



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월01일

(11) 등록번호 10-1774121

(24) 등록일자 2017년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/22 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01) *C07K 16/46* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/22 (2013.01)*A61K 39/39533* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7000528

(22) 출원일자(국제) 2013년07월11일

심사청구일자 2015년01월09일

(85) 번역문제출일자 2015년01월09일

(65) 공개번호 10-2015-0023688

(43) 공개일자 2015년03월05일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2013/064672

(87) 국제공개번호 WO 2014/009465

국제공개일자 2014년01월16일

(30) 우선권주장

12176299.1 2012년07월13일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

WO2011117329 A1

(뒷면에 계속)

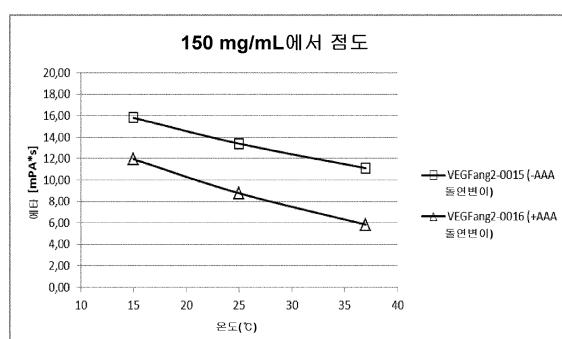
전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 이중특이적 항-VEGF/항-ANG-2 항체 및 안 혈관 질환의 치료에 있어서 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A를 갖는 인간 IgG1 또는 IgG4 서브클래스의 인간 혈관 내피 성장인자(VEGF/VEGF-A) 및 인간 안지오포이에틴-2(ANG-2)에 대한 이중특이적 항체, 이의 제조 방법, 상기 항체를 함유하는 약학 조성물, 및 이의 용도에 관한 것이다.

대 표 도

(52) CPC특허분류

C07K 16/468 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/90 (2013.01)

(72) 발명자

클라인 크리스찬

스위스 체하-8906 본슈테텐 크뤼자케르베크 41

레글라 외르크

독일 81377 뮌헨 인너코플러스트라쎄 17번

뤼트 마티아스

독일 82377 펜츠베르크 가브리엘-뮌터-베크 7

스투벤라우흐 카이-군나르

독일 82377 펜츠베르크 파르크스트라쎄 1아

(56) 선행기술조사문헌

WO2010040508 A1
US20100111967 A1*
WO2009155513 A2
Eur. J. Immunol. 29: 2819-2825(1999)

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 항체로서,

i) VEGF에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위가 서열번호 1의 CDR3H 영역, 서열번호 2의 CDR2H 영역 및 서열번호 3의 CDR1H 영역을 중쇄 가변 도메인 내에 포함하고, 서열번호 4의 CDR3L 영역, 서열번호 5의 CDR2L 영역 및 서열번호 6의 CDR1L 영역을 경쇄 가변 도메인 내에 포함하고;

ii) ANG-2에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위가 서열번호 9의 CDR3H 영역, 서열번호 10의 CDR2H 영역 및 서열번호 11의 CDR1H 영역을 중쇄 가변 도메인 내에 포함하고, 서열번호 12의 CDR3L 영역, 서열번호 13의 CDR2L 영역 및 서열번호 14의 CDR1L 영역을 경쇄 가변 도메인 내에 포함하고;

iii) 상기 이중특이적 항체가 카바트의 EU 지수에 따른 넘버링에 따를 때 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A를 포함하는 인간 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역을 포함하는, 이중특이적 항체.

청구항 9

제8항에 있어서,

i) VEGF에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위가 서열번호 7의 아미노산 서열을 중쇄 가변 도메인 VH로서 포함하고 서열번호 8의 아미노산 서열을 경쇄 가변 도메인 VL로서 포함하고,

ii) ANG-2에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위가 서열번호 15의 아미노산 서열을 중쇄 가변 도메인 VH로서 포함하고 서열번호 16의 아미노산 서열을 경쇄 가변 도메인 VL로서 포함하는, 이중특이적 항체.

청구항 10

삭제

청구항 11

제8항에 있어서,

IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역이 카바트의 EU 지수에 따른 넘버링에 따른 때 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G를 추가로 포함하는, 이중특이적 항체.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

제8항, 제9항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

안 혈관 질환의 치료에 사용되는 이중특이적 항체.

