



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I426920 B

(45) 公告日：中華民國 103 (2014) 年 02 月 21 日

(21) 申請案號：100109957

(22) 申請日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 23 日

(51) Int. Cl. : A61K39/395 (2006.01)

C07K16/22 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2010/03/26

歐洲專利局

10003269.7

(71) 申請人：赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)

瑞士

(72) 發明人：貝納 蒙妮卡 BAEHNER, MONIKA (DE)；因霍夫 俊 沙賓 IMHOF-JUNG, SABINE (DE)；卡夫立 安尼塔 KAVLIE, ANITA (NO)；凱騰伯格 胡伯特 KETTENBERGER, HUBERT (DE)；克萊 克里斯汀 KLEIN, CHRISTIAN (DE)；瑞古拉 喬傑 湯瑪斯 REGULA, JOERG THOMAS (DE)；雪弗 瓦夫崗 SCHAEFER, WOLFGANG (DE)；史甘哲 傑詹 麥可 SCHANZER, JUERGEN MICHAEL (DE)；舒爾 瓦納 SCHEUER, WERNER (DE)；史都本拉奇 凱 甘諾 STUBENRAUCH, KAY-GUNNAR (DE)；湯瑪斯 馬庫斯 THOMAS, MARKUS (DE)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：

TW 200730191

TW 200738263

TW 200932271

審查人員：黃教威

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：14 共 0 頁

(54) 名稱

雙專一性、雙價抗-VEGF / 抗-ANG-2 抗體

BISPECIFIC, BIVALENT ANTI-VEGF/ANTI-ANG-2 ANTIBODIES

(57) 摘要

本發明係關於針對人類血管內皮生長因子(VEGF/VEGF-A)且針對人類血管生成素-2(ANG-2)之雙專一性、雙價抗體，其產生方法，含有該等抗體之醫藥組合物，及其用途。

The present invention relates to bispecific, bivalent antibodies against human vascular endothelial growth factor (VEGF/VEGF-A) and against human angiopoietin-2(ANG-2), methods for their production, pharmaceutical compositions containing said antibodies, and uses thereof.

(無元件符號說明)

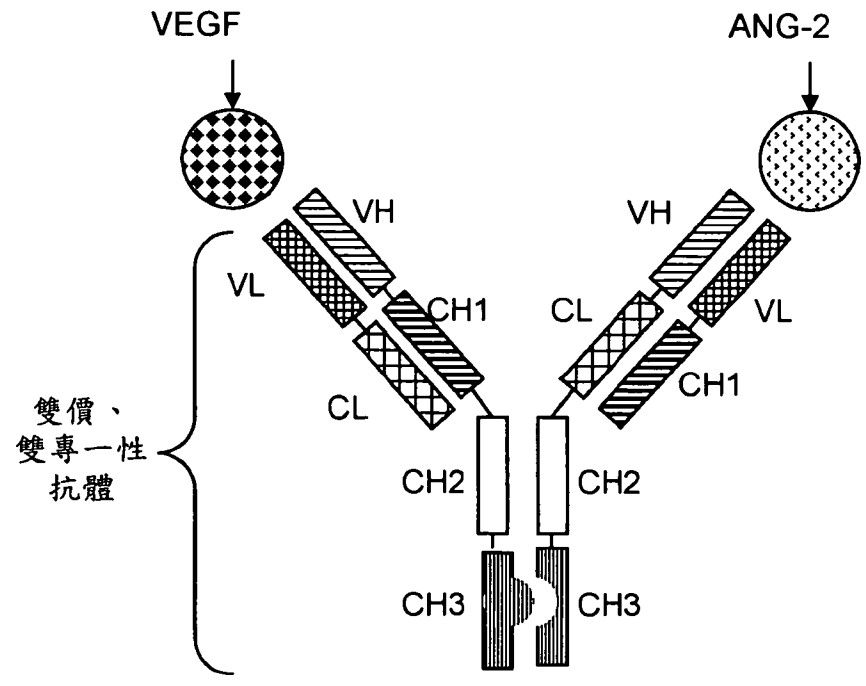


圖 1

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100109957

※申請日：100.3.23

※IPC 分類：

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 16/22 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

## 一、發明名稱：(中文/英文)

雙專一性、雙價抗-VEGF/抗-ANG-2抗體

BISPECIFIC, BIVALENT ANTI-VEGF/ANTI-ANG-2 ANTIBODIES

## 二、中文發明摘要：

本發明係關於針對人類血管內皮生長因子(VEGF/VEGF-A)且針對人類血管生成素-2(ANG-2)之雙專一性、雙價抗體，其產生方法，含有該等抗體之醫藥組合物，及其用途。

## 三、英文發明摘要：

The present invention relates to bispecific, bivalent antibodies against human vascular endothelial growth factor (VEGF/VEGF-A) and against human angiopoietin-2 (ANG-2), methods for their production, pharmaceutical compositions containing said antibodies, and uses thereof.

**四、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：第 ( 1 ) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

**五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**

(無)

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於針對人類血管內皮生長因子(VEGF/VEGF-A)且針對人類血管生成素-2(ANG-2)之雙專一性、雙價抗體，其產生方法，含有該等抗體之醫藥組合物，及其用途。

### 【先前技術】

血管生成與多種病症之發病機制有關，該等病症包括實體腫瘤、眼內新生血管症候群(諸如增生性視網膜病變或年齡相關之黃斑變性(AMD))、類風濕性關節炎及牛皮癬(Folkman, J. 等人, J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M. 等人, Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; 及 Garner, A., Vascular diseases, Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A. 及 Klintworth, G. K.(編), 第2版, Marcel Dekker, New York (1994), 第1625-1710頁)。在實體腫瘤之狀況下，相較於正常細胞而言，新血管生成允許腫瘤細胞獲得生長優勢及增殖自主性。因此，在乳癌以及若干種其他腫瘤之腫瘤切片之微血管密度與患者存活率之間觀測到相關性(Weidner, N. 等人, N Engl J Med. 324 (1991) 1-8; Horak, E.R. 等人, Lancet 340 (1992) 1120-1124; 及 Macchiarini, P. 等人, Lancet 340 (1992) 145-146)。

### VEGF及抗-VEGF抗體

人類血管內皮生長因子(VEGF/VEGF-A)(SEQ ID No:

105)描述於例如以下之文獻中：Leung, D.W.等人, *Science* 246 (1989) 1306-9；Keck, P.J.等人, *Science* 246 (1989) 1309-12；及Connolly, D.T.等人, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 20017-24。VEGF參與調節與腫瘤及眼內病症相關之正常及異常血管生成及新血管生成(Ferrara, N.等人, *Endocr. Rev.* 18 (1997) 4-25；Berkman, R.A.等人, *J. Clin. Invest.* 91 (1993) 153-159；Brown, L.F.等人, *Human Pathol.* 26 (1995) 86-91；Brown, L.F.等人, *Cancer Res.* 53 (1993) 4727-4735；Mattern, J.等人, *Brit. J. Cancer.* 73 (1996) 931-934；及Dvorak, H.F.等人, *Am. J. Pathol.* 146 (1995) 1029-1039)。VEGF為自若干來源分離得到之同型二聚糖蛋白。VEGF對內皮細胞顯示高度專一的促有絲分裂活性。VEGF在胚胎血小管生成期間之新血管形成中及成年期間之血管生成中具有重要調節功能(Carmeliet, P.等人, *Nature*, 380 (1996) 435-439；Ferrara, N.等人, *Nature*, 380 (1996) 439-442；綜述於Ferrara, N.等人, *Endocr. Rev.*, 18 (1997) 4-25中)。已在顯示單個VEGF等位基因失活會導致胚胎由於不能形成維管結構而死亡的研究中證實VEGF所起之作用的重要性(Carmeliet, P.等人, *Nature*, 380 (1996) 435-439；Ferrara, N.等人, *Nature*, 380 (1996) 439-442)。此外，VEGF對單核細胞具有強趨化活性，可在內皮細胞中誘導出纖維蛋白溶酶原活化因子及纖維蛋白溶酶原活化因子抑制物，且亦可誘導微血管滲透性。由於誘導微血管滲透性之活性，故有時稱其為血管滲透因子(VPF)。對

VEGF之分離及特性已有綜述；參見Ferrara, N.等人, J. Cellular Biochem., 47 (1991) 211-218及Connolly, D.T., J. Cellular Biochem., 47 (1991) 219-223。單個VEGF基因之替代mRNA剪接產生VEGF之5種同功異型物。

抗-VEGF中和抗體在小鼠中抑制多種人類腫瘤細胞株之生長(Kim, K.J.等人, Nature 362 (1993) 841-844；Warren, S.R.等人, J. Clin. Invest. 95 (1995) 1789-1797；Borgstrom, P.等人, Cancer Res. 56 (1996) 4032-4039；及Melnyk, O.等人, Cancer Res. 56 (1996) 921-924)。WO 94/10202、WO 98/45332、WO 2005/00900及WO 00/35956涉及針對VEGF之抗體。人類化單株抗體貝伐單抗(bevacizumab)(以商標名Avastin®出售)為腫瘤治療中所用之一種抗-VEGF抗體(WO 98/45331)。

蘭尼單抗(Ranibizumab)(商標名Lucentis®)為一種源自與貝伐單抗(Avastin)相同之親本鼠類抗體的單株抗體片段。其比母體分子小得多且已經親和力成熟而提供與VEGF-A之較強結合(WO 98/45331)。其為一種已獲准用於治療「濕」型年齡相關之黃斑變性(ARMD)的抗血管生成劑，濕型ARMD為年齡相關之視力損失的常見形式。另一抗-VEGF抗體例如為例如US 2007/0141065中所述之HuMab G6-31。

#### **ANG-2及抗-ANG-2抗體**

人類血管生成素-2(ANG-2)(或者縮寫為ANGPT2或ANG2)(SEQ ID No: 106)已描述於Maisonpierre, P.C.等人,

Science 277 (1997) 55-60及Cheung, A.H.等人, Genomics 48 (1998) 389-91中。已發現血管生成素-1及血管生成素-2 (ANG-1(SEQ ID No: 107)及ANG-2(SEQ ID No: 106))為Tie之配位體, Tie為選擇性表現於血管內皮中之酪胺酸激酶家族。Yancopoulos, G.D.等人, Nature 407 (2000) 242-48。血管生成素家族目前存在四個確定的成員。血管生成素-3及血管生成素-4(Ang-3及Ang-4)可代表小鼠及人類中相同基因座上有很大差異之對應物。Kim, I.等人, FEBS Lett, 443 (1999) 353-56; Kim, I.等人, J Biol Chem 274 (1999) 26523-28。ANG-1及ANG-2最初在組織培養實驗中分別鑑別為促效劑及拮抗劑(關於ANG-1, 參見: Davis, S.等人, Cell 87 (1996) 1161-69; 且關於ANG-2, 參見: Maisonpierre, P.C.等人, Science 277 (1997) 55-60)。所有已知血管生成素主要結合於Tie2, 且Ang-1與Ang-2皆以3 nM(Kd)親和力結合於Tie2。Maisonpierre, P.C.等人, Science 277 (1997) 55-60。已顯示Ang-1支持EC存活且促進內皮完整性, Davis, S.等人, Cell 87 (1996) 1161-69; Kwak, H.J.等人, FEBS Lett 448 (1999) 249-53; Suri, C.等人, Science 282 (1998) 468-71; Thurston, G.等人, Science 286 (1999) 2511-2514; Thurston, G.等人, Nat. Med. 6 (2000) 460-63, 而ANG-2具有相反作用且在無存活因子VEGF或鹼性纖維母細胞生長因子時促使血管不穩定及退化。Maisonpierre, P.C.等人, Science 277 (1997) 55-60。然而, 關於ANG-2功能之許多研究已表明更複雜之情形。



ANG-2可能為複雜的血管重塑調節子，其在血管芽生 (vessel sprouting) 與血管退化方面皆起一定作用。證實 ANG-2之該等作用的表現分析揭示在成人芽生式血管生成情形下 ANG-2與 VEGF一起被迅速誘導，而在血管退化情形下 ANG-2在無 VEGF時被誘導。Holash, J.等人, *Science* 284 (1999) 1994-98；Holash, J.等人, *Oncogene* 18 (1999) 5356-62。與情境依賴性作用一致，ANG-2專一地結合於由 Ang-1活化之同一內皮專一性受體 Tie-2，但對其活化具有情境依賴性效應。Maisonpierre, P.C.等人, *Science* 277 (1997) 55-60。

角膜血管生成檢測已顯示 ANG-1與 ANG-2皆具有類似作用，與 VEGF協同地起作用以促進新血管之生長。Asahara, T.等人, *Circ. Res.* 83 (1998) 233-40。藉由在活體外於高濃度下觀測來提高存在劑量依賴性內皮反應之可能性，ANG-2亦可具促血管生成性。Kim, I.等人, *Oncogene* 19 (2000) 4549-52。在高濃度下，ANG-2在血清剝奪細胞凋亡期間藉由經由 PI-3 激酶及 Akt 路徑活化 Tie2 來充當內皮細胞之細胞凋亡存活因子。Kim, I.等人, *Oncogene* 19 (2000) 4549-52。

其他活體外實驗表明在持續暴露期間，ANG-2之作用可自 Tie2 之拮抗劑逐漸變為 Tie2 之促效劑，且在隨後的時間點，其可能直接促成血管形成及新生血管穩定化。Teichert-Kuliszewska, K.等人, *Cardiovasc. Res.* 49 (2001) 659-70。此外，若將 EC 培養於纖維蛋白凝膠上，則亦觀測

到 Tie2 經 ANG-2 活化，此或許表明 ANG-2 之作用可能取決於 EC 分化狀態。Teichert-Kuliszewska, K. 等人, *Cardiovasc. Res.* 49 (2001) 659-70。在培養於三維膠原蛋白凝膠中之微血管 EC 中，ANG-2 亦可誘導 Tie2 活化且促進毛細管狀結構形成。Mochizuki, Y. 等人, *J. Cell. Sci.* 115 (2002) 175-83。利用 3-D 球狀共培養作為血管成熟之活體外模型可證明 EC 與間葉細胞之間的直接接觸會消除對 VEGF 之反應性，而 VEGF 及 ANG-2 之存在誘導芽生。Korff, T. 等人, *Faseb J.* 15 (2001) 447-57。Etoh, T.H. 等人證明 ANG-2 在 VEGF 存在下高度上調組成性表現 Tie2 之 EC，亦即 MMP-1、MMP-9 及 u-PA 之表現。Etoh, T. 等人, *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53。使用活體內瞳孔膜模型，Lobov, I.B. 等人顯示 ANG-2 在內源性 VEGF 存在下促進毛細管直徑迅速增加、基底層重塑、內皮細胞增殖及遷移，且刺激新血管芽生。Lobov, I.B. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11205-10。相比之下，ANG-2 在無內源性 VEGF 之狀況下促進內皮細胞死亡及血管退化。Lobov, I.B. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11205-10。類似地，使用活體內腫瘤模型，Vajkoczy, P. 等人證明多細胞聚集體經由由宿主及腫瘤內皮同時表現 VEGFR-2 及 ANG-2 以芽生式血管生成方式開始血管生長。Vajkoczy, P. 等人, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 777-85。此模型說明生長中的腫瘤之確定微維管結構的特徵為假定由 VEGF 及 ANG-2 之表現介導的連續重塑 (Vajkoczy, P. 等人, *J. Clin. Invest.* 109

(2002) 777-85)。

Tie-2及血管生成素-1之基因剔除小鼠研究顯示類似表型且表明經血管生成素-1刺激之Tie-2磷酸化介導發育中的血管之重塑及穩定化，從而在血管生成期間促進血管成熟及維持內皮細胞支持細胞黏附(Dumont, D.J.等人, *Genes & Development*, 8 (1994) 1897-1909 ; Sato, T.N., *Nature*, 376 (1995) 70-74 ; Thurston, G.等人, *Nature Medicine*: 6 (2000) 460-463)。認為血管生成素-1之作用在廣泛且組成性地表現血管生成素-1之成人體內得以保留(Hanahan, D., *Science*, 277 (1997) 48-50 ; Zagzag, D.等人, *Exp Neurology*, 159 (1999) 391-400)。相比之下，血管生成素-2之表現主要限於血管重塑部位，認為其在該部位中阻斷血管生成素-1之組成性穩定化或成熟功能，從而使血管恢復至並保持可能對芽生信號更具反應性之塑性狀態(Hanahan, D., 1997 ; Holash, J.等人, *Oncogene* 18 (1999) 5356-62 ; Maisonpierre, P.C., 1997)。對病理性血管生成中血管生成素-2表現之研究已發現許多腫瘤類型顯示血管的血管生成素-2表現(Maisonpierre, P.C.等人, *Science* 277 (1997) 55-60)。在小鼠異種移植模型中，功能性研究表明血管生成素-2與腫瘤血管生成有關且將血管生成素-2過度表現與增加之腫瘤生長相關聯(Ahmad, S.A.等人, *Cancer Res.*, 61 (2001) 1255-1259)。其他研究已將血管生成素-2過度表現與腫瘤高血管性(hypervascularity)相關聯(Etoh, T.等人, *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53 ; Tanaka, F.等人,

Cancer Res. 62 (2002) 7124-7129)。

近年來，已提出血管生成素-1、血管生成素-2及/或Tie-2作為可能的抗癌治療標靶。舉例而言，US 6,166,185、US 5,650,490及US 5,814,464各自揭示抗-Tie-2配位體及受體抗體。已有研究報導，使用可溶性Tie-2可降低齧齒動物體內腫瘤之數目及尺寸(Lin, 1997; Lin 1998)。Siemeister, G.等人，Cancer Res. 59:3 (1999) 3185-91產生表現Tie-2之胞外域的人類黑素瘤細胞株，將此等細胞株注入裸小鼠中且報導可溶性Tie-2對腫瘤生長及腫瘤血管生成產生顯著抑制。假定血管生成素-1與血管生成素-2皆結合於Tie-2，根據此等研究，尚不能肯定血管生成素-1、血管生成素-2或Tie-2是否將為抗癌療法之具吸引力的標靶。然而，認為有效的抗血管生成素-2療法可有益於治療諸如癌症之疾病，在該等疾病中進展取決於異常血管生成，其中阻斷該過程可防止疾病發展(Folkman, J., Nature Medicine. 1 (1995) 27-31)。

此外，一些團體已報導使用結合於血管生成素-2之抗體及肽。參見例如US 6,166,185及US 2003/10124129。WO 03/030833、WO 2006/068953、WO 03/057134或US 2006/0122370。

對局部表現血管生成素-2之作用的研究已顯示拮抗血管生成素-1/Tie-2信號使緊密血管結構變松，從而使EC暴露於來自血管生成誘導子(例如VEGF)之活化信號(Hanahan, D., Science, 277 (1997) 48-50)。此由抑制血管生成素-1產

生之促血管生成效應表明抗血管生成素-1療法並非為有效的抗癌治療。

ANG-2在發育期間表現於發生血管重塑之部位處。Maisonpierre, P.C.等人, *Science* 277 (1997) 55-60。在成年個體中, ANG-2表現侷限於血管重塑部位以及高度血管化腫瘤內, 該等腫瘤包括神經膠質瘤(Osada, H.等人, *Int. J. Oncol.* 18 (2001) 305-09; Koga, K.等人, *Cancer Res.* 61 (2001) 6248-54)、肝細胞癌(Tanaka, S.等人, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 341-45)、胃癌(Etoh, T.等人, *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53; Lee, J.H.等人, *Int. J. Oncol.* 18 (2001) 355-61)、甲狀腺瘤(Bunone, G.等人, *Am J Pathol* 155 (1999) 1967-76)、非小細胞肺癌(Wong, M.P.等人, *Lung Cancer* 29 (2000) 11-22)以及結腸癌(Ahmad, S.A.等人, *Cancer* 92 (2001) 1138-43), 及前列腺癌(Wurmbach, J.H.等人, *Anticancer Res.* 20 (2000) 5217-20)。發現一些腫瘤細胞表現ANG-2。舉例而言, Tanaka, S.等人, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 341-45在12份人類肝細胞癌(HCC)試樣中之10份中偵測到ANG-2 mRNA。Ellis團體報導ANG-2普遍表現於腫瘤上皮中。Ahmad, S.A.等人, *Cancer* 92 (2001) 1138-43。其他研究者報導有類似發現。Chen, L.等人, *J. Tongji Med. Univ.* 21 (2001) 228-35。藉由偵測歸檔人類乳癌試樣中之ANG-2 mRNA含量, Sfiligoi, C.等人, *Int. J. Cancer* 103 (2003) 466-74報導ANG-2 mRNA與附屬淋巴結入侵、無疾病時間短及整體存活不良顯著相關。Tanaka,

F.等人, *Cancer Res.* 62 (2002) 7124-29對總計236名分別處於病理階段I至IIIA之非小細胞肺癌(NSCLC)患者進行評述。使用免疫組織化學,其發現16.9% NSCLC患者呈ANG-2陽性。ANG-2陽性腫瘤之微血管密度顯著高於ANG-2陰性腫瘤之微血管密度。ANG-2之該類血管生成作用僅在VEGF表現較高時可見。此外,ANG-2之陽性表現為預測不良手術後存活之重要因子。Tanaka, F.等人, *Cancer Res.* 62 (2002) 7124-7129。然而,其發現Ang-1表現與微血管密度之間無顯著相關性。Tanaka, F.等人, *Cancer Res.* 62 (2002) 7124-7129。此等結果表明ANG-2為具有若干種癌症之患者不良預後的指標。

最近,使用ANG-2基因剔除小鼠模型,Yancopoulos團體報導出生後血管生成需要ANG-2。Gale, N.W.等人, *Dev. Cell* 3 (2002) 411-23。其顯示在ANG-2基因剔除小鼠中未出現眼睛中玻璃狀脈管結構之發育漸進式退化,且其視網膜血管未能自視網膜中央動脈芽出。Gale, N.W.等人, *Dev. Cell* 3 (2002) 411-23。其亦發現缺失ANG-2導致在淋巴脈管結構之成型及功能方面產生重大缺陷。Gale, N.W.等人, *Dev. Cell* 3 (2002) 411-23。Ang-1之遺傳拯救校正淋巴缺陷,但無法校正血管生成缺陷。Gale, N.W.等人, *Dev. Cell* 3 (2002) 411-23。

Peters及其同事報導可溶性Tie2當以重組蛋白或在病毒表現載體中之形式傳遞時抑制小鼠模型中鼠類乳癌及黑素瘤之活體內生長。Lin, P.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

95 (1998) 8829-34 ; Lin, P.等人, J. Clin. Invest. 100 (1997) 2072-78。經如此處理之腫瘤組織的血管密度大大降低。此外，可溶性Tie2阻斷大鼠角膜中由腫瘤細胞條件培養基刺激之血管生成。Lin, P.等人, J. Clin. Invest. 100 (1997) 2072-78。此外，Isner及其團隊證明向VEGF添加ANG-2促進比單獨之VEGF顯著較長且較多之周圍新生血管形成。Asahara, T.等人, Circ. Res. 83 (1998) 233-40。過量可溶性Tie2受體阻止ANG-2對VEGF誘導之新血管生成的調節。Asahara, T.等人, Circ. Res. 83 (1998) 233-40。Siemeister, G.等人, Cancer Res. 59:3 (1999) 3185-91使用裸小鼠異種移植物說明，Flt-1或Tie2之胞外配位體結合域在異種移植物中過度表現導致路徑受到顯著抑制，不能由另一者補償，此表明VEGF受體路徑及Tie2路徑應視為活體內血管生成過程所必需之兩個獨立介體。Siemeister, G.等人, Cancer Res. 59:3 (1999) 3185-91。此係由最新發表之White, R., R.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 5028-33證實。在其研究中展示，在大鼠角膜微囊袋血管生成模型中，專一地結合且抑制ANG-2之核酸酶抗性RNA適體顯著抑制由bFGF誘導之新血管生成。

### 雙專一性抗體

近期已開發出多種重組抗體形式，例如藉由融合例如IgG抗體形式與單鏈結構域產生之四價雙專一性抗體(參見例如 Coloma, M.J.等人, Nature Biotech 15 (1997) 159-163 ; WO 2001/077342 ; 及 Morrison, S.L., Nature Biotech

25 (2007) 1233-1234)。

亦已開發出不再保留抗體核心結構(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)且能夠結合兩個或兩個以上抗原之若干其他新型形式，諸如雙功能抗體、三功能抗體或四功能抗體、微型抗體、若干單鏈形式(scFv、Bis-scFv)(Holliger, P.等人, Nature Biotech 23 (2005) 1126-1136; Fischer, N., Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14; Shen, J.等人, Journal of Immunological Methods 318 (2007) 65-74; Wu, C.等人, Nature Biotech. 25 (2007) 1290-1297)。

所有該等形式使用連接子來融合抗體核心(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)與另一結合蛋白(例如scFv)或融合例如兩個Fab片段或scFv(Fischer, N., Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14)。必須牢記的是，可能需要藉由保持與天然存在之抗體的高度相似性來保留可經由Fc受體結合介導之效應功能，諸如補體依賴性細胞毒性(CDC)或抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。

WO 2007/024715中報導作為經工程改造之多價及多專一性結合蛋白之雙可變域免疫球蛋白。US 6,897,044中報導一種製備生物活性抗體二聚體之方法。US 7,129,330中報導具有至少四個經肽連接子彼此連接之可變域的多價Fv抗體構築體。US 2005/0079170中報導二聚及多聚抗原結合結構。US 6,511,663中報導包含三個或四個藉由一連接結構彼此共價結合之Fab片段的三價或四價單專一性抗原結合蛋白，該蛋白不為天然免疫球蛋白。WO 2006/020258中



報導四價雙專一性抗體，其可有效地表現於原核及真核細胞中且適用於治療及診斷方法中。US 2005/0163782中報導一種自包含未經至少一個鏈間雙硫鍵連接之二聚體與經至少一個鏈間雙硫鍵連接之二聚體的混合物使該兩類多肽二聚體彼此分離或優先合成經至少一個鏈間雙硫鍵連接之二聚體的方法。US 5,959,083中報導雙專一性四價受體。WO 2001/077342中報導具有三個或三個以上功能抗原結合位點之經工程改造之抗體。

