget med Coomassie Blue.

Konsentrasjonen av antistoffer og derivater i cellekultur-supernatanter ble målt ved hjelp av Protein A-HPLC-kromatografi. Kort sagt ble cellekultur-supernatanter inneholdende antistoffer og derivater som binder til Protein A påført en HiTrap Protein
 25 A-kolonne (GE Healthcare) i 50 mM K₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH 7,3 og eluert fra matriksen med 550 mM eddiksyre, pH 2,5, på et Dionex HPLC-System. Det eluerte proteinet ble kvantifisert ved hjelp av UV-absorbans og integrasjon av topp-områder. Et rensset standard IgG1-antistoff tjente som standard.

Alternativt ble konsentrasjonen av antistoffer og derivater i cellekultur-supernatanter målt ved hjelp av Sandwich-IgG-ELISA. Kort fortalt ble StreptaWell
 30 High Bind Streptavidin A-96-brønners mikrotiterplater (Roche) belagt med 100 µl/brønn av biotinyllert anti-humant IgG-kapringsmolekyl F(ab')₂<h-Fcγ₁> BI (Dianova) i en mengde av 0,1 µg/ml i 1 t. ved romtemperatur eller alternativt over natten ved 4°C og deretter vasket tre ganger med 200 µl/brønn PBS, 0,05% Tween
 35 (PBST, Sigma). 100 µl/brønn av en fortyningsserie i PBS (Sigma) av de respektive antistoff-inneholdende cellekultur-supernatanter ble tilsatt til brønnene og inkubert i 1-2 t. på en mikrotiterplateryster ved romtemperatur. Brønnene ble vasket tre ganger

med 200 µl/brønn PBST og bundet antistoff ble påvist med 100 µl F(ab')₂<hFcγ₁>POD (Dianova) i en mengde av 0,1 µg/ml som påvisnings-antistoff i 1-2 t. på en mikrotiterplaterystør ved romtemperatur. Ubundet påvisnings-antistoff ble vasket bort tre ganger med 200 µl/brønn PBST og det bundne påvisnings-antistoffet ble påvist ved tilsetning av 100 µl ABTS/brønn. Bestemmelse av absorpsjon ble utført på et Tecan Fluor Spectrometer ved en målingsbølglengde på 405 nm (referansebølglengde 492 nm).

Proteinrensing.

Proteiner ble rensert fra filtrerte cellekultur-supernatanter i henhold til standard protokoller. Kort sagt ble antistoffer påført en Protein A Sepharose-kolonne (GE Healthcare) og vasket med PBS. Eluering av antistoffer ble oppnådd ved sur pH, fulgt av umiddelbar nøytralisering av prøven. Aggregert protein ble adskilt fra monomere antistoffer ved hjelp av størrelseseksklusjons-kromatografi (Superdex 200, GE Healthcare) i 20 mM Histidine, 140 mM NaCl, pH 6,0. Fraksjoner av monomert antistoff ble samlet, konsentrert om nødvendig ved anvendelse av for eksempel en MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO) sentrifugekonsentrator og lagret ved -80 °C. En del av prøvene ble tilveiebragt for påfølgende proteinanalyse og analytisk karakterisering for eksempel ved hjelp av SDS-PAGE, størrelseseksklusjons-kromatografi, massespektrometri og endotoksinbestemmelse (se figurer 3 og 4).

SDS-PAGE.

NuPAGE® Pre-Cast-gel-systemet (Invitrogen) ble anvendt i henhold til produsentens instruksjoner. Spesielt ble 4-20 % NuPAGE® Novex® TRIS-Glycine Pre-Cast-geler og en Novex® TRIS-Glycine SDS rennende buffer anvendt. (Se for eksempel figur 3). Redusering av prøver ble oppnådd ved tilsetning av NuPAGE®-prøve-reduserende middel før gelen fikk renne.

Analytisk størrelseseksklusjons-kromatografi.

Størrelseseksklusjons-kromatografi for bestemmelse av aggregering og den oligomere tilstanden til antistoffer ble utført ved hjelp av HPLC-kromatografi. Kort fortalt ble Protein A-rensede antistoffer påført en Tosoh TSKgel G3000SW-kolonne i 300 mM NaCl, 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,5, på et Agilent HPLC 1100-system eller på en Superdex 200-kolonne (GE Healthcare) i 2 x PBS på et Dionex HPLC-System. Det eluerte proteinet ble kvantifisert ved hjelp av UV-absorpsjon og integrering av toppområder. BioRad Gel Filtration Standard 151-1901 tjente som standard. (Se for eksempel figur 4).

Massespektrometri.

Den totale deglykosylerte masse av kryssover-antistoffer ble bestemt og bekreftet via elektropray-ioniserings-massespektrometri (ESI-MS). Kort fortalt ble 100 µg rensede antistoffer deglykosylert med 50 mU N-Glycosidase F (PNGaseF, ProZyme) i 100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7, ved 37°C i 12-24 t. ved en proteinkonsentrasjon på opptil 2 mg/ml og deretter avsaltet via HPLC på en Sephadex G25-kolonne (GE Healthcare). Massen til de respektive tunge og lette kjeder ble bestemt ved hjelp av ESI-MS etter deglykosylering og reduksjon. Kort fortalt ble 50 µg antistoff i 115 µl inkubert med 60 µl 1M TCEP og 50 µl 8 M Guanidine-hydroklorid, deretter avsaltet. Den totale masse og massen av de reduserte tunge og lette kjeder ble bestemt via ESI-MS på et Q-Star Elite MS-system utstyrt med en NanoMate-kilde.

VEGF-bindings-ELISA.

Bindingsegenskapene til de tetravalente antistoffene (TvAb) ble evaluert i en ELISA-analyse med full-lengde VEGF165-His-protein (R&D Systems) (figur 5). For dette formål ble klare, forsterkede Falcon-polystyren-mikrotiterplater belagt med 100 µl 2 µg/ml rekombinant human VEGF165 (R&D Systems) i PBS i 2 t. ved romtemperatur eller over natten ved 4 °C. Brønnene ble vasket tre ganger med 300 µl PBST (0,2% Tween 20) og blokkert med 200 µl 2% BSA 0,1% Tween 20 i 30 min. ved romtemperatur og deretter vasket tre ganger med 300 µl PBST. 100 µl/brønn av en fortyningsserie (40 pM-0,01 pM) av rensed <VEGF-ANG-2> TvAb, og som referanse det humane anti-ANG-2 antistoff <ANG-2>-antistoff Mab536 (Oliner et al., Cancer Cell. 2004 Nov;6(5):507-16, US 2006/0122370) og anti-VEGF-antistoff <VEGF>-antistoff G6-31 (Liang et al., J Biol Chem. 2006 Jan 13;281(2):951-61; US 2007/0141065) i PBS (Sigma) ble tilsatt til brønnene og inkubert i 1 t. på en mikrotiterplateryster ved romtemperatur. Brønnene ble vasket tre ganger med 300 µl PBST (0,2% Tween 20) og bundet antistoff ble påvist med 100 µl/brønn 0,1 µg/ml F(ab') <hFcγ₃>POD (Immuno research) i 2% BSA 0,1% Tween 20 som påvisningsantistoff i 1 t. på en mikrotiterplateryster ved romtemperatur. Ubundet påvisningsantistoff ble vasket bort tre ganger med 300 µl/brønn PBST og det bundne påvisningsantistoff ble påvist ved tilsetning av 100 µl ABTS/brønn. Bestemmelse av absorbans ble utført på et Tecan Fluor Spectrometer ved en målingsbølgelengde på 405 nm (referansebølgelengde 492 nm).

VEGF-binding: Kinetisk karakterisering av VEGF-binding ved 37°C ved hjelp av overflate-plasmonresonans (Biacore).

For ytterligere å understøtte ELISA-funnen ble bindingen av <VEGF>-antistoffer G6-31 eller Avastin og <VEGF-Ang-2> TvAb6 eller TvAb-2441-bevacizumab-LC06 eller TvAb-2441-bevacizumab-LC08 til VEGF kvantitativt analysert ved anvendelse av overflate-plasmonresonans-teknologi på et Biacore T100 instrument i henhold til følgende protokoll og analysert ved anvendelse av T100-programvarepakken: Kort fortalt ble <VEGF>-antistoffer kapret på en CM5-Chip via binding til et geit anti humant IgG (JIR 109-005-098). Kapringsantistoffet ble immobilisert ved aminkobling ved anvendelse av standard aminkobling som følger: HBS-N-buffer tjente som rennende buffer, aktivering ble utført ved å blande EDC/NHS med en ligandtetthet på 700 RU som mål. Kaprings-antistoffet ble fortynnet i koblingsbuffer NaAc, pH 5,0, c = 2 µg/ml, til slutt ble fremdeles aktiverte karboksylgrupper blokkert ved injeksjon av 1 M etanolamin. Binding av Mabs <VEGF>-antistoffer ble utført ved en strømning på 5 µl/min. og c(Mabs<VEGF>) = 10 nM, fortynnet med rennende buffer + 1 mg/ml BSA; et bindingsnivå på tilnærmet 30 RU burde nås. rhVEGF (rhVEGF, R&D-Systems Cat.-No, 293-VE) ble anvendt som analytt. Den kinetiske karakteriseringen av VEGF-binding til <VEGF>-antistoffer ble utført ved 37°C i PBS + 0,005 % (volum) Tween20 som rennende buffer. Prøven ble injisert med en strømning på 50 µl/min. og en assosiasjonstid på 80 sek. og en dissosiasjonstid på 1200 sek. med en konsentrasjonsserie av rhVEGF fra 300–0,29 nM. Regenerering av fritt kapringsantistoff-overflate ble utført med 10 mM Glycin, pH 1,5, og en kontaktid på 60 sek. etter hver analytt-syklus. Kinetiske konstanter ble beregnet ved anvendelse av den vanlige dobbel referanse-metoden (kontrollreferanse: binding av rhVEGF til kapringsmolekyl geit anti humant IgG, blindprøver på måle-flow cellen, rhVEGF-konsentrasjon "0", Model: Langmuir-binding 1:1, (Rmaks. satt til lokal på grunn av kapringsmolekylbinding). Figur 11 er en skjematisk oversikt over Biacore-analysen.

ANG-2-bindings-ELISA.

Bindingsegenskapene til de tetravalente antistoffene (TvAb) ble evaluert i en ELISA-analyse med full-lengde angiopoietin-2-His-protein (R&D Systems) (figur 6a). For dette formål ble klare, forsterkede Falcon-polystyrenmikrotiterplater belagt med 100 µl 1 µg/ml rekombinant humant angiopoietin-2 (R&D Systems, bærer-fri) i PBS i 2 timer ved romtemperatur eller over natten ved 4°C. Brønnene ble vasket tre ganger med 300 µl PBST (0,2% Tween 20) og blokkert med 200 µl 2% BSA 0,1% Tween 20 i 30 min. ved romtemperatur og deretter vasket tre ganger med 300 µl PBST. 100

5 µl/brønn av en fortyningsserie (40pM-0,01 pM) av rensset <VEGF-ANG-2> TvAb, og
 som referanse ble <ANG-2>-antistoff Mab536 og VEGF>-antistoff G6-31 i PBS
 (Sigma) tilsatt til brønnene og inkubert i 1 t. på en mikrotiterplateryst ved
 romtemperatur. Brønnene ble vasket tre ganger med 300 µl PBST (0,2% Tween 20)
 5 og bundet antistoff ble påvist med 100 µl/brønn 0,1 µg/ml F(ab') <hk>POD (Biozol
 Cat.No. 206005) i 2% BSA 0,1% Tween 20 som påvisnings-antistoff i 1 t. på en
 mikrotiterplateryst ved romtemperatur. Ubundet påvisnings-antistoff ble vasket bort
 tre ganger med 300 µl/brønn PBST og det bundne påvisnings-antistoff ble påvist ved
 tilsetning av 100 µl ABTS/brønn. Bestemmelse av absorbans ble utført på et Tecan
 10 Fluor Spectrometer ved en målingsbølgelengde på 405 nm (referansebølgelengde 492
 nm).

Sammenlignende binding til ANG-1 og ANG-2 (ANG-1- og ANG-2-bindings- ELISA).

15 Bindingsegenskapene til antistoffer ble evaluert i en ELISA-analyse med full-
 lengde angiopoietin-2-His-protein (R&D Systems #623-AN/CF eller materiale
 produsert på stedet) eller angiopoietin-1-His (R&D systems #923-AN). For dette ble
 96-brønns plater (klare, forsterkede Falcon-polystyrenmikrotiterplater eller Nunc
 Maxisorb) belagt med 100 µl 1 µg/ml rekombinant humant angiopoietin-1 eller
 20 angiopoietin-2 (bærer-fri) i PBS (Sigma) i 2 t. ved romtemperatur eller over natten
 ved 4°C. Brønnene ble vasket tre ganger med 300 µl PBST (0,2% Tween 20) og
 blokkert med 200 µl 2% BSA 0,1% Tween 20 i 30 min. ved romtemperatur og
 deretter vasket tre ganger med 300 µl PBST. 100 µl/brønn av en fortyningsserie
 (40pM-0,01 pM) av rensset test-antistoff i PBS ble tilsatt brønnene og inkubert i 1 t. på
 25 en mikrotiterplateryst ved romtemperatur. Brønnene ble vasket tre ganger med 300
 µl PBST (0,2% Tween 20) og bundet antistoff ble påvist med 100 µl/brønn 0,1 µg/ml
 F(ab') <hk>POD (Biozol Cat.No. 206005) i 2% BSA 0,1% Tween 20 som påvisnings-
 antistoff i 1 t. på en mikrotiterplateryst ved romtemperatur. Ubundet påvisnings-
 antistoff ble vasket bort tre ganger med 300 µl/brønn PBST og det bundne påvisnings-
 30 antistoff ble påvist ved tilsetning av 100 µl ABTS/brønn. Bestemmelse av absorbans
 ble utført på et Tecan Fluor Spectrometer ved en målingsbølgelengde på 405 nm
 (referansebølgelengde 492 nm).

ANG-2-bindings-BIACORE.

35 Binding av antistoffene til antigenet, for eksempel humant ANG-2, ble
 undersøkt ved hjelp av overflate-plasmonresonans ved anvendelse av et BIACORE
 T100-instrument (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sverige). Kort fortalt ble,

for affinitetsmålinger, polyklonale geit<hIgG-Fcgamma>-antistoffer immobilisert på en CM5-chip via aminkobling for presentasjon av antistoffene mot humant ANG-2 (figur 6B). Binding ble målt i HBS-buffer (HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% Tween 20, pH 7,4), 25°C. Renset ANG-2-His (R&D systems eller rensset på stedet) ble

5 tilsatt i varierende konsentrasjoner mellom 6,25 nM og 200 nM i løsning. Assosiasjon ble målt ved hjelp av en ANG-2-injeksjon på 3 minutter; dissosiasjon ble målt ved hjelp av vasking av chip-overflaten med HBS-buffer i 3 minutter og en KD-verdi ble anslått ved anvendelse av en 1:1 Langmuir-bindingsmodell. På grunn av heterogenitet hos ANG-2-preparatet kunne ingen 1:1-binding observeres; KD-verdier er således kun

10 relative anslag. Negative kontrolldata (for eksempel bufferkurver) ble subtrahert fra prøvekurver for korrigerende av systemets iboende grunnlinjeavvik og for støysignal-reduksjon. Biacore T100 Evaluation Software version 1.1.1 ble anvendt for analyse av sensorgrammer og for beregning av affinitetsdata. Alternativt kunne Ang-2 bindes med et bindingsnivå på 2000-1700 RU via et PentaHisAntibody (PentaHis-Ab BSA-fri,

15 Qiagen No. 34660) som ble immobilisert på en CM5-chip via aminkobling (BSA-fri) (se nedenfor).

Hemming av huANG-2-binding til Tie-2 (ELISA).

Interaksjons-ELISA ble utført på 384-brønners mikrotiterplater (MicroCoat, DE, Cat.No. 464718) ved RT. Etter hvert inkuberingsstrinn ble platene vasket 3 ganger med

20 PBST. ELISA-plater ble belagt med 0,5 µg/ml Tie-2-protein (R&D Systems, UK, Cat.No.313-TI) i minst 2 timer (t.). Deretter ble brønnene blokkert med PBS supplert med 0,2% Tween-20 og 2% BSA (Roche Diagnostics GmbH, DE) i 1 t. Fortynninger av rensede antistoffer i PBS ble inkubert sammen med 0,2 µg/ml huAngiopoietin-2 (R&D

25 Systems, UK, Cat.No. 623-AN) i 1 t. ved RT. Etter vasking ble en blanding av 0,5 µg/ml biotinyllert anti-Angiopoietin-2 klon BAM0981 (R&D Systems, UK) og 1:3000 fortynnet streptavidin HRP (Roche Diagnostics GmbH, DE, Cat.No.11089153001) tilsatt i 1 time. Deretter ble platene vasket 6 ganger med PBST. Plater ble utviklet med friskt fremstilt ABTS-reagens (Roche Diagnostics GmbH, DE, buffer #204 530

30 001, tabletter #11 112 422 001) i 30 minutter ved RT. Absorbans ble målt ved 405 nm.

ANG-2-VEGF-brodannende ELISA.

Bindingsegenskapene til de tetravalente antistoffene (TvAb) ble evaluert i en

35 ELISA-analyse med immobilisert full-lengde VEGF165-His-protein (R&D Systems) og humant ANG-2-His-protein (R&D Systems) for påvisning av bundet bispesifikt antistoff (figur 7). Kun et bispesifikt <VEGF-ANG-2> TvAb er i stand til å binde seg samtidig til

VEGF og ANG-2 og således danne bro til de to antigenene, mens monospesifikke "standard" IgG1-antistoffer ikke skulle være i stand til samtidig å binde seg til VEGF og ANG-2 (figur 7).

For dette formål ble klare, forsterkede Falcon-polystyrenmikrotiterplater belagt med 100 µl 2 µg/ml rekombinant human VEGF165 (R&D Systems) i PBS i 2 t. ved romtemperatur eller over natten ved 4°C. Brønnene ble vasket tre ganger med 300 µl PBST (0,2% Tween 20) og blokkert med 200 µl 2% BSA 0,1% Tween 20 i 30 min. ved romtemperatur og deretter vasket tre ganger med 300 µl PBST. 100 µl/brønn av en fortynningsserie (40pM-0,01 pM) av renset <VEGF-ANG-2> TvAb og som referanse <ANG-2>-antistoff Mab536 og VEGF>-antistoff G6-31 i PBS (Sigma) ble tilsatt til brønnene og inkubert i 1 time på en mikrotiterplateryster ved romtemperatur. Brønnene ble vasket tre ganger med 300 µl PBST (0,2% Tween 20) og bundet antistoff ble påvist ved tilsetning av 100 µl 0,5 µg/ml humant ANG-2-His (R&D Systems) i PBS. Brønnene ble vasket tre ganger med 300 µl PBST (0,2% Tween 20) og bundet ANG-2 ble påvist med 100 µl 0,5 µg/ml <ANG-2>mIgG1-Biotin-antistoff (BAM0981, R&D Systems) i 1 t. ved romtemperatur. Ubundet påvisningsantistoff ble vasket bort med tre ganger 300 µl PBST (0,2% Tween 20) og bundet antistoff ble påvist ved tilsetning av 100 µl 1:2000 Streptavidin-POD-konjugat (Roche Diagnostics GmbH, Cat. No.11089153) fortynnet 1:4 i blokkeringsbuffer i 1 t. ved romtemperatur. Ubundet Streptavidin-POD-konjugat ble vasket bort med tre-seks ganger 300 µl PBST (0,2% Tween 20) og bundet Streptavidin-POD-konjugat ble påvist ved tilsetning av 100 µl ABTS/brønn. Bestemmelse av absorbans ble utført på et Tecan Fluor Spectrometer ved en målingsbølgelengde på 405 nm (referansebølgelengde 492 nm).

25 Demonstrasjon av samtidig binding av bispesifikt tetraivalent antistoff <VEGF-Ang-2> TvAb6 til VEGF-A og Ang-2 ved hjelp av Biacore.

For ytterligere å understøtte dataene fra den brodannende ELISA ble det i tillegg gjort en analyse for å bekrefte samtidig binding til VEGF og Ang-2 ved anvendelse av overflate-plasmonresonans-teknologi på et Biacore T100-instrument i henhold til følgende protokoll og analysert ved anvendelse av T100-programvarepakke (T100 Control, Version 2.01, T100 Evaluation, Version 2.01, T100 Kinetics Summary, Version 1.01): Ang-2 ble bundet med et bindingsnivå på 2000-1700 RU i PBS, 0,005 % (volum) Tween20 rennende buffer via et PentaHisAntibody (PentaHis-Ab BSA-free, Qiagen No. 34660) som ble immobilisert på en CM5-chip via aminkobling (BSA-free). HBS-N-buffer tjente som rennende buffer under kobling, aktivering ble utført ved å blande EDC/NHS. PentaHis-Ab BSA-free Capture-Antibody ble fortynnet i koblingsbuffer NaAc, pH 4,5, c = 30 µg/ml, til slutt ble fremdeles aktiverte karboksylgrupper

blokkert ved injeksjon av 1 M etanolamin; ligand-tetthet på 5000 og 17000 RU ble testet. Ang-2 med en konsentrasjon på 500 nM ble bundet av PentaHis-Ab ved en strømning på 5 µl/min. fortynnet med rennende buffer + 1 mg/ml BSA. Deretter ble <Ang-2, VEGF> bispesifikt antistoff-binding til Ang-2 og til VEGF vist ved inkubering med rhVEGF og dannelse av et sandwich-kompleks. For dette formål ble bispesifikt <VEGF-Ang-2> TvAb6 bundet til Ang-2 ved en strømning på 50 µl/min. og en konsentrasjon på 100 nM, fortynnet med rennende buffer + 1 mg/ml BSA, og samtidig binding ble påvist ved inkubering med VEGF (rhVEGF, R&D-Systems Cat.-No, 293-VE) i PBS + 0,005 % (volum) Tween20 rennende buffer ved en strømning på 50 µl/min. og en VEGF-konsentrasjon på 150 nM. Assosiasjonstid 120 sek., disosiasjonstid 1200 sek. Regenerering ble gjort etter hver syklus ved en strømning på 50 µl/min. med 2 x 10 mM Glycin, pH 2,0, og en kontakttid på 60 sek. Sensorgrammer ble korrigert ved anvendelse av den vanlige dobbel-referanse (kontrollreferanse: binding av bispesifikt antistoff og rhVEGF til kapringsmolekyl PentaHisAb). Blindprøver for hvert Ab ble målt med rhVEGF-konsentrasjon "0". En skjematisk fremstilling av Biacore-analysen er vist på figur 13. Et alternativt Biacore-analyseformat er vist på figur 15.

Generering av HEK293-Tie2-cellelinje.

For å bestemme interferensen til angiopoietin-2-antistoffer med ANGPT2-stimulert Tie2-fosforylering og binding av ANGPT2 til Tie2 på celler, ble en rekombinant HEK293-Tie2-cellelinje generert. Kort fortalt ble et pcDNA3-basert plasmid (RB22-pcDNA3 Topo hTie2) som koder for full-lengde human Tie2 (SEKV ID 108) under kontroll av en CMV-promoter og en Neomycin-resistensmarkør transfektert ved anvendelse av Eugene (Roche Applied Science) som transfeksjonsreagens inn i HEK293-celler (ATCC) og resistente celler ble utvalgt i DMEM 10 % FCS, 500 µg/ml G418. Individuelle kloner ble isolert via en kloningssylinder og deretter analysert med tanke på Tie2-ekspresjon ved hjelp av FACS. Klon 22 ble identifisert som klon med høy og stabil Tie2-ekspresjon, selv i fravær av G418 (HEK293-Tie2 clone22). HEK293-Tie2 clone22 ble deretter anvendt for cellulære analyser: ANGPT2-indusert Tie2-fosforylering og ANGPT2 cellulær ligand-bindingsanalyse.

ANGPT2-indusert Tie2-fosforyleringsanalyse.

Hemming av ANGPT2-indusert Tie2-fosforylering ved hjelp av ANGPT2-antistoffer ble målt i henhold til følgende analyseprinsipp. HEK293-Tie2 klon22 ble stimulert med ANGPT2 i 5 minutter i fravær eller nærvær av ANGPT2-antistoff og P-Tie2 ble kvantifisert ved hjelp av sandwich-ELISA. Kort fortalt ble 2x10⁵ HEK293-Tie2 klon 22-celler pr. brønn dyrket over natten på en Poly-D-Lysin-belagt 96-brønns

mikrotiterplate i 100 µl DMEM, 10% FCS, 500 µg/ml Geneticin. Neste dag ble en titreringsrekke av ANGPT2-antistoffer fremstilt i en mikrotiterplate (4 ganger konsentrert, 75 µl endelig volum/brønn, duplikater) og blandet med 75 µl av en ANGPT2- (R&D systems # 623-AN] fortynning (3,2 µg/ml som 4 ganger konsentrert
 5 løsning). Antistoffer og ANGPT2 ble forhåndsinkubert i 15 min. ved romtemperatur. 100 µl av blandingen ble tilsatt til HEK293-Tie2 clone 22-cellene (forhåndsinkubert i 5 min. med 1 mM NaV3O4, Sigma #S6508) og inkubert i 5 min. ved 37°C. Deretter ble celler vasket med 200 µl iskald PBS + 1mM NaV3O4 pr. brønn og lyset ved tilsetning av 120 µl lysebuffer (20 mM Tris, pH 8,0, 137 mM NaCl, 1% NP-40, 10% glycerol, 2
 10 mM EDTA, 1 mM NaV3O4, 1 mM PMSF og 10 µg/ml Aprotinin) pr. brønn på is. Celler ble lyset i 30 min. ved 4°C på en mikrotiterplateryster og 100 µl lysat overført direkte til en p-Tie2 ELISA-mikrotiterplate (R&D Systems, R&D #DY990) uten forutgående sentrifugering og uten bestemmelse av totalt protein. P-Tie2-mengdene ble kvantifisert i henhold til produsentens instruksjoner og IC50-verdier for hemming ble
 15 bestemt ved anvendelse av XLfit4-analyse «plug-in» for Excel (Dose-respons ett sete, modell 205). IC50-verdier kan sammenlignes innen forsøket, men kan variere fra forsøk til forsøk.