청구항 17

제16항에 있어서,

항체가 유리체내 적용을 통해 투여되는, 이중특이적 항체.

청구항 18

제8항, 제9항 및 제11항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체를 암호화하는 핵산.

청구항 19

원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 제18항에 따른 핵산을 발현할 수 있는, 상기 핵산을 함유하는 발현 벡터.

청구항 20

제19항에 따른 발현 벡터를 포함하는 원핵 또는 진핵 숙주 세포.

청구항 21

제8항, 제9항 및 제11항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체를 제조하는 방법으로서,

a) 상기 항체를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 숙주 세포를 형질전환시키는 단계;

b) 상기 항체 분자의 합성을 허용하는 조건 하에서 상기 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

c) 배양물로부터 상기 항체 분자를 회수하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 22

제21항에 따른 방법에 의해 수득된 이중특이적 항체.

청구항 23

인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 2가 항체로서, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 2가 항체.

청구항 24

인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 2가 항체로서, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 2가 항체.

청구항 25

삭제

청구항 26

제23항 또는 제24항에 있어서,

안 혈관 질환의 치료에 사용되는 이중특이적 2가 항체.

청구항 27

제26항에 있어서,

항체가 유리체내 적용을 통해 투여되는, 이중특이적 2가 항체.

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

제8항, 제9항 및 제11항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체, 또는 제23항 또는 제24항에 따른 이중특이적 2가 항체를 포함하는 안 혈관 질환의 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서,

약학 조성물이 유리체내 적용을 통해 투여되는, 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 IgG1 또는 인간 IgG4 서브클래스의 항체(이중특이적 항체를 포함함)의 점도를 감소시키는 방법, 인간 혈관 내피 성장인자(VEGF/VEGF-A) 및 인간 안지오포이에틴-2(ANG-2)에 대한 이중특이적 항체, 및 이의 제조 방법, 상기 항체를 함유하는 약학 조성물, 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈관신생은 고령 종양, 안내 신생혈관 증후군, 예컨대, 증식성 망막병증 또는 연령 관련 황반 변성(AMD), 류마티스성 관절염 및 전선을 포함하는 다양한 장애들의 발병기전에 연루되어 있다(Folkman, J., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M., et al., Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; and Garner, A., Vascular diseases, in: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., and

Klintworth, G. K. (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp. 1625-1710).

[0003] 라니비주맙(Ranibizumab)(상표명 루센티스(Lucentis)®)은 베바시주맙(bevacizumab)(아바스틴(Avastin))과 동일한 모 뮤린 항체로부터 유도된 단일클론 항체 단편이다. 그러나, 이 항체는 VEGF-A에 대한 보다 강한 결합을 제공하도록 친화 성숙되어 있다(국제 특허출원 공개 제WO 98/45331호). VEGF-A 차단이 일부 전신 독성과 관련되어 있을 수 있으므로, 라니비주맙은 혈청 반감기를 감소시켜 결과적으로 전신 독성을 감소시키도록 Fc 부분을 상실하고 있다고 공지되어 있다. 이 항체는 연령 관련 시력 상실의 흔한 형태인 "습성(wet)" 유형의 연령 관련 황반 변성(ARMD)을 치료하도록 승인되어 있는 항-혈관신생 물질이다.

[0004] 각막 혈관신생 분석은 ANG-1 및 ANG-2 둘다가 유사한 효과를 가져 VEGF와 상승작용적으로 작용함으로써 신생 혈관의 성장을 촉진한다는 것을 보여주었다(Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40). 용량 의존적 내피 반응이 있을 가능성은 시험관내에서 고농도의 ANG-2도 전구혈관신생성을 가질 수 있다는 관찰에 의해 제기되었다(Kim, I., et al., Oncogene 19 (2000) 4549-52). 고농도에서 ANG-2는 PI-3 키나제 및 Akt 경로를 통해 Tie2의 활성화를 통한 혈청 결핍 세포자멸 동안 내피세포에 대한 세포자멸 생존 인자로서 작용한다(Kim, I., et al., Oncogene 19 (2000) 4549-52).