WO 1997/001580中報導多專一性及多價抗原結合多肽。WO 1992/004053報導通常由結合於相同抗原決定子的IgG類單株抗體製備之同源結合物(homoconjugate)，其係藉由合成交聯共價連接。WO 1991/06305中報導對抗原具有高親合力之寡聚單株抗體，其中分泌出通常為IgG類之寡聚物，其具有兩個或兩個以上締合在一起以形成四價或六價IgG分子之免疫球蛋白單體。US 6,350,860中報導綿羊源性抗體及經工程改造之抗體構築體，其可用於治療干擾素 $\gamma$ 活性病原性疾。US 2005/0100543中報導作為雙專一性抗體之多價載體的可靶向之構築體，亦即可靶向之構築體之各分子可充當兩個或兩個以上雙專一性抗體之載體。WO 1995/009917中報導經遺傳工程改造之雙專一性四價抗體。WO 2007/109254中報導由穩定化scFv組成或包含穩定化scFv之穩定化結合分子。

#### **VEGF與ANG-2抑制劑之組合**

WO 2007/068895涉及ANG-2拮抗劑與VEGF、KDR及/或

FLTL拮抗劑之組合。WO 2007/089445涉及ANG-2與VEGF抑制劑之組合。

WO 2003/106501涉及結合於血管生成素且含有多聚結構域之融合蛋白。WO 2008/132568涉及結合於血管生成素及VEGF之融合蛋白。

WO 2009/136352涉及抗血管生成化合物。

### 【發明內容】

本發明係關於一種雙專一性、雙價抗體，其包含專一性結合於人類VEGF之第一抗原結合位點及專一性結合於人類ANG-2之第二抗原結合位點，其特徵在於

- i) 該第一抗原結合位點包含SEQ ID NO: 1作為重鏈可變域(VH)及SEQ ID NO: 2作為輕鏈可變域(VL)；及
- ii) 該第二抗原結合位點包含SEQ ID NO: 3作為重鏈可變域(VH)及SEQ ID NO: 4作為輕鏈可變域(VL)。

在本發明之一態樣中，本發明之雙專一性抗體特徵在於包含

- a) 專一性結合於VEGF之第一全長抗體之重鏈及輕鏈；及
- b) 專一性結合於ANG-2之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域CL與CH1彼此置換。

在一實施例中，該雙專一性、雙價抗體特徵在於包含

- a) SEQ ID NO: 7之胺基酸序列作為第一全長抗體之重鏈及SEQ ID NO: 5之胺基酸序列作為第一全長抗體之輕鏈，及
- b) SEQ ID NO: 8之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修

飾重鏈及SEQ ID NO: 6之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修飾輕鏈。

在一實施例中，該雙專一性、雙價抗體特徵在於包含

a) SEQ ID NO: 11之胺基酸序列作為第一全長抗體之重鏈及SEQ ID NO: 9之胺基酸序列作為第一全長抗體之輕鏈，及

b) SEQ ID NO: 12之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修飾重鏈及SEQ ID NO: 10之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修飾輕鏈。

在一實施例中，該雙專一性、雙價抗體特徵在於包含

a) SEQ ID NO: 15之胺基酸序列作為第一全長抗體之重鏈及SEQ ID NO: 13之胺基酸序列作為第一全長抗體之輕鏈，及

b) SEQ ID NO: 16之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修飾重鏈及SEQ ID NO: 14之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修飾輕鏈。

本發明之其他態樣為一種包含該雙專一性抗體之醫藥組合物、用於治療癌症之該組合物、該雙專一性抗體用於製造用以治療癌症之藥物的用途、藉由向需要該治療之患者投與該雙專一性抗體來治療罹患癌症之患者的方法。

本發明之其他態樣為一種包含該雙專一性抗體之醫藥組合物、用於治療血管疾病之該組合物、該雙專一性抗體用於製造用以治療血管疾病之藥物的用途、藉由向需要該治療之患者投與該雙專一性抗體來治療罹患血管疾病之患者

的方法。

本發明之另一態樣為一種編碼本發明之雙專一性抗體之一條鏈的核酸分子。

本發明進一步提供含有本發明之該核酸且能夠在原核或真核宿主細胞中表現該核酸的表現載體，及含有該等載體以用於重組產生本發明雙專一性抗體之宿主細胞。

本發明進一步包含一種包含本發明載體之原核或真核宿主細胞。

本發明進一步包含一種產生本發明雙專一性抗體之方法，其特徵在於在原核或真核宿主細胞中表現本發明之核酸，且自該細胞或細胞培養物上清液回收該雙專一性抗體。本發明進一步包含藉由雙專一性抗體之該產生方法獲得之抗體。

因此，本發明之一實施例為一種雙專一性、雙價抗體，其包含專一性結合於人類 VEGF 之第一抗原結合位點及專一性結合於人類 ANG-2 之第二抗原結合位點，其特徵在於包含 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 及 SEQ ID NO: 8 之胺基酸序列。

因此，本發明之一實施例為一種雙專一性、雙價抗體，其包含專一性結合於人類 VEGF 之第一抗原結合位點及專一性結合於人類 ANG-2 之第二抗原結合位點，其特徵在於包含 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11 及 SEQ ID NO: 12 之胺基酸序列。

因此，本發明之一實施例為一種雙專一性、雙價抗體，

其包含專一性結合於人類 VEGF 之第一抗原結合位點及專一性結合於人類 ANG-2 之第二抗原結合位點，其特徵在於包含 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 及 SEQ ID NO: 16 之胺基酸序列。

對於需要 VEGF 及 ANG-2 靶向療法之人類患者，本發明之雙專一性、雙價抗體顯示益處。本發明之抗體具有對罹患此類疾病、尤其罹患癌症之患者產生益處的非常有用性質。本發明之雙專一性抗體非常有效地抑制腫瘤生長及/或腫瘤血管生成或血管疾病。本發明之雙專一性、雙價抗體、本發明之雙專一性、雙價 <VEGF-ANG-2> 抗體展示有用的藥物動力學/藥效學特性，例如穩定性、優良(亦即緩慢)清除率(例如在低劑量下)。

本發明之雙專一性抗體非常有效於

a) 抑制腫瘤生長(例如使用本發明之雙專一性抗體，可在相較於兩個親本單專一性抗體組合較低之濃度下達成腫瘤停滯(例如在實例 9 及 10 之 COLO205 及 KPL4 腫瘤模型中，相較於 10 mg/kg Ang2i-LC06+10 mg/kg Avastin 之組合，用 10 mg/kg XMAb1 即已達成腫瘤停滯))，及/或

b) 抑制腫瘤血管生成或血管疾病(例如使用本發明之雙專一性抗體，可在相較於兩個親本單專一性抗體組合較低之濃度下達成最大抗血管生成作用(例如在實例 8 之小鼠角膜血管生成檢測中，相較於 10 mg/kg Ang2i-LC06+10 mg/kg Avastin 之組合，用 10 mg/kg XMAb1 即已達成最大抗血管生成作用))。

**【實施方式】**

本發明係關於一種雙專一性、雙價抗體，其包含專一性結合於人類 VEGF 之第一抗原結合位點及專一性結合於人類 ANG-2 之第二抗原結合位點，其特徵在於

- i) 該第一抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 1 作為重鏈可變域(VH)及 SEQ ID NO: 2 作為輕鏈可變域(VL)；及
- ii) 該第二抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 3 作為重鏈可變域(VH)及 SEQ ID NO: 4 作為輕鏈可變域(VL)。

在本發明之一態樣中，本發明之雙專一性抗體特徵在於包含

- a) 專一性結合於 VEGF 之第一全長抗體之重鏈及輕鏈；
- b) 專一性結合於 ANG-2 之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域 CL 與 CH1 彼此置換。

專一性結合於人類血管內皮生長因子(VEGF)及人類血管生成素-2(ANG-2)之雙專一性抗體的此雙專一性、雙價抗體形式描述於 WO 2009/080253 中(參見圖 1 中包括杵臼結構(Knobs-into-Holes)修飾之 CH3 域之例示性略圖)。基於此雙專一性、雙價抗體形式之抗體在本發明之實例中稱為 X Mab。

在一實施例中，該雙專一性、雙價抗體特徵在於包含

- a) SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列作為第一全長抗體之重鏈及 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列作為第一全長抗體之輕鏈，及
- b) SEQ ID NO: 8 之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修

飾重鏈及SEQ ID NO: 6之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修飾輕鏈。

在一實施例中，該雙專一性、雙價抗體特徵在於包含

a) SEQ ID NO: 11之胺基酸序列作為第一全長抗體之重鏈及SEQ ID NO: 9之胺基酸序列作為第一全長抗體之輕鏈，及

b) SEQ ID NO: 12之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修飾重鏈及SEQ ID NO: 10之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修飾輕鏈。

在一實施例中，該雙專一性、雙價抗體特徵在於包含

a) SEQ ID NO: 15之胺基酸序列作為第一全長抗體之重鏈及SEQ ID NO: 13之胺基酸序列作為第一全長抗體之輕鏈，及

b) SEQ ID NO: 16之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修飾重鏈及SEQ ID NO: 14之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修飾輕鏈。

在一實施例中，該雙專一性、雙價抗體特徵在於包含

a) SEQ ID NO: 19之胺基酸序列作為第一全長抗體之重鏈及SEQ ID NO: 17之胺基酸序列作為第一全長抗體之輕鏈，及

b) SEQ ID NO: 20之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修飾重鏈及SEQ ID NO: 18之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修飾輕鏈。

在一實施例中，該雙專一性、雙價抗體特徵在於包含

a) SEQ ID NO: 23之胺基酸序列作為第一全長抗體之重鏈及SEQ ID NO: 21之胺基酸序列作為第一全長抗體之輕鏈，及

b) SEQ ID NO: 24之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修飾重鏈及SEQ ID NO: 22之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修飾輕鏈。

在一實施例中，該雙專一性、雙價抗體特徵在於包含

a) SEQ ID NO: 27之胺基酸序列作為第一全長抗體之重鏈及SEQ ID NO: 25之胺基酸序列作為第一全長抗體之輕鏈，及

b) SEQ ID NO: 28之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修飾重鏈及SEQ ID NO: 26之胺基酸序列作為第二全長抗體之經修飾輕鏈。

因此，本發明之一實施例為一種雙專一性、雙價抗體，其包含專一性結合於人類VEGF之第一抗原結合位點及專一性結合於人類ANG-2之第二抗原結合位點，其特徵在於包含SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO: 8之胺基酸序列。

因此，本發明之一實施例為一種雙專一性、雙價抗體，其包含專一性結合於人類VEGF之第一抗原結合位點及專一性結合於人類ANG-2之第二抗原結合位點，其特徵在於包含SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11及SEQ ID NO: 12之胺基酸序列。

因此，本發明之一實施例為一種雙專一性、雙價抗體，



其包含專一性結合於人類 VEGF 之第一抗原結合位點及專一性結合於人類 ANG-2 之第二抗原結合位點，其特徵在於包含 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 及 SEQ ID NO: 16 之胺基酸序列。

因此，本發明之一實施例為一種雙專一性、雙價抗體，其包含專一性結合於人類 VEGF 之第一抗原結合位點及專一性結合於人類 ANG-2 之第二抗原結合位點，其特徵在於包含 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19 及 SEQ ID NO: 20 之胺基酸序列。

因此，本發明之一實施例為一種雙專一性、雙價抗體，其包含專一性結合於人類 VEGF 之第一抗原結合位點及專一性結合於人類 ANG-2 之第二抗原結合位點，其特徵在於包含 SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23 及 SEQ ID NO: 24 之胺基酸序列。

因此，本發明之一實施例為一種雙專一性、雙價抗體，其包含專一性結合於人類 VEGF 之第一抗原結合位點及專一性結合於人類 ANG-2 之第二抗原結合位點，其特徵在於包含 SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27 及 SEQ ID NO: 28 之胺基酸序列。

在本發明之另一態樣中，本發明之雙專一性抗體特徵在於包含

- a) 專一性結合於 VEGF 之第一全長抗體之重鏈及輕鏈；
- b) 專一性結合於 ANG-2 之第二全長抗體之重鏈及輕鏈，其中重鏈 N 端經由肽連接子連接於輕鏈 C 端。

專一性結合於人類血管內皮生長因子(VEGF)及人類血管生成素-2(ANG-2)之此雙專一性抗體的此雙專一性、雙價抗體形式之一例示性略圖展示於圖2a中，其包括杵臼結構修飾之CH3域。基於此雙專一性、雙價抗體形式之抗體在本發明之實例中稱為OAscFab。

在一實施例中，該雙專一性、雙價抗體特徵在於包含

a) SEQ ID NO: 30之胺基酸序列作為第一全長抗體之重鏈及SEQ ID NO: 31之胺基酸序列作為第一全長抗體之輕鏈，及

b) SEQ ID NO: 29之胺基酸序列作為經由肽連接子連接於第二全長抗體之輕鏈的第二全長抗體之重鏈。

在一實施例中，該雙專一性、雙價抗體特徵在於包含

a) SEQ ID NO: 33之胺基酸序列作為第一全長抗體之重鏈及SEQ ID NO: 34之胺基酸序列作為第一全長抗體之輕鏈，及

b) SEQ ID NO: 32之胺基酸序列作為經由肽連接子連接於第二全長抗體之輕鏈的第二全長抗體之重鏈。

在一實施例中，第二全長抗體之重鏈及輕鏈的抗體重鏈可變域(VH)及抗體輕鏈可變域(VL)藉由在以下位置之間引入雙硫鍵而經雙硫鍵穩定化：重鏈可變域位置44至輕鏈可變域位置100(編號始終根據Kabat之EU索引；(Kabat, E.A. 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)))。藉由在第二全長抗體重鏈及輕鏈

之可變域 VH 與 VL 之間引入雙硫鍵來達成該進一步雙硫鍵穩定化。引入用於穩定化之非天然雙硫橋之技術例如描述於 WO 94/029350 ; Rajagopal, V. 等人, Prot. Engin. 10 (1997) 1453-59 ; Kobayashi 等人, Nuclear Medicine & Biology, 第 25 卷 (1998) 387-393 ; 或 Schmidt, M. 等人, Oncogene 18 (1999) 1711-1721 中。

因此，在一實施例中，該雙專一性、雙價抗體之特徵在於在第二全長抗體重鏈及輕鏈之可變域之間，在重鏈可變域位置 44 與輕鏈可變域位置 100 之間包含雙硫鍵，且包含

a) SEQ ID NO: 36 之胺基酸序列作為第一全長抗體之重鏈及 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列作為第一全長抗體之輕鏈，及

b) SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列作為經由肽連接子連接於第二全長抗體之輕鏈的第二全長抗體之重鏈。

在本發明之另一態樣中，本發明之雙專一性抗體特徵在於包含

a) 專一性結合於 VEGF 之第一全長抗體之重鏈及輕鏈；

b) 專一性結合於 ANG-2 之第二全長抗體之重鏈及輕鏈，其中重鏈 N 端經由肽連接子連接於輕鏈 C 端；且

其中可變域 VL 與 VH 彼此置換。

專一性結合於人類血管內皮生長因子 (VEGF) 及人類血管生成素-2 (ANG-2) 之此雙專一性抗體的此雙專一性、雙價抗體形式之一例示性略圖展示於圖 2b 中，其包括杵臼結構修飾之 CH3 域。基於此雙專一性、雙價抗體形式之抗體

在實例中稱為OAscXFab1。

在一實施例中，該雙專一性抗體特徵在於包含

- a) SEQ ID NO: 39作為第一全長抗體之重鏈及SEQ ID NO: 40作為第一全長抗體之輕鏈，及
- b) SEQ ID NO: 38作為經由肽連接子連接於第二全長抗體之輕鏈的第二全長抗體之重鏈。

在本發明之另一態樣中，本發明之雙專一性抗體特徵在於包含

- a) 專一性結合於VEGF之第一全長抗體之重鏈及輕鏈；
- b) 專一性結合於ANG-2之第二全長抗體之重鏈及輕鏈，其中重鏈N端經由肽連接子連接於輕鏈C端；且其中恆定域CL與CH1彼此置換。

專一性結合於人類血管內皮生長因子(VEGF)及人類血管生成素-2(ANG-2)之此雙專一性抗體的此雙專一性、雙價抗體形式之一例示性略圖展示於圖2c中，其包括杵臼結構修飾之CH3域。基於此雙專一性、雙價抗體形式之抗體在實例中稱為OAscXFab2及OAscXFab3。

在一實施例中，該雙專一性抗體特徵在於包含

- a) SEQ ID NO: 42作為第一全長抗體之重鏈及SEQ ID NO: 43作為第一全長抗體之輕鏈，及
- b) SEQ ID NO: 41作為經由肽連接子連接於第二全長抗體之輕鏈的第二全長抗體之重鏈。

在一實施例中，該雙專一性抗體特徵在於包含

- a) SEQ ID NO: 45作為第一全長抗體之重鏈及SEQ ID

NO: 46作為第一全長抗體之輕鏈，及

b) SEQ ID NO: 44作為經由肽連接子連接於第二全長抗體之輕鏈的第二全長抗體之重鏈。

因此，本發明之一實施例為一種雙專一性、雙價抗體，其包含專一性結合於人類 VEGF 之第一抗原結合位點及專一性結合於人類 ANG-2 之第二抗原結合位點，其特徵在於包含 SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30 及 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列。

因此，本發明之一實施例為一種雙專一性、雙價抗體，其包含專一性結合於人類 VEGF 之第一抗原結合位點及專一性結合於人類 ANG-2 之第二抗原結合位點，其特徵在於包含 SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33 及 SEQ ID NO: 34 之胺基酸序列。

因此，本發明之一實施例為一種雙專一性、雙價抗體，其包含專一性結合於人類 VEGF 之第一抗原結合位點及專一性結合於人類 ANG-2 之第二抗原結合位點，其特徵在於包含 SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36 及 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列。

因此，本發明之一實施例為一種雙專一性、雙價抗體，其包含專一性結合於人類 VEGF 之第一抗原結合位點及專一性結合於人類 ANG-2 之第二抗原結合位點，其特徵在於包含 SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39 及 SEQ ID NO: 40 之胺基酸序列。

因此，本發明之一實施例為一種雙專一性、雙價抗體，

其包含專一性結合於人類 VEGF 之第一抗原結合位點及專一性結合於人類 ANG-2 之第二抗原結合位點，其特徵在於包含 SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42 及 SEQ ID NO: 43 之胺基酸序列。

因此，本發明之一實施例為一種雙專一性、雙價抗體，其包含專一性結合於人類 VEGF 之第一抗原結合位點及專一性結合於人類 ANG-2 之第二抗原結合位點，其特徵在於包含 SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 45 及 SEQ ID NO: 46 之胺基酸序列。

本發明之雙專一性、雙價抗體之 CH3 域較佳藉由「杵臼結構」技術來改變，此技術以若干實例詳細描述於例如 WO 96/027011；Ridgway J.B. 等人，Protein Eng 9 (1996) 617-621；及 Merchant, A.M. 等人，Nat Biotechnol 16 (1998) 677-681 中。在此方法中，改變兩個 CH3 域之相互作用表面，以增強含有此兩個 CH3 域之兩個重鏈的異型二聚。(兩個重鏈之)兩個 CH3 域中之每一者皆可為「杵狀結構(knob)」，而另一者為「臼狀結構(hole)」。引入雙硫橋可穩定化異型二聚體(Merchant, A.M. 等人，Nature Biotech 16 (1998) 677-681；Atwell, S. 等人，J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35)且提高產率。

在本發明之一較佳態樣中，所有本發明之雙專一性抗體的特徵在於：

一重鏈之 CH3 域與另一重鏈之 CH3 域各自在包含抗體 CH3 域之間的初始界面之界面處相遇；

其中該界面經改變以促進雙專一性抗體之形成，其中該改變之特徵在於：

a) 一重鏈之CH3域經改變，

以便在雙專一性抗體內與另一重鏈之CH3域之初始界面相遇的一重鏈之CH3域之初始界面內，

胺基酸殘基經側鏈體積較大之胺基酸殘基置換，進而在另一重鏈之CH3域之界面內產生隆凸，該隆凸可位於另一重鏈之CH3域之界面內的凹穴中；

且

b) 另一重鏈之CH3域經改變，

以便在雙專一性抗體內與第一CH3域之初始界面相遇的第二CH3域之初始界面內，

胺基酸殘基經側鏈體積較小之胺基酸殘基置換，進而在第二CH3域之界面內產生凹穴，第一CH3域之界面內的隆凸可位於該凹穴中。

因此，本發明之抗體較佳特徵在於

a) 之全長抗體之重鏈的CH3域與b) 之全長抗體之重鏈的CH3域各自在包含抗體CH3域之間的初始界面改變的界面處相遇；

其中 i) 在一重鏈之CH3域中，

胺基酸殘基經側鏈體積較大之胺基酸殘基置換，進而在另一重鏈之CH3域之界面內產生隆凸，該隆凸可位於另一重鏈之CH3域之界面內的凹穴中；

且其中

ii)在另一重鏈之CH3域中，

胺基酸殘基經側鏈體積較小之胺基酸殘基置換，進而在第二CH3域之界面內產生凹穴，第一CH3域之界面內的隆凸可位於該凹穴中。

側鏈體積較大之該胺基酸殘基較佳選自由以下組成之群：精胺酸(R)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)。

側鏈體積較小之該胺基酸殘基較佳選自由以下組成之群：丙胺酸(A)、絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)、纈胺酸(V)。

在本發明之一態樣中，兩個CH3域藉由引入半胱胺酸(C)作為各CH3域之相應位置中之胺基酸，以便可在兩個CH3域之間形成雙硫橋而進一步改變。

在一實施例中，雙專一性抗體包含「杵狀結構鏈」CH3域中之T366W突變，及「臼狀結構鏈」CH3域中之T366S、L368A、Y407V突變。亦可例如藉由引入Y349C突變至「杵狀結構鏈」CH3域中且引入E356C突變或S354C突變至「臼狀結構鏈」CH3域中，使用CH3域之間的另一鏈間雙硫橋(Merchant, A.M.等人, Nature Biotech 16 (1998) 677-681)。

在另一實施例中，本發明之雙專一性抗體包含兩個CH3域之一者中之Y349C、T366W突變，及兩個CH3域之另一者中之E356C、T366S、L368A、Y407V突變。在另一較佳實施例中，雙專一性抗體包含兩個CH3域之一者中之Y349C、T366W突變，及兩個CH3域之另一者中之S354C、T366S、L368A、Y407V突變(一CH3域中之另外



Y349C突變與另一CH3域中之另外E356C或S354C突變形成鏈間雙硫橋)(編號始終根據Kabat之EU索引；(Kabat, E.A. 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)))。而且，或者或另外，亦可使用如EP 1 870 459 A1所述之其他杵白結構技術。因此，雙專一性抗體之另一實例為R409D；「杵狀結構鏈」CH3域中之K370E突變及D399K；「白狀結構鏈」CH3域中之E357K突變(編號始終根據Kabat之EU索引；(Kabat, E.A. 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)))。

在另一實施例中，雙專一性抗體包含「杵狀結構鏈」CH3域中之T366W突變，及「白狀結構鏈」CH3域中之T366S、L368A、Y407V突變，及另外R409D；「杵狀結構鏈」CH3域中之K370E突變及D399K；「白狀結構鏈」CH3域中之E357K突變。

在另一實施例中，雙專一性抗體包含兩個CH3域之一者中之Y349C、T366W突變，及兩個CH3域之另一者中之S354C、T366S、L368A、Y407V突變，或該三價、雙專一性抗體包含兩個CH3域之一者中之Y349C、T366W突變，及兩個CH3域之另一者中之S354C、T366S、L368A、Y407V突變，及另外R409D；「杵狀結構鏈」CH3域中之K370E突變及D399K；「白狀結構鏈」CH3域中之E357K突

變。

在本發明之一實施例中，本發明之雙專一性抗體特徵在於具有一或多種以下性質(在如實例3至7中所述之檢測中測定)：

- 雙專一性、雙價抗體以5 nM或低於5 nM結合親和力之KD值結合於VEGF；
- 雙專一性、雙價抗體以5 nM或低於5 nM結合親和力之KD值結合於ANG-2；
- 雙專一性、雙價抗體以15 nM或低於15 nM之IC50抑制經Tie2轉染之HEK293細胞中ANG-2誘導之Tie2磷酸化(在一實施例中，IC50為10 nM或低於10 nM)；
- 雙專一性、雙價抗體以20 nM或低於20 nM之IC50抑制ANG-2結合於Tie2(在一實施例中，IC50為15 nM或低於15 nM)；
- 雙專一性、雙價抗體以20 nM或低於20 nM之IC50抑制VEGF結合於VEGF受體(在一實施例中，IC50為15 nM或低於15 nM)；
- 雙專一性、雙價抗體以10 nM或低於10 nM之IC50抑制VEGF誘導之HUVEC細胞增殖(在一實施例中，IC50為5 nM或低於5 nM)。

在一實施例中，雙專一性、雙價抗體特徵在於包含專一性結合於人類VEGF之第一抗原結合位點及專一性結合於人類ANG-2之第二抗原結合位點，其特徵在於

i) 該第一抗原結合位點包含SEQ ID NO: 1作為重鏈可變

域(VH)及SEQ ID NO: 2作為輕鏈可變域(VL)；及

ii) 該第二抗原結合位點包含SEQ ID NO: 3作為重鏈可變域(VH)及SEQ ID NO: 4作為輕鏈可變域(VL)；

且具有一或多種以下性質(在如實例3至7中所述之檢測中測定)：

- 雙專一性、雙價抗體以5 nM或低於5 nM結合親和力之KD值結合於VEGF；
- 雙專一性、雙價抗體以5 nM或低於5 nM結合親和力之KD值結合於ANG-2；
- 雙專一性、雙價抗體以15 nM或低於15 nM之IC50抑制經Tie2轉染之HEK293細胞中ANG-2誘導之Tie2磷酸化(在一實施例中，IC50為10 nM或低於10 nM)；
- 雙專一性、雙價抗體以20 nM或低於20 nM之IC50抑制ANG-2結合於Tie2(在一實施例中，IC50為15 nM或低於15 nM)；
- 雙專一性、雙價抗體以20 nM或低於20 nM之IC50抑制VEGF結合於VEGF受體(在一實施例中，IC50為15 nM或低於15 nM)；
- 雙專一性、雙價抗體以10 nM或低於10 nM之IC50抑制VEGF誘導之HUVEC細胞增殖(在一實施例中，IC50為5 nM或低於5 nM)。