VEGF-indusert HUVEC-proliferasjonsanalyse.

20 VEGF-indusert HUVEC- (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, Promocell #C-12200) proliferasjon ble valgt for å måle den cellulære funksjonen til VEGF-antistoffer. Kort fortalt ble 5000 HUVEC-celler (lavt passasjeantall, ≤ 5 passasjer) pr. 96 brønner inkubert i 100 µl sultemedium (EBM-2 Endothelial basal medium 2, Promocell # C-22211, 0,5% FCS, Penicillin/Streptomycin) i en kollagen 1-belagt BD Biocoat Collagen
 25 I 96-brønners mikrotiterplate (BD #354407 / 35640 over natten. Varierende konsentrasjoner av antistoff ble blandet med rhVEGF (30 ngl/ml endelig konsentrasjon, BD # 354107) og forhåndsinkubert i 15 minutter ved romtemperatur. Deretter ble blandingen tilsatt HUVEC-cellene og de ble inkubert i 72 t. ved 37°C, 5% CO2. På dagen for analyse ble platen likevektsinnstilt til romtemperatur i 30 min. og celle-
 30 levedyktighet/proliferasjon ble bestemt ved anvendelse av CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay-settet i henhold til manualen (Promega, # G7571/2/3). Luminescens ble bestemt med et spektrofotometer.

Design av tetravalente bispesifikke og tetravalente monospesifikke antistoffer (referanse).

De bispesifikke antistoffene som binder til VEGF (VEGF-A) og ANG-2 (Angiopoietin-2) omfatter et første antigenbindingssete som binder til VEGF og et
 5 andre antigenbindingssete som binder til ANG-2. Som første antigenbindingssete som binder til VEGF, kan for eksempel tung kjede variabelt domene SEKV ID NR: 23 og lett kjede variable domener SEKV ID NR: 24, som begge er avledet fra human fag-display-avledet anti-VEGF-antistoff G6-31, som er beskrevet i detalj i Liang, W.C., et al., J Biol Chem. 281(2) (2006) 951-61 og i US 2007/0141065, anvendes. Alternativt omfatter
 10 for eksempel det andre antigenbindingssetet som spesifikt binder til VEGF tung kjede variable domener SEKV ID NR: 7 eller SEKV ID NR: 100, og lett kjede variable domener SEKV ID NR: 8 eller SEKV ID NR: 101 fra anti-VEGF-antistoffene <VEGF>bevacizumab og <VEGF>B20-4.1., fortrinnsvis fra <VEGF>bevacizumab.

Som andre antigenbindingssete kan tung kjede variabelt domenet SEKV ID NR: 31 og lett kjede variable domener SEKV ID NR: 32 eller SEKV ID NR: 32 med
 15 mutasjonene T92L, H93Q og W94T (Kabat-nummerering), som begge er avledet fra humant anti-ANG-2-antistoff <ANG-2> Mab536 som er beskrevet i detalj i Oliner, J., et al., Cancer Cell. 6(5) (2004) 507-16 og i US 2006/0122370, anvendes. Alternativt omfatter for eksempel det andre antigenbindingssetet som spesifikt binder til ANG-2
 20 tung kjede variable domener SEKV ID NR: 44, SEKV ID NR: 52, SEKV ID NR: 60, SEKV ID NR: 68, SEKV ID NR: 76, SEKV ID NR: 84 eller SEKV ID NR: 92, og lett kjede variable domener SEKV ID NR: 45, SEKV ID NR: 53, SEKV ID NR: 61, SEKV ID NR: 69, SEKV ID NR: 77, SEKV ID NR: 85, SEKV ID NR: 93 fra anti-ANG-2-antistoffene <ANG-2> Ang2s_R3_LC03, <ANG-2>Ang2i_LC06, <ANG-2>Ang2i_LC07, <ANG-2>
 25 Ang2k_LC08, <ANG-2> Ang2s_LC09, <ANG-2> Ang2i_LC10, eller <ANG-2> Ang2k_LC11, fortrinnsvis fra <ANG-2>Ang2i_LC06, eller <ANG-2> Ang2k_LC08.

For å frembringe midler som kombinerer trekk fra begge antistoffer, ble nye tetravalente bispesifikke antistoff-avledede proteinheter konstruert. I disse molekylerne blir rekombinant enkelt-kjede-bindingsmolekyler av ett antistoff bundet
 30 via rekombinant proteinfusjonsteknologi til det andre antistoffet som ble beholdt i formatet av full-lengde IgG1. Dette andre antistoffet har den ønskede andre bindingsspesifisiteten.

Ved hjelp av gensyntese og rekombinant molekylær biologiteknikk, ble tung kjede variabelt domene (VH) og lett kjede variabelt domene (VL) på det respektive
 35 antistoff bundet ved hjelp av en glycinserin (G4S)₃ eller (G4S)₄ enkelt-kjede-bindingsdel for å gi et enkeltkjede-Fv (scFv), som ble tilknyttet C- terminus på den andre antistoff tung kjede ved anvendelse av en (G)₆- eller (G4S)₃-bindingsdel.

I tillegg ble cysteinrester innført i VH- (innbefattende Kabat-posisjon 44) og VL- (innbefattende Kabat-posisjon 100) domenet på det scFv som binder til ANG-2 eller VEGF, som beskrevet tidligere (for eksempel WO 94/029350; Reiter, Y., et al., Nature biotechnology (1996) 1239-1245; Young, N.M., et al, FEBS Letters (1995) 135-139; eller Rajagopal, V., et al., Protein Engineering (1997) 1453-59).

Alle disse molekylene ble rekombinant produsert, rensset og karakterisert og proteinekspresjon, stabilitet og biologisk aktivitet ble evaluert.

En oppsummering av de bispesifikke antistoff-design som ble anvendt for å frembringe tetravalente bispesifikke <VEGF-ANG-2>, <ANG-2-VEGF>-antistoffer og tetravalente monospesifikke <ANG-2>-antistoffer, er gitt i tabell 3. For denne studien anvender vi betegnelsen 'TvAb' for å beskrive de forskjellige tetravalente protein-enhetene.

For å oppnå de bispesifikke tetravalente antistoffer <VEGF-ANG-2> TvAb5 og TvAb6 ble enkeltkjede-Fv (scFv) som binder til angiopoietin-2 avledet fra tung kjede variabelt domene (VH) med SEKV ID NR: 31, og lett kjede variabelt domene (VL) med SEKV ID NR: 32 med mutasjonene T92L, H93Q og W94T avledet fra humant anti-ANG-2-antistoff <ANG-2> Mab536 fusjonert til sekvensen som tilsvarende C-terminus på tung kjede-vektoren til humant anti-VEGF-antistoff <VEGF> G6-31 med SEKV ID NR: 23 og samtidig uttrykt med den respektive lett kjede ekspresjonsvektoren basert på SEKV ID NR: 24. En fremstilling av de designede formatene er vist på figur 1B og listet opp i tabell 3.

For å oppnå de bispesifikke tetravalente antistoffer TvAb9 og TvAb15 ble enkeltkjede-Fv (scFv) som binder til VEGF avledet fra tung kjede variabelt domene (VH) med SEKV ID NR: 23 og lett kjede variabelt domene (VL) med SEKV ID NR: 24, avledet fra humant anti-VEGF-antistoff <VEGF> G6-31 fusjonert til sekvensen som tilsvarende C-terminus på tung kjede-vektoren til humant anti-ANG-2 antistoff <ANG-2> Mab536 med SEKV ID NR: 31 og samtidig uttrykt med den respektive lett kjede ekspresjonsvektoren basert på SEKV ID NR: 32. En fremstilling av de designede formatene er vist på figur 1B og listet opp i tabell 3.

Tabell 3 – De forskjellige bispesifikke tetravalente antistoff-formatene med C-terminal scFv-tilknytning og den tilsvarende TvAb-nomenklatur. En "-" i tabellen betyr "ikke til stede".

Molekylnavn (TvAb-nomenklatur for bispesifikke antistoffer)	Antistoff- rygggrad avledet fra	scFv av- ledet fra	Variable domener VH og VL: SEQ ID NO :	Posisjon til scfv til- knyttet antistoff	Enkelt- kjede- bindings- del	Peptid- bindings- del	scFv disulfid VH44/ VL100 stabilisert
G6=31 (1000)	<VEGF> G6-31	-	23 + 24	-	-	-	-
Mab536 (1000)	<ANG-2> Mab536	-	31 + 32	-	-	-	-
bevacizumab	<VEGF> bevacizu mab	-	23 + 24	-	-	-	-
Ang2i_LC06 (LC06)	<ANG- 2>Ang2i_ LC06	-	52 + 53	-	-	-	-
Ang2k_LC06 (LC08)	<ANG- 2>Ang2k LC08	-	68 + 69				
TvAb5 (2310)	<VEGF> G6-31	<ANG- 2> Mab53 6	23 + 24, 31 + 32 med muta- sjonene T92L, H93Q og W 94T	C-term. HC	(G4S)3	(G)6	-

Molekylnavn (TvAb-nomenklatur for bispesifikke antistoffer)	Antistoff- ryggrad avledet fra	scFv av- ledet fra	Variable domener VH og VL: SEQ ID NO :	Posisjon til scfv til- knyttet antistoff	Enkelt- kjede- bindings- del	Peptid- bindings- del	scFv disulfid VH44/ VL100 stabilisert
TvAb6 (2331)	<VEGF> G6-31	<ANG-2> Mab536	23 + 24, 31 + 32 med muta- sjonene T92L, H93Q og W94T	C-term. HC	(G4S)3	(G4S)3	scFv disulfide VH44/VL 100 stabilized
TvAb9 (2330)	<ANG-2> Mab536	<VEGF> > G6-31	31 + 32, og 23 +24	C-term. HC	(G4S)3	(G4S)3	-
TvAb15 (2431)	<ANG-2> Mab536	<VEGF> > G6-31	31 + 32, og 23 +24	C-term. HC	(G4S)4	(G4S)3	scFv disulfid VH44/VL 100 stabilisert
TvAb-2441- bevacizumab -LC06	bevacizu mab	LC06	7 + 8 og 52 + 53	C-term. HC	(G4S)4	(G4S)4	scFv disulfid VH44/VL 100 stabilisert
TvAb-2441- bevacizumab -LC08	bevacizu mab	LC08	7 + 8 og 68 + 69	C-term. HC	(G4S)4	(G4S)4	scFv disulfid VH44NL 100 stabilisert

Molekylnavn (TvAb-nomenklatur for bispesifikke antistoffer)	Antistoff- ryggrad avledet fra	scFv av- ledet fra	Variable domener VH og VL: SEQ ID NO :	Posisjon til scfv til- knyttet antistoff	Enkelt- kjede- bindings- del	Peptid- bindings- del	scFv disulfid VH44/ VL100 stabilisert
TvAb- 3421_bevaci zumab_LC0 6	bevacizu mab	LC06	7 + 8 og 52 + 53	N-term. HC	(G4S)4	(G4S)2	scFv disulfid VH44/VL 100 stabilisert
TvAb- 4421_bevaci zumab _LC06	bevacizu mab	LC06	7 + 8 og 52 + 53	C-term LC	(G4S)4	(G4S)2	scFv disulfid VH44/VL 100 stabilisert
TvAb- 4461_bevaci zumab _LC06	bevacizu mab	LC06	7 + 8 og 52 + 53	C-term LC	(G4S)4	(G4S)6	scFv disulfid VH44/VL 100 stabilisert

TvAb-formatene er for eksempel basert på:

a) aa) det humane anti-VEGF-antistoff <VEGF> G6-31 og ab) to enkeltkjede-Fv (scFv) som binder til angiopoietin-2 avledet fra tung kjede variabelt domene (VH) med SEKV ID NR: 31, og lett kjede variabelt domene (VL) med SEKV ID NR: 32 med mutasjonene T92L, H93Q og W94T, som er bundet til C-terminus på den tunge kjeden til anti-VEGF-antistoff <VEGF> G6-31 (SEKV ID NR: 23); eller

b) ba) det humane anti-ANG-2-antistoff <ANG-2> Mab536 og bb) to enkeltkjede-Fv (scFv) som binder til VEGF avledet fra tung kjede variabelt domene (VH) med SEKV ID NR: 23 og lett kjede variabelt domene (VL) med SEKV ID NR: 24, som er bundet til C-terminus på den tunge kjeden til anti-ANG-2-antistoff <ANG-2> Mab536 (SEKV ID NR: 31); eller

c) ca) det humane anti-VEGF-antistoff <VEGF> bevacizumab (Avastin) og cb) to enkeltkjede-Fv (scFv) som binder til angiopoietin-2 avledet fra tung kjede variabelt domene (VH) med SEKV ID NR: 52 eller med SEKV ID NR: 68, og lett kjede variabelt

domene (VL) med SEKV ID NR: 53 eller med SEKV ID NR: 69, som er bundet til C-terminus på den tunge kjeden til anti-VEGF-antistoff <VEGF> bevacizumab (Avastin) (sekvensene til det resulterende fusjonspeptid er SEKV ID NR: 102 eller SEKV ID NR: 103, som blir uttrykt samtidig med den lette kjeden til bevacizumab SEKV ID NR: 104. (Alternativt kan to enkeltkjede-Fv (scFv) som binder til angiopoietin-2 også bindes til C-terminus på den lette kjeden eller N-terminus på den tunge kjeden).

Alternativt til den ene to enkeltkjede-Fv (scFv) kan også enkeltkjede-Fab-fragmenter anvendes som beskrevet ovenfor (ved anvendelse av peptid-koplerer for fusjon til C- eller N-termini), i EP-søknad nr. 09004909.9 og i eksempel 10.

Eksempel 1 (referanse).

Ekspresjon & rensing av bispesifikke tetravalente antistoffer.

<VEGF-ANG-2> TvAb5, TvAb6, TvAb-2441-bevacizumab-LC06 og TvAb-2441-bevacizumab -LC08.

Lette og tunge kjeder til de tilsvarende tetravalente bispesifikke antistoffer TvAb5 og TvAb6 ble konstruert i genomiske ekspresjonsvektorer som beskrevet ovenfor). Plasmidene ble amplifisert i E. coli, renset, og deretter transfektert for transient ekspresjon av rekombinante proteiner i HEK293-F-celler (ved anvendelse av Invitrogen's FreeStyle 293-system). Etter 7 dager ble HEK 293-F-cellesupernatanter høstet, filtrert, og de bispesifikke antistoffene renset ved hjelp av protein A- og størrelseseksklusjons-kromatografi. Homogenitet hos alle bispesifikke antistoff-konstruksjoner ble bekreftet ved hjelp av SDS-PAGE under ikke-reduserende og reduserende betingelser og analytisk størrelseseksklusjons-kromatografi. Under reduserende betingelser (figur 3) viste polypeptid tunge kjeder på <VEGF-ANG-2> TvAb6 som har den C-terminale scFv-fusjonen ved SDS-PAGE tydelig molekylstørrelser på ca. 75 kDa analogt med de beregnede molekylvektene. Massespektrometri bekreftet identiteten til de rensede antistoff-konstruksjonene. Ekspresjonsnivåene til alle konstruksjonene ble analysert ved hjelp av Protein A HPLC og var lik ekspresjonsutbyttene til «standard» IgG'er. Proteinutbytte oppnådd opptil 150 mg av TvAb6 <VEGF-ANG-2> pr. liter cellekultur-supernatant, som bestemt ved hjelp av Protein A HPLC.

Størrelseseksklusjons-kromatografi-analyse av den rensede ikke-disulfid-stabiliserte konstruksjonen TvAb5 med C-terminal-fusjonert scFv på tung kjede viste, sammenlignet med «standard» IgG'er, en økt tendens til å aggregere igjen etter rensing av monomert antistoff via størrelseseksklusjons-kromatografi (såkalt "daisy chain"-fenomen). Dette funnet er blitt støttet av andre eksempler (Rajagopal, V., et al., Prot. Engin. (1997) 1453-1459; Kobayashi, H., et al, Nucl Med Biol. (1998) 387-

393, eller Schmidt, M., et al, Oncogene (1999) 18, 1711 - 1721), noe som viser at molekyler som inneholdt scFv'er som ikke var stabilisert med intrakjede-disulfider mellom VH og VL, oppviste en økt tendens til å aggregere og reduserte utbytter. For å ta tak i problemene med aggregering av slike bispesifikke antistoffer, ble disulfid-stabilisering av scFv-gruppene anvendt. For dette formål innførte vi enkelt-cystein-erstatninger innen VH og VL på scFv på definerte posisjoner (posisjoner VH44/VL100 i henhold til Kabat-nummereringsskjema). Disse mutasjoner muliggjør dannelsen av stabile intrakjede-disulfider mellom VH og VL, noe som i sin tur stabiliserer den resulterende disulfid-stabiliserte scFv-modul. Innføring av VH44/VL100-disulfidene i scFv ved C-terminus til Fv i TvAb6 <VEGF-ANG-2>, fører til et stabilt tetravalent antistoff som ikke viste noen tendens til aggregering lenger etter rensing, og forble i en monomer tilstand (figur 4). I tillegg viste TvAb6 <VEGF-ANG-2> ingen økning i tendens til aggregering etter gjentatte fryse-tine-sykluser, for eksempel i den konsentrasjonen anvendt for in vitro og in vivo på 3 mg/kg.

Alle andre TvAb-molekyler beskrevet i tabell 3 (for eksempel TvAb-2441-bevacizumab - LC06 og TvAb-2441-bevacizumab -LC08) ble fremstilt og analytisk karakterisert analogt med prosedyren beskrevet.

Eksempel 2 (referanse).

Samtidig binding av bispesifikt tetravalent antistoff <VEGF-ANG-2> TvAb6, TvAb-2441-bevacizumab -LC06 og TvAb-2441-bevacizumab -LC08 til VEGF-A og ANG-2.

Bindingen av scFv-modulene og av Fv'ene beholdt i IgG-modulen til de forskjellige bispesifikke antistoff-formatene, ble sammenlignet med bindingen av «villtype»-IgG'er som bindingsmodulene og de bispesifikke antistoffene ble avledet fra. Disse analysene ble utført ved ekvimolare konsentrasjoner ved å utføre biokjemiske bindings-ELISA'er og ved å anvende Surface Plasmon Resonance (Biacore).

For <VEGF-ANG-2> TvAb6 ble det vist ved hjelp av VEGF-bindings-ELISA, som beskrevet ovenfor, at det binder til VEGF sammenlignbart med sitt stam-antistoff G6-31 ved en ekvimolar konsentrasjon på 0,625 pM (figur 5). Dette funnet kunne forventes, siden Fv-regionen på TvAb er identisk med den til G6-31. Den lette forskjellen mellom <VEGF-ANG-2> TvAb6 og <VEGF> G6-31 skyldes små forskjeller i proteinkonsentrasjon og en lett sterisk interferens av den C-terminale scFv med binding av <hFc>-POD-påvisnings-antistoffet og kan overvinnes ved anvendelse av et <hk> POD- (Biozol Cat.No. 206005) påvisnings-antistoff så som anvendt for ANG-2-bindings-ELISA.

Ved anvendelse av Biacore ble disse funnene bekreftet ved anvendelse av en klassisk konsentrasjonsserie ved 37 °C (figur 11). Disse dataen viste raske Kon-rater $k(a)$ på 4,7-4,8 E+6 1/(Ms), metning ble nådd med de høyeste konsentrasjonene av VEGF. Koff-ratene nådde en grense for teknisk spesifisering (det vil se 5 x E-6 (s/s), sannsynligvis på grunn av fremdeles bivalent binding (aviditetsvirkning) under disse betingelsene som en konsekvens av den dimere analytten rhVEGF, selv om en meget lav ligandtetthet ble anvendt, noe som resulterte i en endelig VEGF-respons på 10-15 RU. Ikke desto mindre kunne de kinetiske konstantene til de forskjellige <VEGF>-antistoffene sammenlignes ved hjelp av denne metoden og innenfor metodens feilmargen var det ingen påvisbar signifikant forskjell på de kinetiske konstantene til det tetravalente bispesifikke antistoff <VEGF-Ang-2> TvAb6 og det opprinnelige antistoff <VEGF> G6-31. De kinetiske konstantene for <VEGF-Ang-2> TvAb6 og <VEGF> G6-31 under disse betingelsene var praktisk talt identiske ved denne metoden. Således kan de konkluderes at TvAb6 fullstendig beholdt sine VEGF-bindingsegenskaper. Tab. 4 viser de respektive kinetiske konstanter og figur 12 viser de kinetiske karakteristikkene til de to <VEGF>-antistoffene <VEGF-Ang-2> TvAb6 og <VEGF> G6-31 i en Ka-Kd-plotting.

Tab. 14: Kinetiske egenskaper til <VEGF-Ang-2> TvAb6 og <VEGF> G6-31.

Målt ved 37°C	<u>Ka</u>	<u>kd</u>	<u>t1/2</u>	<u>KD</u>
Antistoffer	[1/(Ms)]	[1/s]	[min]	[M]
<VEGF> G6-31	4,83E+06	9,33E-06	1237,8	1,93E-12
<VEGF-Ang-2> TvAb6	4,72E+06	7,24E-06	1596,7	1,53E-12

20

I et ytterligere forsøk ble det vist ved hjelp av ANG-2-bindings-ELISA ved anvendelse av et <hk>-POD-påvisnings-antistoff (Biozol Catalogue No. 206005) som beskrevet ovenfor, at <VEGF-ANG-2> TvAb6 binder til ANG-2 på en måte som er sammenlignbar med den til Mab536, ved en ekvimolar konsentrasjon på 0,039 pM (figur 6A). Dette viste at scFv-modulen til TvAb6 beholdt sine bindingsegenskaper i TvAb-konstruksjonen.

25

For ytterligere å understøtte dette funnet ble <ANG-2> Mab536 og <VEGF-ANG-2> TvAb6 immobilisert ved hjelp av et sekundært antistoff på en Biacore CM5-chip og bindingskinetikk til humant ANG-2 ble bestemt. På grunn av heterogenitet hos ANG-2-preparatet kan ingen 1:1-binding observeres; KD-verdier er således kun relative anslag. Biacore-analysen viste at <VEGF-ANG-2> TvAb6 har en anslått KD-verdi på 4,4 nM for ANG-2. I sammenligning har Mab536 en anslått KD-verdi på 1,6

30

nM. Innen metodens feilmargin kunne noen forskjell i bindingsmodus og affinitet mellom <ANG-2> Mab536 og <VEGF-ANG-2> TvAb6 ikke observeres (figur 6B). Således kan det konkluderes at scFv-modulen til TvAb6 fullstendig beholdt sine bindingsegenskaper i TvAb-konstruksjonen.

5 For å bevise at <VEGF-ANG-2> TvAb6 var i stand til å binde seg samtidig til VEGF og ANG-2, ble brodannende ELISA-analyser og Biacore-analyser, som beskrevet ovenfor, anvendt.

Ved å anvende VEGF-ANG-2-brodannende ELISA beskrevet ovenfor, ble det vist at kun <VEGF-ANG-2> TvAb6 var i stand til å binde seg samtidig til VEGF og ANG-2
10 ved en ekvimolar konsentrasjon på 0,625 pM, mens de monospesifikke "standard" IgG1-antistoffene <ANG-2> Mab536 og <VEGF> G6-31 ikke var i stand til samtidig å binde seg til VEGF og ANG-2 (figur 7).

Figur 14 viser de respektive dataene fra Biacore-analysen. Samtidig binding av begge antigener Ang-2 og VEGF kunne bli vist for det tetravalente bispesifikke
15 antistoff <VEGF-Ang-2> TvAb6. Negative kontroller var som forventet: Det monospesifikke antistoff <Ang-2> Mab536 viste kun binding til Ang-2, men ingen VEGF-binding. Det monospesifikke antistoff <VEGF> G6-31 viste binding til VEGF, men ingen binding til Ang-2 i det hele tatt (data ikke vist). Ut fra de relative responsenheter for den teravalent bispesifikt antistoff <VEGF-Ang-2> TvAb6-
20 bindingen til den Ang-2-belagte overflate, og påfølgende binding til dimer VEGF, kunne bindingsstøkiometrien beregnes til å være i området fra 1:1 til 1:1.4. Sett sammen, ved anvendelse av de beskrevne ELISA- og Biacore-analysene, ble det vist at kun <VEGF-Ang-2> TvAb6 var i stand til å binde seg samtidig til VEGF og Ang-2, mens de monospesifikke "standard" IgG1-antistoffer <Ang-2> Mab536 og <VEGF>
25 G6-31 ikke var i stand til samtidig binding til VEGF og Ang-2 (figur 15).

Lignende resultater ble oppnådd med konstruksjonene TvAb-2441-bevacizumab-LC06 og TvAb-2441-bevacizumab-LC08 i en analog Biacore-analyse vist på fig. 15A. Binding av antistoffene til antigenet, for eksempel humant ANG-2 og VEGF, ble undersøkt ved hjelp av overflate-plasmonresonans ved anvendelse av et
30 BIACORE T100-instrument (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sverige). Kort fortalt ble, for affinitetsmålinger, goat<hIgG-Fc> polyklonale antistoffer immobilisert på en CM4-chip via aminkobling for presentasjon av de bispesifikke antistoffene mot humant ANG-2 og VEGF. Binding ble målt i HBS-buffer (HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% Tween 20, pH 7,4), 25°C. Renset ANG-2-His (R&D systems eller
35 renset på stedet) ble tilsatt i varierende konsentrasjoner mellom 6,25 nM og 200 nM i løsning. Assosiasjon ble målt ved hjelp av en ANG-2-injeksjon på 3 minutter; dissosiasjon ble målt ved hjelp av vasking av chip-overflaten med HBS-buffer i 3

minutter og en KD-verdi ble anslått ved anvendelse av en 1:1 Langmuir-bindingsmodell. På grunn av heterogenitet hos ANG-2-preparatet kunne ingen 1:1-binding observeres; KD-verdier er således kun relative anslag.