[0005] 국제 특허출원 공개 제WO 2010/040508 A9호 및 제WO 2011/117329호는 이중특이적 항-VEGF/항-ANG-2 항체에 관한 것이다. 국제 특허출원 공개 제WO 2008/132568호는 성장인자에 결합하는 융합 단백질에 관한 것이다. 국제 특허출원 공개 제WO 2009/136352호는 항-혈관신생 화합물에 관한 것이다. 국제 특허출원 공개 제WO 2009/080253호 및 제WO 2011/117330호는 이중특이적 2가 항체 포맷에 관한 것이다. 국제 특허출원 공개 제WO 2010/069532호는 Ang2 항체에 관한 것이다.

[0006] 안 혈관 질환, 예컨대, 연령 관련 황반 변성(ARMD) 및 당뇨병성 망막병증(DR)은 각각 비정상적인 맥락막 또는 망막 신생혈관형성에 기인한다. 이들은 산업화된 국가에서 시력 상실의 주요 원인이다. 망막은 신경, 신경아교 및 혈관 요소들의 명확한 층으로 구성되기 때문에, 상대적으로 작은 방해물질, 예컨대, 혈관 증식 또는 부종에서 관찰된 작은 방해물질이 시력 기능의 상당한 상실을 초래할 수 있다. 유전된 망막 변성, 예컨대, 색소성 망막염(RP)도 혈관 기형, 예컨대, 세동맥 좁아짐 및 혈관 위축과 관련되어 있다. 이들은 3500명의 개체 당 1명에게 영향을 미치고, 점진적인 야맹증, 시야 상실, 시신경 위축, 세동맥 약화, 및 종종 완전한 시력상실로 진행되는 시력의 중심 상실을 특징으로 한다.

[0007] 허혈성 망막병증은 혈류의 감소 및 저산소증을 초래하는 망막 혈관구조의 상실 또는 기능장애를 특징으로 한다. 망막은 신생 혈관을 성장시키도록 신호를 발생시킴으로써 저산소증에 반응하지만, 이들 신생 혈관은 통상적으로 취약하고 붕괴된다. 이들 비정상적인 신생 혈관은 누출할 수 있거나, 출혈을 야기할 수 있거나, 망막 탈착으로 이어질 수 있는 흉터형성을 초래할 수 있기 때문에 시력을 가장 위협하는 것은 이들 비정상적인 신생 혈관의 성장이다. 허혈성 망막병증에 대한 현행 치료는 병리학적 혈관들의 성장을 중단시키는 것을 추구하지만, 이들의 성장을 유도하는 근원적인 허혈을 해결하지 못한다. 나아가, 수백만 명에게 영향을 미치는 당뇨병성 망막병증 및 허혈성 망막병증에 대한 표준 치료는 신생 혈관 성장을 중단하고 중심 시력을 보존하기 위한 시도에서 레이저에 의한 망막의 일부의 파괴를 수반한다. 혈관 성장의 주요 촉진제인 혈관 내피 성장인자(VEGF)의 기능을 차단하기 위한 전략이 이용되어 왔다. 단기간에서, 항-VEGF 치료는 시력을 개선할 수 있으나, 근원적인 허혈을 해결하지 못하고, 유리한 측부혈관을 포함하는 모든 혈관의 성장을 억제하기 때문에 이 상태를 사실상 악화시킬 수 있다. 신생 혈관 성장이 허혈성 뇌, 심장 또는 사지에서 요구될 수 있는 노인 및/또는 당뇨병 환자에서 이들 약물의 전신 노출의 심각한 우려도 있다.

[0008] 전형적으로 안 질환의 경우, 보다 작은 항체 단편, 예컨대, Fab 또는 (Fab)₂는 낮은 혈청 반감기를 갖고 전신 독성의 위험이 보다 낮기 때문에 종종 유리체내 적용을 통해 사용된다. 그러나, 이 보다 작은 단편은 전형적으로 (예를 들면, 혈청 내로의 보다 빠른 확산으로 인해) 보다 낮은 유리체내 반감기도 갖고 전형적으로 더 빈번히 투약되어야 한다.

[0009] 문현(Kim et al, Molecular Vision, 15 (2009) 2803-2812)은 눈의 유리체내로 투여된 전장 항체에 관한 것으로서, 이때 FcRn 결합을 갖는 IgG는 야생형 마우스의 혈액 내로 제거된 반면, FcRn 결합을 갖지 않는 IgY는 혈액 시스템 내로 제거되지 않았다. 나아가, FcRn 결합을 갖는 IgG는 FcRn 넉다운 마우스에서 혈액 시스템 내로 제거되지 않았다.