在本發明之一態樣中，本發明之該雙專一性抗體特徵在於包含

a) 專一性結合於VEGF之第一全長抗體之重鏈及輕鏈；

b) 專一性結合於ANG-2之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域CL與CH1彼此置換；

且具有一或多個以下性質(在如實例3至7中所述之檢測中測定)：

- 雙專一性、雙價抗體以5 nM或低於5 nM結合親和力之KD值結合於VEGF；
- 雙專一性、雙價抗體以5 nM或低於5 nM結合親和力之KD值結合於ANG-2；
- 雙專一性、雙價抗體以15 nM或低於15 nM之IC50抑制經Tie2轉染之HEK293細胞中ANG-2誘導之Tie2磷酸化(在一實施例中，IC50為10 nM或低於10 nM)；
- 雙專一性、雙價抗體以20 nM或低於20 nM之IC50抑制ANG-2結合於Tie2(在一實施例中，IC50為15 nM或低於15 nM)；
- 雙專一性、雙價抗體以20 nM或低於20 nM之IC50抑制VEGF結合於VEGF受體(在一實施例中，IC50為15 nM或低於15 nM)；
- 雙專一性、雙價抗體以10 nM或低於10 nM之IC50抑制VEGF誘導之HUVEC細胞增殖(在一實施例中，IC50為5 nM或低於5 nM)。

在一實施例中，雙專一性、雙價抗體特徵在於包含專一性結合於人類VEGF之第一抗原結合位點及專一性結合於人類ANG-2之第二抗原結合位點，其特徵在於

i) 該第一抗原結合位點包含在CDR中胺基酸殘基取代不

超過1個之SEQ ID NO: 1作為重鏈可變域(VH)，及在 CDR中胺基酸殘基取代不超過1個之SEQ ID NO: 2作為輕鏈可變域(VL)；且

ii)該第二抗原結合位點包含在CDR中胺基酸殘基取代不超過1個之SEQ ID NO: 3作為重鏈可變域(VH)，及在 CDR中胺基酸殘基取代不超過1個之SEQ ID NO: 4作為輕鏈可變域(VL)。

在一實施例中，雙專一性、雙價抗體特徵在於包含專一性結合於人類VEGF之第一抗原結合位點及專一性結合於人類ANG-2之第二抗原結合位點，其特徵在於

i)該第一抗原結合位點包含在CDR中胺基酸殘基取代不超過1個之SEQ ID NO: 1作為重鏈可變域(VH)，及在 CDR中胺基酸殘基取代不超過1個之SEQ ID NO: 2作為輕鏈可變域(VL)；且

ii)該第二抗原結合位點包含在CDR中胺基酸殘基取代不超過1個之SEQ ID NO: 3作為重鏈可變域(VH)，及在 CDR中胺基酸殘基取代不超過1個之SEQ ID NO: 4作為輕鏈可變域(VL)；

且具有一或多個以下性質(在如實例3至7中所述之檢測中測定)：

- 雙專一性、雙價抗體以5 nM或低於5 nM結合親和力之KD值結合於VEGF；
- 雙專一性、雙價抗體以5 nM或低於5 nM結合親和力之KD值結合於ANG-2；

- 雙專一性、雙價抗體以 15 nM 或低於 15 nM 之 IC50 抑制經 Tie2 轉染之 HEK293 細胞中 ANG-2 誘導之 Tie2 磷酸化(在一實施例中，IC50 為 10 nM 或低於 10 nM)；
- 雙專一性、雙價抗體以 20 nM 或低於 20 nM 之 IC50 抑制 ANG-2 結合於 Tie2(在一實施例中，IC50 為 15 nM 或低於 15 nM)；
- 雙專一性、雙價抗體以 20 nM 或低於 20 nM 之 IC50 抑制 VEGF 結合於 VEGF 受體(在一實施例中，IC50 為 15 nM 或低於 15 nM)；
- 雙專一性、雙價抗體以 10 nM 或低於 10 nM 之 IC50 抑制 VEGF 誘導之 HUVEC 細胞增殖(在一實施例中，IC50 為 5 nM 或低於 5 nM)。

在本發明之一態樣中，本發明之雙專一性抗體特徵在於包含

- a) 專一性結合於 VEGF 之第一全長抗體之重鏈及輕鏈，且其中第一全長抗體之重鏈包含在 CDR 中胺基酸殘基取代不超過 1 個之 SEQ ID NO: 7 之胺基酸序列，且第一全長抗體之輕鏈包含在 CDR 中胺基酸殘基取代不超過 1 個之 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列，且
- b) 專一性結合於 ANG-2 之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域 CL 及 CH1 彼此置換，且其中第二全長抗體之經修飾重鏈包含在 CDR 中胺基酸殘基取代不超過 1 個之 SEQ ID NO: 8 之胺基酸序列，且第二全長抗體之經修飾輕鏈包含在 CDR 中胺基酸殘

基取代不超過1個之SEQ ID NO: 6之胺基酸序列。

在本發明之一態樣中，本發明之雙專一性抗體特徵在於包含

- a) 專一性結合於VEGF之第一全長抗體之重鏈及輕鏈，且其中第一全長抗體之重鏈包含在CDR中胺基酸殘基取代不超過1個之SEQ ID NO: 7之胺基酸序列，且第一全長抗體之輕鏈包含在CDR中胺基酸殘基取代不超過1個之SEQ ID NO: 5之胺基酸序列，且
- b) 專一性結合於ANG-2之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域CL及CH1彼此置換，且其中第二全長抗體之經修飾重鏈包含在CDR中胺基酸殘基取代不超過1個之SEQ ID NO: 8之胺基酸序列，且第二全長抗體之經修飾輕鏈包含在CDR中胺基酸殘基取代不超過1個之SEQ ID NO: 6之胺基酸序列；

且具有一或多個以下性質(在如實例3至7中所述之檢測中測定)：

- 雙專一性、雙價抗體以5 nM或低於5 nM結合親和力之KD值結合於VEGF；
- 雙專一性、雙價抗體以5 nM或低於5 nM結合親和力之KD值結合於ANG-2；
- 雙專一性、雙價抗體以15 nM或低於15 nM之IC50抑制經Tie2轉染之HEK293細胞中ANG-2誘導之Tie2磷酸化(在一實施例中，IC50為10 nM或低於10 nM)；
- 雙專一性、雙價抗體以20 nM或低於20 nM之IC50抑

制 ANG-2 結合於 Tie2 (在一實施例中，IC<sub>50</sub> 為 15 nM 或低於 15 nM)；

- 雙專一性、雙價抗體以 20 nM 或低於 20 nM 之 IC<sub>50</sub> 抑制 VEGF 結合於 VEGF 受體 (在一實施例中，IC<sub>50</sub> 為 15 nM 或低於 15 nM)；
- 雙專一性、雙價抗體以 10 nM 或低於 10 nM 之 IC<sub>50</sub> 抑制 VEGF 誘導之 HUVEC 細胞增殖 (在一實施例中，IC<sub>50</sub> 為 5 nM 或低於 5 nM)。

如本文所用之「抗體」係指包含抗原結合位點之結合蛋白。如本文所用之術語「結合位點」或「抗原結合位點」表示配位體實際上所結合之抗體分子上之某一(些)區域。術語「抗原結合位點」包含抗體重鏈可變域(VH)及抗體輕鏈可變域(VL)(VH/VL對)。

抗體專一性係指抗體對抗原之特定抗原決定基的選擇性識別。舉例而言，天然抗體為單專一性抗體。

本發明之「雙專一性抗體」為具有兩種不同抗原結合專一性之抗體。本發明之抗體對兩種不同抗原，作為第一抗原之 VEGF 及作為第二抗原之 ANG-2 具專一性。

如本文所用之術語「單專一性」抗體表示具有一或多個結合位點之抗體，該等位點中之每一者皆與同一抗原之同一抗原決定基結合。

如本申請案中所用之術語「價」表示抗體分子中存在指定數目之結合位點。因而，術語「雙價」、「四價」及「六價」表示抗體分子中分別存在兩個結合位點，四個結合位



點及六個結合位點。本發明之雙專一性抗體為「雙價」。

如本文所用之術語「VEGF」係指人類血管內皮生長因子(VEGF/VEGF-A)(SEQ ID No: 47)，其描述於例如Leung, D.W.等人, *Science* 246 (1989) 1306-9；Keck, P.J.等人, *Science* 246 (1989) 1309-12及Connolly, D.T.等人, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 20017-24中。VEGF參與調節與腫瘤及眼內病症相關之正常及異常血管生成及新血管生成(Ferrara, N.等人, *Endocr. Rev.* 18 (1997) 4-25；Berkman, R.A.等人, *J. Clin. Invest.* 91 (1993) 153-159；Brown, L.F.等人, *Human Pathol.* 26 (1995) 86-91；Brown, L.F.等人, *Cancer Res.* 53 (1993) 4727-4735；Mattern, J.等人, *Brit. J. Cancer.* 73 (1996) 931-934；及Dvorak, H.F.等人, *Am. J. Pathol.* 146 (1995) 1029-1039)。VEGF為已自若干來源分離之同型二聚糖蛋白。VEGF顯示針對內皮細胞之高度專一促有絲分裂活性。

如本文所用之術語「ANG-2」係指人類血管生成素-2 (ANG-2)(或者縮寫為ANGPT2或ANG2)(SEQ ID No: 48)，其描述於例如Maisonpierre, P.C.等人, *Science* 277 (1997) 55-60及Cheung, A.H.等人, *Genomics* 48 (1998) 389-91中。發現血管生成素-1及血管生成素-2為Tie之配位體，Tie為選擇性表現於血管內皮中之酪胺酸激酶家族。Yancopoulos, G.D.等人, *Nature* 407 (2000) 242-48。血管生成素家族目前存在四個確定成員。血管生成素-3及血管生成素-4(Ang-3及Ang-4)可代表小鼠及人類中相同基因座上

有很大差異之對應物。Kim, I.等人, FEBS Let, 443 (1999) 353-56; Kim, I.等人, J Biol Chem 274 (1999) 26523-28。ANG-1及ANG-2最初在組織培養實驗中分別鑑別為促效劑及拮抗劑(關於ANG-1, 參見: Davis, S.等人, Cell 87 (1996) 1161-69; 及關於ANG-2, 參見: Maisonpierre, P.C.等人, Science 277 (1997) 55-60)。所有已知血管生成素主要結合於Tie2, 且Ang-1與Ang-2皆以3 nM(Kd)親和力結合於Tie2。Maisonpierre, P.C.等人, Science 277 (1997) 55-60。

本發明雙專一性抗體之抗原結合位點含有六個在不同程度上對結合位點對抗原之親和力作出貢獻的互補決定區(CDR)。存在三個重鏈可變域CDR(CDRH1、CDRH2及CDRH3)及三個輕鏈可變域CDR(CDRL1、CDRL2及CDRL3)。藉由與胺基酸序列之經彙編資料庫(其中CDR及FR已根據序列中的可變性定義)比較來確定CDR及構架區(FR)之範圍。本發明之範疇內亦包括由較少CDR構成之功能性抗原結合位點(亦即, 其中結合專一性由三個、四個或五個CDR決定)。舉例而言, 少於全套6個CDR對結合而言可為足夠的。在一些狀況下, VH或VL域將為足夠。

本發明之抗體進一步包含一或多個免疫球蛋白種類之免疫球蛋白恆定區。免疫球蛋白種類包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE同型, 且在IgG及IgA狀況下, 包括其亞型。

如本文所用之術語「單株抗體」或「單株抗體組成」係指具有單一胺基酸組成之抗體分子製劑。

術語「嵌合抗體」係指包含來自一種來源或物種之可變區(亦即結合區)及源自不同來源或物種之恆定區之至少一部分的抗體，該抗體一般藉由重組DNA技術產生。包含鼠類可變區及人類恆定區之嵌合抗體較佳。本發明涵蓋之「嵌合抗體」的其他較佳形式為恆定區已自初始抗體恆定區修飾或改變以產生尤其關於C1q結合及/或Fc受體(FcR)結合之本發明特性的形式。該等嵌合抗體亦稱為「類別轉換抗體」。嵌合抗體為包含編碼免疫球蛋白可變區之DNA區段及編碼免疫球蛋白恆定區之DNA區段的經表現免疫球蛋白基因的產物。用於產生嵌合抗體之方法包含習知重組DNA及基因轉染技術，為此項技術中所熟知。參見例如 Morrison, S.L.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238及US 5,204,244。

術語「人類化抗體」係指構架或「互補決定區」(CDR)經修飾以包含與親本免疫球蛋白相比專一性不同之免疫球蛋白之CDR的抗體。在一較佳實施例中，將鼠類CDR移植至人類抗體之構架區中以製備「人類化抗體」。參見例如 Riechmann, L.等人, Nature 332 (1988) 323-327; 及 Neuberger, M.S.等人, Nature 314 (1985) 268-270。尤其較佳之CDR對應於呈現識別上文針對嵌合抗體所述之抗原之序列的CDR。本發明涵蓋之「人類化抗體」的其他形式為恆定區已以其他方式自初始抗體恆定區修飾或改變以產生尤其關於C1q結合及/或Fc受體(FcR)結合之本發明特性的形式。

如本文所用之術語「人類抗體」意欲包括具有源自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區的抗體。人類抗體為此項技術中熟知(van Dijk, M.A.及 van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374)。人類抗體亦可在無內源性免疫球蛋白產生之狀況下在免疫後能夠產生完全譜系或精選之人類抗體的轉殖基因動物(例如小鼠)中產生。在該生殖系突變小鼠中轉移人類生殖系免疫球蛋白基因陣列將導致在抗原攻毒後產生人類抗體(參見例如 Jakobovits, A.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A.等人, *Nature* 362 (1993) 255-258; Brueggemann, M.等人, *Year Immunol.* 7 (1993) 33-40)。人類抗體亦可在噬菌體呈現庫中產生(Hoogenboom, H.R.及 Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388; Marks, J.D.等人, *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597)。Cole, A.等人及 Boerner, P.等人之技術亦可用於製備人類單株抗體(Cole, A.等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Liss, A.L., 第77頁 (1985); 及 Boerner, P.等人, *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95)。如已針對本發明之嵌合及人類化抗體所提及, 如本文所用之術語「人類抗體」亦包含在恆定區中例如藉由「類別轉換」(亦即Fc部分改變或突變(例如自IgG1變至IgG4及/或IgG1/IgG4突變))修飾而產生尤其關於C1q結合及/或FcR結合之本發明特性的該類抗體。

如本文所用之術語「重組人類抗體」意欲包括藉由重組

方式製備、表現、產生或分離之所有人類抗體，諸如自轉殖人類免疫球蛋白基因之宿主細胞(諸如NS0或CHO細胞)或動物(例如小鼠)分離之抗體，或使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體表現之抗體。該等重組人類抗體具有重排形式之可變區及恆定區。本發明之重組人類抗體已經受活體內體細胞超突變。因此，重組抗體之VH及VL區之胺基酸序列為雖然源自人類生殖系VH及VL序列且與其有關，但可能並不天然存在於活體內人類抗體生殖系譜系中的序列。

如本文所用之「可變域」(輕鏈(VL)可變域、重鏈(VH)可變域)表示直接參與抗體與抗原結合之輕鏈與重鏈對中之每一者。人類輕鏈及重鏈可變域具有相同通用結構，且各域包含四個構架(FR)區，該等構架區序列普遍保守，由三個「高變區」(或互補決定區，CDR)連接。該等構架區採用 $\beta$ 片構形，且CDR可形成連接 $\beta$ 片結構之環。各鏈中之CDR藉由構架區保持其三維結構且連同來自其他鏈之CDR一起形成抗原結合位點。抗體重鏈及輕鏈CDR3區在本發明抗體之結合專一性/親和力中起尤其重要的作用，且因此提供本發明之另一目標。

當用於本文中時，術語「高變區」或「抗體之抗原結合部分」係指抗體中負責抗原結合之胺基酸殘基。高變區包含來自「互補決定區」或「CDR」之胺基酸殘基。「構架」或「FR」區為除如本文中所定義之高變區殘基之外的可變域區域。因此，抗體之輕鏈及重鏈自N端至C端包含

結構域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。各鏈上之CDR由該等構架胺基酸隔開。重鏈之CDR3尤其為最有助於抗原結合之區域。根據Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)(包括根據Kabat之EU索引編號(下文縮寫為根據Kabat編號))之標準定義判定CDR區及FR區。

如本文所用之術語「結合」或「專一性結合」係指在使用經純化野生型抗原之活體外檢測、較佳電漿子共振檢測(BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Sweden)(實例3)中抗體與抗原(人類VEGF或人類ANG-2)之抗原決定基結合。結合親和力由術語 $k_a$ (抗體/抗原複合物中抗體之締合速率常數)、 $k_D$ (解離常數)及 $K_D$ ( $k_D/k_a$ )定義。在一實施例中, 結合或專一性結合意謂結合親和力( $K_D$ )為 $10^{-8}$  mol/l或 $10^{-8}$  mol/l以下, 較佳為 $10^{-9}$  M至 $10^{-13}$  mol/l。

術語「抗原決定基」包括任何能夠專一性結合抗體之多肽決定子。在某些實施例中, 抗原決定基決定子包括分子之化學活性表面基團, 諸如胺基酸、糖側鏈、磷醯基或磺醯基, 且在某些實施例中, 其可具有特定三維結構特徵及/或特定電荷特徵。抗原決定基為由抗體結合之抗原區。

在某些實施例中, 當抗體在蛋白質及/或大分子之複雜混合物中優先識別其目標抗原時, 稱該抗體專一性結合該抗原。

術語「全長抗體」表示由兩個「全長抗體重鏈」及兩個

「全長抗體輕鏈」組成之抗體(參見圖1)。「全長抗體重鏈」為在N端至C端方向上由抗體重鏈可變域(VH)、抗體重鏈恆定域1(CH1)、抗體鉸鏈區(HR)、抗體重鏈恆定域2(CH2)及抗體重鏈恆定域3(CH3)(縮寫為VH-CH1-HR-CH2-CH3)以及在子類IgE抗體之狀況下視情況存在之抗體重鏈恆定域4(CH4)組成的多肽。「全長抗體重鏈」較佳為在N端至C端方向上由VH、CH1、HR、CH2及CH3組成之多肽。

「全長抗體輕鏈」為在N端至C端方向上由抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域(CL)組成之多肽，縮寫為VL-CL。抗體輕鏈恆定域(CL)可為 $\kappa$ 或 $\lambda$ 。兩個全長抗體鏈經由CL域與CH1域之間及全長抗體重鏈鉸鏈區之間的多肽間雙硫鍵連接在一起。典型全長抗體之實例為天然抗體，如IgG(例如IgG 1及IgG2)、IgM、IgA、IgD及IgE。本發明之全長抗體可來自單一物種(例如人類)，或其可為嵌合或人類化抗體。本發明之全長抗體包含各由一對VH及VL形成之兩個抗原結合位點，兩者皆專一性結合於同一抗原。該全長抗體之重鏈或輕鏈之C端表示該重鏈或輕鏈之C端的最後一個胺基酸。該全長抗體之重鏈或輕鏈之N端表示該重鏈或輕鏈之N端的最後一個胺基酸。

如本發明所用之術語「肽連接子」表示具有較佳由合成法得到的胺基酸序列之肽。使用本發明之此等肽將第二全長抗體(其專一性結合於第二抗原)之輕鏈C端經由肽連接子連接於重鏈N端。第二全長抗體重鏈及輕鏈內之肽連接子為長度為至少30個胺基酸，較佳至少32至50個胺基酸之

胺基酸序列的肽。在一實施例中，肽連接子為長度為32至40個胺基酸之胺基酸序列的肽。在一實施例中，該連接子為 $(G_xS)_n$ ，其中G=甘胺酸，S=絲胺酸( $x=3$ ， $n=8$ 、9或10且 $m=0$ 、1、2或3)或( $x=4$ 且 $n=6$ 、7或8且 $m=0$ 、1、2或3)，較佳 $x=4$ ， $n=6$ 或7且 $m=0$ 、1、2或3，更佳 $x=4$ ， $n=7$ 且 $m=2$ 。在一實施例中，該連接子為 $(G_4S)_6G_2$ 。

如本申請案中所用之術語「恆定區」表示除了可變區之外的抗體結構域的總和。恆定區雖然不直接參與抗原結合，但展現多種效應功能。視其重鏈恆定區之胺基酸序列而定，抗體分為以下類別：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且其中若干種可進一步分為諸如IgG1、IgG2、IgG3及IgG4、IgA1及IgA2的子類。對應於不同類別之抗體的重鏈恆定區分別稱為 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 及 $\mu$ 。在所有5種抗體類別中可發現之輕鏈恆定區稱為 $\kappa$ 及 $\lambda$ 。

如本申請案中所用之術語「自人類起源獲得之恆定區」表示子類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之人類抗體的恆定重鏈區及/或恆定輕鏈 $\kappa$ 或 $\lambda$ 區。該等恆定區為此項技術中熟知且例如由Kabat, E.A.(參見例如Johnson, G.及Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2785-2788)所述。

本發明之雙專一性、雙價抗體較佳具有人類IgG1子類之恆定區。

儘管IgG4子類抗體顯示降低之Fc受體(Fc $\gamma$ RIIIa)結合，但其他IgG子類抗體仍顯示結合性。然而，Pro238、



Asp265、Asp270、Asn297(失去Fc碳水化合物)、Pro329、Leu234、Leu235、Gly236、Gly237、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434及His435為若經改變亦提供降低之Fc受體結合的殘基(Shields, R.L.等人, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J.等人, FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A.等人, Immunology 86 (1995) 319-324; EP 0 307 434)。

在一實施例中，本發明之抗體相較於IgG1抗體具有降低之FcR結合，且雙專一性、雙價抗體涉及具有S228、L234、L235及/或D265突變之IgG4子類或IgG1子類之FcR結合，及/或含有PVA236突變。在一實施例中，雙專一性、雙價抗體中之突變在IgG4 S228P及L235E中以及IgG1 L234A及L235A中。

本發明之另一態樣為特徵在於包含以下之雙專一性、雙價抗體：

a)專一性結合於第一抗原之第一全長抗體之重鏈及輕鏈；

b)專一性結合於第二抗原之第二全長抗體之重鏈及輕鏈，其中重鏈N端經由肽連接子連接於輕鏈C端；且

其中可變域VL與VH或恆定域CL與CH1彼此置換。

此雙專一性、雙價抗體形式之CH3域較佳藉由「杵臼結構」技術來改變，此技術以若干實例詳細描述於例如WO 96/027011; Ridgway J.B.等人, Protein Eng 9 (1996) 617-621; 及 Merchant, A.M.等人, Nat Biotechnol 16 (1998)

677-681中。在此方法中，改變兩個CH3域之相互作用表面，以增強含有此兩個CH3域之兩個重鏈的異型二聚。(兩個重鏈之)兩個CH3域中之每一者皆可為「杵狀結構」，而另一者為「白狀結構」。引入雙硫橋可穩定化異型二聚體 (Merchant, A.M.等人, Nature Biotech 16 (1998) 677-681 ; Atwell, S.等人, J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35)且提高產率。更多細節及實施例參見上文。

本發明之另一態樣為特徵在於包含以下之雙專一性、雙價抗體：

- a)專一性結合於第一抗原之第一全長抗體之重鏈及輕鏈；
- b)專一性結合於第二抗原之第二全長抗體之重鏈及輕鏈，其中重鏈N端經由肽連接子連接於輕鏈C端；且其中可變域VL與VH彼此置換。

此雙專一性、雙價抗體形式之一例示性略圖展示於圖2b中，其包括杵白結構修飾之CH3域。基於此雙專一性、雙價抗體形式之抗體在實例中稱為OAscXFab1。

在一實施例中，該雙專一性抗體特徵在於包含

- a) SEQ ID NO: 39作為第一全長抗體之重鏈及 SEQ ID NO: 40作為第一全長抗體之輕鏈，及
- b) SEQ ID NO: 38作為經由肽連接子連接於第二全長抗體之輕鏈的第二全長抗體之重鏈。

本發明之另一態樣為特徵在於包含以下之雙專一性、雙價抗體：

a) 專一性結合於第一抗原之第一全長抗體之重鏈及輕鏈；

b) 專一性結合於第二抗原之第二全長抗體之重鏈及輕鏈，

其中重鏈N端經由肽連接子連接於輕鏈C端；且

其中恆定域CL與CH1彼此置換。

此雙專一性、雙價抗體形式之一例示性略圖展示於圖2c中，其包括杵臼結構修飾之CH3域。基於此雙專一性、雙價抗體形式之抗體在實例中稱為OAscXFab2及OAscXFab3。

在一實施例中，該雙專一性抗體特徵在於包含

a) SEQ ID NO: 42作為第一全長抗體之重鏈及SEQ ID NO: 43作為第一全長抗體之輕鏈，及

b) SEQ ID NO: 41作為經由肽連接子連接於第二全長抗體之輕鏈的第二全長抗體之重鏈。

在一實施例中，該雙專一性抗體特徵在於包含

a) SEQ ID NO: 45作為第一全長抗體之重鏈及SEQ ID NO: 46作為第一全長抗體之輕鏈，及

b) SEQ ID NO: 44作為經由肽連接子連接於第二全長抗體之輕鏈的第二全長抗體之重鏈。

藉由重組方式產生本發明之抗體。因此，本發明之一態樣為編碼本發明抗體之核酸，且另一態樣為包含編碼本發明抗體之該核酸的細胞。重組產生方法為此項技術中廣泛已知且包含在原核及真核細胞中蛋白質表現，隨後分離抗體且通常純化至醫藥學上可接受之純度。為在宿主細胞中

表現上述抗體，藉由標準方法將編碼各別經修飾輕鏈及重鏈之核酸插入至表現載體中。在適當原核或真核宿主細胞(如 CHO 細胞、NS0 細胞、SP2/0 細胞、HEK293 細胞、COS 細胞、PER.C6 細胞、酵母或大腸桿菌(E.coli)細胞)中進行表現且自細胞中(上清液或溶解後之細胞)回收抗體。重組產生抗體之一般方法為此項技術中熟知且描述於例如 Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202 ; Geisse, S. 等人, Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282 ; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-160 ; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880 之綜述文章中。

因此，本發明之一實施例為一種製備本發明雙專一性抗體之方法，其包含以下步驟：

- a) 宿主細胞經包含編碼該抗體之核酸分子的載體轉型；
- b) 在允許合成該抗體分子之條件下培養宿主細胞；及
- c) 自該培養物回收該抗體分子。

藉由習知免疫球蛋白純化程序(諸如蛋白 A-瓊脂糖凝膠 (protein A-Sepharose)、羥磷灰石層析法、凝膠電泳法、透析或親和層析法)適宜地自培養基分離雙專一性抗體。編碼單株抗體之 DNA 及 RNA 容易採用習知程序分離及定序。融合瘤細胞可用作該 DNA 及 RNA 之來源。一旦分離，即可將 DNA 插入表現載體中，接著轉染至不另外產生免疫球蛋白之宿主細胞(諸如 HEK 293 細胞、CHO 細胞或骨髓瘤細胞)中，以在宿主細胞中合成重組單株抗體。

藉由向抗體 DNA 中引入適當核苷酸變化或藉由核苷酸合

成來製備雙專一性抗體之胺基酸序列變異體(或突變體)。然而，該等修飾僅可在非常有限之範圍中進行。舉例而言，修飾不改變上述抗體特徵(諸如IgG同型及抗原結合)，但可改良重組產生之產率、蛋白質穩定性或促進純化。

如本申請案中所用之術語「宿主細胞」表示可經工程改造而產生本發明抗體之任何種類之細胞系統。在一實施例中，使用HEK293細胞及CHO細胞作為宿主細胞。如本文所用之表述「細胞」、「細胞株」及「細胞培養物」可互換使用且所有該等名稱均包括後代。因此，短語「轉型體」及「轉型細胞」包括初級個體細胞及自其產生之培養物，與轉移次數無關。亦應瞭解，所有後代之DNA含量可能由於有意或無意突變而不能完全一致。具有與針對原始轉型細胞所篩檢相同之功能或生物活性的變異後代包括在內。

NS0細胞中之表現由例如Barnes, L.M.等人, *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M.等人, *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270描述。短暫表現由例如Durocher, Y.等人, *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9描述。可變域之選殖由Orlandi, R.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; 及Norderhaug, L.等人, *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87描述。較佳短暫表現系統(HEK 293)由Schlaeger, E.-J.及Christensen, K.在*Cytotechnology* 30 (1999) 71-83中及由Schlaeger, E.-J.在J.