5 VEGF (R&D systems) ble tilsatt i varierende konsentrasjoner på mellom 6,25 nM og 200 nM i løsning. Assosiasjon ble målt ved hjelp av en VEGF-injeksjon på 3 minutter; dissosiasjon ble målt ved hjelp av vasking av chip-overflaten med HBS-buffer i 3 minutter, og en KD-verdi ble anslått ved anvendelse av en 1:1 Langmuir-bindingsmodell.

10 Rekkefølgen for injeksjon av bindingspartnerne kan byttes om, først VEGF og deretter Ang2, eller vice versa.

Negative kontrolldata (for eksempel bufferkurver) ble subtrahert fra prøvekurver for korrigerende av systemets iboende grunnlinjeavvik og for støysignal-reduksjon. Biacore T100 Evaluation Software version 1.1.1 ble anvendt for analyse av sensorgrammer og for beregning av affinitetsdata.

15

Antistoff	Affinitet hAng-2	Affinitet hVEGF
TvAb-2441-bevacizumab-LC06	2,3 nM	0,35 nM
TvAb-2441-bevacizumab-LC08	0,7 nM	0,34 nM
G6-31	--	< 0,1 nM
MAB536	3 nM	--
bevacizumab	--	0,59 nM

20

Til slutt kunne samtidig binding av TvAb-2441-bevacizumab-LC06 og TvAb-2441-bevacizumab-LC08 bli vist ved inkubering med ANGPT2 og VEGF fortløpende. Som vist på figur 15B kan ANGPT2 og VEGF binde seg samtidig til de bispesifikke antistoffene.

Eksempel 3 (referanse).

In vivo virkning av disulfid-stabilisert bispesifikt tetraivalent antistoff <VEGF-ANG-2> TvAb6 sammenlignet med <ANG-2> Mab536, <VEGF> G6-31 og kombinasjonen av Mab536 og G6-31 i den iscenesatte subkutane Colo205 xenotransplantatmodellen i Scid beige-mus.

Det rensede disulfid-stabiliserte <VEGF-ANG-2> TvAb6 (n00.2331 se tabell 3) ble sammenlignet med antistoffene <ANG-2> Mab536, <VEGF> G6-31 og kombinasjonen av <ANG-2> Mab536 og <VEGF> G6-31 i den iscenesatte subkutane Colo205 xenotransplantatmodellstudier (Ang2_PZ_Colo205_003 og Ang2_PZ_Colo205_005) Scid beige-mus av hunkjønn ved forskjellige doser.

Antistoffer: <ANG-2> Mab536 ble tilveiebragt som løsning fra fryst beholdning (c = 4,5 mg/ml), <VEGF> G6-31 ble tilveiebragt som fryst løsning (c = 0,6 mg/ml) og <VEGF-ANG-2> TvAb6 ble tilveiebragt som løsning fra fryst beholdning (c = 0,5 mg/ml) i 20 mM Histidine, 140 mM NaCl, pH 6,0. Antistoffløsning ble hensiktsmessig fortynnet i PBS fra beholdning av tidligere injeksjoner når nødvendig, og PBS ble anvendt som vehikkel.

Cellelinjer og dyrkningsbetingelser: Colo205 humane kolorektal-kreftceller ble opprinnelig anskaffet fra ATCC og etter ekspansjon deponert i Roche Penzberg intern cellebank. Tumorcellelinje ble rutinemessig dyrket i RPMI 1640-medium (PAA, Laboratories, Østerrike) supplert med 10 % føtalt bovint serum (PAA Laboratories, Østerrike) og 2 mM L-glutamin, ved 37°C i vannmettet atmosfære ved 5 % CO₂. Passasje 2-5 ble anvendt for transplantasjon.

Dyr: SCID beige-mus av hunkjønn; alder 4-5 uker ved ankomst (kjøpt fra Charles River Tyskland) ble holdt under spesifikt patogenfrie betingelser med daglige sykluser på 12 timer lys/12 timer mørke i henhold til bindende retningslinjer (GV-Solas; Felasa; TierschG). Forsøksprotokoll for studien ble gjennomgått og godkjent av lokal myndighet. Etter ankomst ble dyrene holdt i karantenedelen av dyrenes oppholdsområde i én uke for å venne seg til nye omgivelser og for observasjon. Kontinuerlig overvåking av helsen ble utført på regulær basis. Diettmat (Provimi Kliba 3337) og vann (surgjort, pH 2,5-3) ble gitt ad libitum. Alderen til musene ved start av studien var omtrent 10 uker.

Overvåking: Dyrene ble kontrollert daglig med tanke på kliniske symptomer og påvisning av ugunstige effekter. For overvåking gjennom forsøket ble kroppsvekten til dyrene dokumentert og tumorvolum ble målt ved hjelp av caliper etter iscenesetting.

Tumorcelleinjeksjon: På dagen for injeksjon ble Colo205-celler sentrifugert, vasket én gang og gjenoppslemmet i PBS. Etter en ytterligere vasking med PBS ble cellekonsentrasjon og celledørrelse bestemt ved anvendelse av en celleteller og

analyseringssystem (Vi-CELL, Beckman Coulter). For injeksjon av Colo205-celler ble den endelige titeren justert til $5,0 \times 10^7$ celler/ml, levedyktighet ca. 90%. Deretter ble 100 µl av denne suspensjonen, tilsvarende $2,5 \times 10^6$ celler pr. dyr injisert s.c. i musenes høyre flanke.

- 5 Behandling av dyrene startet på dagen for randomisering, 16 dager etter celletransplantasjon (studie Ang2_PZ_Colo205_003) og 14 dager etter celletransplantasjon (studie Ang2_PZ_Colo205_005) ved et midlere tumorvolum på henholdsvis 100 mm³ eller 150 mm³.

- 10 Doseplan inntil dag 74 (se fig. 8A) av studie Ang2_PZ_Colo205_003:

Gruppe	Antall dyr	Forbindelse	Dose (mg/kg)	Administreringsmåte/vei	Antall behandlinger	Kumulativ dose mg/kg
1	10	Vehikkel		i.p. én gang ukentlig	4	
2	10	<VEGF> G6-31	6 mg/kg	i.p. én gang ukentlig	8	48
3	10	<ANG-2> Mab536	6 mg/kg	i.p. én gang ukentlig	8	48
4	10	<VEGF> G6-31 +	5 mg/kg +	i.p. én gang ukentlig	8	40
		<ANG-2> Mab536	6 mg/kg	i.p. én gang ukentlig	8	48
5	10	<VEGF-ANG-2> TvAb6	7 mg/kg	i.p. én gang ukentlig	8	56

- 15 I studien ble Ang2_PZ_Colo205_003 <VEGF-ANG-2> TvAb6 ved en feiltagelse underdosert med hensyn til et ekvimolart forhold. Dosen av <VEGF-ANG-2> TvAb6 ble justert i studie Ang2_PZ_Colo205_005, slik at dyrene fikk et ekvimolart forhold ANG-2- og VEGF-bindings seter med <VEGF-ANG-2> TvAb6 så vel som kombinasjonen av <VEGF> G6-31 og <ANG-2> Mab536.

Tumorveksthemming inntil dag 74 (se fig. 8a), Ang2-PZ-Colo205_003-studie:

<VEGF-ANG-2> TvAb6 i en dose på 7 mg/kg oppviste virkning sammenlignbar med den til en kombinasjon av <VEGF> G6-31 ved 5 mg/kg og <ANG-2> Mab536 ved 6 mg/kg og <VEGF> G6-31 som enkeltmiddel i en dose på 6 mg/kg (figur 8A), og var overlegent enkeltmiddel <ANG-2> Mab536 i en dose på 6 mg/kg. Siden subkutan Colo205-modellen er meget responsiv overfor <VEGF> G6-31-antistoffet som blokkerer humant så vel som murint VEGF, noe som resulterer i nesten fullstendig tumorveksthemming, kunne <VEGF-ANG-2> TvAb6 således ikke differensieres fra G6-31 som enkeltmiddel (6 mg/kg) under de valgte forsøksbetingelsene, mens <VEGF-ANG-2> TvAb6 viste en sammenlignbar hemming, lik kombinasjonen av <ANG-2> Mab536 og <VEGF> G6-31 ved en klart lavere kumulativ dose (<VEGF-ANG-2> TvAb6 = 56 mg/kg antistoff, sammenlignet med kombinasjonen av <ANG-2> Mab536 og <VEGF> G6-31 = 40 + 48 = 88 mg/kg antistoff).

Doseplan for studie inntil dag 63, Ang2_PZ_Colo205_005:

Gruppe	Antall dyr	Forbindelse	Dose (mg/kg)	Administrerings-vei/måte	Antall behandlinger	Kumulativ dose
6	10	Vehikkel		i.p. én gang ukentlig	6	
7	10	<VEGF> G6-31	3	i.p. én gang ukentlig	7	21 mg/ kg
8	10	<VEGF> G6-31 +	3	i.p. én gang ukentlig	7	21 mg/kg
		<ANG-2> Mab536	3	i.p. én gang ukentlig	7	21 mg/kg
9	10	<ANG-2> Mab536	3	i.p. én gang ukentlig	7	21 mg/kg
10	10	<VEGF-ANG-2> TvAb6	4	i.p. én gang ukentlig	7	28 mg/kg

Tumorveksthemming inntil dag 63, Ang2_PZ_Colo205_005-studie:

<VEGF-ANG-2> TvAb6 i en dose på 4 mg/kg oppviste virkning sammenlignbar med den til kombinasjonen av <VEGF> G6-31 og <ANG-2> Mab536 ved 3 mg/kg hver, og var overlegen både enkeltmiddel <VEGF> G6-31 så vel som <ANG-2>

Mab536 i en dose på 3 mg/kg (figur 8B). Dette er det første eksempel som viser at ved en lavere dose (med hensyn til den oppsummerte konsentrasjonen av antistoff – den kumulative dose av kombinasjonen er 21+21 = 42 m/kg versus 28 mg/kg av det bispesifikke antistoff TvAb6) kan et bispesifikt antistoff som målsøker VEGF og ANG-2 resultere i sterk anti-tumor-virkning som er sammenlignbar med kombinasjonen av de respektive enkeltmidlene som blokkerer VEGF og ANG-2 og er overlegen hvert enkelt middel.

Eksempel 4 (referanse).

10 Blokkering av VEGF-indusert rørdannelse.

For å bekrefte at de anti-VEGF-relaterte aktivitetene ble beholdt i det bispesifikke tetravalente <VEGF-ANG-2> TvAb6, ble det vist i en VEGF-indusert rørdannelses-analyse AngioKit TCS CellWorks (CellSystems) at <VEGF-ANG-2> TvAb6 medierte doseavhengig hemming av rørdannelse som er sammenlignbar med det monospesifikke antistoff <VEGF> G6-31. AngioKit TCS CellWorks-analysen ble utført i henhold til følgende prosedyre: celler ble stimulert hver gang med 2 ng/ml VEGF før behandling med antistoffer på dag 1, 4, 7 og 9. Vaskulære rør ble visualisert ved farging av endotelceller ved anvendelse av et CD31-PE-antistoff (BD Pharmingen #555446) på dag 11. Det ble tatt bilder med en forstørrelse på 4x og verdier for rørlengde og antall forgreningspunkter ble kvantitativt analysert ved anvendelse av Angiogenese Tube Formation Application Module i MetaMorph (Molecular Devices). Verdier og standard avvik ble beregnet ved hjelp av duplikater og analyse av 4 bilder pr. prøve. Figur 9 viser de respektive resultatene og figur 10 A og B den kvantitative analyse. Angiopietin-2 har ingen innflytelse på rørdannelse og således ble hemming av ANG-2 ikke studert i denne analysen. Dataene viser at de bispesifikke <VEGF-ANG-2> TvAb6- og de monospesifikke <VEGF> G6-31-antistoffene er like virkningsfulle når det gjelder hemming av VEGF-stimulert rørdannelse.

Eksempel 5 (referanse).

30 Tie2-fosforylering.

For å bekrefte at de anti-ANGPT2-relaterte aktivitetene ble beholdt i de bispesifikke tetravalente <VEGF-ANGPT2>-antistoffene TvAb-2441-bevacizumab-LC06 og TvAb-2441-bevacizumab-LC08, ble det vist at TvAb-2441-bevacizumab-LC06 og TvAb-2441-bevacizumab-LC08 griper inn i ANGPT2-stimulert Tie2-fosforylering på en måte sammenlignbar med deres moderkloner LC06 og LC08 i den ANGPT2-stimulerte Tie2-fosforyleringsanalysen, som beskrevet ovenfor.

I et første forsøk viste begge bispesifikke antistoffer TvAb-2441-bevacizumab-LC06 og TvAb-2441-bevacizumab-LC08 en dose-avhengig interferens med ANGPT2 stimulert Tie2-fosforylering med IC50-verdier som er sammenlignbare med dem til moderklonene LC06 og LC08, som vist på figur 16A. TvAb-2441-bevacizumab-LC06
 5 grep inn i ANGPT2-stimulert Tie2-fosforylering med en IC50-verdi på tilnærmet 721 ng/ml, mens LC06 grep inn i ANGPT2-stimulert Tie2-fosforylering med en IC50-verdi på tilnærmet 508 ng/ml. TvAb-2441-bevacizumab-LC08 grep inn i ANGPT2-stimulert Tie2-fosforylering med en IC50-verdi på tilnærmet 364 ng/ml, mens LC08 grep inn i ANGPT2-stimulert Tie2-fosforylering med en IC50-verdi på tilnærmet 499 ng/ml.

10 I et andre forsøk viste begge bispesifikke antistoffer TvAb-2441-bevacizumab-LC06 og TvAb-2441-bevacizumab-LC08 en dose-avhengig interferens med ANGPT2-stimulert Tie2-fosforylering med IC50-verdier sammenlignbare med dem til moderklonene LC06 og LC08, som vist på figur 16B. TvAb-2441-bevacizumab-LC06 grep inn i ANGPT2-stimulert Tie2-fosforylering med en IC50-verdi på tilnærmet 488
 15 ng/ml, mens LC06 grep inn i ANGPT2-stimulert Tie2-fosforylering med en IC50-verdi på tilnærmet 424 ng/ml. TvAb-2441-bevacizumab-LC08 grep inn i ANGPT2-stimulert Tie2-fosforylering med en IC50-verdi på tilnærmet 490 ng/ml, mens LC08 grep inn i ANGPT2-stimulert Tie2-fosforylering med en IC50-verdi på tilnærmet 399 ng/ml.

Sett sammen viser disse dataene at de bispesifikke tetravalente <VEGF-
 20 ANGPT2>-antistoffene TvAb-2441-bevacizumab-LC06 og TvAb-2441-bevacizumab-LC08 griper inn i ANGPT2-stimulert Tie2-fosforylering på en måte som er sammenlignbar med deres moderkloner LC06 og LC08 innenfor feilmarginen til denne cellulære analysen.

25 Eksempel 6 (referanse).

Hemming av huANG-2-binding til Tie-2 (ELISA).

Interaksjons-ELISA ble utført på 384-brønners mikrotiterplater (MicroCoat, DE, Cat.No. 464718) ved RT. Etter hvert inkuberingstrinn ble platene vasket 3 ganger med PBST. ELISA-plater ble belagt med 0,5 µg/ml Tie-2 protein (R&D Systems, UK,
 30 Cat.No.313-TI) i minst 2 timer (t.). Deretter ble brønnene blokkert med PBS supplert med 0,2% Tween-20 og 2% BSA (Roche Diagnostics GmbH, DE) i 1 time.

Fortynninger av rensede antistoffer i PBS ble inkubert sammen med 0.2 µg/ml huAngiopoietin-2 (R&D Systems, UK, Cat.No. 623-AN) i 1 t. ved RT. Etter vasking ble en blanding av 0,5 µg/ml biotinyllert anti-angiopoietin-2-klon BAM0981 (R&D Systems,
 35 UK) og 1:3000 fortynnet streptavidin HRP (Roche Diagnostics GmbH, DE, Cat.No.11089153001) tilsatt i 1 t. Deretter ble platene vasket 6 ganger med PBST. Platene ble utviklet med friskt fremstilt ABTS-reagens (Roche Diagnostics GmbH, DE,

buffer #204 530 001, tablets #11 112 422 001) i 30 minutter ved RT. Absorbans ble målt ved 405 nm.

Oppsummeringsdata for Ang2-interaksjons-ELISA:

5

<VEGF-ANG-2> bispesifikt antistoff (eller monospesifikke stam-antistoffer)	AVG IC50 (ng/ml)	STDEV
	hANG2	
<VEGF-ANG-2>G6_31	>20000	
TvAb-2441_G6_31_Ang2i_LC06	75	39
TvAb-2441_G6_31_Ang2k_LC08	66	31
TvAb-2441_bevacizumab_LC06	44	8
TvAb-2441_bevacizumab_LC08	42	11
<ANG-2>Mab 536	15	8
<VEGF>Bevacizumab	>20000	
TvAb-3421_bevacizumab_LC06	31	1
TvAb-4421_bevacizumab_LC06	35	17
TvAb-4461_bevacizumab_LC06	46	10

Eksempel 7 (referanse).

Hemming av hVEGF-binding til hVEGF-receptor (ELISA).

10 Testen ble utført på 384-brønners mikrotiterplater (MicroCoat, DE, Cat.No. 464718) ved RT. Etter hvert inkuberingstrinn ble platene vasket 3 ganger med PBST. I begynnelsen ble platene belagt med 0,5 µg/ml hVEGF-R-protein (R&D Systems, UK, Cat.No.321-FL) i minst 2 timer (t.). Deretter ble brønnene blokkert med PBS supplert med 0,2% Tween-20 og 2% BSA (Roche Diagnostics GmbH, DE) i 1 t. Fortynninger av

15 rensede antistoffer i PBS ble inkubert sammen med 0,15 µg/ml huVEGF121 (R&D Systems, UK, Cat.No. 298-VS) i 1 t. ved RT. Etter vasking ble en blanding av 0,5 µg/ml anti-VEGF-klon Mab923 (R&D Systems, UK) og 1:2000 pepperrotperoksidase-(HRP) konjugert F(ab')₂ anti-muse-IgG (GE Healthcare, UK, Cat.No.NA9310V) tilsatt i 1 t. Deretter ble platene vasket 6 ganger med PBST. Platene ble utviklet med friskt

fremstilt ABTS-reagens (Roche Diagnostics GmbH, DE, buffer #204 530 001, tablets #11 112 422 001) i 30 minutter ved RT. Absorbans ble målt ved 405 nm.

Oppsummeringsdata for VEGF-interaksjons-ELISA:

5

<VEGF-ANG-2> bispesifikt antistoff	AVG IC50 (ng/ml)	STDEV
	VEGF	
<VEGF-ANG-2> G6_31	1431	130
TvAb-2441_G6_31_Ang2i_LC06	1654	213
TvAb-2441_G6_31_Ang2k_LC08	1392	184
TvAb-2441_bevacizumab_LC06	2831	503
TvAb-2441_bevacizumab_LC08	2305	972
TvAb-<ANG-2> Mab 536	>20000	
TvAb-<VEGF> Bevacizumab	1584	357
TvAb-3421_bevacizumab_LC06	2660	284
TvAb-4421_bevacizumab_LC06	1980	1319
TvAb-4461_bevacizumab_LC06	1677	394

Eksempel 8 (referanse).

HUVEC-proliferasjon.

10

For å bekrefte at de anti-VEGF-relaterte aktivitetene ble beholdt i de bispesifikke tetravalente <VEGF-ANG2>-antistoffene TvAb-2441-bevacizumab-LC06 og TvAb-2441-bevacizumab-LC08, ble det vist at TvAb-2441-bevacizumab-LC06 og TvAb-2441-bevacizumab-LC08 griper inn i VEGF-indusert HUVEC-proliferasjon på en måte sammenlignbar med deres moderkloner LC06 og LC08 i den VEGF-induserte HUVEC-proliferasjonsanalysen, som beskrevet ovenfor.

15

Figur 18 viser at TvAb-2441-bevacizumab-LC06 og TvAb-2441-bevacizumab-LC08 faktisk, på en konsentrasjonsavhengig måte, griper inn i VEGF-indusert HUVEC-proliferasjon sammenlignbar med stam-antistoffet bevacizumab.

Eksempel 9 (referanse).ELISA-bindingsanalyse til humant ANG-1 og til humant ANG-2.

Bindingen av stam- <ANG-2>-antistoffer Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 og Ang2k-LC08 til humant ANG-1 og humant ANG-2 ble bestemt i en ANG-1- eller ANG-2-bindings-ELISA som beskrevet ovenfor (se sammenlignende binding til ANG-1 og ANG-2 (ANG-1- og ANG-2-bindings-ELISA)). Kort fortalt er ELISA-typen analyse basert på immobilisering av human villtype Angiopoietin-1 eller -2 på en mikrotiterplate. Binding av et antistoff rettet mot det immobiliserte ANG-1 eller ANG-2 blir målt via et <human Fc> (anti-IgG) -antistoff med et POD-konjugat. En fortynningsserie av <ANG-2>-antistoffet tillater bestemmelse av en EC₅₀-konsentrasjon. Som referanse ble humant anti-ANG-2-antistoff <ANG-2>-antistoff Mab536 (Oliner et al., Cancer Cell. 2004 Nov;6(5):507-16, US 2006/0122370) anvendt. EC50-konsentrasjonene bestemt er oppsummert i tabellen nedenfor.

Antistoff	hANG-1-binding EC50	hANG-2-binding EC50
<ANG-2>Mab536	2538 ng/ml	133 ng/ml
<ANG-2>Ang2i-LC06	> 8000 ng/ml	84 ng/ml
<ANG-2>Ang2i-LC07	> 8000 ng/ml	3006 ng/ml
<ANG-2>Ang2i-LC08	4044 ng/ml	105 ng/ml

Alle antistoffer binder seg spesifikt til ANG-2. Mab536 og Ang2k-LC08 viser også spesifikk binding mot ANG-1, mens Ang2i-LC06 og Ang2i-LC07 ikke binder seg spesifikt til ANG-1, siden de har en EC50-verdi på over 8000 ng/ml (påvisningsgrense).

Eksempel 10 (referanse).Ekspresjon & rensing av bispesifikke tetravalente enkeltkjede Fab <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyler scFab-Avastin-LC06-2620, scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640 og scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641.

Analogt med prosedyrene beskrevet i eksempel 1 og i materialene og metodene ovenfor, ble de bispesifikke tetravalente enkeltkjede Fab <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekylene scFab-Avastin-LC06-2620, scFab-Avastin-LC06-2640 og scFab-Avastin-LC06-2641, alle tre basert på <VEGF> bevacizumab og <ANG-2> Ang2i-LC06, uttrykt og rensset. Bindingsaffiniteten og andre egenskaper ble bestemt som beskrevet i eksemplene ovenfor. De relevante (senere modifiserte) lett og tung kjede aminosyresekvensene i disse bispesifikke antistoffene er angitt i SEKV ID NR: 109 -

110 (scFAB-Avastin-LC06-2620), i SEKV ID NR: 111 -112 (scFAB-Avastin-LC06-2640) og i SEKV ID NR: 113-114 (scFAB-Avastin-LC06-2641).

Nøkkeldata	scFAB-Avastin-LC06-2620	scFAB-Avastin-Ang2i-LC06-2640	scFAB-Avastin-LC06-Ang2i-2641
Ekspresjon (Utbytte)	29 µg/ml	27 µg/ml	18 µg/ml
Rensing (Utbytte, Prot. A. homog.)	21 mg, 57%	19 mg, 86%	12 mg, 90%
Homogenitet etter preparativ SEC	98%	98%	99%
Funksjon			
hANG-2-affinitet (Biacore)	1,9 E-9 M	1,8 E-9 M	1,9 E-9 M
hVEGF-affinitet (Biacore)	1 E-10 M	1E-10 M	1E-10 M

5 Eksempel 11 (referanse).

Ekspresjon & rensing av bispesifikk trivalent enkeltkjede Fab <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-KiH-C-scFab.

Analogt med prosedyrene beskrevet i eksempel 1 og i materialene og metodene ovenfor, ble det bispesifikke trivalente enkeltkjede Fab <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-KiH-C-scFab, basert på <VEGF> bevacizumab og
10 <ANG-2> Ang2i-LC06, uttrykt og rensset. Bindingsaffiniteten og andre egenskaper ble bestemt som beskrevet i eksemplene ovenfor. De relevante (senere modifiserte) lett og tung kjede aminosyresekvensene i dette bispesifikke antistoff er angitt i SEKV ID NR: 115-117 (Avastin-LC06-KiH-C-scFab).

15

Nøkkeldata	Avastin-LC06-KiH-C-scFab
Ekspresjon (Utbytte)	15 µg/ml
Rensing (Utbytte, Prot. A. homog.)	4,8 mg, 91 %
Homogenitet etter preparativ SEC	97%

Funksjon	
hANG-2-affinitet (Biacore)	4,4 E-9 M
hVEGF-affinitet (Biacore)	1 E-10 M

Eksempel 12 (referanse).

Ekspresjon & rensing av bispesifikt trivalent <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl
 5 Avastin-LC06-C-Fab-6CSS.

Analogt med prosedyrene beskrevet i eksempel 1 og i materialene og metodene ovenfor (se også det bispesifikke trivalente <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyl Avastin-LC06-C-Fab-6CSS basert på <VEGF> bevacizumab og <ANG-2> Ang2i-LC06 ble uttrykt og rensset. Bindingsaffiniteter og andre egenskaper ble bestemt
 10 som beskrevet i eksemplene ovenfor. Bispesifikke trivalente antistoffmolekyler med dette format generelt, er beskrevet i EP-søknad nr. 09005108.7. De relevante (senere modifiserte) lett og tung kjede aminosyresekvensene i dette bispesifikke <VEGF-ANG-2>-antistoff er angitt i SEKV ID NR: 118-120 (Avastin-LC06-C-Fab-6CSS).