[0010] 다양한 안 혈관 질환, 예컨대, 허혈성 망막병증을 치료하고 예방하기 위한 보다 우수한 수단이 당분야에서 필요하다.

발명의 내용

- [0011] 본 발명의 한 양태는 (인간으로부터 유래된) 인간 IgG1 또는 인간 IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역을 포함하는 항체의 점도를 감소시키는 방법으로서, 인간 IgG1 또는 인간 IgG4 서브클래스의 항체 불변 중쇄 영역을 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A(카바트(Kabat)의 EU 지수에 따른 넘버링)로 변경시키는 단계를 포함한다.
- [0012] 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 방법은 상기 항체가 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 항체인 것을 특징으로 하고, 이 때
- [0013] i) VEGF에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위는 서열번호 1의 CDR3H 영역, 서열번호 2의 CDR2H 영역 및 서열번호 3의 CDR1H 영역을 중쇄 가변 도메인 내에 포함하고, 서열번호 4의 CDR3L 영역, 서열번호 5의 CDR2L 영역 및 서열번호 6의 CDR1L 영역을 경쇄 가변 도메인 내에 포함하고;
- [0014] ii) ANG-2에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위는 서열번호 9의 CDR3H 영역, 서열번호 10의 CDR2H 영역 및 서열번호 11의 CDR1H 영역을 중쇄 가변 도메인 내에 포함하고, 서열번호 12의 CDR3L 영역, 서열번호 13의 CDR2L 영역 및 서열번호 14의 CDR1L 영역을 경쇄 가변 도메인 내에 포함하고;
- [0015] iii) 상기 이중특이적 항체는 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 포함하는 (인간으로부터 유래된) 인간 IgG1 또는 인간 IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역을 포함한다.
- [0016] 본 발명의 한 실시양태에서, 이러한 방법은 전술된 상기 이중특이적 항체가 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 포함하고 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 추가로 포함하는 (인간으로부터 유래된) 인간 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역을 포함한다는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명의 한 실시양태는 이러한 방법에 의해 수득된 항체이다.
- [0018] 본 발명의 한 실시양태는 항체의 점도를 감소시키기 위한 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)의 용도이고, 이때 상기 항체는 (인간으로부터 유래된) 인간 IgG1 또는 인간 IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역을 포함한다.
- [0019] 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 용도는 상기 항체가 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 항체인 것을 특징으로 하고, 이 때
- [0020] i) VEGF에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위는 서열번호 1의 CDR3H 영역, 서열번호 2의 CDR2H 영역 및 서열번호 3의 CDR1H 영역을 중쇄 가변 도메인 내에 포함하고, 서열번호 4의 CDR3L 영역, 서열번호 5의 CDR2L 영역 및 서열번호 6의 CDR1L 영역을 경쇄 가변 도메인 내에 포함하고;
- [0021] ii) ANG-2에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위는 서열번호 9의 CDR3H 영역, 서열번호 10의 CDR2H 영역 및 서열번호 11의 CDR1H 영역을 중쇄 가변 도메인 내에 포함하고, 서열번호 12의 CDR3L 영역, 서열번호 13의 CDR2L 영역 및 서열번호 14의 CDR1L 영역을 경쇄 가변 도메인 내에 포함하고;
- [0022] iii) 상기 이중특이적 항체는 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 포함하는 (인간으로부터 유래된) 인간 IgG1 또는 인간 IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역을 포함한다.
- [0023] 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 특정 용도는 상기 이중특이적 항체가 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 포함하고 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 추가로 포함하는 (인간으로부터 유래된) 인간 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역을 포함한다는 것을 특징으로 한다.
- [0024] 또한, 본 발명은 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 2가 항체에 관한 것으로서, 이때
- [0025] i) VEGF에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위는 서열번호 1의 CDR3H 영역, 서열번호 2의 CDR2H 영역 및 서열번호 3의 CDR1H 영역을 중쇄 가변 도메인 내에 포함하고, 서열번호 4의 CDR3L 영역, 서열번호 5의 CDR2L

영역 및 서열번호 6의 CDR1L 영역을 경쇄 가변 도메인 내에 포함하고;

[0026] ii) ANG-2에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위는 서열번호 9의 CDR3H 영역, 서열번호 10의 CDR2H 영역 및 서열번호 11의 CDR1H 영역을 중쇄 가변 도메인 내에 포함하고, 서열번호 12의 CDR3L 영역, 서열번호 13의 CDR2L 영역 및 서열번호 14의 CDR1L 영역을 경쇄 가변 도메인 내에 포함하고;

[0027] iii) 상기 이중특이적 항체는 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 포함하는 (인간으로부터 유래된) 인간 IgG1 또는 인간 IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역을 포함한다.