Immunol. Methods 194 (1996) 191-199中描述。

適於原核生物之控制序列例如包括啟動子、視情況存在之操縱序列及核糖體結合位點。已知真核細胞利用啟動子、強化子及聚腺苷酸化信號。

當一核酸與另一核酸序列功能相關時，其為「可操作地連接」。舉例而言，若前序列或分泌性前導序列之DNA表現為參與多肽分泌之前蛋白，則其可操作地連接於多肽之DNA；若啟動子或強化子影響編碼序列之轉錄，則其可操作地連接於該序列；或若核糖體結合位點經定位以促進轉譯，則其可操作地連接於編碼序列。一般而言，「可操作地連接」意謂所連接之DNA序列為鄰接的，且在分泌性前導序列之狀況下為鄰接且處於閱讀框架中。然而，強化子不必為鄰接的。連接係藉由在適宜的限制性位點接合來實現。若該等位點不存在，則根據習知實務使用合成性寡核苷酸接附子(adaptor)或連接子。

藉由標準技術(包括鹼性/SDS處理、CsCl分帶技術(CsCl banding)、管柱層析法、瓊脂糖凝膠電泳及此項技術中熟知之其他技術)純化抗體以去除細胞組分或其他污染物，例如其他細胞核酸或蛋白質。參見 Ausubel, F. 等人編, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。已充分確立不同方法且廣泛用於蛋白質純化，諸如使用微生物蛋白之親和層析法(例如蛋白A或蛋白G親和層析法)、離子交換層析法(例如陽離子交換(羧甲基樹脂)、陰離子交換(胺基乙基樹

脂)及混合模式交換)、嗜硫吸附法(例如用 $\beta$ -巰基乙醇及其他SH配位體)、疏水性相互作用或芳族吸附層析法(例如利用苯基-瓊脂糖、氮雜親芳烴性樹脂(aza-arenophilic resin)或間胺基苯基醯酸)、金屬螯合物親和層析法(例如利用Ni(II)及Cu(II)親和性材料)、尺寸排阻層析法及電泳法(諸如凝膠電泳法、毛細管電泳法)(Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102)。

現已發現，本發明之針對人類VEGF及人類ANG-2之雙專一性抗體具有有用的特徵，諸如高穩定性及有用藥物動力學/藥效學特性，例如優良(亦即緩慢)清除率(例如在低劑量下)。

對於需要VEGF及ANG-2靶向療法之人類患者，本發明之雙專一性、雙價抗體顯示益處。

此外，其具有生物或藥理學活性且展示活體內腫瘤生長抑制及/或腫瘤血管生成抑制。

本發明之雙專一性抗體非常有效於

- a) 抑制腫瘤生長(例如使用本發明之雙專一性抗體，可在相較於兩個親本單專一性抗體組合較低之濃度下達成腫瘤停滯(例如在實例9及10之COLO205及KPL4腫瘤模型中，相較於10 mg/kg Ang2i-LC06+10 mg/kg Avastin之組合，用10 mg/kg XMAb1即已達成腫瘤停滯))，及/或
- b) 抑制腫瘤血管生成或血管疾病(例如使用本發明之雙專一性抗體，可在相較於兩個親本單專一性抗體組合

較低之濃度下達成最大抗血管生成作用(例如在實例8之小鼠角膜血管生成檢測中，相較於10 mg/kg Ang2i-LC06+10 mg/kg Avastin之組合，用10 mg/kg XMAb1即已達成最大抗血管生成作用))。

最後，本發明之針對人類VEGF及人類ANG-2之雙專一性、雙價抗體可具有有用的功效/毒性概況，且可為需要抗-VEGF及抗-ANG-2療法之患者提供益處。

本發明之一態樣為一種包含本發明抗體之醫藥組合物。本發明之另一態樣為本發明抗體用於製造醫藥組合物之用途。本發明之另一態樣為一種製造包含本發明抗體之醫藥組合物的方法。在另一態樣中，本發明提供一種含有本發明抗體與醫藥載劑調配在一起之組合物，例如醫藥組合物。

本發明之一實施例為本發明之雙專一性抗體，其係用於治療癌症。

本發明之另一態樣為該醫藥組合物，其係用於治療癌症。

本發明之另一態樣為本發明抗體之用途，其係用於製造用以治療癌症之藥物。

本發明之另一態樣為治療罹患癌症之患者的方法，其係藉由向需要該治療之患者投與本發明抗體。

本發明之另一態樣為該醫藥組合物，其係用於預防癌轉移。

本發明包含用於預防癌轉移之本發明雙專一性抗體。



本發明之另一態樣為本發明雙專一性抗體之用途，其係用於製造用以預防癌轉移之藥物。

本發明之另一態樣為預防罹患原發性癌症之患者之癌轉移的方法，其係藉由向需要該預防性治療之患者投與本發明雙專一性抗體。

可展示非常有效地預防活體內原位及皮下癌症模型中自發性癌轉移/繼發性腫瘤(參見實例9)(和靜脈內注射腫瘤細胞之實驗模型對比)。此類似於細胞自原發性腫瘤傳播及轉移至如肺或肝之繼發性器官(其中為繼發性腫瘤)的臨床情況。

根據本發明之術語「癌轉移」係指癌細胞自原發性腫瘤傳播至患者體內別處之一或多個部位，接著形成繼發性腫瘤。確定癌症是否已經轉移之轉移偵測手段為此項技術中已知，且包括骨頭掃描、胸部X射線、CAT掃描、MRI掃描及腫瘤標記物測試。

如本文所用之術語「預防癌轉移」或「預防繼發性腫瘤」具有相同含義，且係指針對罹患癌症之患者之癌轉移的防治藥劑以此方式抑制或減少癌細胞自原發性腫瘤進一步傳播至患者體內別處之一或多個部位。此意謂預防、延遲或減少原發性腫瘤或癌症之轉移，因此預防、延遲或減少繼發性腫瘤之形成。較佳預防或減少肺之癌轉移(亦即繼發性腫瘤)，此意謂預防或減少癌細胞自原發性腫瘤轉移性傳播至肺。

如本文所用之「醫藥載劑」包括生理學相容之任何及所

有溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等張及吸收延遲劑及其類似物。載劑較佳適於靜脈內、肌肉內、皮下、非經腸、脊椎或表皮投與(例如藉由注射或輸注)。

本發明之組合物可藉由此項技術中已知之各種方法投與。如熟習此項技術者所瞭解，投與途徑及/或模式將視所要結果而變化。為藉由特定投與途徑來投與本發明化合物，可能需要將化合物以防止其失活之物質塗佈或將化合物與該物質共同投與。舉例而言，化合物可在適當載劑(例如脂質體或稀釋劑)中向個體投與。醫藥學上可接受之稀釋劑包括生理食鹽水及水性緩衝溶液。醫藥載劑包括無菌水溶液或分散液及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末。此項技術中已知用於醫藥活性物質之該等介質及試劑的用途。

如本文所用之短語「非經腸投與」意謂除經腸及局部投與之外的投與模式，一般藉由注射，且包括(不限於)靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊柱內、硬膜外及胸骨內注射及輸注。

如本文所用之術語癌症係指增生性疾病，諸如淋巴瘤、淋巴球性白血病、肺癌、非小細胞肺(NSCL)癌、細支氣管細胞肺癌、骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭或頸癌、皮膚或眼內黑素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門區癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、結腸癌、乳癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、陰

門癌、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、膀胱癌、腎癌或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、間皮瘤、肝細胞癌、膽癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、脊柱腫瘤、腦幹神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、神經鞘瘤、室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、腦膜瘤、鱗狀細胞癌、垂體腺瘤及尤文氏肉瘤(Ewings sarcoma)，包括上述任何癌症之難治癒形式，或上述一或多種癌症的組合。

本發明之另一態樣為本發明之雙專一性抗體或該醫藥組合物，其係作為抗血管生成劑。該抗血管生成劑可用於治療癌症，尤其實體腫瘤及其他血管疾病。

本發明之一實施例為本發明之雙專一性抗體，其係用於治療血管疾病。

本發明之另一態樣為該醫藥組合物，其係用於治療血管疾病。

本發明之另一態樣為本發明抗體之用途，其係用於製造用以治療血管疾病之藥物。

本發明之另一態樣為治療罹患血管疾病之患者的方法，其係藉由向需要該治療之患者投與本發明抗體。

術語「血管疾病」包括癌症、發炎疾病、動脈粥樣硬化、局部缺血、外傷、敗血症、COPD、哮喘、糖尿病、AMD、視網膜病變、中風、肥胖症、急性肺損傷、出血、血管滲漏(例如由細胞因子誘發)、過敏症、葛瑞夫茲氏病

(Graves' Disease)、橋本氏自體免疫甲狀腺炎(Hashimoto's Autoimmune Thyroiditis)、特發性血小板減少性紫癍、巨細胞動脈炎、類風濕性關節炎、全身性紅斑性狼瘡症(SLE)、狼瘡性腎炎、克羅恩氏病(Crohn's Disease)、多發性硬化症、潰瘍性結腸炎(尤其實體腫瘤)、眼內新生血管症候群(諸如增生性視網膜病變或年齡相關之黃斑變性(AMD))、類風濕性關節炎及牛皮癬(Folkman, J.等人, J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M.等人, Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; 及 Garner, A., Vascular diseases, Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A.及 Klintworth, G.K., (編), 第2版, Marcel Dekker, New York (1994), 第1625-1710頁)。

此等組合物亦可含有佐劑, 諸如防腐劑、濕潤劑、乳化劑及分散劑。可藉由滅菌程序(同上)及藉由納入例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸及其類似物之各種抗細菌劑及抗真菌劑來確保防止微生物存在。亦可能需要組合物中包括諸如糖、氯化鈉及其類似物之等張劑。另外, 可藉由納入延遲吸收之試劑(諸如單硬脂酸鋁及明膠)來實現可注射醫藥形式之延長吸收。

不管所選投與途徑, 藉由熟習此項技術者已知之習知方法, 將可以適合水合形式使用之本發明化合物及/或本發明醫藥組合物調配成醫藥學上可接受之劑型。

可改變本發明醫藥組合物中活性成分之實際劑量濃度, 以便獲得有效達成針對特定患者、組合物及投藥模式的所

要治療反應且對患者無毒性的活性成分之量。所選劑量濃度將視多種藥物動力學因素而定，包括所採用之本發明特定組合物之活性、投與途徑、投與時間、所採用之特定化合物的排泄率、治療持續時間、與所採用特定組合物組合使用之其他藥物、化合物及/或物質、所治療患者之年齡、性別、體重、病狀、一般健康狀況及先前病史，及醫藥技術中熟知之類似因素。

組合物必須無菌且在一定程度上流動，以便可藉由針筒傳遞組合物。除水以外，載劑較佳為等張緩衝生理食鹽水溶液。

可例如藉由使用諸如卵磷脂之包衣，藉由在分散液狀況下維持所要粒徑及藉由使用界面活性劑來保持適當流動性。在許多情況下，較佳在組合物中包括等張劑，例如糖、多元醇(諸如甘露糖醇或山梨糖醇)及氯化鈉。

如本文所用，表述「細胞」、「細胞株」及「細胞培養物」可互換使用且所有該等名稱均包括後代。因此，短語「轉型體」及「轉型細胞」包括初級個體細胞及自其產生之培養物，與轉移次數無關。亦應瞭解，所有後代之DNA含量可能由於有意或無意突變而不能完全一致。具有與針對原始轉型細胞所篩檢相同之功能或生物活性的變異後代包括在內。當意欲使用不同名稱時，根據上下文將顯而易知。

如本文所用之術語「轉型」係指將載體/核酸轉移至宿主細胞中之過程。若使用不具有難以對付之細胞壁障壁之

細胞作為宿主細胞，則例如藉由如Graham, F.L., van der Eb, A.J., *Virology* 52 (1973) 546-467所述之磷酸鈣沈澱法進行轉染。然而，亦可使用諸如藉由細胞核注射或藉由原生質體融合將DNA引入細胞中之其他方法。若使用原核細胞或含有實質細胞壁構造之細胞，則一種轉染方法例如為如Cohen, S.N.等人, *PNAS*. 69 (1972) 2110-2114所述之使用氯化鈣的鈣處理法。

如本文所用之「表現」係指將核酸轉錄成mRNA之過程及/或隨後將經轉錄之mRNA(亦稱為轉錄物)轉譯成肽、多肽或蛋白質之過程。轉錄物及經編碼之多肽統稱為基因產物。若聚核苷酸係源自基因組DNA，則真核細胞中之表現可包括mRNA之剪接。

「載體」為一種核酸分子，詳言之為自我複製之核酸分子，其將所插入之核酸分子轉移至宿主細胞中及/或宿主細胞之間。該術語包括主要用於將DNA或RNA插入細胞中(例如染色體整合)之載體、主要用於複製DNA或RNA之複製載體及用於轉錄及/或轉譯DNA或RNA之表現載體。亦包括提供一種以上所述功能之載體。

「表現載體」為一種聚核苷酸，其在引入適當宿主細胞中時可轉錄且轉譯為多肽。「表現系統」通常係指一種由可用於產生所要表現產物之表現載體構成的適合宿主細胞。

為幫助理解本發明，提供以下實例、序列表及圖，本發明之真實範疇闡述於隨附申請專利範圍中。應瞭解，可在

不悖離本發明精神之情況下對所闡述之程序作出修改。

序列表之描述(胺基酸序列)

SEQ ID NO:1	<VEGF>貝伐單抗之可變重鏈域VH
SEQ ID NO:2	<VEGF>貝伐單抗之可變輕鏈域VL
SEQ ID NO:3	<ANG-2>E6Q之可變重鏈域VH
SEQ ID NO:4	<ANG-2>E6Q之可變輕鏈域VL
SEQ ID NO: 5	XMab1-<VEGF>輕鏈
SEQ ID NO: 6	XMab1-<ANG2>輕鏈
SEQ ID NO: 7	XMab1-<VEGF>重鏈
SEQ ID NO: 8	XMab1-<ANG2>重鏈
SEQ ID NO: 9	XMab2-<VEGF>輕鏈
SEQ ID NO: 10	XMab2-<ANG2>輕鏈
SEQ ID NO: 11	XMab2-<VEGF>重鏈
SEQ ID NO: 12	XMab2-<ANG2>重鏈
SEQ ID NO: 13	XMab3-<VEGF>輕鏈
SEQ ID NO: 14	XMab3-<ANG2>輕鏈
SEQ ID NO: 15	XMab3-<VEGF>重鏈
SEQ ID NO: 16	XMab3-<ANG2>重鏈
SEQ ID NO: 17	XMab4-<VEGF>輕鏈
SEQ ID NO: 18	XMab4-<ANG2>輕鏈
SEQ ID NO: 19	XMab4-<VEGF>重鏈
SEQ ID NO: 20	XMab4-<ANG2>重鏈
SEQ ID NO: 21	XMab5-<VEGF>輕鏈
SEQ ID NO: 22	XMab5-<ANG2>輕鏈

SEQ ID NO: 23 XMab5-<VEGF>重鏈  
SEQ ID NO: 24 XMab5-<ANG2>重鏈  
SEQ ID NO: 25 XMab6-<VEGF>輕鏈  
SEQ ID NO: 26 XMab6-<ANG2>輕鏈  
SEQ ID NO: 27 XMab6-<VEGF>重鏈  
SEQ ID NO: 28 XMab6-<ANG2>重鏈  
SEQ ID NO: 29 OAscFab1-<ANG2>肽連接之重鏈及輕鏈  
SEQ ID NO: 30 OAscFab1-<VEGF>重鏈  
SEQ ID NO: 31 OAscFab1-<VEGF>輕鏈  
SEQ ID NO: 32 OAscFab2-<ANG2>肽連接之重鏈及輕鏈  
SEQ ID NO: 33 OAscFab2-<VEGF>重鏈  
SEQ ID NO: 34 OAscFab2-<VEGF>輕鏈  
SEQ ID NO: 35 OAscFab3-<ANG2>肽連接之重鏈及輕鏈  
SEQ ID NO: 36 OAscFab3-<VEGF>重鏈  
SEQ ID NO: 37 OAscFab3-<VEGF>輕鏈  
SEQ ID NO: 38 OAscXFab1-<ANG2>肽連接之重鏈及輕鏈  
SEQ ID NO: 39 OAscXFab1-<VEGF>重鏈  
SEQ ID NO: 40 OAscXFab1-<VEGF>輕鏈  
SEQ ID NO: 41 OAscXFab2-<ANG2>肽連接之重鏈及輕鏈  
SEQ ID NO: 42 OAscXFab2-<VEGF>重鏈  
SEQ ID NO: 43 OAscXFab2-<VEGF>輕鏈  
SEQ ID NO: 44 OAscXFab3-<ANG2>肽連接之重鏈及輕鏈  
SEQ ID NO: 45 OAscXFab3-<VEGF>重鏈  
SEQ ID NO: 46 OAscXFab3-<VEGF>輕鏈



SEQ ID NO: 47 人類血管內皮生長因子(VEGF)

SEQ ID NO: 48 人類血管生成素-2(ANG-2)

### 實驗程序

### 實例

### 材料及一般方法

關於人類免疫球蛋白輕鏈及重鏈之核苷酸序列的一般資訊於以下文獻中給出：Kabat, E.A. 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)。抗體鏈之胺基酸係根據EU編號來編號及提及 (Edelman, G.M. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85 ; Kabat, E.A. 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991))。

### 重組DNA技術

如 Sambrook, J. 等人, Molecular cloning: A laboratory manual ; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所述使用標準方法來處理DNA。根據製造商之說明書使用分子生物學試劑。

### 基因合成

可自由化學合成製成之寡核苷酸製備所要基因區段。藉由黏接及接合寡核苷酸(包括PCR擴增)來組裝側接有單限制性核酸內切酶裂解位點之基因區段, 隨後經由指定限制性位點(例如 KpnI/SacI或 AscI/PacI)選殖至基於 pPCRScript

(Stratagene)之 pGA4 選殖載體中。藉由 DNA 定序來確定次選殖基因片段之 DNA 序列。

根據 Geneart(Regensburg, Germany)之既定說明來對基因合成片段排序。合成編碼 Ang-2/VEGF 雙專一性抗體之輕鏈及重鏈的所有基因區段，其具有編碼目的是使蛋白質在真核細胞中分泌之前導肽(MGWSCIILFLVATATGVHS)的 5' 端 DNA 序列及在合成基因之 5' 及 3' 端之獨特限制性位點。設計具有雙硫鍵穩定化之「杵白結構」修飾之重鏈的 DNA 序列，其在「杵狀結構」重鏈中具有 S354C 及 T366W 突變且在「白狀結構」重鏈中具有 Y349C、T366S、L368A 及 Y407V 突變。

#### **DNA 序列確定**

藉由根據 MediGenomix GmbH(Martinsried, Germany)或 Sequiserve GmbH(Vaterstetten, Germany)進行之雙股定序來確定 DNA 序列。

#### **DNA 及蛋白質序列分析與序列資料管理**

GCG(Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin)之套裝軟體第 10.2 版及 Infomax 之 Vector NT1 Advance 套件第 8.0 版用於序列產生、定位、分析、註釋及說明。

#### **表現載體**

為表現所述抗體，應用基於含 CMV-內含子 A 啟動子之 cDNA 構造或含 CMV 啟動子之基因組構造，短暫表現(例如在 HEK293 EBNA 或 HEK293-F 細胞中)或穩定表現(例如在 CHO 細胞中)之表現質體變異體(例如圖 2B)。

除抗體表現卡匣外，載體亦含有：

- 允許在大腸桿菌中複製此質體之複製起點，及
- 賦予大腸桿菌安比西林(ampicillin)抗性之 $\beta$ -內醯胺酶基因。

抗體基因之轉錄單元係由以下要素構成：

- 5'端之獨特限制性位點；
- 來自人類細胞巨大病毒之即刻早期強化子及啟動子；
- 隨後為在cDNA構造狀況下之內含子A序列；
- 人類抗體基因之5'-未轉譯區；
- 免疫球蛋白重鏈信號序列；
- 呈具有免疫球蛋白外顯子-內含子構造之cDNA或基因組構造形式的人類抗體鏈(重鏈、經修飾重鏈或輕鏈)；
- 具有聚腺苷酸化信號序列之3'未轉譯區；及
- 3'端之獨特限制性位點。

為短暫及穩定轉染，藉由質體製備法自經轉型大腸桿菌培養物(Nucleobond AX, Macherey-Nagel)製備大量質體。

### 細胞培養技術

如 Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J.及 Yamada, K.M. (編), John Wiley & Sons, Inc.中所述使用標準細胞培養技術。

### 在HEK293-F系統中短暫轉染

根據製造商之說明書，使用FreeStyle™ 293表現系統

(Invitrogen, USA), 藉由短暫轉染人類胚腎 293-F 細胞來表現重組免疫球蛋白變異體。簡言之, 在 37°C / 8% CO<sub>2</sub> 下在 FreeStyle™ 293 表現培養基中培養懸浮之 FreeStyle™ 293-F 細胞, 且在轉染當日, 將細胞以 1-2×10<sup>6</sup> 個活細胞/毫升之密度接種於新鮮培養基中。使用 325 μl 293fectin™ (Invitrogen, Germany) 及 250 μg 1:1 莫耳比率之重鏈及輕鏈質體 DNA, 在 Opti-MEM<sup>®</sup> I 培養基 (Invitrogen, USA) 中製備 DNA-293fectin™ 複合物, 單專一性親本抗體之最終轉染體積達 250 ml。使用 325 μl 293fectin™ (Invitrogen, Germany) 及 250 μg 一般 1:1:1 莫耳比率之「杵白結構」重鏈 1 及 2 及輕鏈質體 DNA, 在 Opti-MEM<sup>®</sup> I 培養基 (Invitrogen, USA) 中製備具有兩個重鏈及一個輕鏈之「杵白結構」DNA-293fectin 複合物, 最終轉染體積 (OAscFab 及 OAscXFab) 達 250 ml。為使表現量最佳, 可改變比率。使用 325 μl 293fectin™ (Invitrogen, Germany) 及 250 μg 1:1:1 莫耳比率之「杵白結構」重鏈 1 及 2 及輕鏈質體 DNA, 在 Opti-MEM<sup>®</sup> I 培養基 (Invitrogen, USA) 中製備 X Mab DNA-293fectin 複合物, 最終轉染體積達 250 ml。為使表現量最佳, 可改變比率。轉染後第 7 天, 藉由在 14000 g 下離心 30 分鐘收集含有抗體之細胞培養物上清液, 且經由無菌過濾器 (0.22 μm) 過濾。上清液儲存在 -20°C 下, 直至純化。

### 蛋白質測定

根據 Pace, C.N. 等人, Protein Science, 4 (1995) 2411-1423, 藉由使用基於胺基酸序列計算之莫耳消光係數測定

280 nm下的光學密度(OD)來測定經純化抗體及衍生物之蛋白質濃度。

#### 上清液中之抗體濃度測定

藉由免疫沈澱法，使用蛋白A瓊脂糖(Protein A Agarose)珠粒(Roche)來估算細胞培養物上清液中之抗體及衍生物濃度。將60  $\mu$ L蛋白A瓊脂糖珠粒在TBS-NP40(50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40)中洗滌3次。隨後，向在TBS-NP40中預平衡之蛋白A瓊脂糖珠粒施加1-15 mL細胞培養物上清液。在室溫下培育1小時後，將珠粒在Ultrafree-MC-過濾器管柱[Amicon]上以0.5 mL TBS-NP40洗滌1次，以0.5 mL 2 $\times$ 磷酸鹽緩衝鹽水(2 $\times$ PBS, Roche)洗滌2次，且以0.5 mL 100 mM檸檬酸鈉(pH 5.0)簡單洗滌4次。藉由添加35  $\mu$ l NuPAGE<sup>®</sup> LDS樣品緩衝液(Invitrogen)溶離所結合之抗體。分別將樣品的一半與NuPAGE<sup>®</sup>樣品還原劑組合或保持未還原，且在70 $^{\circ}$ C下加熱10分鐘。從而，將20  $\mu$ l施加於4-12% NuPAGE<sup>®</sup> Bis-Tris SDS-PAGE(Invitrogen)(對於非還原性SDS-PAGE使用MOPS緩衝液，且對於還原性SDS-PAGE使用具有NuPAGE<sup>®</sup>抗氧化操作緩衝液添加劑(Invitrogen)之MES緩衝液)且以庫馬斯藍(Coomassie Blue)染色。