Nøkkeldata	scFAB-Avastin-LC06-2620	scFAB-Avastin-LC06-2640	scFAB-Avastin-LC06-2641
Ekspresjon (Utbytte)	29 µg/ml	27 µg/ml	18 µg/ml
Rensing (Utbytte, Prot. A. homog.)	21 mg, 57%	19 mg, 86%	12 mg, 90%
Homogenitet etter preparativ SEC	98%	98%	99%
Funksjon			
hANG-2-affinitet (Biacore)	1,9 E-9 M	1,8 E-9 M	1,9 E-9 M
hVEGF-affinitet (Biacore)	1 E-10 M	1E-10 M	1E-10 M

15

Eksempel 13

Ekspresjon & rensing av bispesifikke bivalente domene-utvekslede <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyler Avastin-LC06-CH1-CL, Avastin-LC06-VH-VL og Avastin-LC06-VH-VL-SS.

20 Analogt med prosedyrene beskrevet i eksempel 1 og i materialene og metodene ovenfor, ble de bispesifikke bivalente domene-utvekslede <VEGF-ANG-2>-

antistoffmolekylene Avastin-LC06-CH1-CL (CH-CL-utveksling som beskrevet i WO 2009/080253), Avastin-LC06-VH-VL (VH-VL-utveksling som beskrevet i WO 2009/080252) og Avastin-LC06-VH-VL-SS (VH-VL-utveksling som beskrevet i WO 2009/080252 og en ytterligere innført VH44 VL100-disulfidbinding) basert på <VEGF> bevacizumab og <ANG-2> Ang2i-LC06, uttrykt og renset. Bindingsaffiniteten og andre egenskaper ble bestemt som beskrevet i eksemplene ovenfor. De relevante (senere modifiserte) lett og tung kjede aminosyresekvensene i disse bispesifikke antistoffene er angitt i SEKV ID NR: 121 -124 (Avastin-LC06-CH1-CL), i SEKV ID NR: 125 -128 (Avastin-LC06-VH-VL) og i SEKV ID NR: 129 -132 (Avastin-LC06-VH-VL-SS).

10

Nøkkeldata	Avastin-LC06-CM-CHI-CL	Avastin-LC06-CM-VH-VL	Avastin-LC06-VH-VL-SS
Ekspresjon (Utbytte)	87 µg/ml	44 µg/ml	65 µg/ml
Rensing (Utbytte, Prot. A. homog.)	50 mg, 62%	22 mg, 95%	91 mg, 74%
Homogenitet etter preparativ SEC	84%	> 99 %	95 %
Funksjon			
hANG-2-affinitet (Biacore)	1,3 E-9 M	2,1 E-9 M	1,46 E-9 M
hVEGF-affinitet (Biacore)	1 E-10 M	1 E-10 M	1 E-10 M

Eksempel 14

Ekspresjon & rensing av bispesifikke bivalente ScFab-Fc-fusjon <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekyler Avastin-LC06-N-scFab og Avastin-LC06-N-scFabSS.

15

Analogt med prosedyrene beskrevet i eksempel 1 og i materialene og metodene ovenfor, ble de bispesifikke bivalente ScFab-Fc fusjon <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekylene Avastin-LC06-N-scFab og Avastin-LC06-N-scFabSS basert på <VEGF> bevacizumab og <ANG-2> Ang2i-LC06, uttrykt og renset. Bindingsaffinitet og andre egenskaper ble bestemt som beskrevet i eksemplene ovenfor. De relevante modifiserte tung kjede aminosyresekvensene i disse bispesifikke antistoffene er angitt i SEKV ID NR: 133-134 (Avastin-LC06-N-scFab) og i SEKV ID NR: 135 -136 (Avastin-LC06-N-scFabSS).

20

Nøkkeldata	Avastin-LC06-N-scFab	Avastin-LC06-N-scFabSS
Ekspresjon (Utbytte)		62 µg/ml
Rensing (Utbytte, Prot. A. homog.)		43 %
Funksjon		
hANG-2-affinitet (Biacore)		1 nM
VEGF-affinitet (Biacore)		1 nM

Eksempel 15

5 Hemming av hVEGF-binding til hVEGF-reseptor (ELISA), blokkering av VEGF-indusert rørdannelse, hemming av huANG-2-binding til Tie-2 (ELISA), Tie2-fosforylering, og HUVEC-proliferasjon av de bispesifikke <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekylene i eksempler 10 til 14.

10 Hemming av hVEGF-binding til hVEGF-reseptor (ELISA), blokkering av VEGF-indusert rørdannelse, hemming av huANG-2-binding til Tie-2 (ELISA), Tie2-fosforylering og HUVEC-proliferasjon av de bispesifikke <VEGF-ANG-2>-antistoffmolekylene i eksempler 10 til 14, kan bestemmes analogt med prosedyrene beskrevet i materialer og metoder og eksempler 4 til 9 ovenfor.

Eksempel 16 (referanse).

15 In vivo virkning av bispesifikt antistoff <VEGF-ANG-2>-antistoff sammenlignet med <ANG-2> ANG2i-LC06, og kombinasjonen av <ANG-2> ANG2i-LC06 og Avastin i motstandsdyktig Colo205 xenotransplantatmodell i Scid beige-mus (etter resistens mot bevacizumab-(Avastin) behandling).

20 Cellelinjer og dyrkningsbetingelser:

Colo205 humane kolorektalkreftceller ble opprinnelig anskaffet fra ATCC og etter ekspansjon deponert i Roche Penzberg intern cellebank. Tumorcellelinje ble rutinemessig dyrket i RPMI 1640-medium (PAA, Laboratories, Østerrike) supplert med 10% føtalt bovint serum (PAA Laboratories, Østerrike) og 2 mM L-glutamin, ved 37°C
25 i vannmettet atmosfære ved 5% CO₂. Passasje 2-5 ble anvendt for transplantasjon.

Dyr:

SCID beige-mus av hunkjønn; alder 4-5 uker ved ankomst (kjøpt fra Charles River Tyskland), ble holdt under spesifikt patogenfrie betingelser med daglige sykluser

på 12 timer lys/12 timer mørke i henhold til bindende retningslinjer (GV-Solas; Felasa; TierschG). Forsøksprotokoll for studien ble gjennomgått og godkjent av lokal myndighet. Etter ankomst ble dyrene holdt i karantenedelen av dyrenes oppholds-
 område i én uke for å venne seg til nye omgivelser og for observasjon. Kontinuerlig
 5 overvåking av helsen ble utført på regulær basis. Diettmat (Provimi Kliba 3337) og vann (surgjort, pH 2,5-3) ble gitt ad libitum. Alderen til musene ved start av studien var omtrent 10 uker.

Tumorcelleinjeksjon:

10 På dagen for injeksjon ble tumorceller høstet (trypsin-EDTA) fra dyrkningskolber (Greiner) og overført til 50 ml dyrkningsmedium, vasket én gang og resuspendert i PBS. Etter et ytterligere vasketrinn med PBS og filtrering (cellefilter; Falcon $\varnothing$ 100 μm) ble den endelige celletiteren justert til $2,5 \times 10^7/\text{ml}$. Tumorcelsesuspensjonen ble forsiktig blandet med overføringspipette for å unngå
 15 celleaggregering. Etter dette ble celsesuspensjonen fylt i en 1,0 ml tuberkulinsprøyte (Braun Melsungen) ved anvendelse av en bred nål (1,10 x 40 mm); for injeksjon ble nålstørrelsen endret (0,45 x 25 mm) og for hver injeksjon ble en ny nål anvendt. Anestesi ble utført ved anvendelse av en Stephens inhalasjonsenhet for små dyr med preinkuberingskammer (plexiglass), individuell nesemaske for mus (silisium) og ikke
 20 brennbar eller eksplosiv anestesiforbindelse Isofluran (cp-pharma) i et lukket sirkulasjonssystem. To dager før injeksjon ble pelsen til dyrene barbert av og for celleinjeksjon ble huden til anestetiserte dyr forsiktig løftet opp med en anatomisk pinsett og 100 μl celsesuspensjon ($= 2,5 \times 10^6$ celler) ble injisert subkutan i dyrenes høyre flanke.

25

Behandling av dyrene:

Forhåndsbehandling:

Behandling av dyrene startet 14 dager etter celletransplantasjon (studie Ang2_PZ_Colo205_008) ved et midlere tumorvolum på henholdsvis 100 mm^3 til 150
 30 mm^3 . Musene ble behandlet én gang ukentlig med Avastin (10 mg/kg) i en tidsperiode på 5 uker.

Andre behandling:

Deretter ble musene randomisert for 2. behandling og inndelt i fire grupper
 35 med 10 mus i hver gruppe. Tumorvolum ved starten av andre behandling på dag 51 var i området fra 336 til 341 mm^3 . Musene ble behandlet én gang ukentlig i.p. med de forskjellige forbindelsene som antydnet i følgende tabell.

Gruppe	Antall dyr	Forbindelse	Dose (mg/kg) (nMol/kg)	Administreringsvei/måte	Antall behandlinger	Kumulativ dose (mg/kg)
11	10	Avastin	10 mg/kg (68 nMol/kg)	i.p. én gang ukentlig	11	110
12	10	ANG2i-LC06	10 mg/kg (68 nMol/kg)	i.p. én gang ukentlig	6	60
13	10	ANG2i-LC06 +	10 mg/kg (68 nMol/kg)	i.p. én gang ukentlig	6	60
		Avastin	+ 10 mg/kg (68 nMol/kg)	i.p. én gang ukentlig	11	110
14	10	TvAb-2441-bevacizu mab-LC06	13 mg/kg (64 nMol/kg)	i.p. én gang ukentlig	6	78

Overvåking:

Dyrene ble kontrollert 2x pr. uke med tanke på deres helsestatus. Kropps-
5 vekten ble dokumentert 2x pr. uke etter celleinjeksjon. Tumorenes dimensjoner ble målt ved hjelp av caliper som begynte på dagen for iscenesettelse og deretter 2 ganger pr. uke under hele behandlingsperioden. Tumorvolum ble beregnet i henhold til NCI-protokoll ($\text{tumorvekt} = 1/2ab^2$, hvor "a" og "b" er henholdsvis den lange og korte diameteren til tumoren). Termineringskriterier var den kritiske tumormasse (opp til
10 1,7 g eller $\varnothing > 1,5$ cm), tap av kroppsvekt mer enn 20% fra grunnlinje, tumor-ulcerasjon eller generelt dårlig tilstand hos dyrene.

Resultater: Tumorveksthemming basert på middelveidier (i prosent) på dag 91.

	TGI
ANG2i-LC06 10 mg/kg (68 nMol/kg) i.p.; Avastin 10 mg/kg (68 nMol/kg) i.p.	45,3
ANG2i-LC06 10 mg/kg i.p. (68 nMol/kg)	44,4
TvAb-2441-bevacizumab-LC06_13mg/kg i.p. (64 nMol/kg)	60,4

Resultatene viser at det bispesifikke <VEGF-ANG-2>-antistoff TvAb-2441-bevacizumab-LC06 viste sterkere tumorveksthemming (ved lavere doser) i den bevacizumab (Avastin) resistente xenotransplantat-tumormodellen Colo205 i Scid beige-mus sammenlignet med behandlingen med monospesifikt antistoff ANG2i-LC06 alene, eller kombinasjonen av ANG2i-LC06 og Avastin.

Eksempel 17 (referanse).

In vivo hemming av tumor-angiogenese i s.c. Calu-3 NSCLC xenotransplantat.
- Påvisning via ikke-invasiv in vivo billedannelse av angiogenese ved anvendelse av anti-CD31 merket med

Cellelinjer og dyrkningsbetingelser:

Denne humane lungeadenokarsinom-kreftcellelinjen er blitt etablert fra en human kaukasisk mann med lungekreft. Celler ble anskaffet fra Roche, Kamakura og underkastes passeringer/overføringer på stedet for arbeidende cellebank. Tumorceller blir rutinemessig dyrket i RPMI1640-medium (PAN Biotech, Tyskland) supplert med 10% fetalt bovint serum (PAN Biotech, Tyskland) og 2 mM L-glutamin (PAN Biotech, Tyskland) ved 37°C i vannmettet atmosfære ved 5% CO₂. Dyrkningsoverføring blir utført med trypsin / EDTA 1x (PAN) splitting en gang/uke.

Dyr:

BALB/c naken-mus av hunkjønn; alder 4-5 uker ved ankomst (kjøpt fra Charles River, Tyskland) ble holdt under spesifikt patogenfrie betingelser med daglige sykluser på 12 timer lys/12 timer mørke i henhold til bindende retningslinjer (GV-Solas; Felasa; TierschG). Forsøksprotokoll for studien ble gjennomgått og godkjent av lokal myndighet. Etter ankomst ble dyrene holdt i karantenedelen av dyrenes oppholds-område i én uke for å venne seg til nye omgivelser og for observasjon. Kontinuerlig overvåking av helsen ble utført på regulær basis. Diettmat (Provimi Kliba 3337) og vann (surgjort, pH 2,5-3) ble gitt ad libitum. Alderen til musene ved start av studien var omtrent 10 uker.

Tumorcelleinjeksjon:

På dagen for injeksjon ble tumorceller høstet (trypsin-EDTA) fra dyrkningskolber (Greiner) og overført til 50 ml dyrkningsmedium, vasket én gang og gjenoppslemmet i PBS. Etter et ytterligere vasketrinn med PBS og filtrering («cell strainer»; Falcon 0 100 µm) ble den endelige celletiteren justert til $5,0 \times 10^7/\text{ml}$. Tumorcellesuspensjonen ble forsiktig blandet med overføringspipette for å unngå celleaggregering. Etter dette ble celsuspensjonen fylt i en 1,0 ml tuberkulinsprøyte (Braun Melsungen) ved anvendelse av en bred nål (1,10 x 40 mm); for injeksjon ble nålstørrelsen endret (0,45 x 25 mm) og for hver injeksjon ble en ny nål anvendt. Anestesi ble utført ved anvendelse av en Stephens inhalasjonsenhet for små dyr med preinkuberingskammer (plexiglass), individuell nesemaske for mus (silikon) og ikke brennbar eller eksplosiv anestesiforbindelse Isofluran (cp-pharma) i et lukket sirkulasjonssystem. To dager før injeksjon ble pelsen til dyrene barbert av og for celleinjeksjon ble huden til anestetiserte dyr forsiktig løftet opp med en anatomisk pinsett og 100 µl celsuspensjon ($= 5,0 \times 10^6$ celler) ble injisert subkutan i dyrenes høyre flanke.

Behandling av dyrene.

På dag 35 av studien ble musene randomisert til statistisk sett godt distribuerte grupper, avhengig av deres kroppsvekt og tumorstørrelse. For behandling med terapeutiske antistoffer bestod hver gruppe av 10 mus og behandling med terapeutiske antistoffer ble utført én gang ukentlig i.p. i en tidsperiode på 6 uker. (Se fig. 19).

25

- Gruppe 1: Vehikkel (Xolair) 10 mg/kg
- Gruppe 2: Avastin 10 mg/kg
- Gruppe 3: Kombinasjon av monospesifikk <VEGF> Avastin 10 mg/kg pluss monospesifikk <ANG-2> Ang2i-LC06 10 mg/kg (= Avastin / Ang2i-LC06)
- Gruppe 4: Bispesifikt <VEGF-ANG-2>-antistoff 2441-Avastin-scFv-LC06 13.3 mg/kg

Overvåking:

Dyrene ble kontrollert 2x pr. uke med tanke på deres helsestatus. Kroppsvekten ble dokumentert 2x pr. uke etter celleinjeksjon. Tumorenes dimensjoner ble målt ved hjelp av caliper som begynte på dagen for iscenesettelse og deretter 2
 5 ganger pr. uke under hele behandlingsperioden. Tumorvolum ble beregnet i henhold til NCI-protokoll (tumorvekt = $1/2ab^2$, hvor "a" og "b" er henholdsvis den lange og korte diameteren til tumoren). Termineringskriterier var den kritiske tumormasse (opp til 1,7 g eller $\varnothing > 1,5$ cm), tap av kroppsvekt mer enn 20% fra grunnlinje, tumor-ulcerasjon eller generelt dårlig tilstand hos dyrene.

Overvåking av blodkar og angiogenese med merket anti-CD 31-antistoff.

Innledende studier avslørte at anti-CD31-antistoff var beste middel for bildeddannelse av tumorvaskulatur. Dette midlet målsøker muse-endotel CD31-reseptorer og visualiserer enkeltblodkar med et lavt signal-mot-bakgrunn-forhold.
 15 Derfor representerer bildeddannelse med anti-CD31-antistoff en mulig måte å bildeddanne tumorvaskulatur på. Tre mus fra hver terapigruppe er blitt valgt og injisert i.v. med 50 µg/muse-anti-CD3-antistoff kovalent merket med den organiske fluorofor Alexa610 på dag 35, 49 og 79. Nær-infrarød bildeddannelse ble utført 24 t. etter hver tilførsel av merket antistoff under inhalasjonsanestesi. En økning eller reduksjon av
 20 tumorvaskulatur ble visualisert ved anvendelse av verktøyet for sammenligning av bildeddannelse fra MAESTRO system. Under behandling med kontrollen mab Xolair og det terapeutiske antistoff Avastin ble en økning av tumorblodkar fra dag 35 til dag 79 observert. I motsetning til dette oppviste den kombinerte behandling med Avastin pluss Ang2i-LC06 og 2441-Avastin-scFv-LC06 en reduksjon av tumorvaskulatur (fig
 25 19).

Tumorregioner ble kvantifisert ved manuelt å tegne målingsområder og signalintensitet ble evaluert etter intensitetsverdier (totalt signal/eksponeringstid). De gjennomsnittlige endringene av CD31-signaler fra dag 35 til 49 og fra dag 49 til 79 ble plottet på fig. 19. Alle behandlingsgruppene avslørte en økning i tumorvaskulatur fra
 30 dag 35 til 49. Mens CD31-tumorsignaler stadig akselererte i gruppe 1 (Xolair) og gruppe 2 (Avastin), ble tumorvaskulatur signifikant redusert i gruppe 3 (kombinasjon av Avastin pluss <ANG-2> Ang2i-LC06) og gruppe 4 (bispesifikt <VEGF-ANG-2>-antistoff 2441-Avastin-scFv-LC06), idet gruppe 4 klart viser den mest uttalte anti-angiogene effekt (fig. 19).

35 Umiddelbart etter de siste in vivo bildeddannende studiene ble tumorer eksplantert (dag 79), fiksert i formalin og innstøpt i parafin for ex vivo studier. Fluorescensmikroskopi viste tallrike vel definerte kapillærer i tumorer behandlet med

kontroll mab Xolair. Adskillige tumorblodkar ble observert hos mus behandlet med Avastin. I motsetning til dette hadde behandlingsgrupper 3 og 4 signifikant færre og mindre definerte blodkar i tumorene sammenlignet med behandlingsgrupper 1 og 2, mens gruppe 4 viste den mest uttalte effekt. Gruppe 4 avslørte lavere mikrokaretthet, kapillærene var generelt mindre og ustrukturerte og de oppviste svakere anti-CD31 fluorescenssignaler enn gruppe 1, 2 og 3. Histokjemisk HE-farging viste intratumorale nekrotiske regioner for opp til 90% av alle regioner i behandlingsgruppen med det bispesifikke antistoffet i gruppe 4, noe som er klart høyere enn for de andre behandlingsgruppene (data ikke vist).

Eksempel 18

In vivo virkning av bispesifikke antistoffer <VEGF-ANG-2> og sammenlignet med de monospesifikke stam-antistoffene (alene eller i kombinasjon) i den iscenesatte subkutane Colo205 xenotransplantatmodellen i Scid beige-mus.

Cellelinjer og dyrkningsbetingelser:

Colo205 humane kolorektalkreftceller ble opprinnelig anskaffet fra ATCC og etter ekspansjon deponert i Roche Penzberg intern cellebank. Tumorcellelinje ble rutinemessig dyrket i RPMI 1640-medium (PAA, Laboratories, Østerrike) supplert med 10% fetalt bovint serum (PAA Laboratories, Østerrike) og 2 mM L-glutamin, ved 37°C i vannmettet atmosfære ved 5% CO₂. Passasje 2-5 ble anvendt for transplantasjon.

Dyr:

SCID beige-mus av hunkjønn; alder 4-5 uker ved ankomst (kjøpt fra Charles River, Tyskland) ble holdt under spesifikt patogenfrie betingelser med daglige sykluser på 12 timer lys/12 timer mørke i henhold til bindende retningslinjer (GV-Solas; Felasa; TierschG). Forsøksprotokoll for studien ble gjennomgått og godkjent av lokal myndighet. Etter ankomst ble dyrene holdt i karantenedelen av dyrenes oppholdsområde i én uke for å venne seg til nye omgivelser og for observasjon. Kontinuerlig overvåking av helsen ble utført på regulær basis. Diettmat (Provimi Kliba 3337) og vann (surgjort, pH 2,5-3) ble gitt ad libitum. Alderen til musene ved start av studien var omtrent 10 uker.

Tumorcelleinjeksjon:

På dagen for injeksjon ble Colo205-celler sentrifugert, vasket én gang og gjenoppslemmet i PBS. Etter en ytterligere vasking med PBS ble cellekonsentrasjon og celledyrrelse bestemt ved anvendelse av en celledetektor og analyseringssystem (Vi-

CELL, Beckman Coulter). For injeksjon av Colo205-celler ble den endelige titeren justert til $5,0 \times 10^7$ celler/ml, levedyktighet ca. 90%. Deretter ble 100 µl av denne suspensjonen, tilsvarende $2,5 \times 10^6$ celler pr. dyr, injisert s.c. i musenes høyre flanke.

Behandling av dyrene startet på dagen for randomisering, 16 dager etter celletransplantasjon (studie Ang2_PZ_Colo205_009) ved et midlere tumorvolum på 100 mm³, respektive.

Doseplan for studie Ang2_PZ_Colo205_009:

Antall dyr	Forbindelse	Dose (mg/kg)	Administreringsvei/måte
10	Xolair	10	i.p. én gang ukentlig
10	<VEGF> Avastin	10	i.p. én gang ukentlig
10	< ANG-2> Ang2i-LC06	10	i.p. én gang ukentlig
10	Ang2i-LC06 + Avastin	10 10	i.p. én gang ukentlig i.p. én gang ukentlig
10	<VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC06	13,3	i.p. én gang ukentlig
10	<VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-CH1-CL	20	i.p. én gang ukentlig
10	<VEGF-ANG-2> scFab-Avastin-LC06-2620	16,6	i.p. én gang ukentlig

10

Overvåking:

Dyrene ble kontrollert 2x pr. uke med tanke på deres helsestatus. Kroppsvekten ble dokumentert 2x pr. uke etter celleinjeksjon. Tumordimensjoner ble målt ved hjelp av caliper som begynte på dagen for iscenesetting og deretter 2 ganger pr. uke under hele behandlingsperioden. Tumorvolum ble beregnet i henhold til NCI-protokoll (tumorvekt = $1/2ab^2$, hvor "a" og "b" er henholdsvis den lange og korte diameteren til tumoren). Termineringskriterier var den kritiske tumormasse (opp til 1,7 g eller Ø > 1,5 cm), tap av kroppsvekt mer enn 20% fra grunnlinje, tumorulcerasjon eller generelt dårlig tilstand hos dyrene.

20

Resultater:

Tumoreksthemming (TGI) basert på midlere verdier (i prosent) på dag 61.

	TGI
<VEGF > Avastin	66
< ANG-2> Ang2i-LC06	47
Ang2i-LC06 + Avastin	78
<VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC06	87
<VEGF-ANG-2> Avastin-LC06- CH1-CL	92
<VEGF-ANG-2> scFab-Avastin-LC06-2620	86

5 Resultatene viser at alle tre bispesifikke <VEGF-ANG-2> Avastin
(bevacizumab)-ANG2i-LC06-antistoffer (alle basert på bevacizumab-sekvensene SEKV
ID NR: 7 og 8 og på ANG2i-LC06-sekvenser SEKV ID NR: 52 og 53) viste en sterkere
tumoreksthemming i xenotransplantat-tumormodell Colo205 i Scid beige-mus
sammenlignet med behandlingen med monospesifikke antistoffer ANG2i-LC06 og
10 Avastin alene eller kombinasjonen av ANG2i-LC06 og Avastin.

Eksempel 19

Ekspresjon & rensing og egenskaper hos bispesifikke <VEGF-ANG-2>-
antistoffmolekyler scFab-Avastin-LC10-2620, scFab-Avastin-LC10-2640 og scFab-
15 Avastin-LC10-2641, Avastin-LC10-KiH-C-scFab, Avastin-LC10-C-Fab-6CSS, Avastin-
LC10-CH1-CL, Avastin-LC10-VH-VL og Avastin-LC10-VH-VL-SS, Avastin-LC10-N-scFab
og Avastin-LC10-N-scFabSS.

Ved å erstatte VH- og VL-domenene på Ang2i-LC06 (SEKV ID NR: 52 og 53)
med de tilsvarende VH- og VL-domenene på Ang2i-LC10 (SEKV ID NR: 84 og 85) og
20 ved anvendelse av de (bortsett fra slik erstatning) analoge prosedyrene og
sekvensene beskrevet i eksempel 10 til 14, blir de bispesifikke <VEGF-ANG-2>-
antistoffmolekylene scFab-Avastin-LC10-2620, scFab-Avastin-LC10-2640 og scFab-
Avastin-LC10-2641, Avastin-LC10-KiH-C-scFab, Avastin-LC10-C-Fab-6CSS, Avastin-LC
10-CH1-CL, Avastin-LC 10-VH-VL og Avastin-LC 10-VH-VL-SS, Avastin-LC10-N-scFab
25 og Avastin-LC10-N-scFabSS, alle basert på <VEGF> bevacizumab og <ANG-2> Ang2i-
LC10, uttrykt og renset.

Bindingsaffiniteten og andre in vitro egenskaper blir bestemt som beskrevet i
eksemplene ovenfor.