[0028] 한 실시양태에서, 상기 이중특이적 항체는

[0029] i) VEGF에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위가 서열번호 7의 아미노산 서열을 중쇄 가변 도메인 VH로서 포함하고 서열번호 8의 아미노산 서열을 경쇄 가변 도메인 VL로서 포함하고,

[0030] ii) ANG-2에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위가 서열번호 15의 아미노산 서열을 중쇄 가변 도메인 VH로서 포함하고 서열번호 16의 아미노산 서열을 경쇄 가변 도메인 VL로서 포함하는 것

[0031] 을 특징으로 한다.

[0032] 한 실시양태에서, 상기 이중특이적 항체는 iii)의 불변 중쇄 영역이 인간 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역인 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, IgG1 서브클래스의 상기 이중특이적 항체는 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역이 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0033] 한 실시양태에서, 상기 이중특이적 항체는 iii)의 불변 중쇄 영역이 인간 IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역인 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, IgG4 서브클래스의 상기 이중특이적 항체는 IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역이 돌연변이 S228P 및 L235E(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, IgG4 서브클래스의 상기 이중특이적 항체는 IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역이 돌연변이 S228P, L235E 및 P329G(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0034] 본 발명의 추가 양태는 상기 이중특이적 항체를 포함하는 약학 조성물, 안 혈관 질환의 치료에 사용되는 상기 약학 조성물, 안 혈관 질환의 치료용 약제의 제조를 위한 상기 이중특이적 항체의 용도, 및 상기 이중특이적 항체를 이러한 치료를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써 안 혈관 질환을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법이다. 한 실시양태에서, 이중특이적 항체 또는 상기 이중특이적 항체를 포함하는 약학 조성물은 유리체내 적용을 통해 투여된다.

[0035] 본 발명의 추가 양태는 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 중쇄 및/또는 경쇄를 암호화하는 핵산 분자이다.

[0036] 본 발명은 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 상기 핵산을 발현할 수 있는 본 발명에 따른 상기 핵산을 함유하는 발현 벡터, 및 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 재조합 제조를 위한 이러한 벡터를 함유하는 숙주 세포도 제공한다.

[0037] 본 발명은 본 발명에 따른 벡터를 포함하는 원핵 또는 진핵 숙주 세포를 추가로 포함한다.

[0038] 본 발명은 본 발명에 따른 핵산을 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 발현하고 상기 세포 또는 세포 배양 상청액으로부터 상기 이중특이적 항체를 회수하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 제조 방법을 추가로 포함한다. 한 실시양태는 하기 단계들을 포함하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 제조 방법이다:

[0039] a) 상기 항체를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 숙주 세포를 형질전환시키는 단계;

[0040] b) 상기 항체 분자의 합성을 허용하는 조건 하에서 상기 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

[0041] c) 상기 배양물로부터 상기 항체 분자를 회수하는 단계.

[0042] 본 발명은 이러한 이중특이적 항체의 제조 방법에 의해 수득된 항체도 포함한다.

[0043] 따라서, 본 발명의 한 실시양태는 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 2가 항체이다.

[0044] 따라서, 본 발명의 한 실시양태는 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로

로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 2가 항체이다.

[0045]

본 발명에 따른 항체는 안 혈관 질환을 앓고 있는 환자에게 이익을 제공하는 그의 특정 변경을 Fc 부분/불변 영역 내에 갖기 때문에 매우 귀중한 성질을 갖는다. 이들 항체는 (불변 영역을 갖지 않는 보다 작은 항체 단편에 비해) 유리체내 환경에서의 높은 안정성 및 눈(실제 질환이 위치하고 치료됨)으로부터의 느린 확산을 보인다(따라서, 치료 일정이 비-IgG 유사 항체, 예컨대, Fab 및 (Fab)₂ 단편에 비해 잠재적으로 개선될 수 있다).