藉由蛋白A-HPLC層析法量測細胞培養物上清液中之抗體及衍生物濃度。簡言之，向在50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、300 mM NaCl(pH 7.3)中之HiTrap蛋白A管柱(GE Healthcare)施加含有結合蛋白A之抗體及衍生物的細胞培養物上清液且在

Dionex HPLC系統上以550 mM乙酸(pH 2.5)自基質溶離。利用UV吸光度及峰面積積分值來定量所溶離之蛋白質。經純化標準IgG1抗體用作標準物。

或者，藉由夾心IgG-ELISA來量測細胞培養物上清液中之抗體及衍生物濃度。簡言之，將StreptaWell高結合抗生蛋白鏈菌素(Streptavidin)A-96孔微量滴定盤(Roche)用每孔100  $\mu$ L經生物素標記抗人類IgG捕捉分子F(ab')<sub>2</sub><hFc $\gamma$ >BI (Dianova)以0.1  $\mu$ g/mL在室溫下塗佈1小時或在4°C下塗佈隔夜，隨後以每孔200  $\mu$ L PBS、0.05% Tween(PBST, Sigma)洗滌3次。向各孔中添加每孔100  $\mu$ L各別含抗體細胞培養物上清液於PBS(Sigma)中之連續稀釋液，且在室溫下在微量滴定盤震盪器上培育1-2小時。以每孔200  $\mu$ L PBST洗滌各孔3次，且在室溫下在微量滴定盤震盪器上以100  $\mu$ l 0.1  $\mu$ g/mL之F(ab')<sub>2</sub><hFc $\gamma$ >POD(Dianova)作為偵測抗體偵測所結合之抗體1-2小時。以每孔200  $\mu$ L PBST洗滌3次洗去未經結合之偵測抗體，且藉由每孔添加100  $\mu$ L ABTS來偵測所結合之偵測抗體。在Tecan Fluor光譜儀上在405 nm量測波長下(參考波長492 nm)進行吸光度測定。

#### 純化雙專一性抗體

藉由使用Protein A-Sepharose<sup>TM</sup>(GE Healthcare, Sweden)之親和層析法及Superdex200尺寸排阻層析法，自細胞培養物上清液純化雙專一性抗體。簡言之，將無菌過濾之細胞培養物上清液施加於經PBS緩衝液(10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、137 mM NaCl及2.7 mM KCl，pH 7.4)平衡之

HiTrap ProteinA HP(5 ml)管柱上。用平衡緩衝液洗去未結合之蛋白質。用0.1 M檸檬酸鹽緩衝液(pH 2.8)溶離抗體及抗體變異體，且用0.1 ml 1 M Tris(pH 8.5)中和含有蛋白質之溶離份。接著，彙集溶離之蛋白質溶離份，用Amicon Ultra離心過濾裝置(MWCO: 30 K, Millipore)濃縮至3毫升體積，且負載於經20 mM Histidin、140 mM NaCl(pH 6.0)平衡之Superdex200 HiLoad 120 ml 16/60凝膠過濾管柱(GE Healthcare, Sweden)上。彙集含有高分子量聚集體小於5%之經純化雙專一性抗體的溶離份，且以1.0 mg/ml等分試樣儲存在-80°C下。

### SDS-PAGE

根據製造商之說明書，使用NuPAGE® Pre-Cast凝膠系統(Invitrogen)。詳言之，使用4-20% NuPAGE® Novex® TRIS-Glycine Pre-Cast凝膠及Novex® TRIS-Glycine SDS操作緩衝液。(例如參見圖3)。藉由在操作凝膠之前添加NuPAGE®樣品還原劑來達成樣品之還原。

### 分析型尺寸排阻層析法

藉由HPLC層析法進行用於測定抗體之聚集及寡聚狀態的尺寸排阻層析。簡言之，將蛋白A純化抗體施加至在Agilent HPLC 1100系統上在300 mM NaCl、50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.5)中之Tosoh TSKgel G3000SW管柱上或Dionex HPLC系統上在2×PBS中之Superdex 200管柱(GE Healthcare)上。利用UV吸光度及峰面積積分值來定量所溶離之蛋白質。BioRad凝膠過濾標準151-1901用作標準

物。(例如參見圖4)。

### 質譜法

經由電噴霧電離質譜法(ESI-MS)測定及確認交叉抗體之總去糖基化質量。簡言之，在37°C下在100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7)中在達2 mg/ml之蛋白質濃度下用50 mU N-糖苷酶F(PNGaseF, ProZyme)將100  $\mu\text{g}$ 經純化抗體去糖基化12-24小時，隨後經由Sephadex G25管柱(GE Healthcare)上之HPLC脫鹽。在去糖基化及還原之後藉由ESI-MS測定各別重鏈及輕鏈之質量。簡言之，將115  $\mu\text{l}$ 中之50  $\mu\text{g}$ 抗體與60  $\mu\text{l}$  1 M TCEP及50  $\mu\text{l}$  8 M胍鹽酸鹽一起培育，隨後脫鹽。經由裝備有NanoMate源之Q-Star Elite MS系統上的ESI-MS測定總質量及經還原重鏈及輕鏈之質量。

### HEK293-Tie2細胞株之產生

為測定血管生成素-2抗體對ANGPT2刺激之Tie2磷酸化及細胞上ANGPT2與Tie2之結合的干擾，產生重組HEK293-Tie細胞株。簡言之，使用Fugene(Roche Applied Science)作為轉染試劑，將在CMV啟動子及新黴素抗性標記物控制下編碼全長人類Tie2(SEQ ID 108)的基於pcDNA3之質體(RB22-pcDNA3 Topo hTie2)轉染至HEK293細胞(ATCC)中，且在DMEM 10% FCS、500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418中選擇抗性細胞。經由選殖柱分離個別純系，隨後用FACS分析Tie2表現。純系22經鑑別為甚至在無G418存在下亦具有高量且穩定之Tie2表現之純系(HEK293-Tie2純系22)。HEK293-Tie2純系22隨後用於細胞檢測：ANGPT2誘導之



Tie2磷酸化及 ANGPT2細胞配位體結合檢測。

### ANGPT2誘導之Tie2磷酸化檢測

根據以下檢測原理，量測 ANGPT2抗體對 ANGPT2誘導之Tie2磷酸化的抑制。在不存在或存在 ANGPT2抗體之情況下以 ANGPT2刺激 HEK293-Tie2純系 22，歷時 5分鐘，且用夾心式 ELISA來定量 P-Tie2。簡言之，使每孔  $2 \times 10^5$  個 HEK293-Tie2純系 22細胞在聚-D-離胺酸塗佈之 96孔微量滴定盤上於 100  $\mu$ l DMEM、10% FCS、500  $\mu$ g/ml遺傳黴素 (Geneticin)中生長隔夜。次日，在微量滴定盤中準備一系列滴定之 ANGPT2抗體(4倍濃縮，每孔 75  $\mu$ l最終體積，一式兩份)，且與 75  $\mu$ l ANGPT2 [R&D systems # 623-AN]稀釋液(3.2  $\mu$ g/ml，4倍濃縮溶液)混合。將抗體及 ANGPT2在室溫下預培育 15分鐘。向 HEK293-Tie2純系 22細胞(與 1 mM  $\text{NaV}_3\text{O}_4$ (Sigma #S6508)一起預培育 5分鐘)中添加 100  $\mu$ l混合物，且在 37 $^\circ\text{C}$ 下培育 5分鐘。隨後，每孔以 200  $\mu$ l冰冷 PBS+1 mM  $\text{NaV}_3\text{O}_4$ 洗滌細胞，且在冰上由每孔添加 120  $\mu$ l溶解緩衝液(20 mM Tris(pH 8.0)、137 mM NaCl、1% NP-40、10%甘油、2 mM EDTA、1 mM  $\text{NaV}_3\text{O}_4$ 、1 mM PMSF及 10  $\mu$ g/ml抑 肽 酶(Aprotinin))溶解。在 4 $^\circ\text{C}$ 下在微量滴定盤震盪器上溶解細胞 30分鐘，且不預先離心及不測定總蛋白質，將 100  $\mu$ l溶解產物直接轉移至 p-Tie2 ELISA微量滴定盤(R&D Systems, R&D #DY990)中。根據製造商之說明書定量 P-Tie2量，且使用 Excel之 XLfit4分析插件(XLfit4 analysis plug-in)(劑量反應單點分析模型 205)測定抑制之

IC<sub>50</sub>值。可比較一個實驗內之IC<sub>50</sub>值，但其可隨不同實驗而變化。

### VEGF誘導之HUVEC增殖檢測

選擇 VEGF 誘導之 HUVEC(人臍靜脈內皮細胞，Promocell #C-12200)增殖來量測 VEGF 抗體之細胞功能。簡言之，將每 96 孔 5000 個 HUVEC 細胞(低繼代次數，≤5 次繼代)在膠原蛋白 I 塗佈之 BD Biocoat 膠原蛋白 I 96 孔微量滴定盤(BD #354407/35640)中於 100 μl 饑餓培養基(EBM-2 內皮細胞基礎培養基 2(Promocell # C-22211)、0.5% FCS、盤尼西林(Penicilline)/鏈黴素(Streptomycine))中培育隔夜。使不同濃度之抗體與 rhVEGF(30 ng/ml 最終濃度，BD #354107)混合，且在室溫下預培育 15 分鐘。隨後，將混合物添加至 HUVEC 細胞中，且將其於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下培育 72 小時。在分析當日，使培養盤平衡至室溫，歷時 30 分鐘，且根據手冊(Promega, # G7571/2/3)使用 CellTiter-Glo™ 發光細胞活力檢測套組(Luminescent Cell Viability Assay kit)來測定細胞活力/增殖。以分光光度計測定發光。

#### 實例 1a

雙專一性、雙價結構域交換之 <VEGF-ANG-2> 抗體分子 X Mab 的表現及純化

根據以上材料及方法中所述之程序，表現及純化雙專一性、雙價結構域交換之 <VEGF-ANG-2> 抗體分子 X Mab1、X Mab2 及 X Mab3。<VEGF> 部分之 VH 及 VL (SEQ ID NO: 1

及 SEQ ID NO: 2) 係基於貝伐單抗。 <ANG2> 部分之 VH (SEQ ID NO: 3) 係由 ANG2i-LC06 之 VH 序列 (其描述於 PCT 申請案第 PCT/EP2009/007182 號 (WO 2010/040508) 中且其為經由噬菌體呈現所得之序列之進一步成熟片段) 之 E6Q 突變 (位置 6 上之起始胺基酸麩胺酸 (E) 經麩醯胺酸 (Q) 置換) 獲得。 <ANG2> 部分之 VL (SEQ ID NO: 4) 來源於 ANG2i-LC06 之 VL 序列 (參見 PCT 申請案第 PCT/EP2009/007182 號 (WO 2010/040508))。表現及純化雙專一性、雙價結構域交換之 <VEGF-ANG-2> 抗體分子 XMab1、XMab2 及 XMab3。此等雙專一性、雙價抗體之相關輕鏈及重鏈胺基酸序列以 SEQ ID NO: 5-8 (XMab1)、SEQ ID NO: 9-12 (XMab2) 及 SEQ ID NO: 13-16 (XMab3) 給出。關於例示性結構，參見圖 1。

關鍵資料	XMab1	XMab2	XMab3
表現(產量)	32 µg/mL	10 µg/mL	39 µg/mL
純化(產量, 蛋白A同源)	31 mg/L, 64%	8 µg/mL, 80%	-

類似地表現及純化雙專一性、雙價 <VEGF-ANG-2> 抗體 XMab4、XMab5 及 XMab6 (相關輕鏈及重鏈胺基酸序列以 SEQ ID NO: 17-20 (XMab4)、SEQ ID NO: 21-24 (XMab5) 及 SEQ ID NO: 25-28 (XMab6) 給出)。

如所述測定結合親和力及其他性質。

### 實例 1b

雙專一性、雙價 <VEGF-ANG-2> 抗體分子 OAscFab 之表現及純化

根據以上材料及方法中所述之程序，表現及純化雙專一性、雙價<VEGF-ANG-2>抗體分子 OAscFab1、OAscFab2、OAscFab3。<VEGF>部分之 VH 及 VL (SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 2) 係基於貝伐單抗。<ANG2>E6Q 部分之 VH (SEQ ID NO: 3) 係由 ANG2i-LC06 之 VH 序列 (其描述於 PCT 申請案第 PCT/EP2009/007182 號 (WO 2010/040508) 中且其為經由噬菌體呈現所得之序列之進一步成熟片段) 之 E6Q 突變 (位置 6 上之起始胺基酸麩胺酸 (E) 經麩醯胺酸 (Q) 置換) 獲得。<ANG2>E6Q 部分之 VL (SEQ ID NO: 4) 來源於 ANG2i-LC06 之 VL 序列 (參見 PCT 申請案第 PCT/EP2009/007182 號 (WO 2010/040508))。此等雙專一性、雙價抗體之相關輕鏈及重鏈胺基酸序列以 SEQ ID NO: 29-31 (OAscFab1)、SEQ ID NO: 32-34 (OAscFab2) 及 SEQ ID NO: 35-37 (OAscFab3) 給出。關於例示性結構，參見圖 2a。藉由西方墨點法確認 OAscFab1、OAscFab2 及 OAscFab3 之表現。純化 OAscFab2 及 OAscFab3，產生以下產量。

抗體	上清液	蛋白 A		SEC	
		產量	單體	產量	單體
OAscFab2	0.5 L	36.0 mg	86%	21.7 mg	>95%
OAscFab3	0.5 L	29.3 mg	85%	17.7 mg	>95%

如所述測定結合親和力及其他性質。

### 實例 1c

雙專一性、雙價結構域交換之<VEGF-ANG-2>抗體分子 OAscXFab 的表現及純化

根據以上材料及方法中所述之程序，表現及純化雙專一

性、雙價結構域交換之 <VEGF-ANG-2> 抗體分子 OAscXFab1、OAscXFab2、OAscXFab3。<VEGF> 部分之 VH 及 VL (SEQ ID NO: 1 及 SEQ ID NO: 2) 係基於貝伐單抗。<ANG2>E6Q 部分之 VH (SEQ ID NO: 3) 係由 ANG2i-LC06 之 VH 序列 (其描述於 PCT 申請案第 PCT/EP2009/007182 號 (WO 2010/040508) 中且其為經由噬菌體呈現所得之序列之進一步成熟片段) 之 E6Q 突變 (位置 6 上之起始胺基酸麩胺酸 (E) 經麩醯胺酸 (Q) 置換) 獲得。<ANG2>E6Q 部分之 VL (SEQ ID NO: 4) 來源於 ANG2i-LC06 之 VL 序列 (參見 PCT 申請案第 PCT/EP2009/007182 號 (WO 2010/040508))。此等雙專一性、雙價抗體之相關輕鏈及重鏈胺基酸序列以 SEQ ID NO: 38-40 (OAscXFab1)、SEQ ID NO: 41-43 (OAscXFab2) 及 SEQ ID NO: 44-46 (OAscXFab3) 給出。關於例示性結構，參見圖 2b (OAscXFab1) 及圖 2c (OAscXFab2、OAscXFab3)。藉由西方墨點法確認表現。

關鍵資料	OAscXFab1	OAscXFab2	OAscXFab3
表現(產量)	23 µg/mL	23 µg/mL	26 µg/mL

如所述測定結合親和力及其他性質。

## 實例 2

### 雙專一性抗體之穩定性

#### 變性溫度 (SYPRO 橙法)

為確定發生蛋白質變性 (亦即溫度誘發之蛋白質結構損失) 之溫度，使用一種依賴於在疏水性環境中顯示強烈螢光之疏水性螢光染料 (SYPRO 橙, Invitrogen) 的方法。蛋白

質變性後，疏水性小片暴露於溶劑，導致螢光增加。在高於變性溫度之溫度下，螢光強度又降低，因此將達到最大強度時之溫度定義為變性溫度。該方法由Ericsson, U.B.等人, Anal Biochem 357 (2006) 289-298及He, F.等人, Journal of Pharmaceutical Sciences 99 (2010) 1707-1720描述。

將於 20 mM His/HisCl、140 mM NaCl(pH 6.0)中約 1 mg/mL濃度之蛋白質樣品與SYPRO橙(5000×儲備溶液)混合，達到1:5000之最終稀釋。將20  $\mu$ L體積轉移至384孔培養盤中，且在LightCycler<sup>®</sup> 480即時PCR系統(Roche Applied Sciences)中在0.36°C/min之加熱速率下記錄隨溫度而變之螢光。

#### 藉由動態光散射(DLS)測定之聚集溫度

藉由動態光散射(DLS)測定發生熱誘發性蛋白質聚集的溫度。DLS產生有關處於溶解狀態之大分子之尺寸分佈的資訊，由微秒規模上散射光強度之波動獲得。當逐漸加熱樣品時，聚集在某一溫度開始，導致粒子尺寸增大。粒子尺寸開始增加之溫度定義為聚集溫度。聚集溫度與變性溫度不必相同，因為變性可能未必為聚集之先決條件。

使用DynaPro DLS盤式讀數器(Wyatt technologies)量測聚集溫度。在量測之前，經由384孔過濾板(Millipore MultiScreen 384孔過濾系統，0.45  $\mu$ m)過濾樣品，至光學384孔培養盤(Corning #3540)中。使用35  $\mu$ L之樣品體積，於調配緩衝液(20 mM檸檬酸鹽、180 mM蔗糖、20 mM精胺酸、0.02%聚山梨酸酯 20)中之蛋白質濃度為約 1

mg/mL。各孔經20  $\mu$ L石蠟油(Sigma)覆蓋以避免蒸發。以0.05°C/min之速率，將樣品自25°C加熱至80°C，且連續獲得每次操作最大15個樣品數目之DLS資料。

#### 每次DLS之聚集速率

DLS為一種偵測處於溶解狀態之大分子之聚集體的靈敏方法，因為聚集體會產生強的光散射信號。因此，可隨時間推移藉由重複獲得DLS資料來跟蹤分子聚集之趨勢。為加速潛在聚集至實用速率，在50°C下進行量測。

如上所述進行樣品製備。記錄DLS資料長達100小時。以隨時間推移平均直徑之線性擬合之斜率來計算聚集速率(奈米/天)。

#### 於調配緩衝液中之穩定性

為評估雙專一性分子在聚集/碎裂方面的穩定性，將樣品在調配緩衝液(20 mM檸檬酸鹽、180 mM蔗糖、20 mM精胺酸、0.02%聚山梨酸酯20)中約1 mg/mL之蛋白質濃度下於40°C下培育3週。對照樣品在-80°C下儲存3週。

藉由HPLC進行尺寸排阻層析法以定量聚集體及低分子量(LMW)物質。將25-100  $\mu$ g之量的蛋白質施加於Ultimate3000 HPLC系統(Dionex)上在300 mM NaCl、50 mM磷酸鉀(pH 7.5)中之Tosoh TSKgel G3000SWXL管柱上。藉由280 nm下之UV吸光度來定量溶離之蛋白質。

## 結果：

方法	XMab1(SEQ ID NO: 5-8)之穩定性
變性溫度(SYPRO橙法)	71°C
藉由動態光散射(DLS)測定之聚集溫度	65°C
每次DLS之聚集速率	0.04奈米/天
於調配緩衝液中之穩定性(在40°C與-80°C 下儲存3週後的差異)	$\Delta$ HMW : 0.6面積% $\Delta$ LMW : 0.5面積% $\Delta$ 單體 : -1.2面積%

## 實例 3：

## 雙專一性抗體&lt;VEGF-Ang-2&gt;之結合性質

## A)藉由表面電漿子共振(SPR)分析表徵之結合性質

藉由使用BIAcore T100儀器(GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden)施加表面電漿子共振(SPR)，證實兩種抗原之同時結合。使用標準胺偶合化學，將VEGF固定於CM5感測器晶片。第一步中，在25°C下以於HBS緩衝液(10 mM HEPES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20，pH 7.4)中10  $\mu$ g/ml之濃度注射<VEGF-Ang-2>XMab。在抗體結合於固定之VEGF後，在第二步中以10  $\mu$ g/ml注射hAng-2(圖3)。

在另一實驗中，確定<VEGF-Ang-2>XMab之親和力及結合動力學。簡言之，經由胺偶合將山羊<hIgG-Fc $\gamma$ >多株抗體固定於CM4晶片上，以呈遞針對Ang-2及VEGF之雙專一性抗體。在25°C或37°C下於HBS緩衝液中量測結合。添加溶解狀態下介於0.37 nM與30 nM之間或介於3.7 nM與200 nM之間之各種濃度之經純化Ang-2-His(R&D systems或內



部純化)或 VEGF(R&D systems或內部純化)。藉由注射3分鐘來量測締合；藉由用 HBS 緩衝液洗滌晶片表面10分鐘來量測解離，且使用 1:1 朗繆爾結合模型(Langmuir binding model)評估 KD 值。由於 Ang-2 製劑之異質性，故無法觀測到 1:1 結合。因此，KD 值為表觀值。經測定之 <VEGF-Ang-2>XMab 對 VEGF 之親和力極高，在 37°C 下所計算之解離速率甚至超出 Biacore 規格。表 1 中概述兩種抗原之結合常數。

表 1：<VEGF-Ang-2>XMab1 結合於 Ang-2 及 VEGF 之動力學參數

分析物	表觀ka(1/Ms)	表觀kd(1/s)	表觀KD(M)
Ang-2	2.7E+06	6.3E-04	2.4E-10
VEGF	1.2E+05	< 1E-06	< 1E-10

#### B) 定量結合活性雙專一性 <Ang2/VEGF>XMab1 之檢測

除 SPR 分析外，建立 ELISA 以定量結合活性雙專一性 mAb<Ang2/VEGF> 抗體之量。在此檢測中，第一步中，將 hAng2 直接塗佈於 maxisorp 微量滴定盤 (MTP) 之孔中。同時，將樣品/參考標準物 (mAb<Ang2/VEGF>) 在另一 MTP 孔中與地高辛配基化 VEGF 一起預先培育。預先培育及塗佈後，藉由洗滌 Ang2 塗佈之 MTP 來移除過量未結合之 Ang2。接著將預先培育之 <Ang2/VEGF> 與 VEGF-Dig 之混合物轉移至 hAng2 塗佈之 MTP 中且培育。培育後，藉由洗滌來移除過量預先培育之溶液，接著與辣根過氧化酶標記之抗地高辛配基抗體一起培育。抗體-酶結合物催化 ABTS® 受質之顏色反應。藉由 ELISA 讀數器在 405 nm 波長

(參考波長：490 nm([405/490] nm))下量測信號。一式兩份確定各樣品之吸光度值。(例示此測試系統之略圖展示於圖4中且用於定量之ELISA之校正曲線展示於圖5中)

#### 實例4

##### Tie2磷酸化

為證實抗-ANGPT2相關活性保留在雙專一性雙價<VEGF-ANGPT2>抗體XMAb1中，進行Tie2磷酸化檢測。用如上所述之ANGPT2刺激之Tie2磷酸化檢測測定XMAb1之功效。

在如上所述之ANGPT2刺激之Tie2磷酸化檢測中顯示XMAb1干擾ANGPT2刺激之Tie2磷酸化。XMAb1之IC50為7.4 nM +/- 2.3。

#### 實例5

##### 對huANG-2與Tie-2之結合的抑制(ELISA)

在室溫下在384孔微量滴定盤(MicroCoat, DE, 目錄號464718)上進行相互作用ELISA。在各培育步驟後，以PBST洗滌培養盤3次。以5 µg/ml Tie-2蛋白塗佈ELISA培養盤1小時。此後，以補充有0.2% Tween-20及2% BSA之PBS(Roche Diagnostics GmbH, DE)阻斷各孔1小時。將經純化之雙專一性Xmab抗體於PBS中之稀釋液與0.2 µg/ml人類血管生成素-2(R&D Systems, UK, 目錄號623-AN)一起在室溫下培育1小時。洗滌後，添加0.5 µg/ml生物素標記抗血管生成素-2純系BAM0981(R&D Systems, UK)與1:3000稀釋之抗生蛋白鏈菌素HRP(Roche Diagnostics GmbH, DE,

目錄號 11089153001)之混合物，歷時1小時。此後，以 PBST洗滌培養盤3次。在室溫下，以新鮮製備之ABTS試劑(Roche Diagnostics GmbH, DE, 緩衝液#204 530 001, 錠劑#11 112 422 001)使培養盤顯色30分鐘。在405 nm下量測吸光度，且測定IC<sub>50</sub>。XMab1顯示以12 nM之IC<sub>50</sub>抑制 ANG-2與Tie-2之結合。

### 實例 6

#### 對 hVEGF與 hVEGF受體之結合的抑制(ELISA)

在室溫下在384孔微量滴定盤(MicroCoat, DE, 目錄號 464718)上進行測試。在各培育步驟後，以PBST洗滌培養盤3次。開始時，以1 µg/ml hVEGF-R蛋白(R&D Systems, UK, 目錄號 321-FL)塗佈培養盤1小時。此後，以補充有0.2% Tween-20及2% BSA之PBS(Roche Diagnostics GmbH, DE)阻斷各孔1小時。將經純化之雙專一性Xmab抗體於PBS中之稀釋液與0.15 µg/ml huVEGF121(R&D Systems, UK, 目錄號 298-VS)一起在室溫下培育1小時。洗滌後，添加0.5 µg/ml抗VEGF純系Mab923(R&D Systems, UK)與1:2000結合辣根過氧化酶(HRP)之F(ab')<sub>2</sub>抗小鼠IgG(GE Healthcare, UK, 目錄號 NA9310V)的混合物，歷時1小時。此後，以PBST洗滌培養盤6次。在室溫下，以新鮮製備之ABTS試劑(Roche Diagnostics GmbH, DE, 緩衝液#204 530 001, 錠劑#11 112 422 001)使培養盤顯色30分鐘。在405 nm下量測吸光度，且測定IC<sub>50</sub>。XMab1顯示以10 nM之IC<sub>50</sub>抑制VEGF與VEGF受體之結合。