Eksempel 20

In vivo virkning av bispesifikt antistoff <VEGF-ANG-2>-molekyler scFab-Avastin-LC10-2620, scFab-Avastin-LC10-2640 og scFab-Avastin-LC10-2641, Avastin-LC10-KiH-C-scFab, Avastin-LC10-C-Fab-6CSS, Avastin-LC10-CH1-CL, Avastin-LC10-VH-VL og Avastin-LC10-VH-VL-SS, Avastin-LC10-N-scFab og Avastin-LC10-N-scFabSS.

In vivo virkning av bispesifikt antistoff <VEGF-ANG-2>-molekyler scFab-Avastin-LC10-2620, scFab-Avastin-LC10-2640 og scFab-Avastin-LC10-2641, Avastin-LC 10-KiH-C-scFab, Avastin-LC10-C-Fab-6CSS, Avastin-LC 10-CH1 -CL, Avastin-LC10-VH-VL og Avastin-LC10-VH-VL-SS, Avastin-LC10-N-scFab og Avastin-LC10-N-scFabSS, blir bestemt analogt med de tilsvarende eksemplene ovenfor.

SEKVENSLISTE

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Bispecific anti-VEGF/anti-ANG-2 antibodies

<130> 25401 FT

5 <150> EP 08017607.6 <151> 2008-10-08

<150> EP 08021834.0

<151> 2008-12-16

<160> 136

<170> PatentIn version 3.2

10 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

15 <223> heavy chain CDR3, <VEGF>bevacizumab

 $\langle 400 \rangle$ 1

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

 $\langle 210 \rangle$ 2

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> heavy chain CDR2, <VEGF>bevacizumab

<400> 2

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

25 Arg

 $\langle 210 \rangle$ 3 $\langle 211 \rangle$ 5

<212> PRT

<213> Artificial

30 $\langle 220 \rangle$

<223> heavy chain CDR1, <VEGF>bevacizumab

85

5 <400> 3
 Asn Tyr Gly Met Asn
 1 5

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

 <220>
 <223> light chain CDR3, <VEGF>bevacizumab

 10 <400> 4
 Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
 1 5

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

 15 <220>
 <223> light chain CDR2, <VEGF>bevacizumab

 <400> 5
 Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
 1 5

 20 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> light chain CDR1, <VEGF>bevacizumab

 25 <400> 6
 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

 <210> 7
 <211> 123
 <212> PRT
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> heavy chain variable domain, <VEGF>bevacizumab

86

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain variable domain, <VEGF>bevacizumab

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

5

10

<210> 9
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> heavy chain CDR3, <VEGF>ranibizumab

<400> 9
 Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

10 <210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> heavy chain CDR2, <VEGF>ranibizumab

15 <400> 10
 Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
 1 5 10 15

Arg

20 <210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> heavy chain CDR1, <VEGF>ranibizumab

<400> 11
 His Tyr Gly Met Asn
 1 5

25 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> light chain CDR3, <VEGF>ranibizumab

<400> 12
 Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
 1 5

<210> 13
 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR2, <VEGF>ranibizumab

5

<400> 13

Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser
1				5		

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR1, <VEGF>ranibizumab

<400> 14

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

15

<210> 15

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20

<223> heavy chain variable domain, <VEGF>ranibizumab

89

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16

<211> 107

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain variable domain, <VEGF>ranibizumab

<400> 16

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

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

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

10

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

90

50

55

60

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

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

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

<210> 17

<211> 11

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR3, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 17

10

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

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> heavy chain CDR2, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 18

Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 19

20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR1, <VEGF>HuMab G6-31

25

<400> 19

Asp Tyr Trp Ile His
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR3, <VEGF>HuMab G6-31

5

<400> 20

Gln	Gln	Gly	Tyr	Gly	Asn	Pro	Phe	Thr
1				5				

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR2, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 21

Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser
1				5		

15

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20

<223> light chain CDR1, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 22

Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Val	Ala
1				5					10	

<210> 23

<211> 120

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain variable domain, <VEGF> HuMab G6-31

<400> 23

30

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

```

<400> 24
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1                               10                               15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Asn Pro Phe
      85                               90                               95

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

```

10

<210> 25
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> heavy chain CDR3, <ANG-2> Mab 536

<400> 25
 Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Tyr
 1 5 10

10 <210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> heavy chain CDR2, <ANG-2> Mab 536

15 <400> 26
 Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

20 <210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> heavy chain CDR1, <ANG-2> Mab 536

<400> 27
 Ser Tyr Gly Met His
 1 5

25 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> light chain CDR3, <ANG-2> Mab 536

<400> 28
 Met Gln Gly Thr His Trp Pro Pro Thr
 1 5

<210> 29
 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR2, <ANG-2> Mab 536

5

<400> 29

Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser
1				5		

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR1, <ANG-2> Mab 536

<400> 30

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp
1				5					10					15	

15

<210> 31

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20

<223> heavy chain variable domain, <ANG-2> Mab 536

<400> 31

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

95

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain variable domain, <ANG-2> Mab 536

<400> 32

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

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

<210> 33

<211> 20

5

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> (G4S)4 linker

5

<400> 33

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

Gly Gly Gly Ser
 20

<210> 34

<211> 104

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<400> 34

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 1 5 10 15

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 20 25 30

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 35 40 45

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 50 55 60

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100

15

<210> 35

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

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

```

<400> 36
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1          5          10          15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20          25          30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35          40          45

```

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

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

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

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

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

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

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

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

100

<210> 37
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 37
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> heavy chain CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 38
 Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val
 1 5

15

<210> 39
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> heavy chain CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 39
 Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

101

<210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> heavy chain CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

 <400> 40
 Asn Ala Trp Met Ser
 1 5

10 <210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> light chain CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

15 <400> 41
 Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Met Tyr Thr
 1 5 10

20 <210> 42
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> light chain CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

 <400> 42
 His Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5

25 <210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> light chain CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

 <400> 43
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Arg Leu Asn
 1 5 10

35 <210> 44
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

102

<220>

<223> heavy chain variable domain, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 44

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Thr Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 45

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain variable domain, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

5

10

103

<400> 45

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Met
 85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 46

<211> 20

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 46

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

Ala Phe Asp Ile
 20

10

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> heavy chain CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 47

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

Gly

<210> 48

20

<211> 5

104

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC06

5

<400> 48

Gly	Tyr	Tyr	Met	His
1				5

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 49

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

15

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20

<223> light chain CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 50

Asp	Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ser
1				5		

<210> 51

<211> 11

25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 51

30

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

<210> 52

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial

105

<220>

<223> heavy chain variable domain, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 52

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

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

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

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

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

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

5

85 90 95

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

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

Ser

<210> 53

<211> 110

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> light chain variable domain, <ANG-2>Ang2i_LC06

106

<400> 53

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

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

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

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

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

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

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

<210> 54

<211> 20

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 54

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

10

Ala Phe Asp Ile
 20

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> heavy chain CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 55

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

Gly

20

<210> 56

<211> 5

107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC07

5

<400> 56

Gly	Tyr	Tyr	Met	His
1				5

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 57

Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Gln	Gly	Val
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

15

1				5						10
---	--	--	--	---	--	--	--	--	--	----

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

20

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 58

Asp	Asp	Ser	Glu	Arg	Pro	Ser
1					5	

25

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30

<223> light chain CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 59

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

35

<210> 60

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial

108

<220>

<223> heavy chain variable domain, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 60

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 61

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain variable domain, <ANG-2>Ang2i_LC07

5

10

109

<400> 61

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

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

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

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

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

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

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

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR3, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 62

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

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR2, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 63

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

110

<220>

<223> heavy chain CDR1, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 64

Ser	Tyr	Gly	Met	His
1				5

5

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10

<223> light chain CDR3, <ANG-2>Ang2k-LC08

<400> 65

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

<210> 66

<211> 7

15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR2, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 66

20

Asn	Asn	Asp	Gln	Arg	Pro	Ser
1				5		

<210> 67

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> light chain CDR1, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 67

Ser	Gly	Phe	Ala	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	Ser	Val	Asn
1				5							10	

30

<210> 68

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain variable domain, <ANG-2> Ang2k_LC08

111

<400> 68

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110

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

5

<210> 69

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10

<223> light chain variable domain, <ANG-2> Ang2k_LC08

<400> 69

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

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

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

Ile Tyr Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

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

112

<210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> heavy chain CDR3, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 70
 Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val
 1 5

10 <210> 71
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> heavy chain CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09

15 <400> 71
 Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Val Lys Gly

20 <210> 72
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> heavy chain CDR1, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 72
 Asn Ala Trp Met Ser
 1 5

25 <210> 73
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> light chain CDR3, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 73
 Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro
 1 5

<210> 74
 <211> 7

113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09

5

<400> 74

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 75

<211> 16

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR1, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 75

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

15

<210> 76

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20

<223> heavy chain variable domain, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 76

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Thr Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val Trp Gly Ser Pro Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 77
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> light chain variable domain, <ANG-2> Ang2s LC09

```

<400> 77
Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile
 1          5          10          15
Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr
          20          25          30
Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
          35          40          45
Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
          50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
65          70          75          80
Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro Phe
          85          90          95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr
          100          105

```

10

$\langle 210 \rangle$ 78
 $\langle 211 \rangle$ 20
 $\langle 212 \rangle$ PRT
 $\langle 213 \rangle$ Artificial

<220>
<223> heavy chain CDR3, <ANG-2> Ang2i LC10

15

```

<400> 78
Ser  Pro  Asn  Pro  Tyr  Tyr  Tyr  Asp  Ser  Ser  Gly  Tyr  Tyr  Tyr  Pro  Gly
1          5          10          15

Ala  Phe  Asp  Ile
      20

```

20

<210> 79
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> heavy chain CDR2, <ANG-2> Ang2i LC10

115

<400> 79

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

Gly

<210> 80

<211> 5

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 80

Gly	Tyr	Tyr	Met	His
1			5	

10

<210> 81

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC10

15

<400> 81

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

<210> 82

<211> 7

20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10

25

<400> 82

Asp	Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ser
1				5		

<210> 83

<211> 11

<212> PRT

30

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 83

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

116

<210> 84
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> heavy chain variable domain, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 84
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125

10

Ser

<210> 85
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> light chain variable domain, <ANG-2> Ang2i_LC10

117

<400> 85

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

Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln
 20 25 30

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

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

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

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

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105

<210> 86

<211> 15

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 86

10

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

<210> 87

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> heavy chain CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 87

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

20

<210> 88

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

118

```

<220>
<223> heavy chain CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 88
Ser Tyr Gly Met His
1           5

5      <210> 89
      <211> 12
      <212> PRT
      <213> Artificial

<220>
10     <223> light chain CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 89
Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Pro Gly Val

      1           5           10

15     <210> 90
      <211> 7
      <212> PRT
      <213> Artificial

<220>
20     <223> light chain CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 90
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1           5

<210> 91
<211> 11
25     <212> PRT
      <213> Artificial

<220>
<223> light chain CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 91
Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
30     1           5           10

<210> 92
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

35     <220>
      <223> heavy chain variable domain, <ANG-2> Ang2k_LC11

```

119

<400> 92

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110

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

5

<210> 93

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> light chain variable domain, <ANG-2> Ang2k_LC11

<220>

<221> misc feature

<222> (98)..(98)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (102)..(102)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

120

<400> 93

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

Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln
 20 25 30

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

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

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

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

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

5

<210> 94

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10

<223> heavy chain CDR3, <VEGF>B20-4.1

<400> 94

Trp Gly His Ser Thr Ser Pro Trp Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> heavy chain CDR2, <VEGF>B20-4.1

<400> 95

Ala Ile Trp Pro Phe Gly Gly Tyr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

20

Gly

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

121

<220>

<223> heavy chain CDR1, <VEGF>B20-4.1

<400> 96

Phe	Ser	Ile	Asn	Gly	Ser	Trp	Ile
1				5			

5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR3, <VEGF>B20-4.1

<400> 97

Gln	Gln	Ser	Asn	Thr	Ser	Pro	Leu	Thr
1				5				

15

<210> 98

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> light chain CDR2, <VEGF>B20-4.1

<400> 98

Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser
1				5			

20

<210> 99

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> light chain CDR1, <VEGF>B20-4.1

<400> 99

Arg	Ala	Ser	Gln	Val	Ile	Arg	Arg	Ser	Leu	Ala
1				5					10	

30

<210> 100

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> heavy chain variable domain, <VEGF>B20-4.1

122

<400> 100

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Ile Asn Gly Ser
 20 25 30

Trp Ile Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Ala Ile Trp Pro Phe Gly Gly Tyr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val
 115

5

<210> 101

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10

<223> light chain variable domain, <VEGF>B20-4.1

<400> 101

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

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

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

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

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

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

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

123

<210> 102
 <211> 730
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> bevacizumab heavy chain Ang2i_LC06 scFv fusion peptide of <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC06

<400> 102
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

10

124

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

125

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

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser
 465 470 475 480

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

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln
 500 505 510

Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser
 515 520 525

Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr
 530 535 540

Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg
 545 550 555 560

Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr
 565 570 575

Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp
 580 585 590

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro
 610 615 620

126

Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala
625 630 635 640

Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp
645 650 655

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp
660 665 670

Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
675 680 685

Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu
690 695 700

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val
705 710 715 720

Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
725 730

<210> 103

<211> 727

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> bevacizumab heavy chain Ang2i_LC08 scFv fusion peptide of <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC08

<400> 103

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

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

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

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

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr

10

127

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

128

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser
465 470 475 480

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
485 490 495

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln
500 505 510

Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly
515 520 525

129

Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 530 535 540

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 545 550 555 560

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Thr Leu Asp Ile
 565 570 575

Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 580 585 590

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro
 610 615 620

Pro Ser Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser
 625 630 635 640

Gly Phe Ala Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln
 645 650 655

Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Asn Asp Gln Arg
 660 665 670

Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser
 675 680 685

Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 690 695 700

Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Cys
 705 710 715 720

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 725

<210> 104

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> light chain of bevacizumab

130

<400> 104

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

5

<210> 105

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

131

<400> 105

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg

180

185

190

5

<210> 106

<211> 504

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10

<223> Human angiopoietin-2 (ANG-2) with leader and His-tag

132

<400> 106

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

133

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile

Gln	Lys	Leu	Gln	His	Leu	Glu	His	Val	Met	Glu	Asn	Tyr	Thr	Gln	Trp	85	90	95
Leu	Gln	Lys	Leu	Glu	Asn	Tyr	Ile	Val	Glu	Asn	Met	Lys	Ser	Glu	Met	100	105	110
Ala	Gln	Ile	Gln	Gln	Asn	Ala	Val	Gln	Asn	His	Thr	Ala	Thr	Met	Leu	115	120	125
Glu	Ile	Gly	Thr	Ser	Leu	Leu	Ser	Gln	Thr	Ala	Glu	Gln	Thr	Arg	Lys	130	135	140
Leu	Thr	Asp	Val	Glu	Thr	Gln	Val	Leu	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Leu	Glu	145	150	160
Ile	Gln	Leu	Leu	Glu	Asn	Ser	Leu	Ser	Thr	Tyr	Lys	Leu	Glu	Lys	Gln	165	170	175
Leu	Leu	Gln	Gln	Thr	Asn	Glu	Ile	Leu	Lys	Ile	His	Glu	Lys	Asn	Ser	180	185	190
Leu	Leu	Glu	His	Lys	Ile	Leu	Glu	Met	Glu	Gly	Lys	His	Lys	Glu	Glu	195	200	205
Leu	Asp	Thr	Leu	Lys	Glu	Glu	Lys	Glu	Asn	Leu	Gln	Gly	Leu	Val	Thr	210	215	220
Arg	Gln	Thr	Tyr	Ile	Ile	Gln	Glu	Leu	Glu	Lys	Gln	Leu	Asn	Arg	Ala	225	230	235
Thr	Thr	Asn	Asn	Ser	Val	Leu	Gln	Lys	Gln	Gln	Leu	Glu	Leu	Met	Asp	245	250	255
Thr	Val	His	Asn	Leu	Val	Asn	Leu	Cys	Thr	Lys	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	260	265	270
Lys	Gly	Gly	Lys	Arg	Glu	Glu	Glu	Lys	Pro	Phe	Arg	Asp	Cys	Ala	Asp	275	280	285
Val	Tyr	Gln	Ala	Gly	Phe	Asn	Lys	Ser	Gly	Ile	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Ile	290	295	300
Asn	Asn	Met	Pro	Glu	Pro	Lys	Lys	Val	Phe	Cys	Asn	Met	Asp	Val	Asn			

[illegible]

$\langle 210 \rangle$ 108

 $\langle 211 \rangle$ 1124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

137

<400> 108

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

138

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Ala Pro Asn Val Ile Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Val Ile Asn

139

450		455		460
Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Pro Ile Lys Ser Lys Lys				
465		470		475 480
Leu Leu Tyr Lys Pro Val Asn His Tyr Glu Ala Trp Gln His Ile Gln				
	485		490	495
Val Thr Asn Glu Ile Val Thr Leu Asn Tyr Leu Glu Pro Arg Thr Glu				
	500		505	510
Tyr Glu Leu Cys Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly Gly Glu Gly				
	515		520	525
His Pro Gly Pro Val Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro				
	530		535	540
Pro Pro Arg Gly Leu Asn Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Thr Leu Asn				
	545		550	555 560
Leu Thr Trp Gln Pro Ile Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Val				
	565		570	575
Glu Val Glu Arg Arg Ser Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys				
	580		585	590
Val Pro Gly Asn Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu His Pro Arg				
	595		600	605
Glu Gln Tyr Val Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu				
	610		615	620
Trp Ser Glu Asp Leu Thr Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro				
	625		630	635 640
Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val				
	645		650	655
Ile Ser Trp Thr Ile Leu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Thr Ile				
	660		665	670
Arg Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Val Asp Val Lys				
	675		680	685

140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

141

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 109

<211> 946

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Heavy chain 1 of bispecific, tetravalent single chain Fab <VEGF-ANG-2> antibody molecule scFAB-Avastin-LC06-2620

142

<400> 109

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

143

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

144

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 450 455 460

Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr
 465 470 475 480

Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
 485 490 495

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp
 500 505 510

Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn
 515 520 525

Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp
 530 535 540

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr
 545 550 555 560

Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala
 565 570 575

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 580 585 590

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 595 600 605

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 610 615 620

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 625 630 635 640

145

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 645 650 655

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 660 665 670

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 675 680 685

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 690 695 700

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu
 705 710 715 720

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 725 730 735

Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 740 745 750

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
 755 760 765

Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
 770 775 780

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp
 785 790 795 800

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp
 805 810 815

Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 820 825 830

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 835 840 845

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 850 855 860

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

146

865 870 875 880

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
885 890 895

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
900 905 910

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
915 920 925

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
930 935 940

Thr His
945

<210> 110

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Light chain of bispecific, tetravalent single chain Fab <VEGF-ANG-2> antibody molecule
scFab-Avastin-LC06-2620

<400> 110

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

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

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

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

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

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

5

10

147

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 111

<211> 956

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Heavy chain 1 of bispecific, tetravalent single chain Fab <VEGF-ANG-2> antibody molecule scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640

<400> 111

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

5

10

148

50		55		60	
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr					
65		70		75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
		85		90	95
Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val					
		100		105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly					
		115		120	125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly					
		130		135	140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val					
145		150		155	160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe					
		165		170	175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val					
		180		185	190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val					
		195		200	205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys					
		210		215	220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu					
225		230		235	240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr					
		245		250	255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val					
		260		265	270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val					
		275		280	285

149

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro
 465 470 475 480
 Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
 485 490 495
 Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 500 505 510

150

Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
515 520 525

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
530 535 540

Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
545 550 555 560

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr
565 570 575

Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
580 585 590

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
595 600 605

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
610 615 620

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
625 630 635 640

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
645 650 655

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
660 665 670

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
675 680 685

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
690 695 700

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
705 710 715 720

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
725 730 735

151

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
740 745 750

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
755 760 765

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
770 775 780

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
785 790 795 800

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
805 810 815

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
820 825 830

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
835 840 845

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
850 855 860

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
865 870 875 880

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
885 890 895

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
900 905 910

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
915 920 925

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
930 935 940

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
945 950 955

<210> 112

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Light chain of bispecific, tetravalent single chain Fab <VEGF-ANG-2> antibody molecule
scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640

152

<400> 112

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 Phe Asn Arg Gly Glu Cys 210

<210> 113

<211> 956

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Heavy chain 1 of bispecific, tetravalent single chain Fab <VEGF-ANG-2> antibody
 molecule scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641

153

<400> 113

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

154

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

155

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

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

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro
 465 470 475 480

Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
 485 490 495

Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 500 505 510

Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 515 520 525

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
 530 535 540

Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 545 550 555 560

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr
 565 570 575

Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 580 585 590

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 595 600 605

156

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 610 615 620

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 625 630 635 640

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 645 650 655

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 660 665 670

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 675 680 685

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 690 695 700

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 705 710 715 720

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 725 730 735

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 740 745 750

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met
 755 760 765

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 770 775 780

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 785 790 795 800

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 805 810 815

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 820 825 830

157

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
835 840 845

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
850 855 860

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
865 870 875 880

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
885 890 895

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
900 905 910

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
915 920 925

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
930 935 940

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
945 950 955

<210> 114

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Light chain of bispecific, tetravalent single chain Fab <VEGF-ANG-2> antibody molecule
scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641

<400> 114

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

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

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

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

5

10

158

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 115

<211> 946

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Heavy chain 1 of bispecific, trivalent single chain Fab <VEGF-ANG-2> antibody molecule
Avastin-LC06-KiH-C-scFab

10

<400> 115

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

159

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

				245					250							255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val			260					265							270	
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		275					280						285			
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		290				295						300				
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	305				310					315						320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala				325					330						335	
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro			340				345							350		
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		355				360						365				
Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		370				375					380					
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr					390					395						400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu				405					410						415	
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser			420				425						430			
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		435				440						445				
Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln		450				455						460				
Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr					470					475						480

161

Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
 485 490 495

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp
 500 505 510

Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn
 515 520 525

Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp
 530 535 540

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr
 545 550 555 560

Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala
 565 570 575

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 580 585 590

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 595 600 605

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 610 615 620

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 625 630 635 640

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 645 650 655

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 660 665 670

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 675 680 685

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 690 695 700

162

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu
 705 710 715 720
 Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 725 730 735
 Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 740 745 750
 Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
 755 760 765
 Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
 770 775 780
 Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp
 785 790 795 800
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp
 805 810 815
 Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 820 825 830
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 835 840 845
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 850 855 860
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 865 870 875 880
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 885 890 895
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 900 905 910
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 915 920 925
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 930 935 940

Thr His
945

<210> 116

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial

163

<220>

<223> Heavy chain 2 of bispecific, trivalent single chain Fab <VEGF-ANG-2> antibody molecule
Avastin-LC06-KiH-C-scFab

<400> 116

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

164

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

165

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

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

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 117

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Light chain of bispecific, trivalent single chain Fab <VEGF-ANG-2> antibody molecule
Avastin-LC06-KiH-C-scFab

<400> 117

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

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

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

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

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

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

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

10

166

100

105

110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 118

<211> 698

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Heavy chain 1 of bispecific, trivalent <VEGF-ANG-2> antibody molecule Avastin-LC06-C-Fab-6CSS

10

<400> 118

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

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

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

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

167

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

168

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 465 470 475 480
 Gly Gly Ser Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala
 485 490 495
 Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser
 500 505 510
 Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu

169

515 520 525
 Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe
 530 535 540
 Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val
 545 550 555 560
 Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser
 565 570 575
 Ser Asp His Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg
 580 585 590
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 595 600 605
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 610 615 620
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 625 630 635 640
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 645 650 655
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 660 665 670
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 675 680 685
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 690 695

<210> 119

<211> 719

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Heavy chain 2 of bispecific, trivalent <VEGF-ANG-2> antibody molecule Avastin-LC06-C-Fab-6CSS

170

<400> 119

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

171

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

172

450 455 460
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 465 470 475 480
 Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 485 490 495
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 500 505 510
 Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu
 515 520 525
 Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala
 530 535 540
 Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
 545 550 555 560
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 565 570 575
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 595 600 605
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 610 615 620
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 625 630 635 640
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 645 650 655
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 660 665 670
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 675 680 685
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 690 695 700
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 705 710 715

<210> 120

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

173

<220>

<223> Light chain of bispecific, trivalent <VEGF-ANG-2> antibody molecule Avastin-LC06-C-Fab-6CSS

<400> 120

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 121

<211> 459

<212> PRT

<213> Artificial

5

10

174

<220>

<223> Heavy chain 1 of bispecific, bivalent domain exchanged <VEGF-ANG-2> antibody molecule Avastin-LC06-CH1-CL

<400> 121

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

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

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

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

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

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

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

5

175

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

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 145 150 155 160

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

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220

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

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

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285

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

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

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

176

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 122

<211> 457

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Heavy chain 2 of bispecific, bivalent domain exchanged <VEGF-ANG-2> antibody
 molecule Avastin-LC06-CH1-CL

<400> 122

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

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

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

10

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

177

50		55		60
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr				
65		70		75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
		85		90 95
Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val				
		100		105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala				
		115		120 125
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly				
		130		135 140
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala				
		145		150 155 160
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln				
		165		170 175
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser				
		180		185 190
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr				
		195		200 205
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser				
		210		215 220
Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro				
		225		230 235 240
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys				
		245		250 255
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val				
		260		265 270
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr				
		275		280 285

178

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

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

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

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 123

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Light chain 1 of bispecific, bivalent domain exchanged <VEGF-ANG-2> antibody molecule
 Avastin-LC06-CH1-CL

179

<400> 123

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 124

<211> 212

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Light chain 2 of bispecific, bivalent domain exchanged <VEGF-ANG-2> antibody molecule
 Avastin-LC06-CH1-CL

180

<400> 124

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys
 210

5

<210> 125

<211> 459

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Heavy chain 1 of bispecific, bivalent domain exchanged <VEGF-ANG-2> antibody molecule Avastin-LC06-VH-VL

181

<400> 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

182

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

183

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

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

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

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 126

<211> 439

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Heavy chain 2 of bispecific, bivalent domain exchanged <VEGF-ANG-2> antibody
molecule Avastin-LC06-VH-VL