놀랍게도, 비-변경된 IgG 항체에 비해, (더 이상 FcRn에 결합하지 않는) 불변 영역 내에 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A를 갖는 항체의 유리체내 적용 후 눈에서의 반감기는 유사한 반면(단지 약간 감소됨)(표 17a 및 18a, 및 도 7d 및 7e), 눈으로부터 혈액 혈청 내로의 확산은 유사하였다(표 15 및 도 7b). 이것은 VEGF 및 ANG-2를 (예를 들면, 항-ANG-2/ANG-2 항체 복합체 또는 항-VEGF/VEGF 항체 복합체로서 혈액 혈청 내로 수송함으로써) 눈으로부터 제거하는 것이 ANG-2 및/또는 VEGF와 관련된 안 혈관 질환의 치료에 바람직하기 때문에 매우 귀중하다. 다른 한편으로, 본 발명에 따른 항체는 비-변경된 IgG 항체에 비해 혈청으로부터 꽤 신속히 제거된다(이것은 전신 노출로부터 발생되는 잠재적 부작용을 감소시키는 데에 매우 바람직하다).

[0046]

놀랍게도, 본 발명에 따른 항체는 (불변 영역 내에 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A를 갖지 않는 벼전에 비해) 보다 낮은 점도를 보이므로(도 2 참조), 안 질환의 치료 동안 얇은 바늘을 통해 유리체내 적용에 특히 유용하다(이러한 적용의 경우 전형적으로 얇은 바늘이 사용되고, 높은 점도가 적절한 적용을 다소 어렵게 만든다). 보다 낮은 점도는 고농도 제제도 가능하게 한다.

[0047]

또한, 놀랍게도, 본 발명에 따른 항체는 (Fc 부분 내에 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A를 갖지 않는 벼전에 비해) 저장 동안 보다 낮은 응집 경향을 보이는데(도 4), 이것은 (눈에서의 응집이 이러한 치료 동안 합병증을 초래할 수 있기 때문에) 눈에서의 유리체내 적용에 매우 중요하다. 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 혈관 질환의 억제에 있어서 우수한 효능을 보인다.

[0048]

특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 불변 영역 내의 그들의 특정 변경(예를 들면, P329G LALA)으로 인해 부작용, 예컨대, 혈전증 및/또는 원치않는 세포 사멸(예를 들면, ADCC로 인한 세포 사멸)의 위험을 감소시키는 귀중한 성질, 예컨대, Fc γ 수용체와의 비-결합을 보인다.

도면의 간단한 설명

[0049]

도 1은 AAA 돌연변이(돌연변이 I253A, H310A 및 H435A - 카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 갖는 <VEGF-ANG-2> IgG1 또는 IgG4 항체의 개념 및 장점의 개략도이다.

도 2는 200 mM 아르기닌/석시네이트(pH 5.5) 중 150 mg/ml에서 소규모 DLS-기초 점도 측정 외삽 점도를 나타낸다(본 발명에 따른 <VEGF-ANG-2> 항체 VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)과 기준물 VEGFang2-0015(이러한 AAA 돌연변이를 갖지 않음)의 비교).

도 3은 20 mM His 및 140 mM NaCl(pH 6.05)에서 온도(DLS 응집 시작 온도를 포함함)에 의존하는 DLS 응집을 나타낸다(본 발명에 따른 <VEGF-ANG-2> 항체 VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)과 기준물 VEGFang2-0015(이러한 AAA 돌연변이를 갖지 않음)의 비교).

도 4는 100 mg/ml에서 40°C에서 7일 동안 저장 결과이다(주 피크의 감소 및 고분자량/HMW 증가)(보다 낮은 응집을 보여준 본 발명에 따른 <VEGF-ANG-2> 항체 VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)과 기준물 VEGFang2-0015(이러한 AAA 돌연변이를 갖지 않음)의 비교).

도 5a는 VEGFang2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음)의 FcRn 정상 상태 친화성을 나타낸다. 상이한 농도에서 비아코어 센소그램(Biacore sensogramm)의 중첩은 VEGFang2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음)의 농도 의존적 결합을 보여준다.