## 實例 7

### HUVEC 增殖

為證實抗-VEGF 相關活性保留在雙專一性雙價 <VEGF-ANG2> 抗體 XMAb1 中，進行 VEGF 誘導之 HUVEC 增殖檢測。在如上所述之 VEGF 誘導之 HUVEC 增殖檢測中，顯示 XMAb1 以類似於貝伐單抗之方式干擾 VEGF 誘導之 HUVEC 增殖。XMAb1 以濃度依賴性方式干擾 VEGF 誘導之 HUVEC 增殖，類似於親本抗體貝伐單抗 (Avastin)。貝伐單抗之 IC50 為 1.1 nM 且 XMAb 之 IC50 為 2.3 nM。

## 實例 8

### 小鼠角膜微囊袋血管生成檢測

自 Charles River (Sulzfeld, Germany) 購得 8 至 10 週齡之雌性 Balb/c 小鼠。根據 Rogers, M.S. 等人, Nat Protoc 2 (2007) 2545-2550 描述之方法修改方案。簡言之，在顯微鏡下使用外科手術刀片及尖銳鑷子在麻醉小鼠中以自角膜緣至頂部約 1 mm 製備約 500  $\mu$ m 寬之微囊袋。植入直徑為 0.6 mm 之圓盤 (Nylaflo®, Pall Corporation, Michigan)，且使植入區域之表面平滑。在相應生長因子或媒劑中培育圓盤至少 30 分鐘。3、5 及 7 天後 (或者僅在 3 天後)，對眼睛攝影且量測血管反應。藉由計算新血管面積 / 角膜總面積之百分比來定量檢測。

將圓盤負載 300 ng VEGF 或作為對照之 PBS，且植入，持續 7 天。在第 3、5 及 7 天，隨時間推移監測血管自角膜緣至圓盤之外生長。在圓盤植入之前的一天，經靜脈內投與

抗體 (<Ang-2/VEGF>XMAb1、<hVEGF>Avastin(貝伐單抗))，Avastin及XMAb1之劑量為10 mg/kg。對照組中之動物接受媒劑。施用體積為10 ml/kg。

為測試XMAb1對活體內VEGF誘導之血管生成的影響，進行小鼠角膜血管生成檢測。在此檢測中，將VEGF浸泡之Nylaflo圓盤植入無血管角膜之囊袋中距離角膜緣血管固定距離處。血管立即朝著所形成VEGF梯度之方向生長至角膜中。結果顯示，自研究第3天至第5天，全身性投與XMAb1(10 mg/kg)幾乎完全抑制血管朝著VEGF梯度之方向自角膜緣外生長(圖6)。在另一實驗中，進行直接比較研究。將圓盤負載300 ng VEGF或作為對照之PBS，且植入，持續3天。在第3天，隨時間推移監測血管自角膜緣至圓盤之外生長。在圓盤投植入前的一天，經靜脈內投與抗體(雙專一性<Ang-2/VEGF>抗體XMAb1、親本<VEGF>抗體貝伐單抗(Avastin)、親本<Ang-2>抗體ANG2i-LC06，及<VEGF>抗體貝伐單抗(Avastin)與<Ang-2>抗體ANG2i-LC06之組合)，貝伐單抗(Avastin)之劑量為10 mg/kg，XMAb1之劑量為10 mg/kg，貝伐單抗(Avastin)之劑量為10 mg/kg，且ANG2i-LC06之劑量為10 mg/kg。投與具有10 mg/kg貝伐單抗(Avastin)及10 mg/kg ANG2i-LC06之貝伐單抗(Avastin)與ANG2i-LC06之組合。對照組中之動物接受媒劑。施用體積為10 ml/kg。

結果(參見圖7及下表)顯示，在研究第3天，全身性投與XMAb1(10 mg/kg)幾乎完全抑制血管朝著VEGF梯度方向自

角膜緣外生長，類似於貝伐單抗與Ang2i-LC06之組合。相比之下，抗Ang-2單一療法僅輕微抑制VEGF誘導之血管生成(圖7)。在與10 mg/kg Ang2i-LC06+10 mg/kg貝伐單抗(Avastin)組合相比10 mg/kg XMab1之較低濃度下，即已達成最大作用。

表：在小鼠角膜微囊袋血管生成檢測中第3天時VEGF誘導之血管生成的抑制百分比

	VEGF誘導之血管生成之抑制%	
第3天	VEGF(300 ng)	0
	Ang2i-LC06(10 mg/kg)	38
	貝伐單抗(Avastin)(10 mg/kg)	83
	XMab1(10 mg/kg)	96
	Ang2i-LC06(10 mg/kg)+貝伐單抗(Avastin)(10 mg/kg)	95

#### 實例9

Scid beige小鼠之Colo205異種移植模型中雙專一性抗體<VEGF-ANG-2>抗體之活體內功效

細胞株及培養條件：

Colo205人類結腸直腸癌細胞(ATCC編號CCL-222)。通常在水飽和氛圍中在37°C、5% CO<sub>2</sub>下於補充有10%胎牛血清(PAA Laboratories, Austria)及2 mM L-麩醯胺酸之RPMI 1640培養基(PAA, Laboratories, Austria)中培養腫瘤細胞株。繼代2-5次用於移植。

動物：

根據約定原則(GV-Solas; Felasa; TierschG)，將到達時4-5週齡之雌性SCID beige小鼠(自Charles River Germany購得)維持在無特定病原體之條件下，每日12小時亮/12小

時暗循環。評述實驗研究方案且經地方政府批准。到達後，使動物在動物實驗設施之檢疫部分中維持一週，以使其習慣新環境且進行觀測。定時進行連續健康監測。隨意提供膳食(Provimi Kliba 3337)及水(酸化pH 2.5-3)。研究開始時小鼠年齡為約10週。

#### 腫瘤細胞注射：

在注射當日，自培養瓶(Greiner)收集腫瘤細胞(胰蛋白酶-EDTA)，且轉移至50 ml培養基中，洗滌一次，且再懸浮於PBS中。再用PBS進行洗滌步驟及過濾(細胞過濾器；Falcon Ø 100 µm)後，將最終細胞效價調至 $2.5 \times 10^7$ /ml。用移液管小心地混合腫瘤細胞懸浮液以避免細胞聚集。此後，使用寬針(1.10×40 mm)將細胞懸浮液填充至1.0 ml結核菌素針筒(Braun Melsungen)中；對於注射，改變針的尺寸(0.45×25 mm)，且每次注射使用新針。在密閉循環系統中利用預培育腔室(譜萊玻璃(plexiglas))、個別小鼠鼻子遮罩(矽)及不可燃或非爆炸性麻醉化合物異氟烷(cp-pharma)用史蒂芬吸入單元(Stephens inhalation unit)對小動物進行麻醉。在注射前兩天，刮削動物之皮毛，且為注射細胞，用解剖鉗小心提起麻醉動物之皮，且將100 µl細胞懸浮液(= $2.5 \times 10^6$ 個細胞)皮下注射至動物的右側腹中。

#### 動物處理

動物處理分別在平均腫瘤體積達約 $100 \text{ mm}^3$ 之隨機日開始。每週以如下表中所示之不同化合物腹膜內處理小鼠一次。

動物編號	化合物	劑量(mg/kg)	投與途徑/模式
10	Xolair	10	腹膜內，每週一次
10	<VEGF>Avastin	10	腹膜內，每週一次
10	<ANG-2>Ang2i-LC06	10	腹膜內，每週一次
10	Ang2i-LC06+Avastin	10	腹膜內，每週一次
		10	腹膜內，每週一次
10	XMAb1	10	腹膜內，每週一次

### 監測：

每週管理動物之健康狀態2次。細胞注射後，每週提供體重資料2次。在指定日開始用測徑規量測腫瘤尺寸，隨後在整個處理期內每週量測2次。根據NCI方案計算腫瘤體積(腫瘤體積=1/2ab<sup>2</sup>，其中「a」及「b」分別為腫瘤之長及短直徑)。終止準則為臨界腫瘤質量(高達1.7 g或Ø >1.5 cm)、體重損失超過基線20%、腫瘤潰爛或動物之不良一般狀況。

結果(參見圖8)表明，相較於用單專一性抗體處理，雙專一性、雙價<VEGF-ANG-2>抗體XMAb1在Scid beige小鼠之異種移植腫瘤模型Colo205中展示較高程度之腫瘤生長抑制。LC06與貝伐單抗組合之功效展示類似於XMAb1之結果。XMAb1之最大功效用10 mg/kg即已達到。

在第二實驗中，分析XMAb1對較大腫瘤之作用。

### 動物處理

動物處理分別在平均腫瘤體積達約400 mm<sup>3</sup>之隨機日開始。每週以如下表中所示之不同化合物腹膜內處理小鼠一次。



動物編號	化合物	劑量(mg/kg)	投與途徑/模式
10	Xolair	10	腹膜內，每週一次
10	<VEGF>Avastin	10	腹膜內，每週一次
10	<ANG-2>Ang2i-LC06	10	腹膜內，每週一次
10	Ang2i-LC06+Avastin	10	腹膜內，每週一次
		10	腹膜內，每週一次
10	XMAb1	10	腹膜內，每週一次

#### 監測：

每週管理動物之健康狀態2次。細胞注射後，每週提供體重資料2次。在指定日開始用測徑規量測腫瘤尺寸，隨後在整個處理期內每週量測2次。根據NCI方案計算腫瘤體積(腫瘤體積=1/2ab<sup>2</sup>，其中「a」及「b」分別為腫瘤之長及短直徑)。終止準則為臨界腫瘤質量(高達1.7 g或>1.5 cm)、體重損失超過基線20%、腫瘤潰爛或動物之不良一般狀況。

結果(參見圖9)表明，相較於用單專一性抗體處理在巨大腫瘤中與對照相比展示無功效，雙專一性、雙價<VEGF-ANG-2>抗體XMAb1在Scid beige小鼠之異種移植腫瘤模型Colo205中展示較高程度之腫瘤生長抑制。LC06與貝伐單抗組合之功效展示類似於XMAb1之結果。XMAb1之最大功效用10 mg/kg即已達到。

總之，結果證明，相較於用單專一性抗體處理，XMAb1展示優良功效，與腫瘤尺寸無關。

相較於10 mg/kg Ang2i-LC06+10 mg/kg Avastin之組合，在10 mg/kg XMAb1之較低濃度下即已達成此等模型中之腫瘤停滯。

## 實例 10

### Scid beige 小鼠之原位 KPL-4 異種移植模型中雙專一性抗體 <VEGF-ANG-2> 抗體之活體內功效

#### 腫瘤細胞株

已自具有發炎性皮膚癌轉移之乳癌患者的惡性胸膜滲出液確定人類乳癌細胞株 KPL-4 (Kurebayashi, J. 等人, Br. J. Cancer 79 (1999) 707-17)。通常在水飽和氛圍中在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下於補充有 10% 胎牛血清 (PAN Biotech, Germany) 及 2 mM L-麩醯胺酸 (PAN Biotech, Germany) 之 DMEM 培養基 (PAN Biotech, Germany) 中培養腫瘤細胞。用 1× 胰蛋白酶 / EDTA (PAN) 進行培養物繼代，每週分裂 3 次。

#### 小鼠

到達後，使雌性 SCID beige 小鼠 (10-12 週齡；體重 18-20 g，得自 Charles River (Sulzfeld, Germany)) 在 AALAAC 批准之動物實驗設施之檢疫部分中維持一週，以使其習慣新環境且進行觀測。進行連續健康監測。根據國際原則 (GV-Solas ; Felasa ; TierschG) 將小鼠維持在 SPF 條件下，每日 12 小時亮 / 12 小時暗循環。隨意提供膳食 (Kliba Provimi 3347) 及水 (經過濾)。評述實驗研究方案且經地方政府批准 (Regierung von Oberbayern ; 註冊編號 211.2531.2-22/2003)。

#### 腫瘤細胞注射

在注射當日，自培養瓶 (Greiner TriFlask) 收集腫瘤細胞 (胰蛋白酶-EDTA)，且轉移至 50 ml 培養基中，洗滌一次，

且再懸浮於PBS中。再用PBS進行洗滌步驟及過濾(細胞過濾器；Falcon Ø 100 µm)後，將最終細胞效價調至 $1.5 \times 10^8$ /ml。用移液管小心地混合腫瘤細胞懸浮液以避免細胞聚集。在密閉循環系統中利用預培育腔室(譜萊玻璃)、個別小鼠鼻子遮罩(矽)及不可燃或非爆炸性麻醉化合物異氟烷(Pharmacia-Upjohn, Germany)用史蒂芬吸入單元對小動物進行麻醉。注射前兩天，刮削動物之皮毛。對於腹股溝乳腺脂肪墊注射，將細胞以20 µl體積原位注射至各麻醉小鼠之右側倒數第二個腹股溝乳腺脂肪墊中。對於原位植入，使用漢彌爾頓微升針筒(Hamilton microliter syringe)及30Gx1/2"針穿過乳頭下之皮膚注射細胞懸浮液。

### 動物處理

動物處理分別在平均腫瘤體積達約80 mm<sup>3</sup>之隨機日開始。每週以如下表中所示之不同化合物腹膜內處理小鼠一次。

動物編號	化合物	劑量(mg/kg)	投與途徑/模式
10	Xolair	10	腹膜內，每週一次
10	<VEGF>Avastin	10	腹膜內，每週一次
10	<ANG-2>Ang2i-LC06	10	腹膜內，每週一次
10	Ang2i-LC06+Avastin	10	腹膜內，每週一次
		10	腹膜內，每週一次
10	XMAb1	10	腹膜內，每週一次

### 監測腫瘤生長

每週管理動物之健康狀態2次。細胞注射後，每週提供體重資料2次。在處理期開始時，在指定日用測徑規量測

腫瘤尺寸，每週2次。根據NCI方案計算腫瘤體積(B. Teicher; Anticancer drug development guide, Humana Press, 1997, 第5章(, 第92頁)(腫瘤體積= $1/2ab^2$ ，其中「a」及「b」分別為腫瘤之長及短直徑)。

終止準則為臨界腫瘤質量(高達1.7 g或 $\varnothing > 1.5$  cm)、體重損失超過基線20%、腫瘤潰爛或動物之不良一般狀況。

結果(參見圖10)表明，相較於用單專一性抗體處理，雙專一性、雙價<VEGF-ANG-2>抗體XMAb1在Scid beige小鼠之異種移植腫瘤模型Colo205中展示較高程度之腫瘤生長抑制。LC06與貝伐單抗組合之功效展示類似於XMAb1之結果。XMAb1之最大功效用10 mg/kg即已達到。

在第二實驗中，分析XMAb1對較大腫瘤之作用。

#### 動物處理

動物處理分別在平均腫瘤體積達約160 mm<sup>3</sup>之隨機日開始。每週以如下表中所示之不同化合物腹膜內處理小鼠一次。

動物編號	化合物	劑量(mg/kg)	投與途徑/模式
10	Xolair	10	腹膜內，每週一次
10	<VEGF>Avastin	10	腹膜內，每週一次
10	<ANG-2>Ang2i-LC06	10	腹膜內，每週一次
10	Ang2i-LC06+Avastin	10	腹膜內，每週一次
		10	腹膜內，每週一次
10	XMAb1	10	腹膜內，每週一次

#### 監測：

每週管理動物之健康狀態2次。細胞注射後，每週提供體重資料2次。在處理期開始時，在指定日用測徑規量測

腫瘤尺寸，每週2次。根據NCI方案計算腫瘤體積(B. Teicher; Anticancer drug development guide, Humana Press, 1997, 第5章，第92頁)(腫瘤體積= $1/2ab^2$ ，其中「a」及「b」分別為腫瘤之長及短直徑)。

終止準則為臨界腫瘤質量(高達1.7 g或 $\varnothing > 1.5$  cm)、體重損失超過基線20%、腫瘤潰爛或動物之不良一般狀況。

結果(參見圖11)表明，相較於用單專一性抗體處理，雙專一性、雙價<VEGF-ANG-2>抗體XMAb1在Scid beige小鼠之異種移植腫瘤模型Colo205中展示較高程度之腫瘤生長抑制。LC06與貝伐單抗組合之功效展示類似於XMAb1之結果。XMAb1之最大功效用10 mg/kg即已達到。

總之，結果證明，相較於用單專一性抗體處理，XMAb1展示優良功效，與腫瘤尺寸無關。

相較於10 mg/kg Ang2i-LC06+10 mg/kg Avastin之組合，在10 mg/kg XMAb1之較低濃度下即已達成此等模型中之腫瘤停滯。

#### 實例 11

在皮下Colo205異種移植物中用XMAb1處理對微血管密度之影響

藉由計數腫瘤載玻片之所有血管來評估血管密度。在石蠟包埋切片上用螢光抗小鼠CD34抗體(純系MEC14.7)標記血管。定量血管，且微血管密度計算為每平方毫米之血管數。所有結果皆以平均值 $\pm$ SEM表示。為確定實驗組之顯著差異，使用鄧尼特法(Dunnetts-Method)。認為 $p < 0.05$ 為

統計上顯著的。結果表明，經處理之腫瘤中總腫瘤內MVD減少。用ANG2i-LC06處理使MVD降低29%，貝伐單抗使MVD降低 $\leq 0\%$ ，貝伐單抗+ANG2i-LC06使MVD降低15%，且XMAb1使MVD降低28%。

## 實例 12

Scid beige小鼠之皮下N87異種移植模型中雙專一性抗體<VEGF-ANG-2>抗體之活體內功效

### 腫瘤細胞株

人類胃癌細胞株N87癌細胞(NCI-N87(ATCC編號CRL 5822))。通常在水飽和氛圍中在37°C、5% CO<sub>2</sub>下於補充有10%胎牛血清(PAN Biotech, Germany)及2 mM L-麩醯胺酸(PAN Biotech, Germany)之RPMI 1640中培養腫瘤細胞。用1×胰蛋白酶/EDTA(PAN)進行培養物繼代，每週分裂3次。

### 小鼠

到達後，使雌性SCID beige小鼠(10-12週齡；體重18-20 g，得自Charles River(Sulzfeld, Germany))在AALAAC批准之動物實驗設施之檢疫部分中維持一週，以使其習慣新環境且進行觀測。進行連續健康監測。根據國際原則(GV-Solas; Felasa; TierschG)將小鼠維持在SPF條件下，每日12小時亮/12小時暗循環。隨意提供膳食(Kliba Provimi 3347)及水(經過濾)。評述實驗研究方案且經地方政府批准(Regierung von Oberbayern；註冊編號211.2531.2-22/2003)。

### 腫瘤細胞注射

在細胞注射當日，自培養瓶(Greiner T 75)收集細胞，轉移至50 ml培養基中，洗滌一次，且再懸浮於PBS中。再用PBS洗滌後，用Vi-Cell™(細胞活力分析儀，Beckman Coulter, Madison, Wisconsin, U.S.A)量測細胞濃度。小心地混合腫瘤細胞懸浮液(PBS)(以減少細胞聚集)且保持於冰上。將細胞懸浮液填充至1.0 ml針筒中。對於注射，使用0.45×25 mm之針尺寸。為產生原發性腫瘤，將於100 µl體積PBS中之 $5 \times 10^6$ 個N87腫瘤細胞皮下注射至各小鼠之右側腹中。

#### 動物處理

動物處理分別在平均腫瘤體積達約130 mm<sup>3</sup>之隨機日開始。每週以如下表中所示之不同化合物腹膜內處理小鼠一次。

動物編號	化合物	劑量(mg/kg)	投與途徑/模式
10	Xolair	10	腹膜內，每週一次
10	<VEGF>Avastin	10	腹膜內，每週一次
10	<ANG-2>Ang2i-LC06	10	腹膜內，每週一次
10	XMAb1	10	腹膜內，每週一次

#### 監測腫瘤生長

每週管理動物之健康狀態1次。細胞注射後，每週提供體重資料1次。在處理期開始時，在指定日用測徑規量測腫瘤尺寸，每週一次。根據NCI方案計算腫瘤體積(B. Teicher; Anticancer drug development guide, Humana Press, 1997, 第5章，第92頁)(腫瘤體積= $1/2ab^2$ ，其中「a」及「b」分別為腫瘤之長及短直徑)。

終止準則為臨界腫瘤質量(高達1.7 g或 $\emptyset > 1.5$  cm)、體重

損失超過基線 20%、腫瘤潰爛或動物之不良一般狀況。

結果表明，相較於用單專一性抗體處理，雙專一性、雙價 <VEGF-ANG-2> 抗體 XMab1 在 Scid beige 小鼠之異種移植腫瘤模型 Colo205 中展示較高程度之腫瘤生長抑制(圖 12)。

### 【圖式簡單說明】

圖 1：包括杵臼結構修飾之 CH3 域之 XMab 實例的例示性雙價雙專一性抗體形式。

圖 2a：包括杵臼結構修飾之 CH3 域之 OAscFab 實例的例示性雙價雙專一性抗體形式。

圖 2b：包括杵臼結構修飾之 CH3 域之 OAscXFab1 實例的例示性雙價雙專一性抗體形式。

圖 2c：包括杵臼結構修飾之 CH3 域之 OAscXFab2 及 OAscXFab3 實例的例示性雙價雙專一性抗體形式。

圖 3：<VEGF-Ang-2>XMab1 與 VEGF 結合(第一步)、接著與 hAng-2 結合(第二步)同時進行。

圖 4：定量結合活性 mAb<Ang2/VEGF> 抗體之 ELISA 原理。

圖 5：定量結合活性 mAb<Ang2/VEGF>XMab1 抗體之 ELISA 之校正曲線。

圖 6：小鼠角膜血管生成檢測。投與本發明之雙專一性抗體抑制血管朝著 VEGF 梯度方向自角膜緣外生長。

圖 7：小鼠角膜血管生成檢測。投與本發明之雙專一性抗體抑制血管生成/血管朝著 VEGF 梯度方向自角膜緣外生



長。比較雙專一性<Ang2/VEGF>抗體 XMab1、<Ang2>Mab ANG2i-LC06(LC06)、<VEGF>Mab 貝伐單抗 (Avastin) 及 ANG2i-LC06 與 <VEGF>Mab 貝伐單抗 (Avastin) 之組合。(平均值 +/- SEM; n=6)

圖 8：本發明之雙專一性抗體在活體內抑制人類結腸直腸癌 Colo205 之小鼠異種移植物(小型腫瘤)中腫瘤生長。比較雙專一性<Ang2/VEGF>抗體 XMab1、<Ang2>Mab ANG2i-LC06(LC06)、<VEGF>Mab 貝伐單抗 (Avastin) 及 ANG2i-LC06 與 <VEGF>Mab 貝伐單抗 (Avastin) 之組合。(ANG2\_PZ\_COLO205\_015; 平均值 +/- SEM; n=10)

圖 9：本發明之雙專一性抗體在活體內抑制人類結腸直腸癌 Colo205 之小鼠異種移植物(大型腫瘤)中腫瘤生長。比較雙專一性<Ang2/VEGF>抗體 XMab1、<Ang2>Mab ANG2i-LC06(LC06)、<VEGF>Mab 貝伐單抗 (Avastin) 及 ANG2i-LC06 與 <VEGF>Mab 貝伐單抗 (Avastin) 之組合。(ANG2\_PZ\_COLO205\_015A; 平均值 +/- SEM; n=10)

圖 10：本發明之雙專一性抗體在活體內抑制人類乳癌 KPL-4 之小鼠異種移植物(小型腫瘤)中腫瘤生長。比較雙專一性<Ang2/VEGF>抗體 XMab1、<Ang2>Mab ANG2i-LC06(LC06)、<VEGF>Mab 貝伐單抗 (Avastin) 及 ANG2i-LC06 與 <VEGF>Mab 貝伐單抗 (Avastin) 之組合。(ANG2\_PZ\_KPL-4\_005; 平均值 +/- SEM; n=10)

圖 11：本發明之雙專一性抗體在活體內抑制人類乳癌 KPL-4 之小鼠異種移植物(大型腫瘤)中腫瘤生長。比較雙

專一性 <Ang2/VEGF> 抗體 XMab1、<Ang2>Mab ANG2i-LC06(LC06)、<VEGF>Mab 貝伐單抗 (Avastin) 及 ANG2i-LC06 與 <VEGF>Mab 貝伐單抗 (Avastin) 之組合。  
(ANG2\_PZ\_KPL-4\_005A；平均值  $\pm$  SEM；n=10)

圖 12：本發明之雙專一性抗體在活體內抑制胃癌 N87 之小鼠異種移植物中腫瘤生長。比較雙專一性 <Ang2/VEGF> 抗體 XMab1、<Ang2>Mab ANG2i-LC06(LC06)、<VEGF> Mab 貝伐單抗 (Avastin) 及 ANG2i-LC06 與 <VEGF>Mab 貝伐單抗 (Avastin) 之組合。(ANG2\_PZ\_N87\_004；平均值  $\pm$  SEM)

## 序列表

102年9月11日修正本

&lt;110&gt; 瑞士商赫孚孟拉羅股份有限公司

&lt;120&gt; 雙專一性、雙價抗-VEGF/抗-ANG-2 抗體

&lt;130&gt; 26642 FT

&lt;140&gt; 100109957

&lt;141&gt; 2011-03-23

&lt;150&gt; EP10003269

&lt;151&gt; 2010-03-26

&lt;160&gt; 48

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 123

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; &lt;VEGF&gt;貝伐單抗之可變重鏈域 VH

&lt;400&gt; 1

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

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; &lt;VEGF&gt;貝伐單抗之可變輕鏈域 VL

&lt;400&gt; 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 3  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> <ANG-2>E6Q 之可變重鏈域 VH

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> <ANG-2>E6Q 之可變輕鏈域 VL

<400> 4

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  
100 105

<210> 5  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> XMabl -<VEGF>輕鏈

<400> 5

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> 6  
<211> 213  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> XMabl -<ANG2>輕鏈

<400> 6

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 Ser Ser Ala Ser  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

195

200

205

Glu Pro Lys Ser Cys  
210

<210> 7  
<211> 453  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> XMab1 -<VEGF>重鏈

<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 Ala Ser Thr Lys Gly  
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 8  
 <211> 463  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> XMab1 -<ANG2>重鏈

<400> 8

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> XMab2 -<VEGF>輕鏈

<400> 9

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> 10  
<211> 212  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> X Mab2 -<VEGF>重鏈

<400> 10

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 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

<210> 11  
<211> 453  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> XMab2 -<ANG2>重鏈