<400> 126

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

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

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

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

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

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

10

184

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

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

186

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 128

<211> 230

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Light chain 2 of bispecific, bivalent domain exchanged <VEGF-ANG-2> antibody molecule
Avastin-LC06- VH-VL

10

<400> 128

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

188

<400> 129

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 145 150 155 160

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

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190

189

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

190

<210> 130

<211> 439

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Heavy chain 2 of bispecific, bivalent domain exchanged <VEGF-ANG-2> antibody molecule Avastin-LC06-VH-VL-SS

<400> 130

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

191

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
340 345 350

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

192

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435

<210> 131

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Light chain 1 of bispecific, bivalent domain exchanged <VEGF-ANG-2> antibody molecule
 Avastin-LC06- VH-VL-SS

<400> 131

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

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

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

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

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

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

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

5

10

193

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 132

<211> 230

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Light chain 2 of bispecific, bivalent domain exchanged <VEGF-ANG-2> antibody molecule
 Avastin-LC06- VH-VL-SS

10 <400> 132

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

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

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

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

194

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
130 135 140

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
145 150 155 160

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 133

<211> 706

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Heavy chain 1 of bispecific, bivalent ScFab-Fc fusion <VEGF-ANG-2> antibody molecule
Avastin-LC06-N-scFab

10 <400> 133

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

195

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

196

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 385 390 395 400

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 450 455 460

197

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
 705

<210> 134

<211> 699

<212> PRT

<213> Artificial

198

<220>

<223> Heavy chain 2 of bispecific, bivalent ScFab-Fc fusion <VEGF-ANG-2> antibody molecule
Avastin-LC06-N-scFab

<400> 134

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

199

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220

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

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 260 265 270

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

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro
 290 295 300

Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr
 305 310 315 320

Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 325 330 335

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser
 340 345 350

His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 355 360 365

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

200

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 385 390 395 400
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 405 410 415
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 420 425 430
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 435 440 445
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 450 455 460
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 465 470 475 480
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 485 490 495
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 500 505 510
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 515 520 525
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 530 535 540
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 545 550 555 560
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 565 570 575
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 580 585 590
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 595 600 605
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe

201

610

615

620

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

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
645 650 655

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

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695

<210> 135

<211> 706

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Heavy chain 1 of bispecific, bivalent ScFab-Fc fusion <VEGF-ANG-2> antibody molecule
Avastin-LC06-N-scFabSS

<400> 135

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

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

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

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

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

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

10

202

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

203

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

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

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

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 385 390 395 400

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 450 455 460

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

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

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

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

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

204

545 550 555 560
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 565 570 575
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 580 585 590
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 595 600 605
 Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 610 615 620
 Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 625 630 635 640
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 645 650 655
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 660 665 670
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 675 680 685
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 690 695 700
 Gly Lys
 705

<210> 136

<211> 699

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Heavy chain 2 of bispecific, bivalent ScFab-Fc fusion <VEGF-ANG-2> antibody molecule
 Avastin-LC06-N-scFabSS

<400> 136

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

10

205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220

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

207

465		470		475		480									
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
				485					490					495	
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
			500					505					510		
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
		515					520					525			
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
	530					535					540				
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
545					550					555					560
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
				565					570						575
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
			580					585					590		
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp
		595					600					605			
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe
	610					615					620				
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
625					630					635					640
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
				645					650					655	
Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
			660					665					670		
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
		675					680					685			
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
	690					695									

P a t e n t k r a v

1. Bispesifikt antistoff som spesifikt binder til human vaskulær endotel-vekstfaktor (VEGF) og humant angiopoietin-2 (ANG-2), som omfatter et første antigenbindingssete som spesifikt binder til human VEGF og et andre antigenbindingssete som spesifikt binder til humant ANG-2, hvor:

- i) nevnte antigenbindingsseter er hvert et par av et antistoff tung kjede variabelt domene og et antistoff lett kjede variabelt domene;
- ii) nevnte første antigenbindingssete som spesifikt binder til VEGF omfatter i tung kjede variabelt domenet en CDR3-region med SEKV ID NR: 1, en CDR2-region med SEKV ID NR: 2 og en CDR1-region med SEKV ID NR:3, og i lett kjede variabelt domenet en CDR3-region med SEKV ID NR: 4, en CDR2-region med SEKV ID NR:5 og en CDR1-region med SEKV ID NR:6;
- iii) nevnte andre antigenbindingssete som spesifikt binder til ANG-2 omfatter i tung kjede variabelt domenet en CDR3-region med SEKV ID NR: 46, en CDR2-region med SEKV ID NR: 47 og en CDR1-region med SEKV ID NR: 48, og i lett kjede variabelt domenet en CDR3-region med SEKV ID NR: 49, en CDR2-region med SEKV ID NR: 50 og en CDR1-region med SEKV ID NR: 51; og
- iv) nevnte antistoff er bivalent.

2. Bispesifikt antistoff ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at forholdet mellom bindingsaffinitetene KD til antigenbindingssetet spesifikt for VEGF/KD til antigenbindingssetet spesifikt for ANG-2 er 1,0–10,0.

3. Bispesifikt antistoffet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 2, k a r a k t e r i s e r t v e d det andre antigenbindingssetet som spesifikt binder til humant ANG-2 ikke spesifikt binder til humant angiopoietin 1 (ANG-1).

4. Farmasøytisk preparat som omfatter et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3.

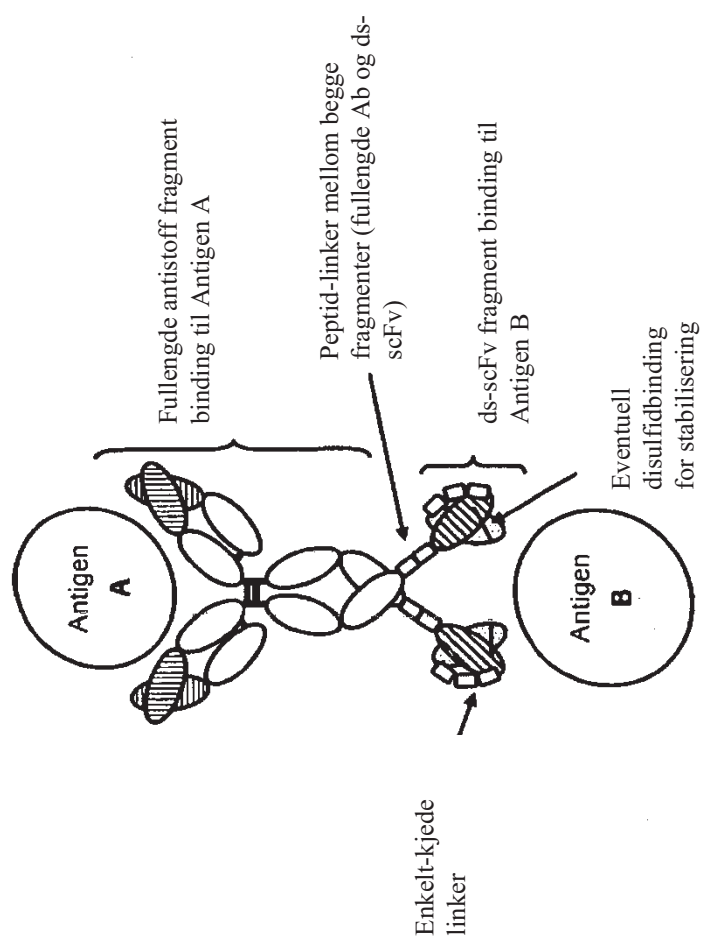
5. Farmasøytisk preparat ifølge krav 4, for anvendelse ved behandling av kreft.

6. Farmasøytisk preparat ifølge krav 4, for anvendelse ved behandling av vaskulære sykdommer.

7. Bispesifikt antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, for anvendelse ved behandling av kreft.
8. Bispesifikt antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, for anvendelse ved behandling av vaskulære sykdommer.
9. Nukleinsyre som koder for et bispesifikt antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3.
10. Ekspresjonsvektor som inneholder nukleinsyren ifølge krav 10, som er i stand til å uttrykke nevnte nukleinsyre i en prokaryot eller eukaryot vertscelle.
11. Prokaryot eller eukaryot vertscelle som omfatter en vektor ifølge krav 10.
12. Fremgangsmåte for fremstilling av et bispesifikt antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1 to 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d ekspresjon av en nukleinsyre ifølge krav 9 i en prokaryot eller eukaryot vertscelle og gjenvinning av nevnte bispesifikke antistoff fra nevnte celle eller cellkultursupernatant.

210

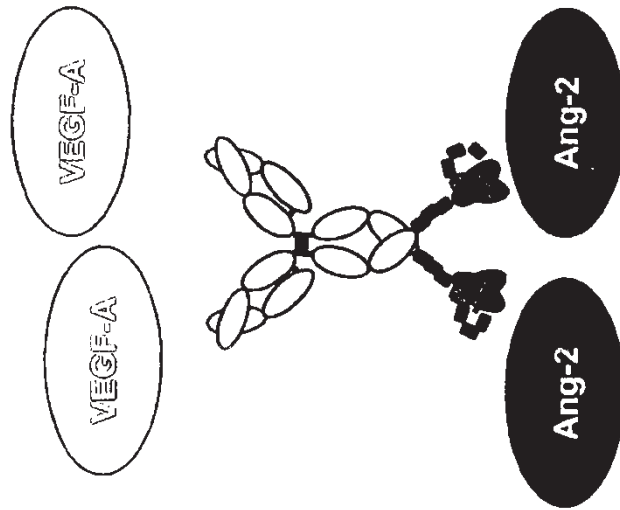
1/31

FIGUR 1A

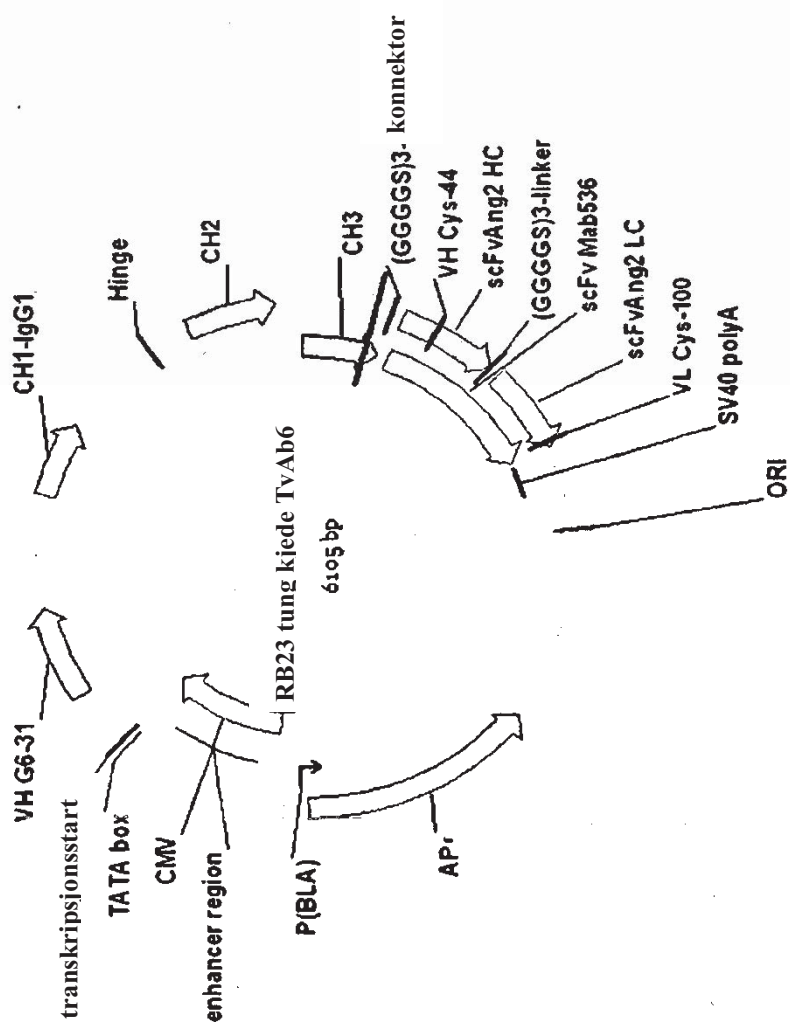
212

3/31

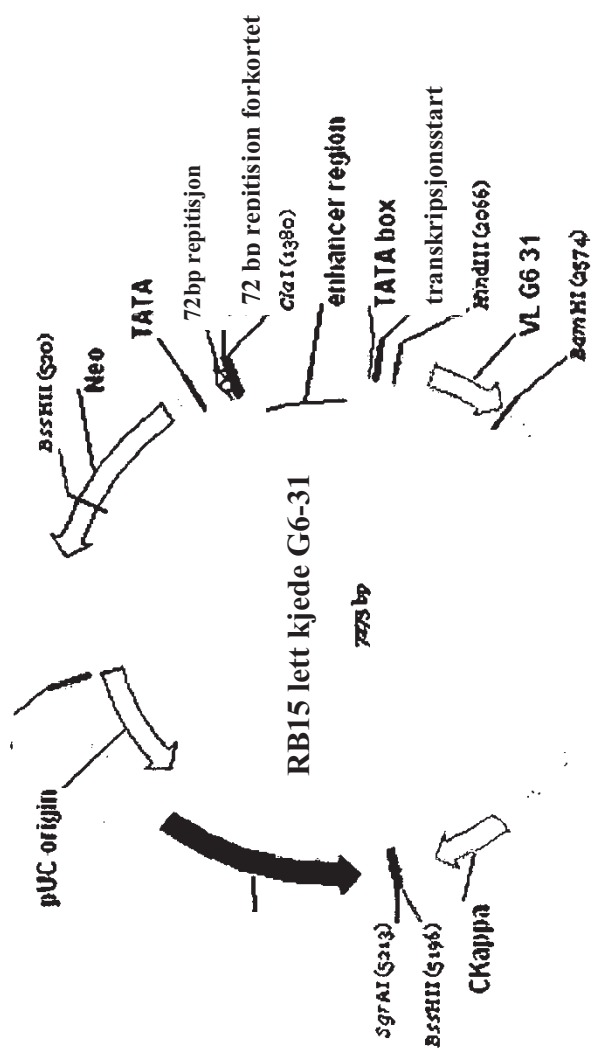
FIGUR 2A



FIGUR 2 – DEL EN



FIGUR 2B – DEL TO



215

6/31

FIGUR 3

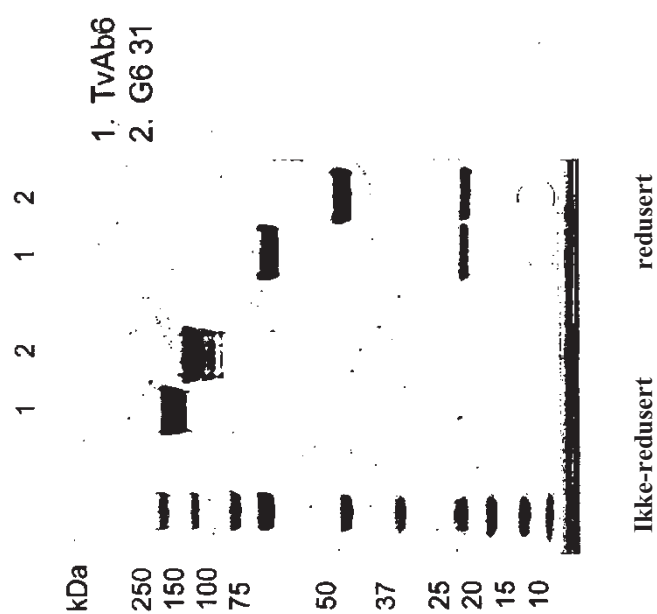


Fig. 4A

1. Protein A Pool
G6-31: 10 % aggregater
TvAb6: 25 % aggregater

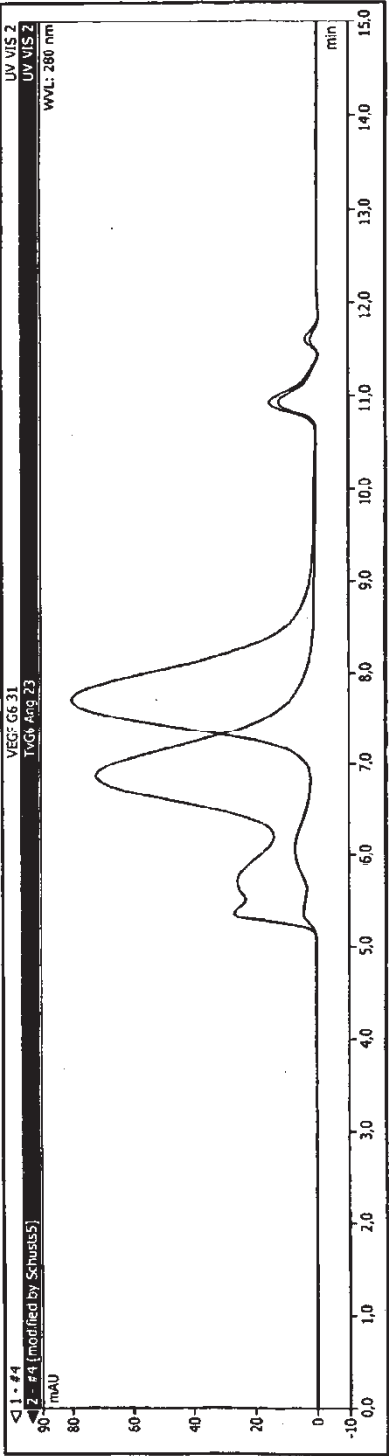


Fig. 4B

2. SEC Pool, etter rensing

G6-31: > 99 % monomer

TvAb6: > 99 % monomer

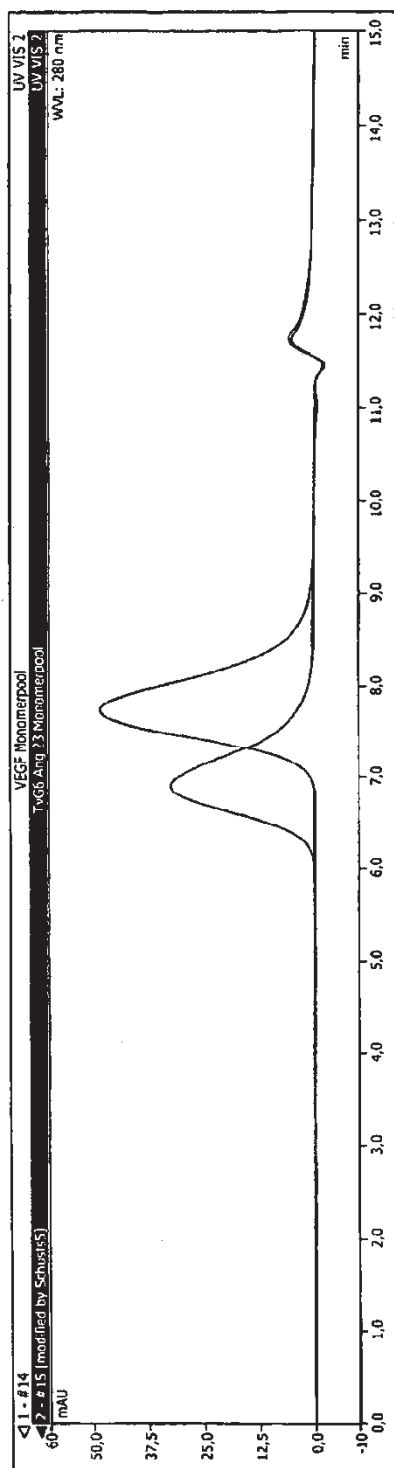
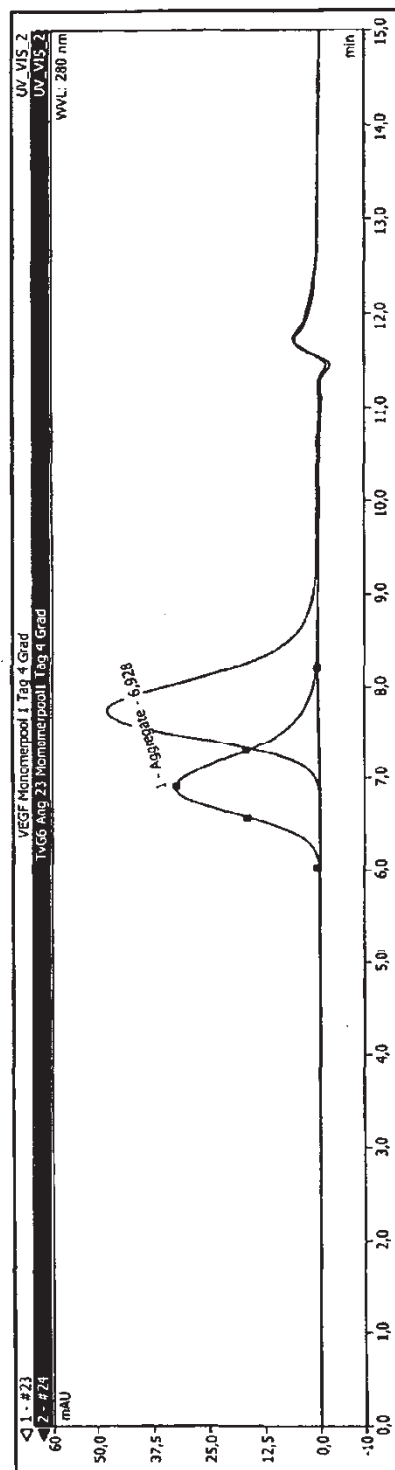