도 5b는 A: VEGFang2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음)의 FcRn 정상 상태 친화성을 나타낸다. VEGFang2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음)의 농도 의존적 결합 반응 곡선은 FcRn과의 결합을 보여준다.

도 5c는 VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)의 FcRn 정상 상태 친화성을 나타낸다. 상이한 농도에서 비아코어 센소그램의 중첩은 모든 농도에서 FcRn과의 비-결합을 보여준다.

도 5d는 VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)의 FcRn 정상 상태 친화성을 나타낸다. VEGFang2-0016(AAA 돌연

변이를 가짐)의 농도 의존적 결합 반응 곡선은 FcRn과의 비-결합을 보여준다.

도 5e는 VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)의 FcRn 정상 상태 친화성을 나타낸다. VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)의 농도 의존적 결합 반응 곡선은 FcRn과의 비-결합을 보여준다(-0.6 내지 0.2 RU의 반응 범위/0 내지 0.35 M의 농도 규모 범위).

도 6은 AAA 돌연변이를 갖지 않는 VEGFang2-0015와 AAA 돌연변이를 갖는 VEGFang2-0016의 FcγRIIIa 상호작용 측정 결과이다(둘다 P329G LALA 돌연변이를 갖는 IgG1 서브클래스이고; IgG1 서브클래스 및 IgG4 기초 항체의 항-Dig는 대조군으로서 사용되었다).

도 7a는 혈청 및 전체 눈 용해물에서 <VEGF/Ang2> 이중특이적 항체의 농도의 측정을 위한 개략적인 Pk-ELISA 분석 원리를 도시한다.

도 7b는 정맥내 적용 후 혈청 농도를 나타낸다(AAA 돌연변이를 갖지 않는 화합물 VEGFang2-0015와 AAA 돌연변이를 갖는 VEGFang2-0016의 비교).

도 7c는 유리체내 적용 후 혈청 농도를 나타낸다(AAA 돌연변이를 갖지 않는 화합물 VEGFang2-0015와 AAA 돌연변이를 갖는 VEGFang2-0016의 비교).

도 7d는 (정맥내 적용에 비해 우측 눈 내로의 유리체내 적용 후) 우측 눈 및 좌측 눈에서 VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)의 눈 용해물 농도를 나타낸다. 유리체내 적용 후 우측 눈에서만 상당한 농도가 검출될 수 있었다. 정맥내 적용 후, 눈 용해물에서의 농도는 VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)의 낮은 혈청 반감기로 인해 검출될 수 없었다.

도 7e는 (정맥내 적용에 비해 우측 눈 내로의 유리체내 적용 후) 우측 눈 및 좌측 눈에서 VEGFang2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음)의 눈 용해물 농도를 나타낸다. 우측 눈에서(그리고 어느 정도 좌측 눈에서) 유리체내 적용 후 VEGFang2-0015의 농도가 검출될 수 있었다. 이것은 VEGFang2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음)의 긴 반감기에 의해 설명될 수 있는, 우측 눈으로부터 혈청 내로의 확산 및 혈청으로부터 좌측 눈 내로의 확산을 암시 한다. 정맥내 적용 후에도 양 눈의 눈 용해물에서 상당한 농도가 혈청 안정성 VEGFang2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음)의 눈 내로의 확산으로 인해 검출될 수 있었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0050] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 2가 항체이다.
- [0051] 본 발명의 한 양태에서, 본 발명에 따른 이러한 이중특이적 2가 항체는
- [0052] a) VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄; 및
- [0053] b) 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 교체되어 있는, ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 전장 항체의 변경된 중쇄 및 변경된 경쇄
- [0054] 를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0055] 인간 혈관 내피 성장인자(VEGF) 및 인간 안지오포이에틴-2(ANG-2)에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체에 대한 이 이중특이적 2가 항체 포맷은 국제 특허출원 공개 제WO 2009/080253호(놉스-인투-홀스(Knobs-into-Holes) 변경된 CH3 도메인을 포함함)에 기재되어 있다. 이 이중특이적 2가 항체 포맷에 기초한 항체는 CrossMab로서 명명된다.
- [0056] 한 실시양태에서, 이러한 이중특이적 2가 항체는
- [0057] a) 서열번호 25의 아미노산 서열을 제1 전장 항체의 중쇄로서 포함하고, 서열번호 27의 아미노산 서열을 제1 전장 항체의 경쇄로서 포함하고;
- [0058] b) 서열번호 26의 아미노산 서열을 제2 전장 항체의 변경된 중쇄로서 포함하고, 서열번호 28의 아미노산 서열을 제2 전장 항체의 변경된 경쇄로서 포함하는 것
- [0059] 을 특징으로 한다.
- [0060] 한 실시양태에서, 이러한 이중특이적 2가 항체는
- [0061] a) 서열번호 21의 아미노산 서열을 제1 전장 항체의 중쇄로서 포함하고, 서열번호 23의 아미노산 서열을 제1 전