<400> 11

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  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270  
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365  
 Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 405 410 415  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Leu Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 12  
 <211> 461  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> XMab2 -<ANG2>重鏈

&lt;400&gt; 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro  
 165 170 175

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
 180 185 190

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
 195 200 205

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
 210 215 220

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

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

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

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

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

290

295

300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> XMab3 -<VEGF>輕鏈

<400> 13

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> 14  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> XMab3-<ANG2>輕鏈

<400> 14

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 Ser Ser Ala Ser  
 100 105 110

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



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

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

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

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

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

Glu Pro Lys Ser Cys  
210

<210> 15  
<211> 453  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> X Mab3 -<VEGF>重鏈

<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 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 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  
 450

<210> 16  
 <211> 463  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> XMab3 -<ANG2>重鏈

<400> 16  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr



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> 18  
<211> 212  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> XMab4-<ANG2>輕鏈

<400> 18

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 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

<210> 19  
 <211> 453  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> XMab4 -<VEGF>重鏈

<400> 19

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

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  
 450

<210> 20  
 <211> 461  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> X Mab4 -<ANG2>重鏈

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro  
 165 170 175

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
 180 185 190

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
 195 200 205

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
 210 215 220



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> XMab5 -<VEGF>輕鏈

<400> 21

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



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 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val 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

<210> 23  
<211> 453  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> XMab5 -<VEGF>重鏈

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 24  
<211> 461  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> XMab5 -<ANG2>重鏈

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
115 120 125

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

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

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro  
165 170 175

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
180 185 190

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
195 200 205

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> XMab6 -<VEGF>輕鏈

<400> 25

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> 26

<211> 212

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> XMab6 -<ANG2>輕鏈

<400> 26

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





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 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  
   450  
 <210> 28  
 <211> 461  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> X Mab6 -<ANG2>重鏈  
 <400> 28  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
   1                      5                      10                      15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
                     20                      25                      30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                     35                      40                      45  
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
   50                      55                      60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
   65                      70                      75                      80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                     85                      90                      95  
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr  
                     100                      105                      110  
 Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
                     115                      120                      125  
 Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser  
   130                      135                      140  
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp  
   145                      150                      155                      160

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro  
 165 170 175

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
 180 185 190

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
 195 200 205

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450

455

460

<210> 29  
 <211> 706  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> OAscFab1 -<ANG2>肽連接之重鏈及輕鏈

<400> 29

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 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 Gln 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

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



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 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





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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 32  
 <211> 705  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> OAscFab2 -<ANG2>肽連接之重鏈及輕鏈  
 <400> 32

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Thr Glu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 385 390 395 400

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys  
 705

<210> 33  
 <211> 453  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> OAscFab2 -<VEGF>重鏈

<400> 33

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr 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 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  
450

<210> 34  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> OAscFab2 -<VEGF>輕鏈

<400> 34

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> 35  
<211> 705  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> OAscFab3 -<ANG2>肽連接之重鏈及輕鏈

<400> 35

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 Gly Gln Pro Lys  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Thr Glu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 385 390 395 400

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys  
 705

<210> 36  
 <211> 453  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> OAscFab3 -<VEGF>重鏈

<400> 36

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr 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 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  
 450

<210> 37  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> OAscFab3 -<VEGF>輕鏈

<400> 37

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> 38  
<211> 708  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> OAscxFabI -<ANG2>肽連接之重鏈及輕鏈

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
485 490 495

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
500 505 510

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
515 520 525

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

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
565 570 575

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

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

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

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

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

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
675 680 685

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
690 695 700

Ser Pro Gly Lys  
705

<210> 39  
<211> 453  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> OAscXFabI -<VEGF>重鏈

<400> 39

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

1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr 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 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  
450

<210> 40  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> OAscXFabI -<VEGF>輕鏈

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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





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

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

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

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

Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile  
370 375 380

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val  
385 390 395 400

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys  
405 410 415

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu  
420 425 430

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu

435                      440                      445  
 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr  
     450                      455                      460  
 His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu  
     465                      470                      475                      480  
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
                             485                      490                      495  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
                             500                      505                      510  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
                             515                      520                      525  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
     530                      535  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
     545                      550                      555                      560  
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
                             565                      570                      575  
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
                             580                      585                      590  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
                             595                      600                      605  
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
     610                      615                      620  
 Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
     625                      630                      635                      640  
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
                             645                      650                      655  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
                             660                      665                      670  
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
                             675                      680                      685  
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
     690                      695                      700

Ser Pro Gly Lys  
705

<210> 42  
 <211> 453  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; OAscxFab2 -&lt;VEGF&gt;重鏈

&lt;400&gt; 42

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

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  
 450  
  
 <210> 43  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> OAscXFab2 -<VEGF>輕鏈  
  
 <400> 43  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20                      25                      30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile  
 35                      40                      45  
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50                      55                      60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                      70                      75                      80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 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> 44  
<211> 705  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> OAscXFab3 -<ANG2>肽連接之重鏈及輕鏈

<400> 44

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 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 210 215 220

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

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

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

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

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

Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile  
 305 310 315 320

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

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

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

Val Thr Val Ser Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe  
 370 375 380

Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys  
 385 390 395 400

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

Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys  
 420 425 430

Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro  
 435 440 445

Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu  
 450 455 460

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

705

<210> 45  
 <211> 453  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> OAscXFab3 -<VEGF>重鏈

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser 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 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  
450

<210> 46  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> OAscXFab3 -<VEGF>輕鏈  
<400> 46

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 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> 47  
<211> 191  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 48  
<211> 504  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 具有前導序列及 His 標籤之人類血管生成素-2(ANG-2)

<400> 48

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



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

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

Ser Gly His His His His His His  
500

102年9月11日修正本

## 七、申請專利範圍：

1. 一種雙專一性、雙價抗體，其包含專一性結合於人類 VEGF 之第一抗原結合位點及專一性結合於人類 ANG-2 之第二抗原結合位點，其特徵在於
  - i) 該第一抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 1 作為重鏈可變域(VH)及 SEQ ID NO: 2 作為輕鏈可變域(VL)；及
  - ii) 該第二抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 3 作為重鏈可變域(VH)及 SEQ ID NO: 4 作為輕鏈可變域(VL)；且其進一步之特徵在於包含
    - a) 專一性結合於 VEGF 之第一全長抗體之重鏈及輕鏈；
    - b) 專一性結合於 ANG-2 之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域 CL 與 CH1 彼此置換。
2. 如請求項 1 之雙專一性抗體，其特徵在於包含
  - a) SEQ ID NO: 7 作為該第一全長抗體之重鏈及 SEQ ID NO: 5 作為該第一全長抗體之輕鏈，及
  - b) SEQ ID NO: 8 作為該第二全長抗體之經修飾重鏈及 SEQ ID NO: 6 作為該第二全長抗體之經修飾輕鏈。
3. 如請求項 1 之雙專一性抗體，其特徵在於包含
  - a) SEQ ID NO: 11 作為該第一全長抗體之重鏈及 SEQ ID NO: 9 作為該第一全長抗體之輕鏈，及
  - b) SEQ ID NO: 12 作為該第二全長抗體之經修飾重鏈及 SEQ ID NO: 10 作為該第二全長抗體之經修飾輕鏈。
4. 如請求項 1 之雙專一性抗體，其特徵在於包含
  - a) SEQ ID NO: 15 作為該第一全長抗體之重鏈及 SEQ ID

- NO: 13作為該第一全長抗體之輕鏈，及
- b) SEQ ID NO: 16作為該第二全長抗體之經修飾重鏈及  
SEQ ID NO: 14作為該第二全長抗體之經修飾輕鏈。
5. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至4中任一項之抗體。
  6. 如請求項1至4中任一項之雙專一性抗體，其係用於治療癌症。
  7. 一種如請求項1至4中任一項之抗體的用途，其係用於製造用以治療癌症之藥物。
  8. 如請求項1至4中任一項之雙專一性抗體，其係用於治療選自眼內新生血管症候群、類風濕性關節炎或牛皮癬之症狀。
  9. 如請求項8之雙專一性抗體，其係用於治療增生性視網膜病變或年齡相關之黃斑變性。
  10. 一種如請求項1至4中任一項之抗體的用途，其係用於製造用以治療選自眼內新生血管症候群、類風濕性關節炎或牛皮癬之症狀之藥物。
  11. 如請求項10之用途，其中該藥物係用於治療增生性視網膜病變或年齡相關之黃斑變性。
  12. 一種核酸，其編碼如請求項1至4中任一項之雙專一性抗體。
  13. 一種表現載體，其含有如請求項12之核酸，該表現載體能夠在原核或真核宿主細胞中表現該核酸。
  14. 一種原核或真核宿主細胞，其包含如請求項13之載體。

15. 一種製備如請求項1至4中任一項之雙專一性抗體的方法，其包含以下步驟：
  - a) 使用包含編碼該抗體之核酸分子的載體轉型宿主細胞；
  - b) 在允許合成該抗體分子之條件下培養該宿主細胞；及
  - c) 自該培養物回收該抗體分子。
16. 一種雙專一性抗體，其係由如請求項15之方法獲得。