Fig. 4C

3. SEC Pool, efter 24 t ved 4°C

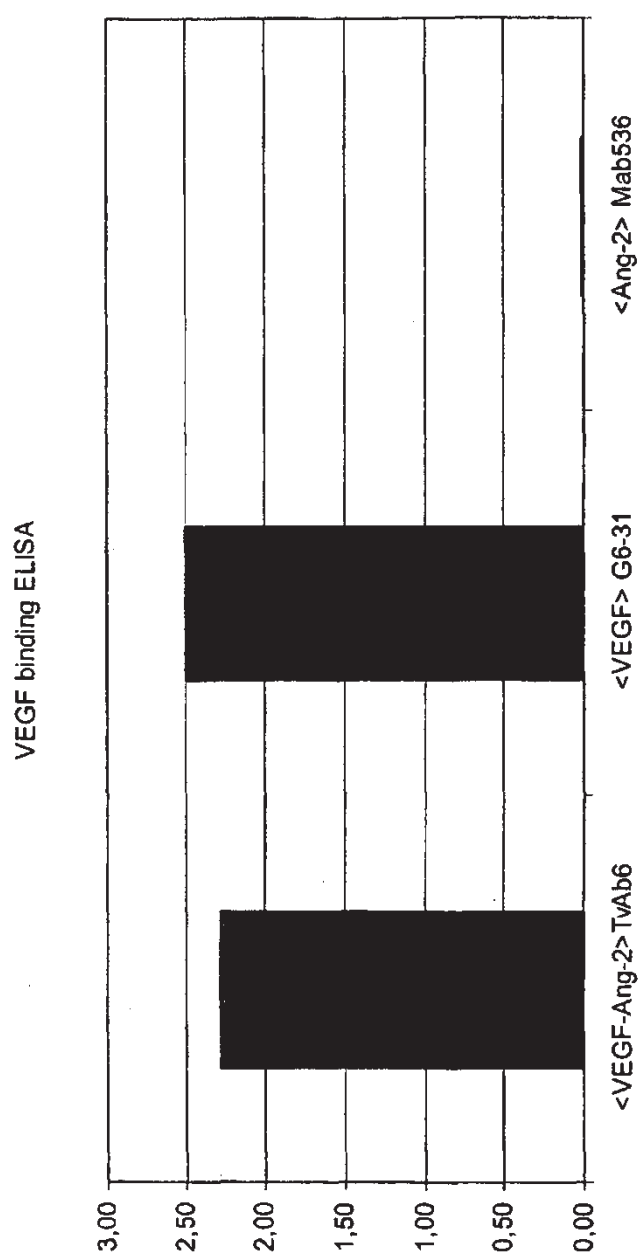
G6-31: > 99 % monomer

TvAb6: > 99 % monomer



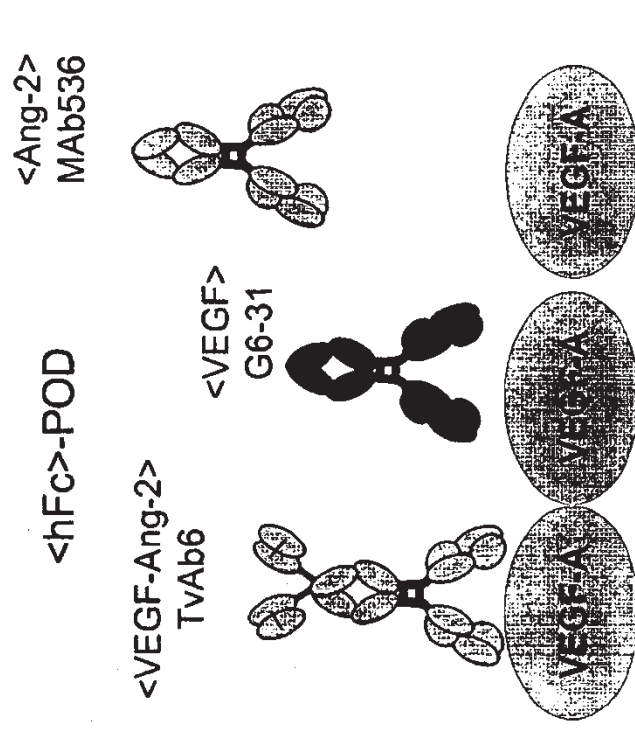
10/31

FIGUR 5 – DEL EN

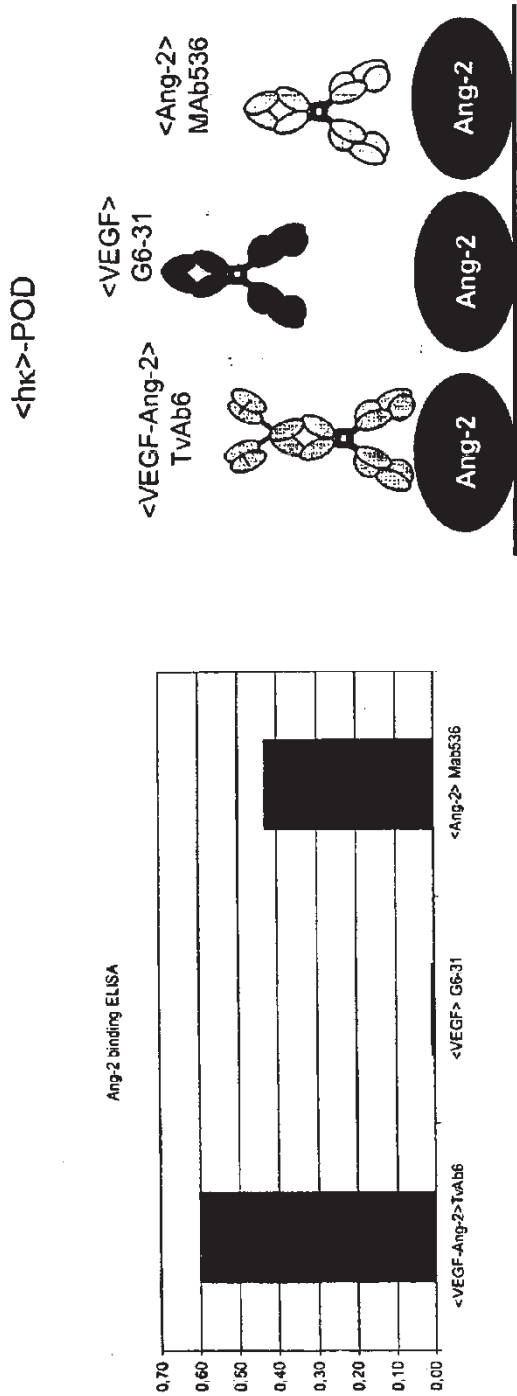


11/31

FIGUR 5 – DEL TO

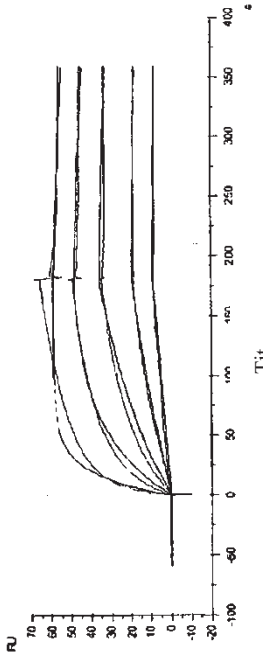


FIGUR 6A

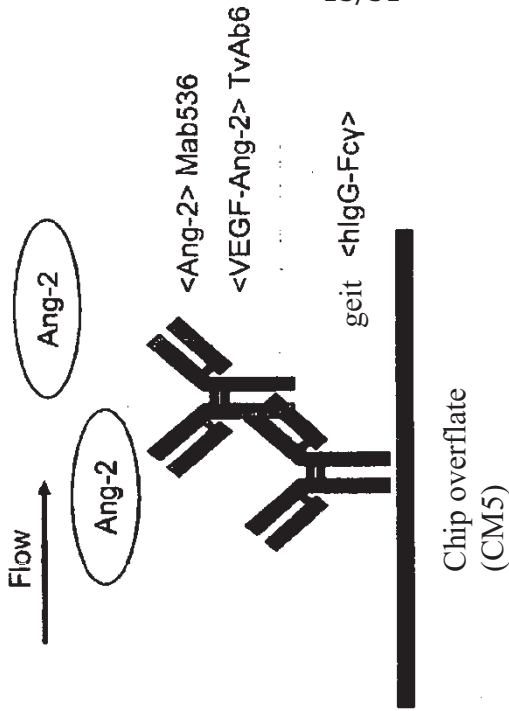
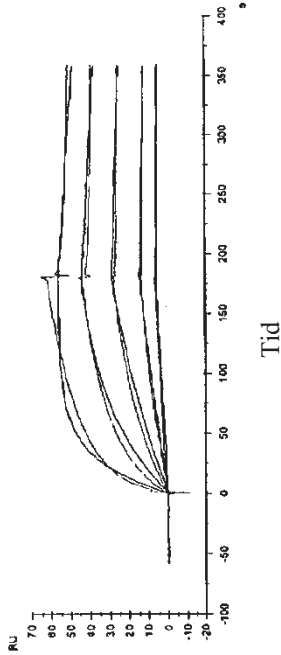


FIGUR 6B

Binding av hAng-2 to <Ang-2> Mab536 (1:1 Langmuir bindingsmodell)