八、圖式：

102年9月11日修正本

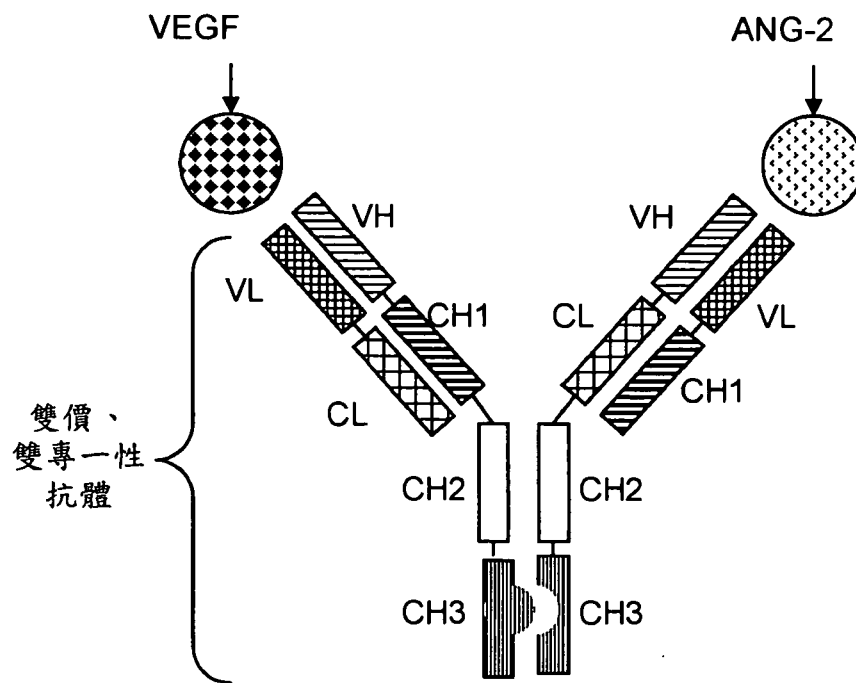


圖 1

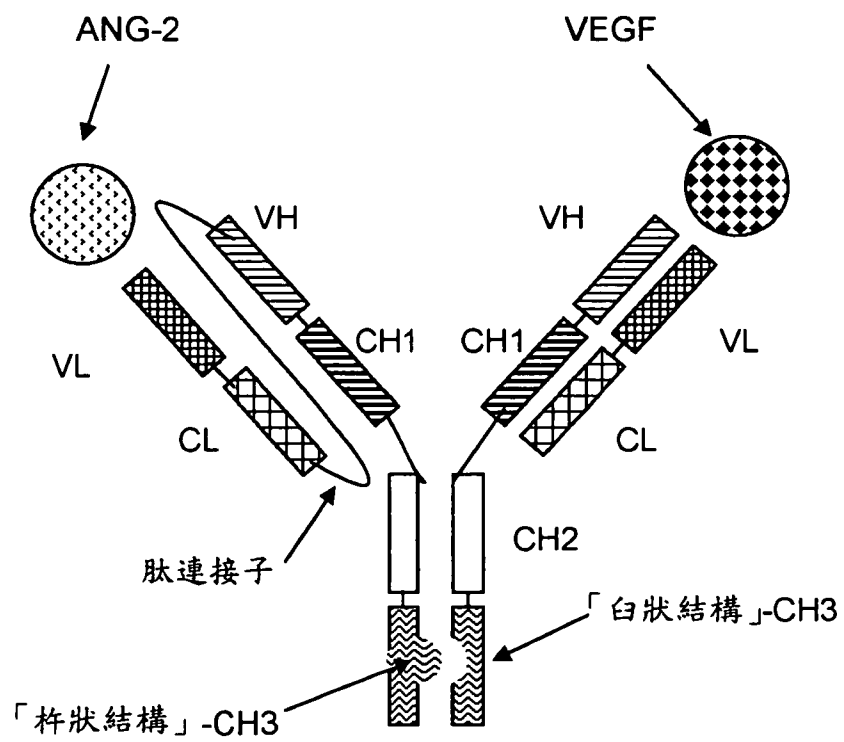


圖 2a

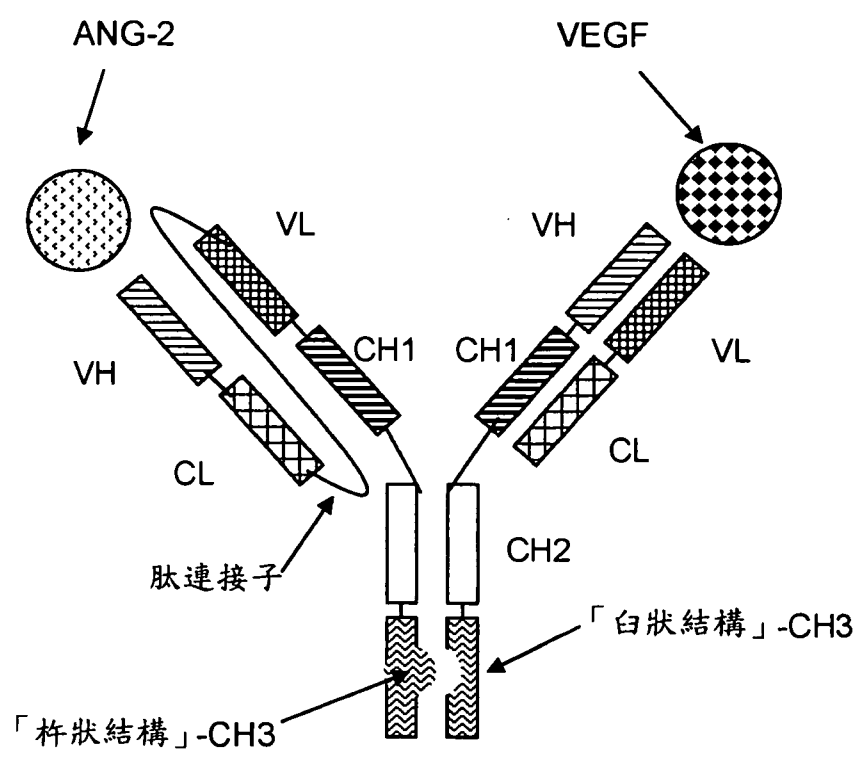


圖2b

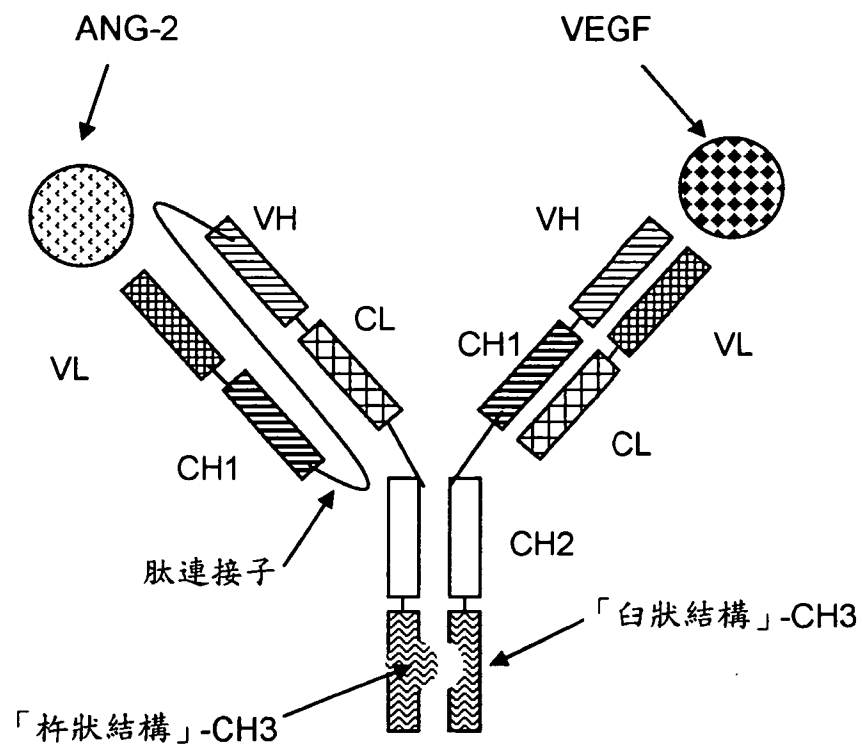


圖2c

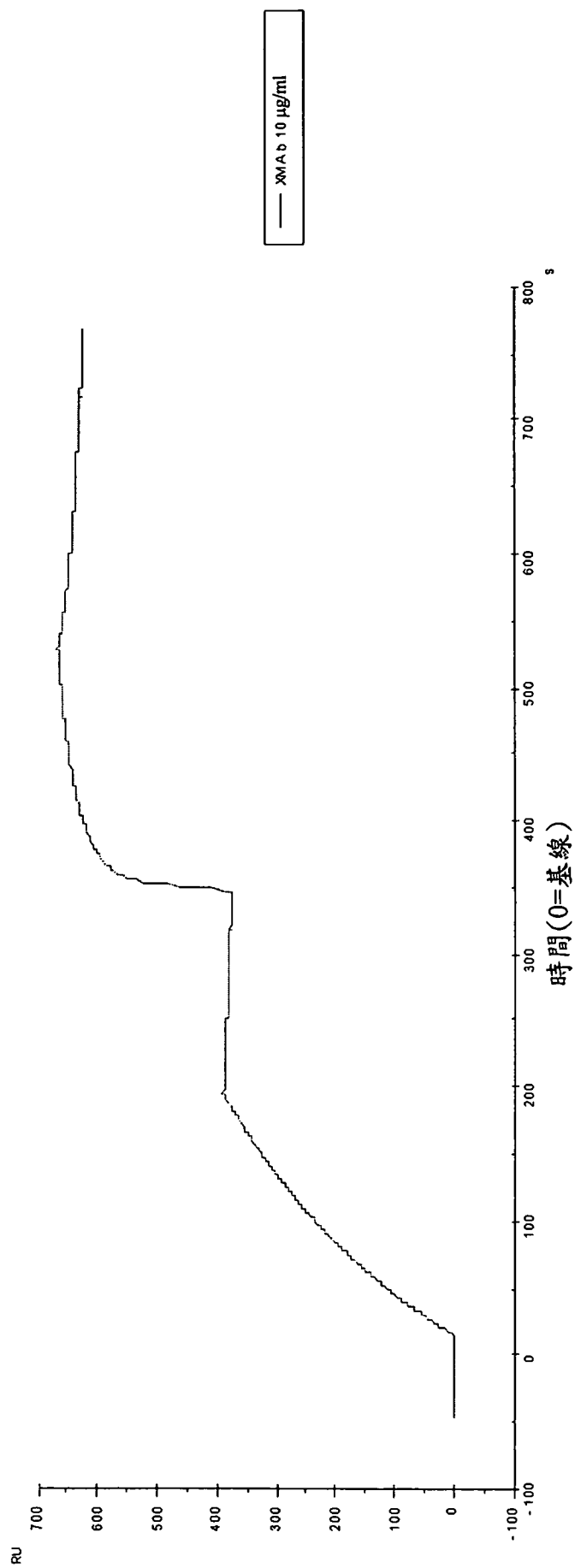


圖3

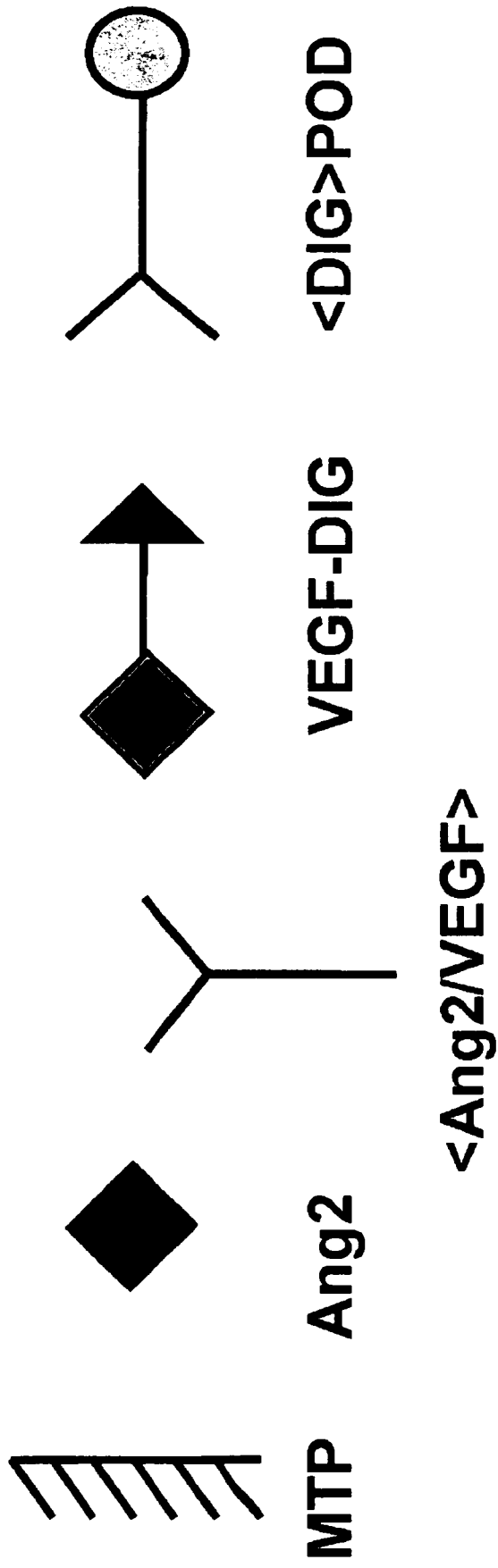


圖4

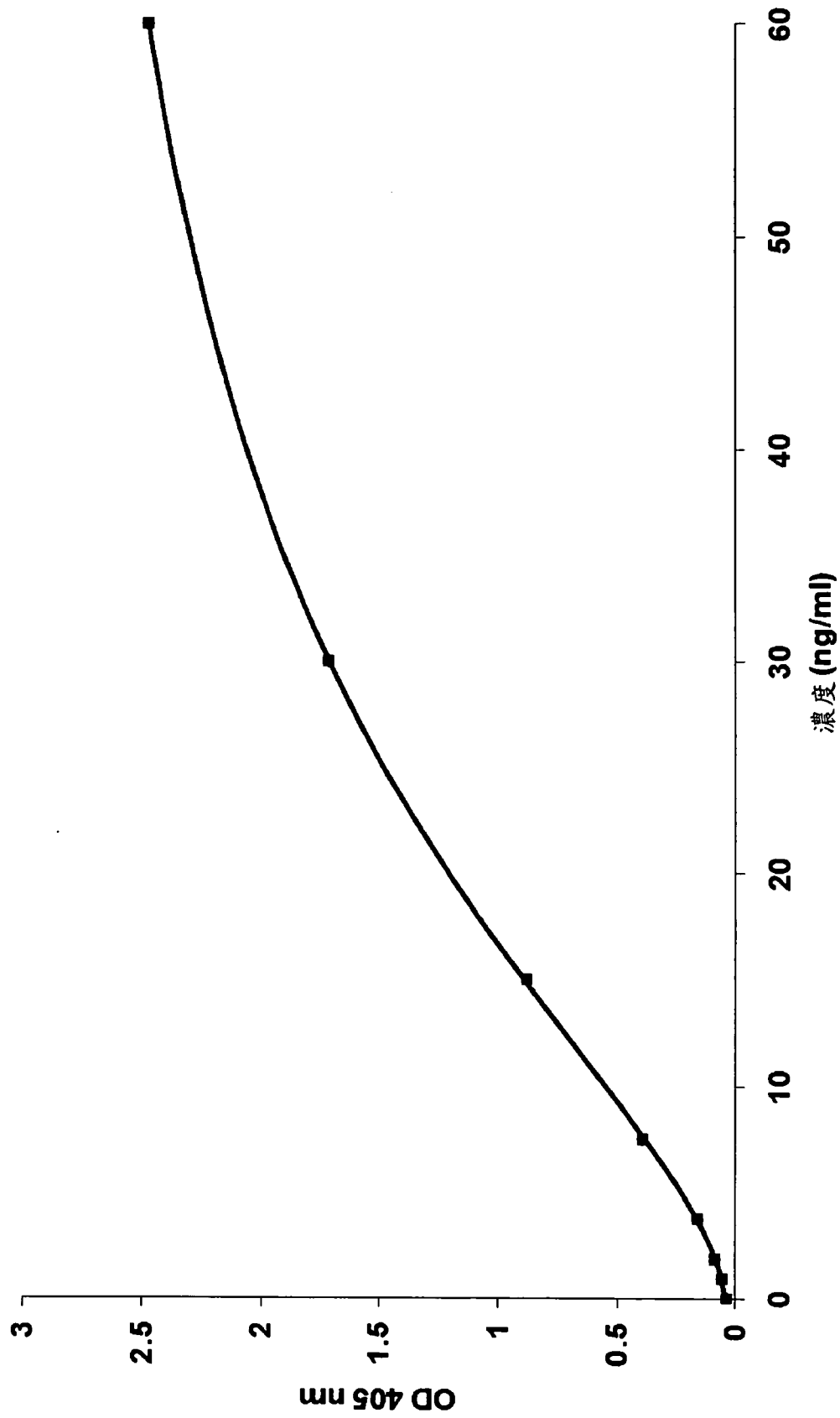


圖5

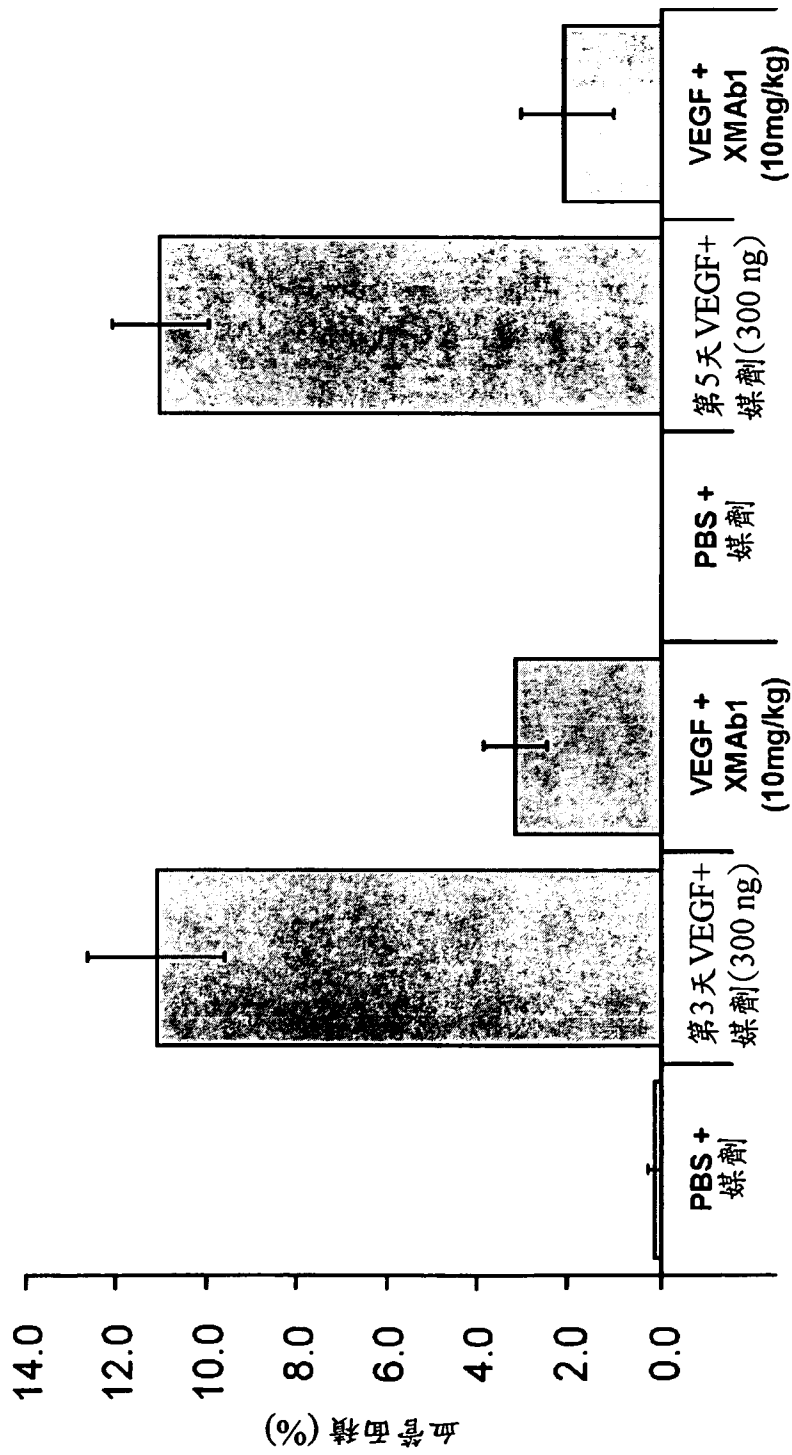
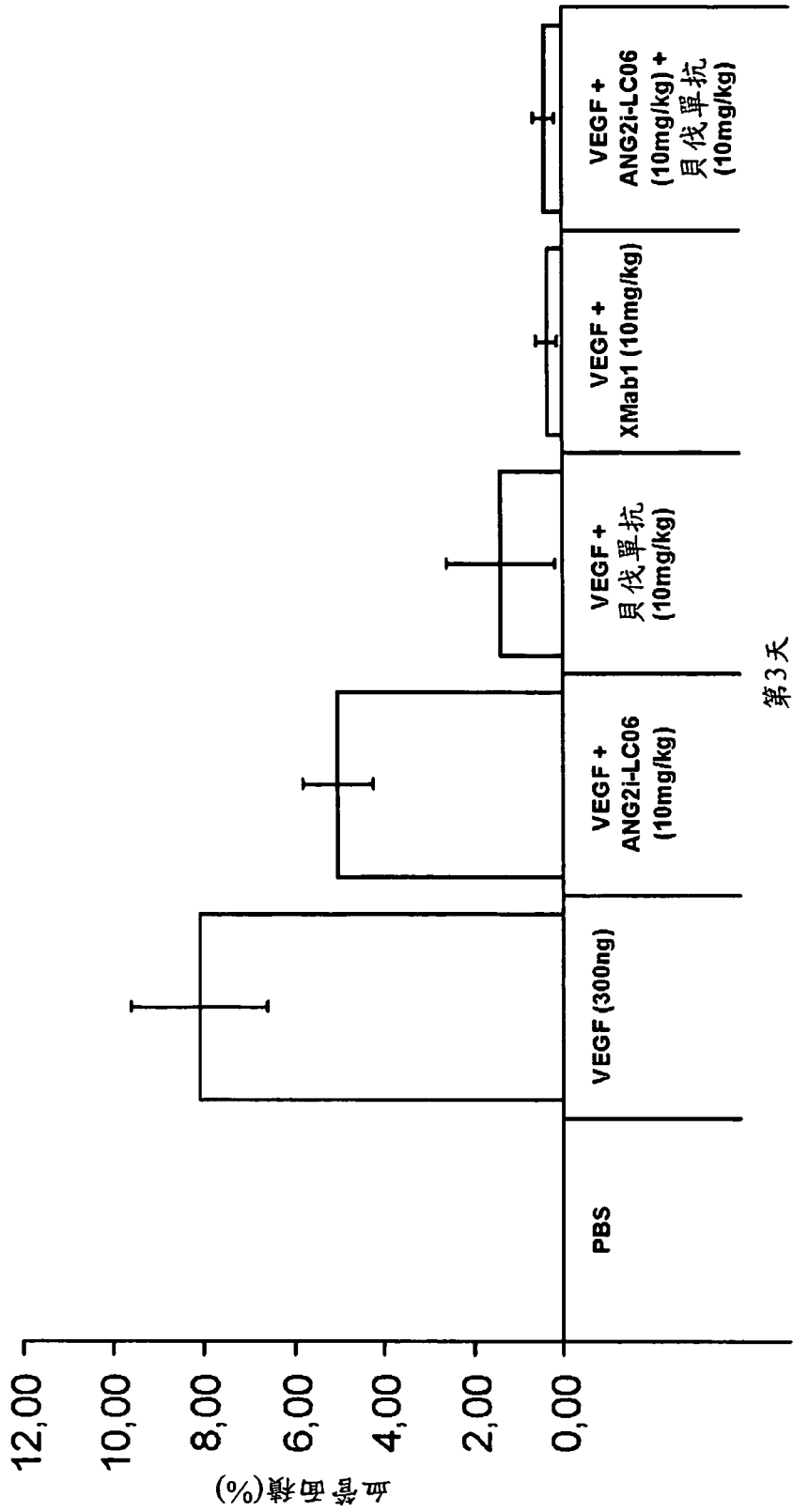


圖6





第3天

圖7

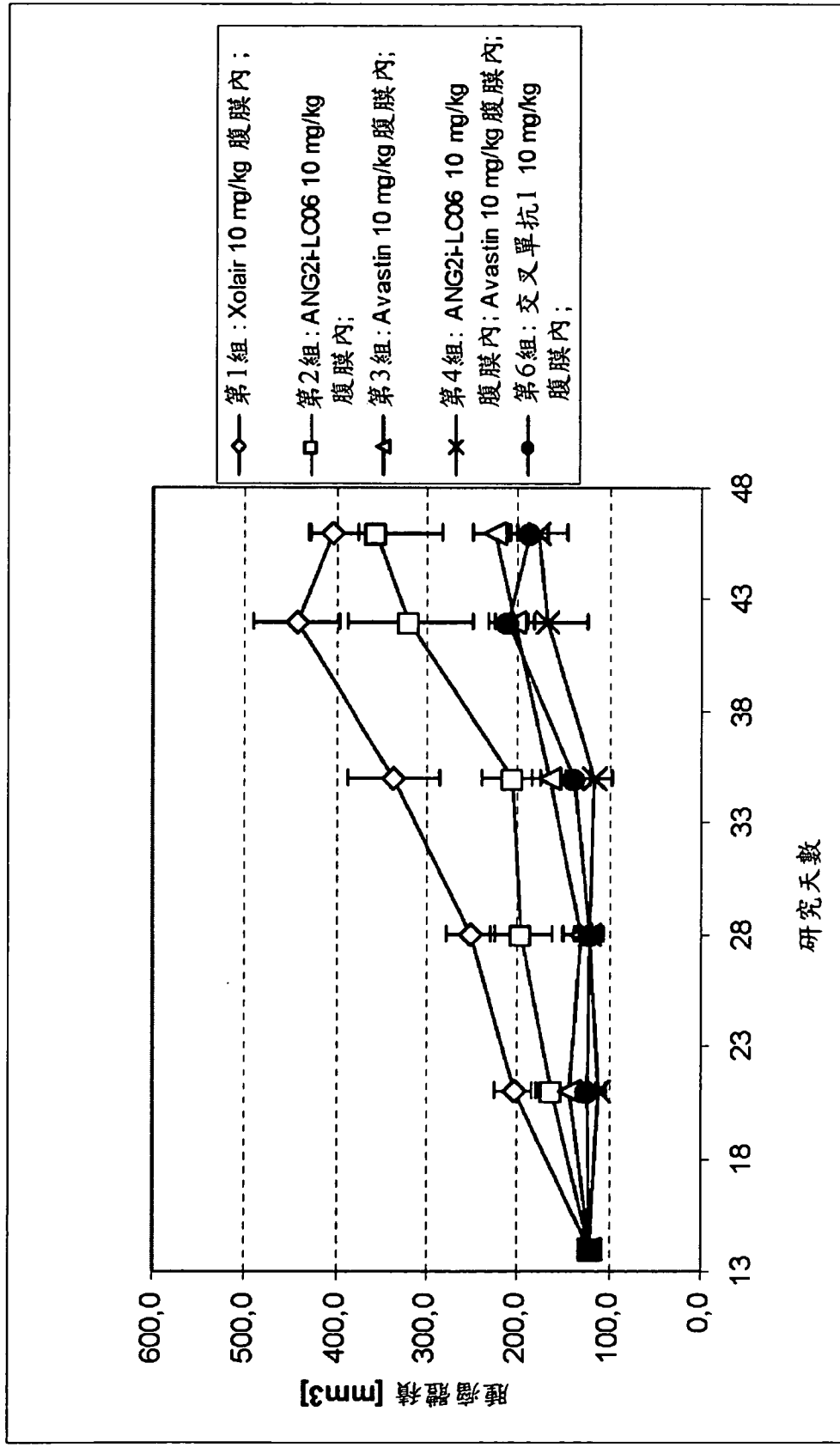


圖8

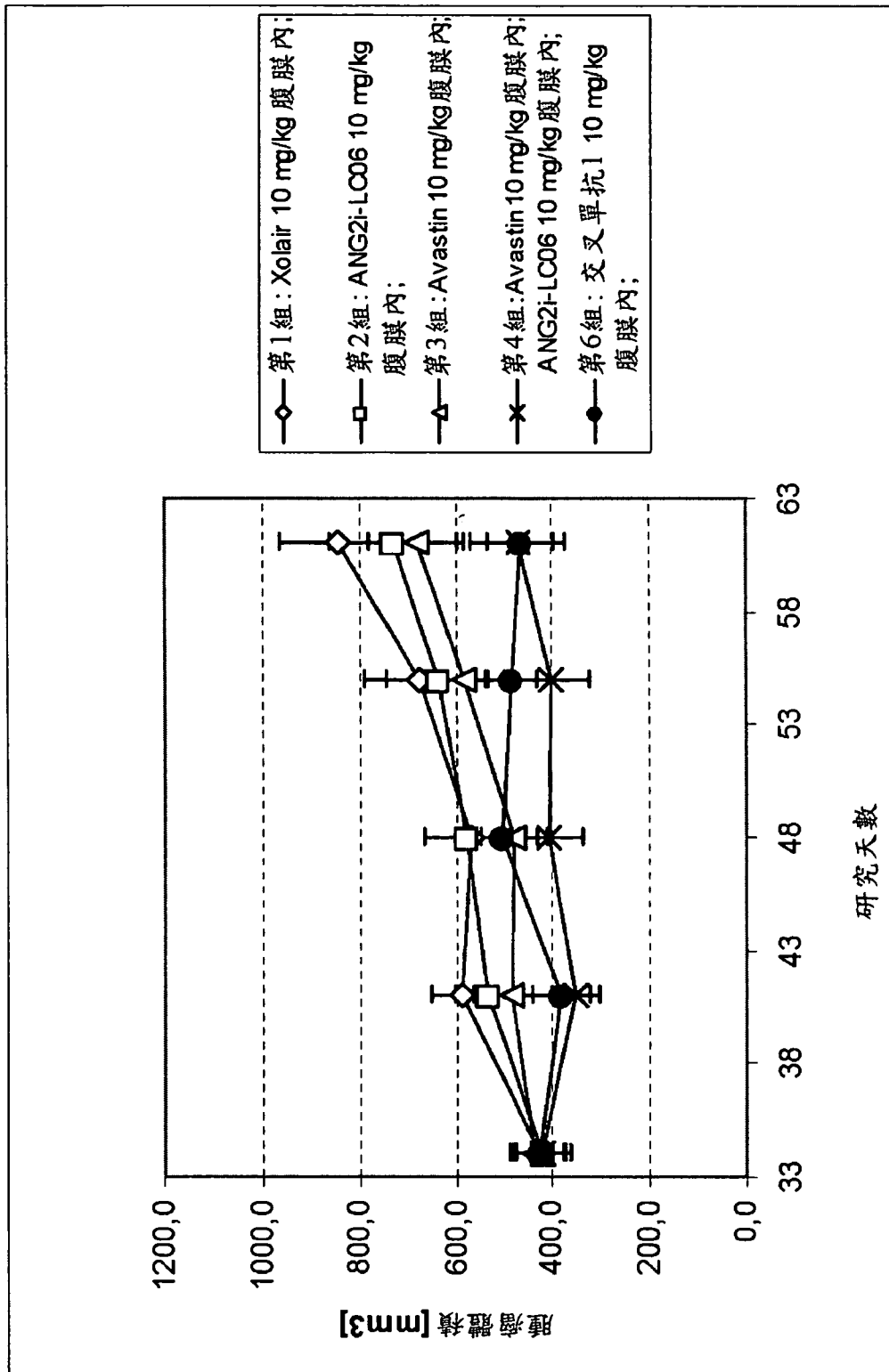


圖9

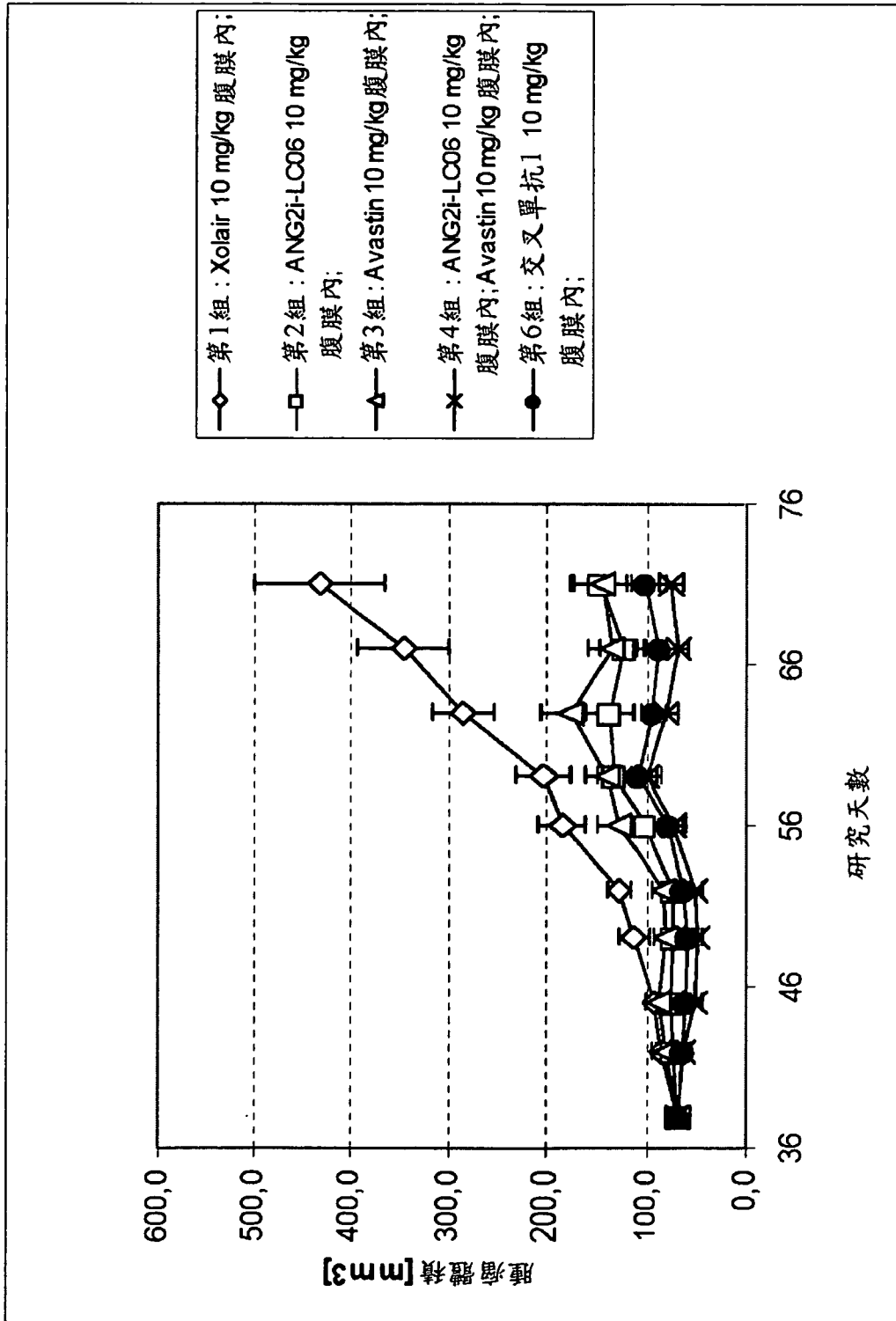


圖10

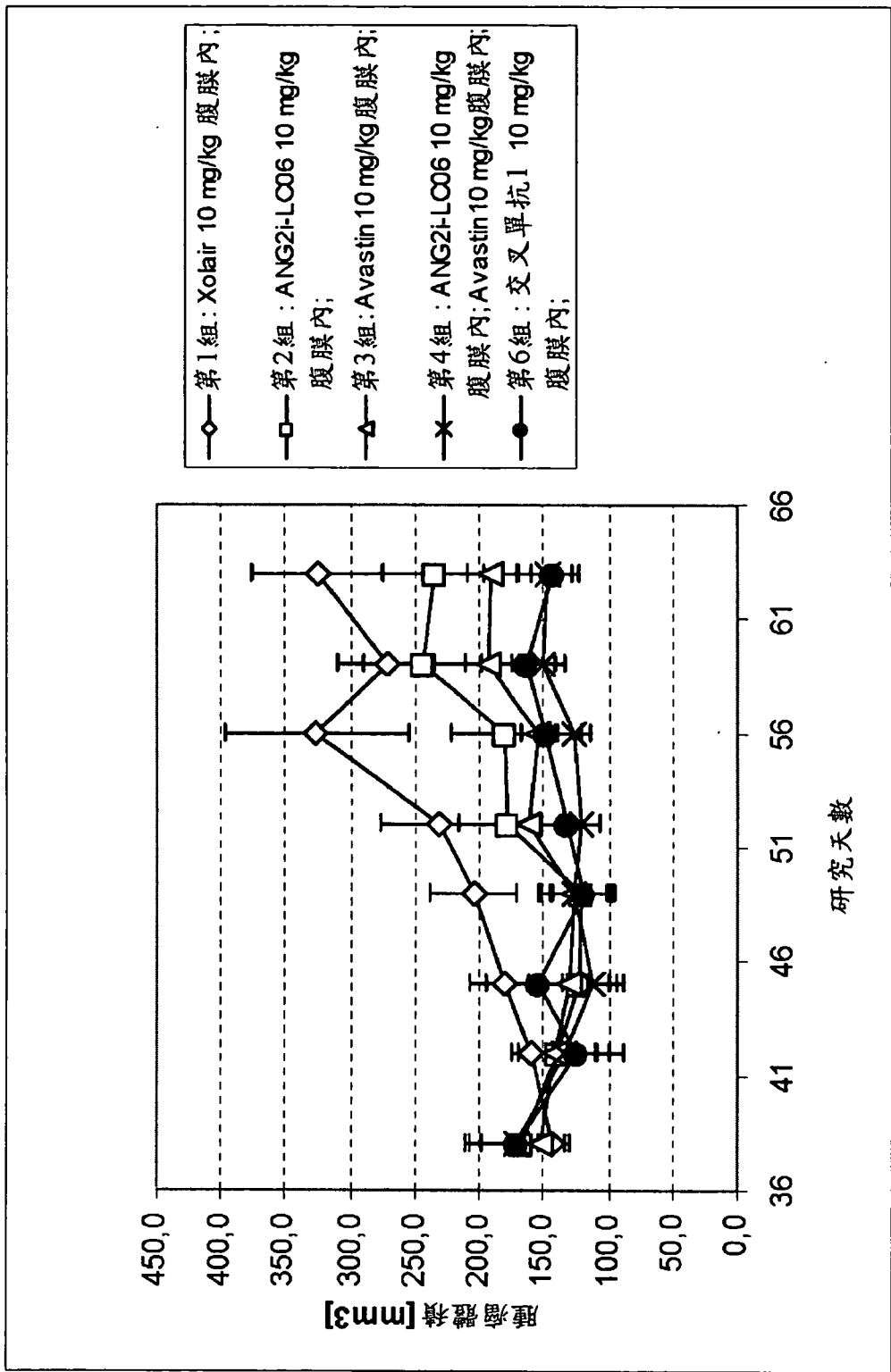


圖11

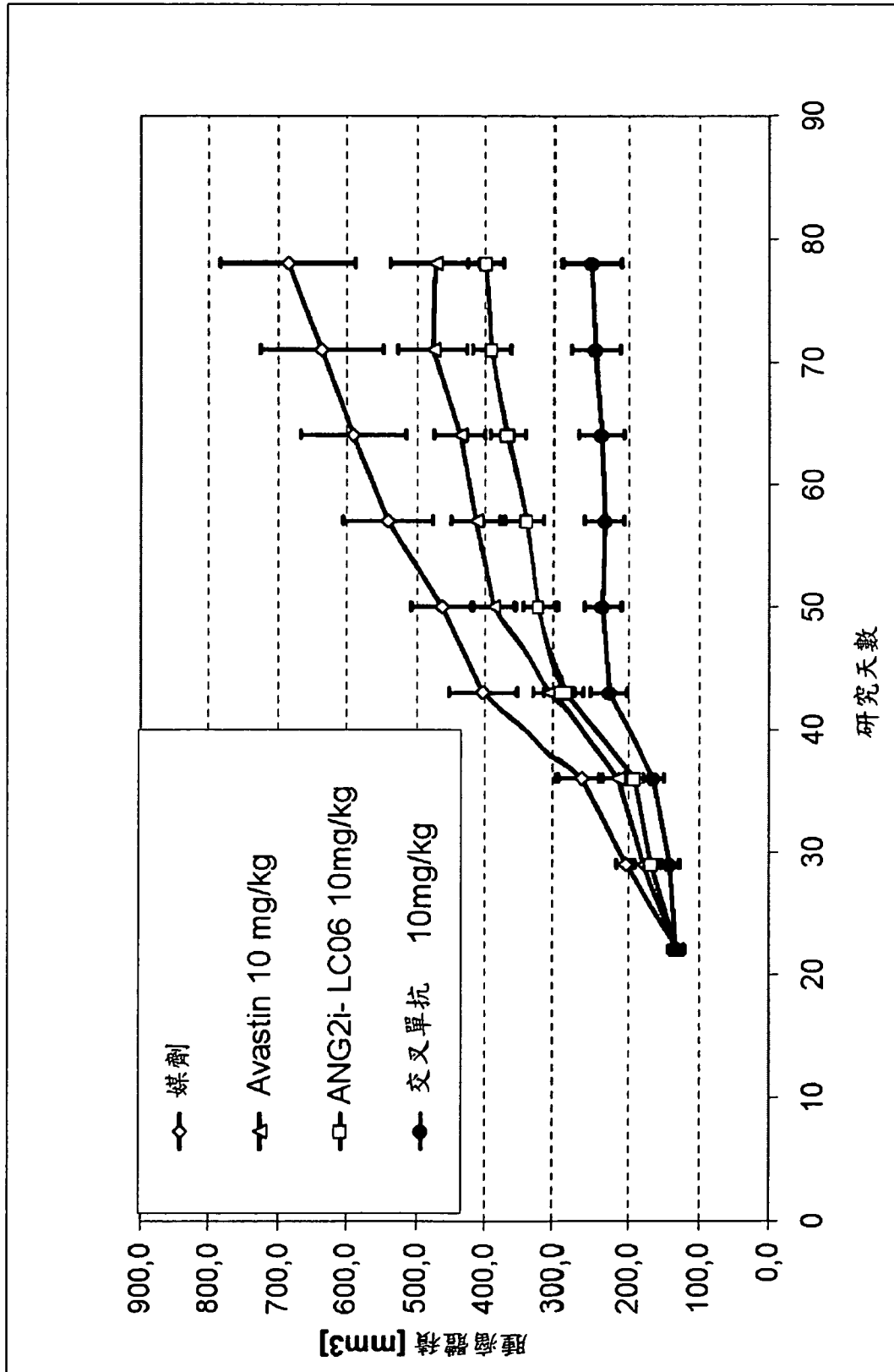


圖12