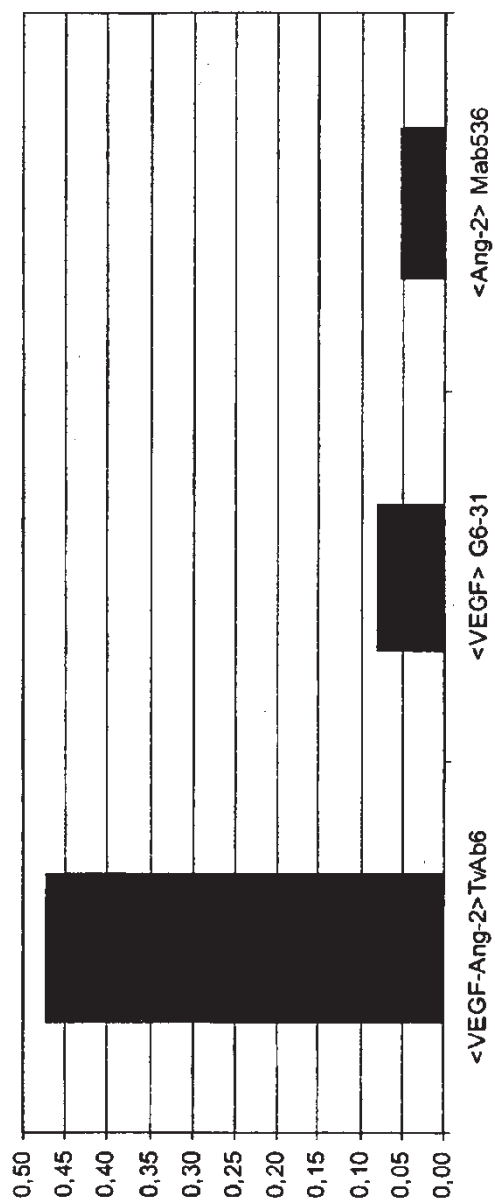


Binding av hAng-2 to <VEGF-Ang-2> TvAb6



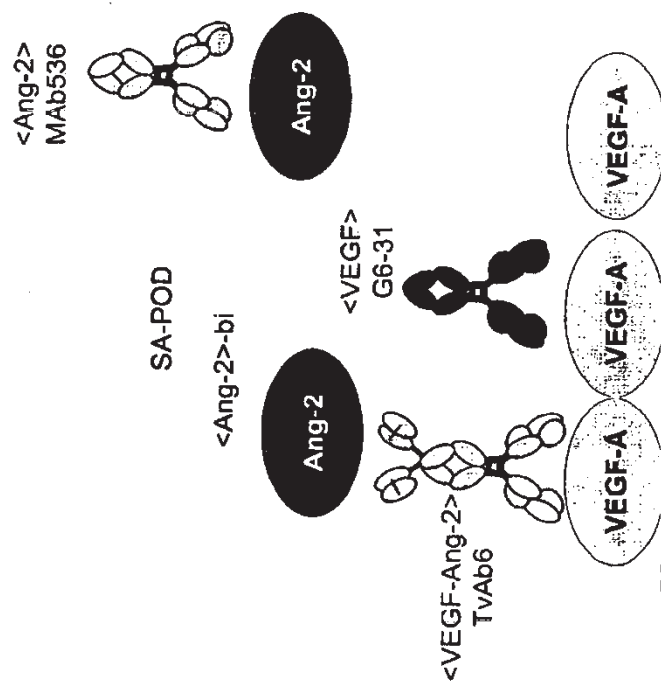
FIGUR 7 – DELEN

VEGF-Ang-2 brodannelse ELISA

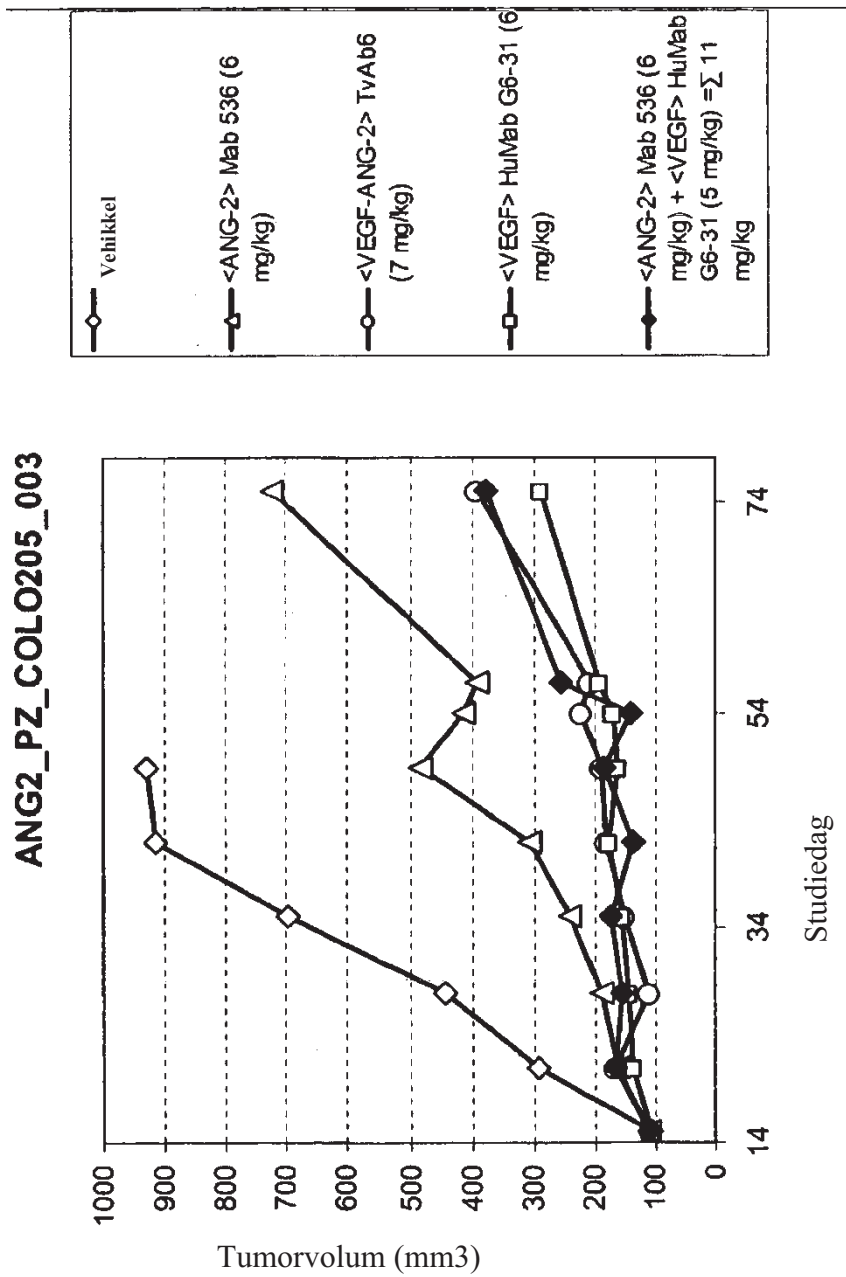


15/31

FIGUR 7 – DEL TO

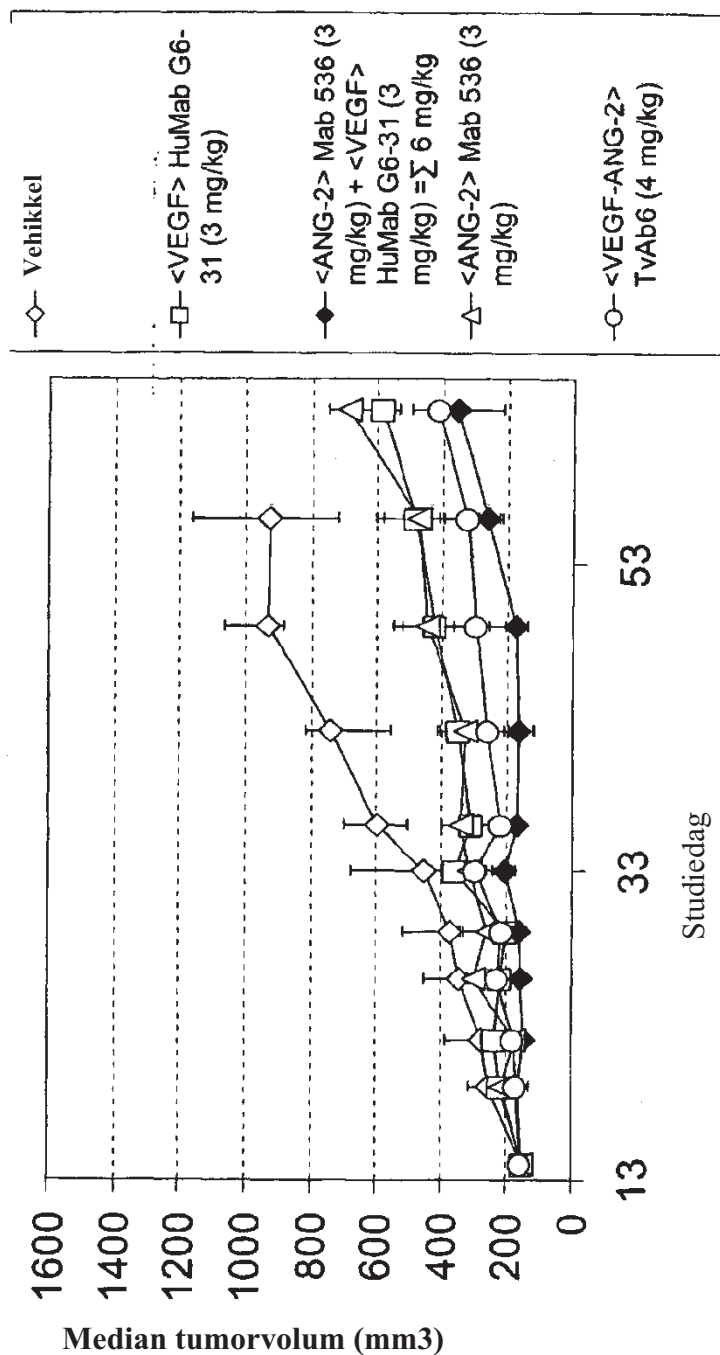


FIGUR 8A

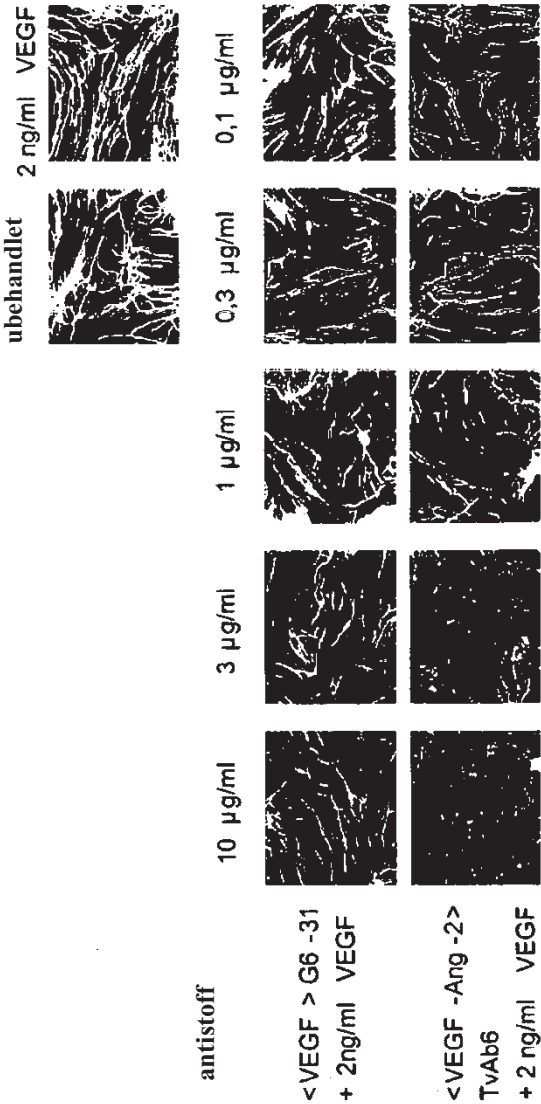


FIGUR 8B

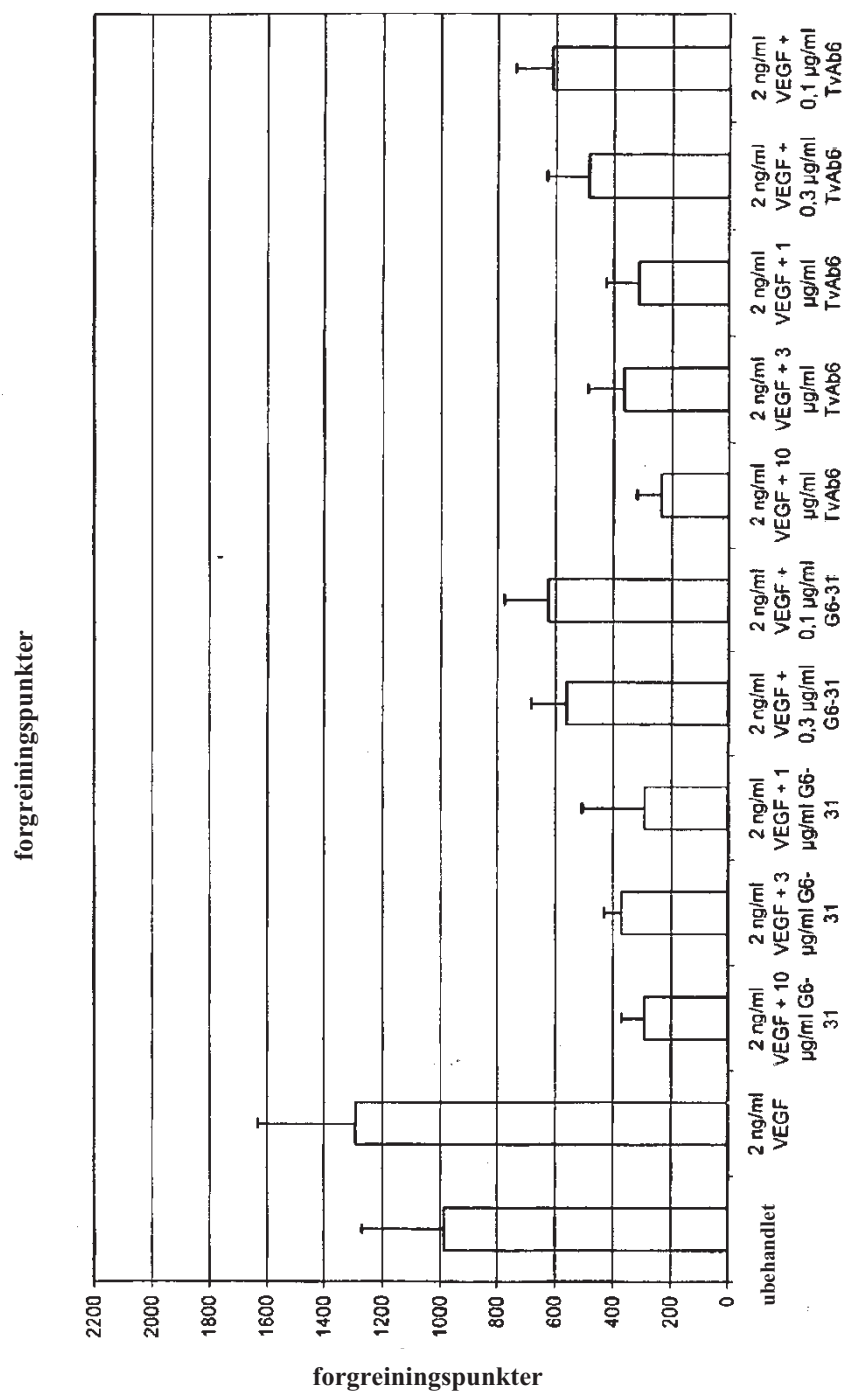
ANG2_PZ_COLO205_005



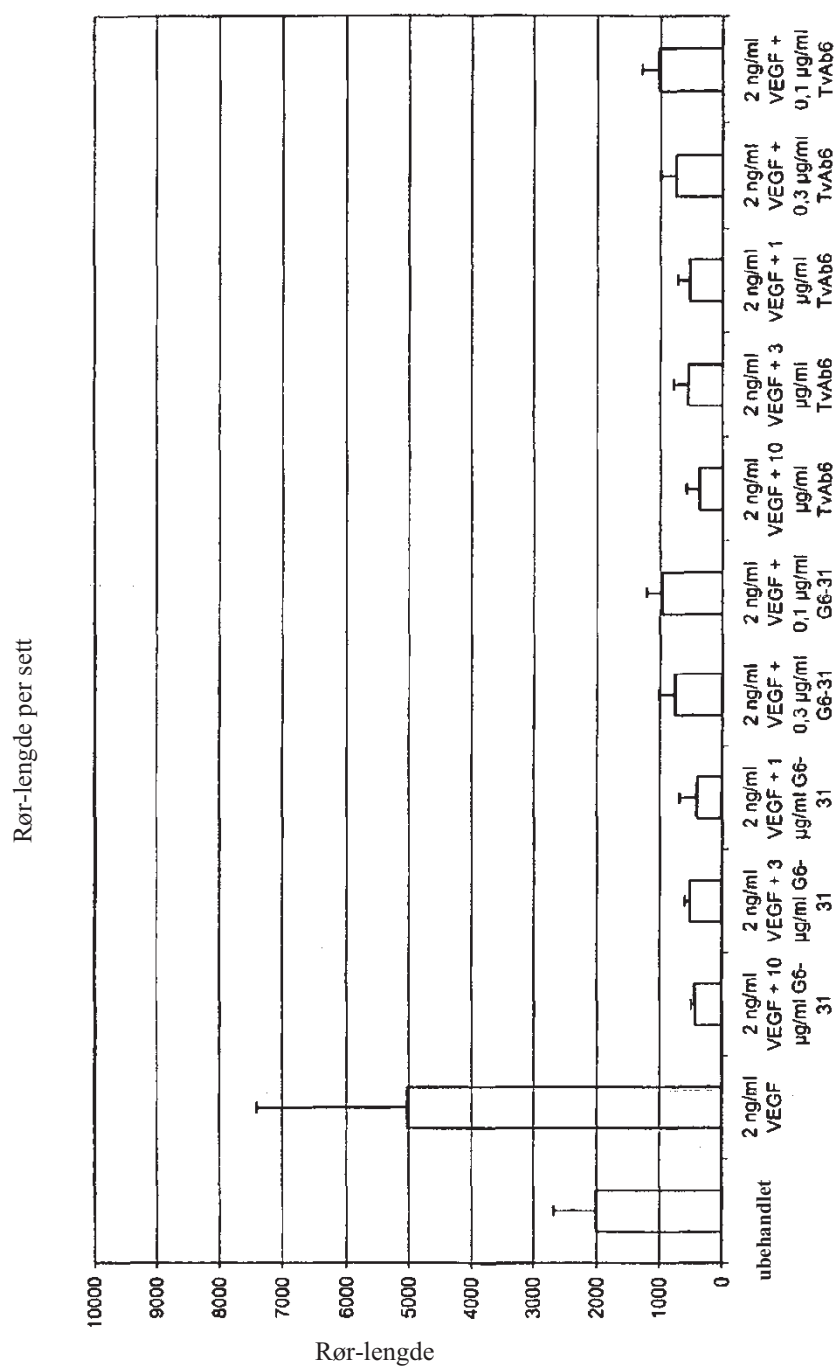
FIGUR 9



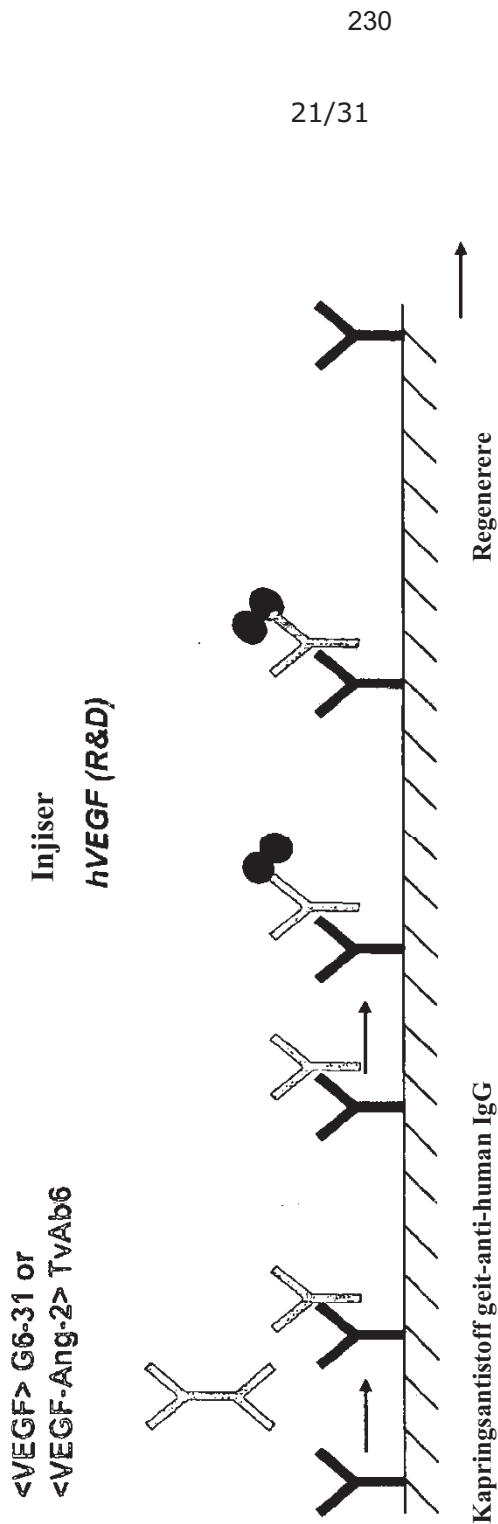
FIGUR 10A



FIGUR 10B



FIGUR 11



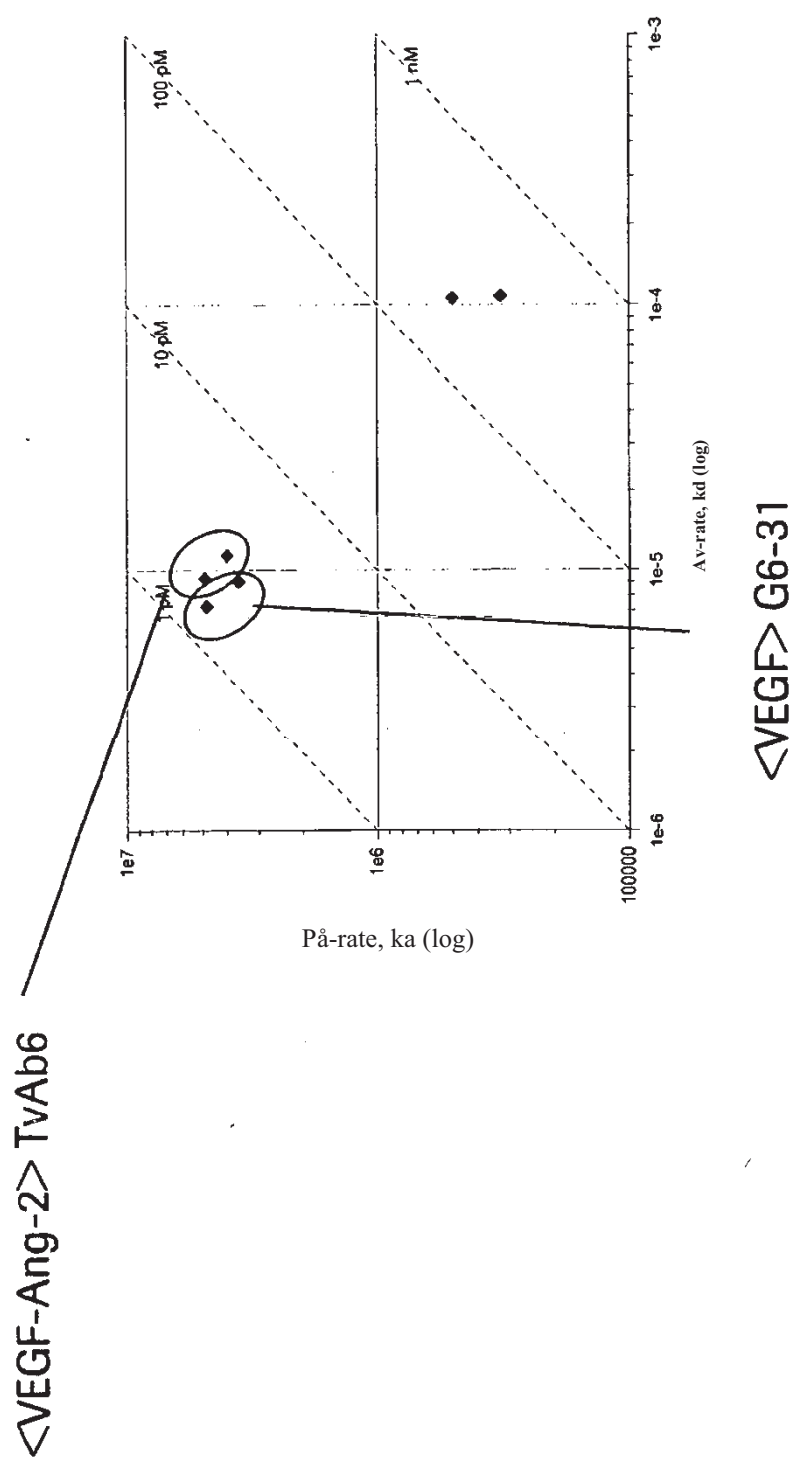
21/31

230

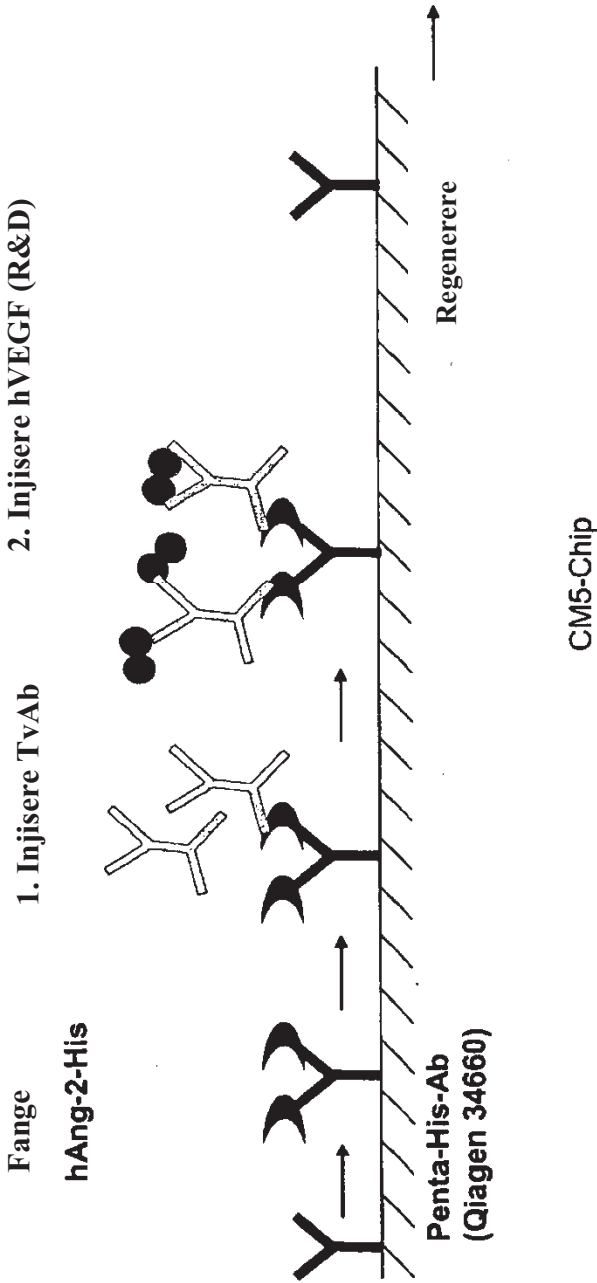
231

22/31

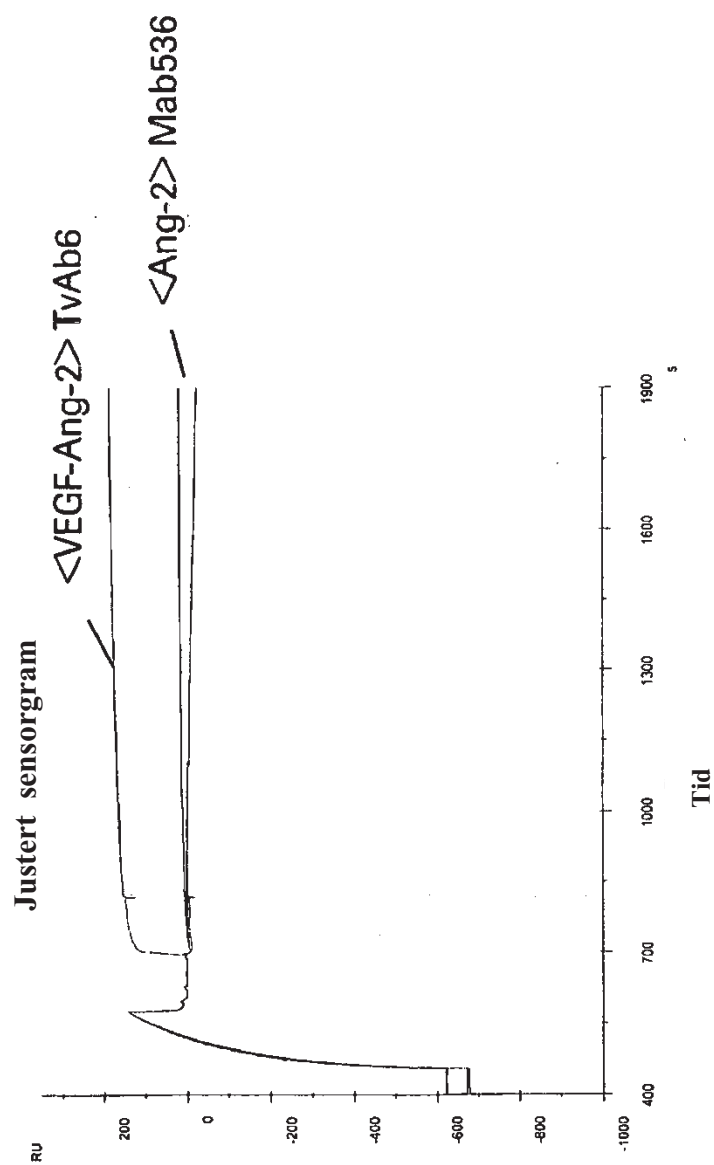
FIGUR 12



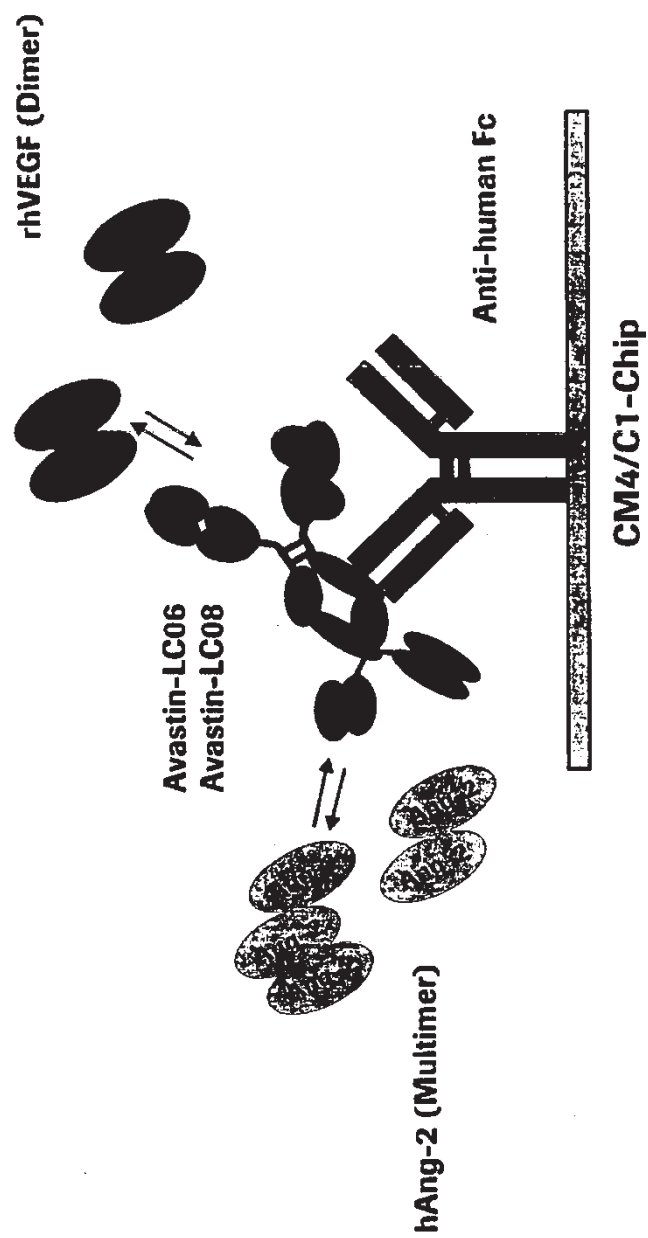
FIGUR 13



FIGUR 14



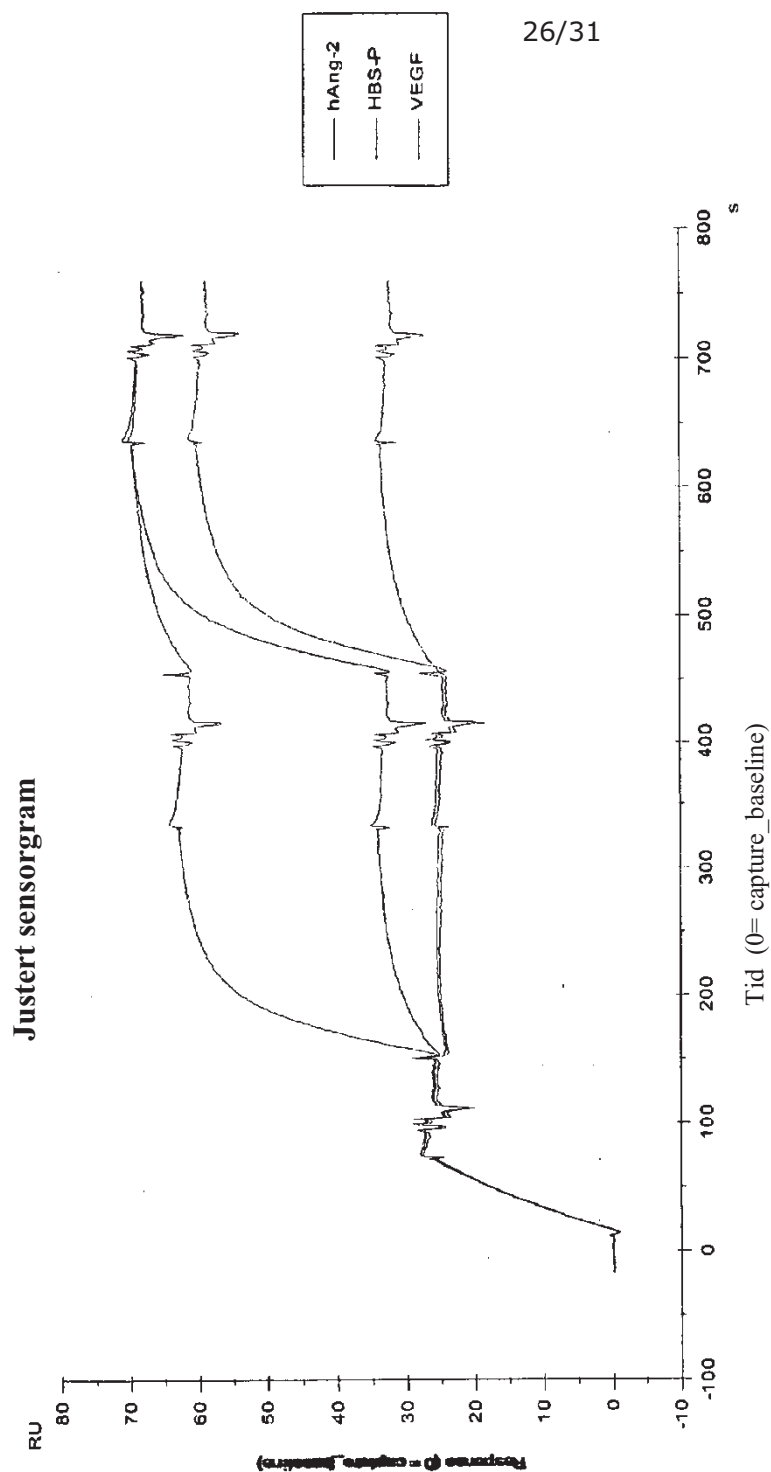
FIGUR 15A



235

26/31

FIGUR 15B



27/31

Fig 16A

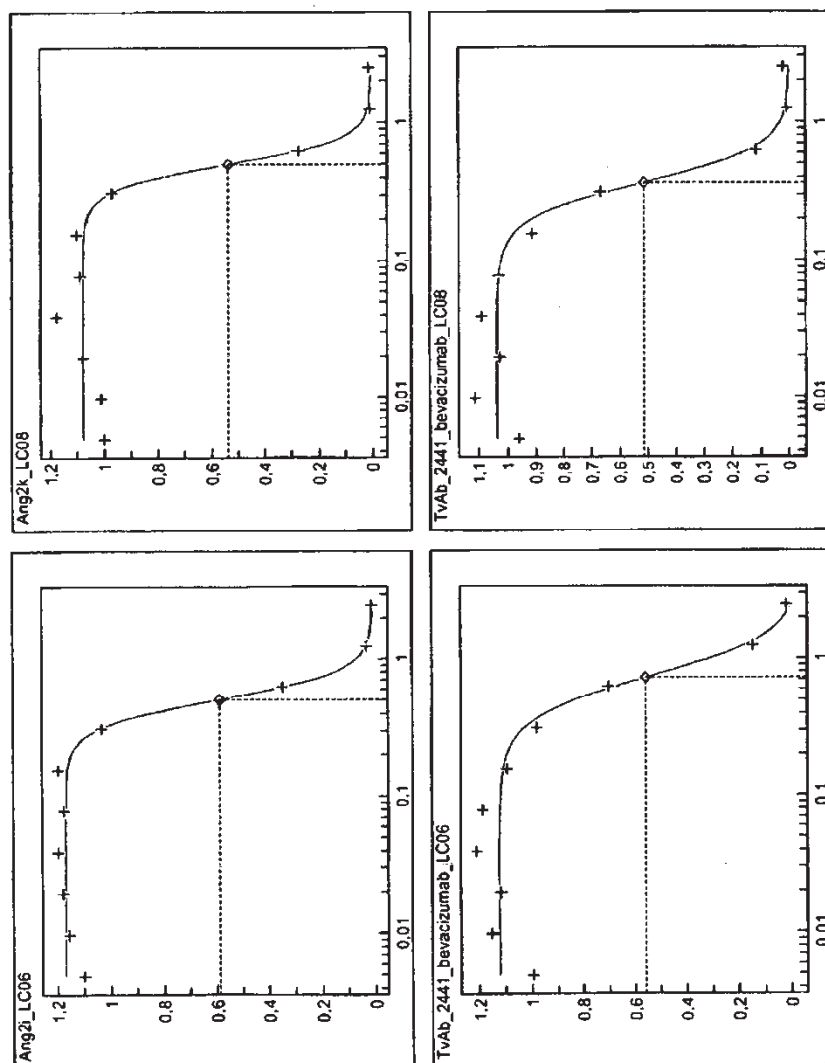
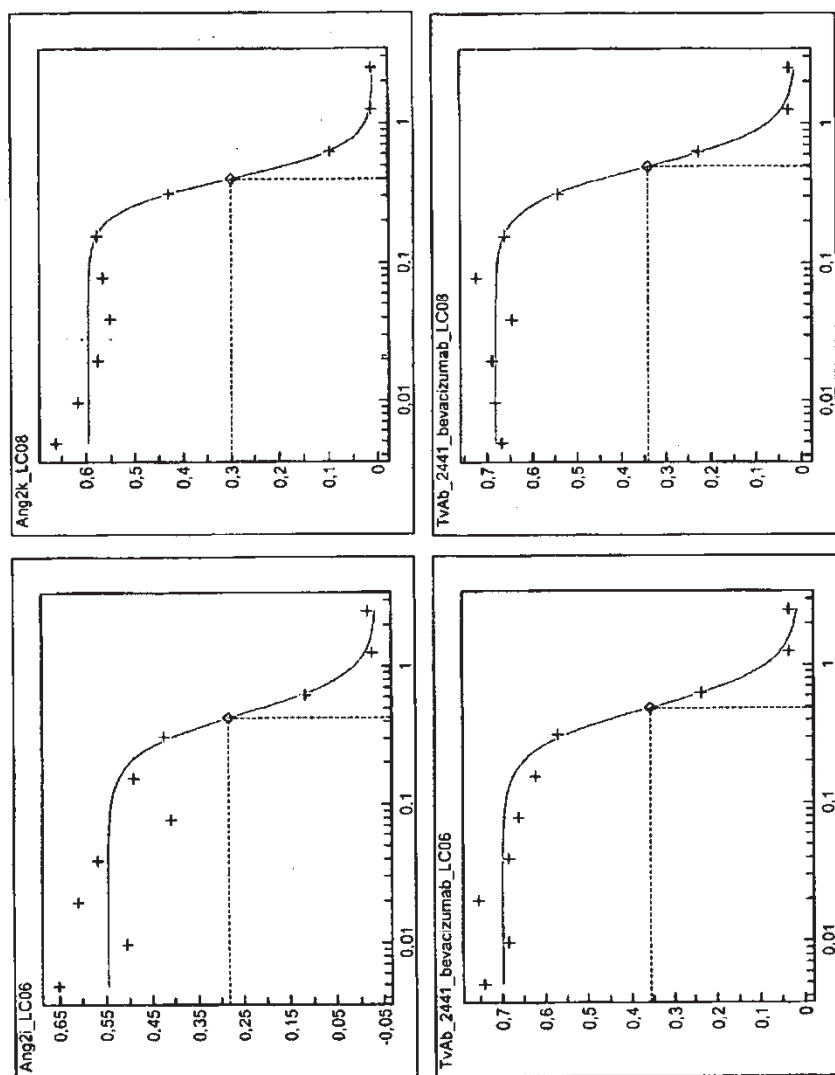


Fig 16B



238

29/31

Fig 17

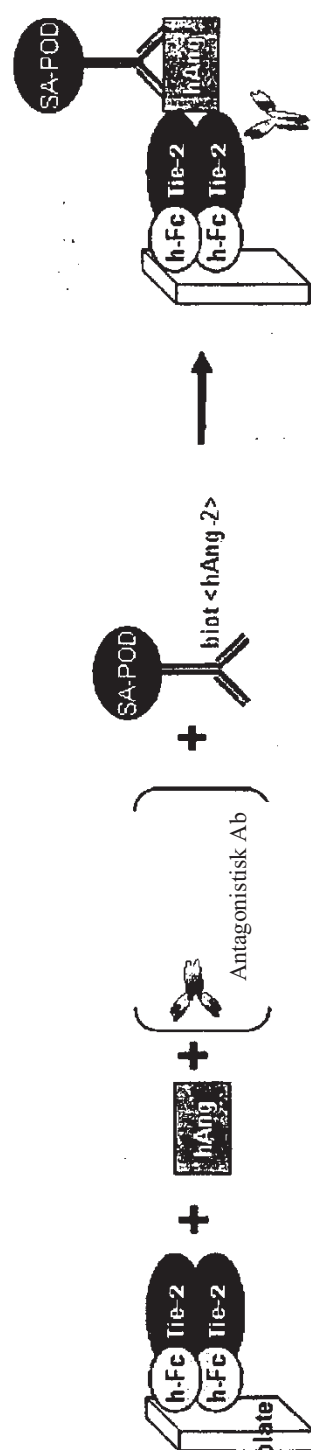


Fig 18

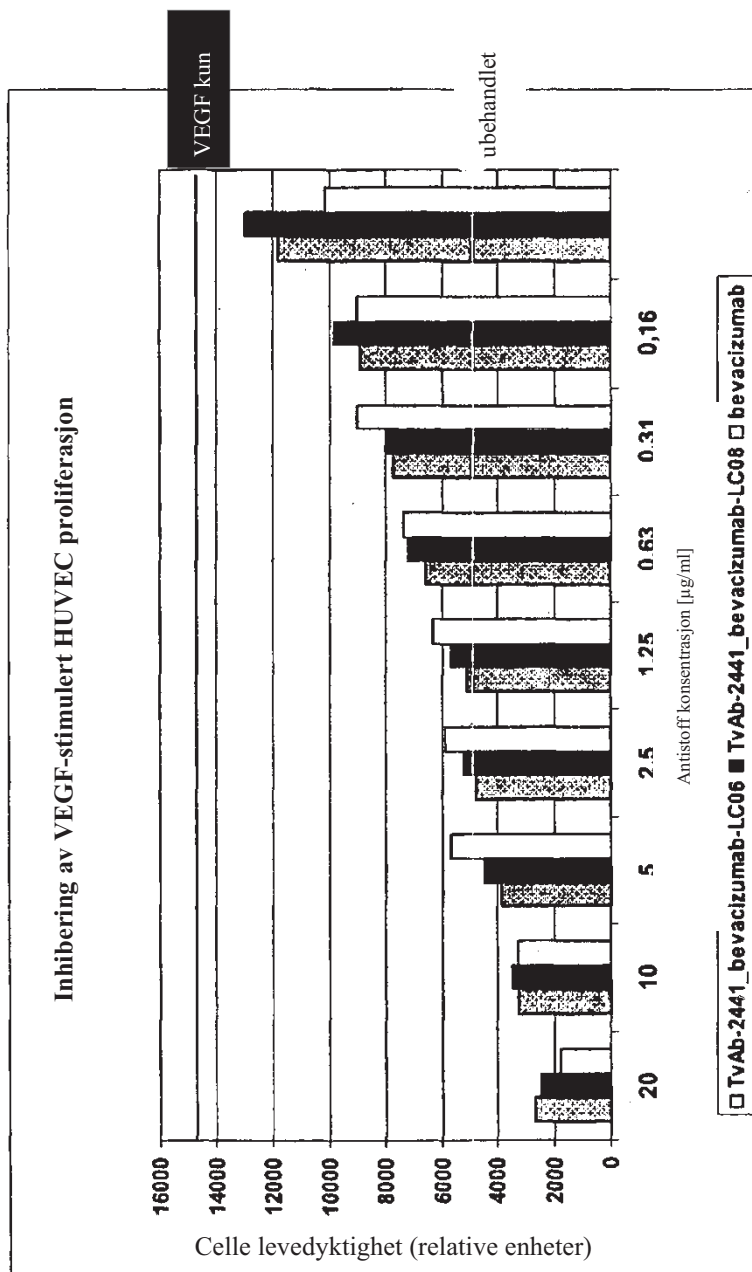


Fig 19