장 항체의 경쇄로서 포함하고;

[0062] b) 서열번호 22의 아미노산 서열을 제2 전장 항체의 변경된 중쇄로서 포함하고, 서열번호 24의 아미노산 서열을 제2 전장 항체의 변경된 경쇄로서 포함하는 것

[0063] 을 특징으로 한다.

[0064] 한 실시양태에서, 이러한 이중특이적 2가 항체는

[0065] a) 서열번호 29의 아미노산 서열을 제1 전장 항체의 중쇄로서 포함하고, 서열번호 31의 아미노산 서열을 제1 전장 항체의 경쇄로서 포함하고;

[0066] b) 서열번호 30의 아미노산 서열을 제2 전장 항체의 변경된 중쇄로서 포함하고, 서열번호 32의 아미노산 서열을 제2 전장 항체의 변경된 경쇄로서 포함하는 것

[0067] 을 특징으로 한다.

[0068] 따라서, 본 발명의 한 실시양태는 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 2가 항체이다.

[0069] 따라서, 본 발명의 한 실시양태는 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 2가 항체이다.

[0070] 따라서, 본 발명의 한 실시양태는 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31 및 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 2가 항체이다.

[0071] 본 발명의 또 다른 양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는

[0072] a) VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄; 및

[0073] b) ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 전장 항체의 중쇄 및 경쇄로서, 이때 상기 중쇄의 N-말단이 펩티드 연결기를 통해 상기 경쇄의 C-말단에 연결되어 있는, 중쇄 및 경쇄

[0074] 를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0075] 인간 혈관 내피 성장인자(VEGF) 및 인간 안지오포이에틴-2(ANG-2)에 특이적으로 결합하는 이 이중특이적 항체에 대한 이 이중특이적 2가 항체 포맷은 뉴스-인투 홀스(Knobs-into-Holes) 변경된 CH3 도메인을 포함하는 국제 특허출원 공개 제WO 2011/117330호에 기재되어 있다. 이 이중특이적 2가 항체 포맷에 기초한 항체는 OAscFab로서 명명된다.

[0076] 한 실시양태에서, 이러한 이중특이적 2가 항체는

[0077] a) 서열번호 33의 아미노산 서열을 제1 전장 항체의 중쇄로서 포함하고, 서열번호 35의 아미노산 서열을 제1 전장 항체의 경쇄로서 포함하고;

[0078] b) 서열번호 34의 아미노산 서열을, 펩티드 연결기를 통해 제2 전장 항체의 경쇄에 연결된 제2 전장 항체의 중쇄로서 포함하는 것

[0079] 을 특징으로 한다.

[0080] 한 실시양태에서, 이러한 이중특이적 2가 항체는

[0081] a) 서열번호 36의 아미노산 서열을 제1 전장 항체의 중쇄로서 포함하고, 서열번호 38의 아미노산 서열을 제1 전장 항체의 경쇄로서 포함하고;

[0082] b) 서열번호 37의 아미노산 서열을, 펩티드 연결기를 통해 제2 전장 항체의 경쇄에 연결된 제2 전장 항체의 중쇄로서 포함하는 것

[0083] 을 특징으로 한다.

[0084] 한 실시양태에서, 제2 전장 항체의 중쇄 및 경쇄의 항체 중쇄 가변 도메인(VH) 및 항체 경쇄 가변 도메인(VL)은

하기 위치들 사이의 이황화 결합의 도입에 의해 이황화 안정화된다: 중쇄 가변 도메인 위치 44 내지 경쇄 가변 도메인 위치 100(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링(Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))). 이러한 추가 이황화 안정화는 제2 전장 항체 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 VH와 VL 사이에 이황화 결합의 도입에 의해 달성된다. 안정화를 위해 비-천연 이황화 가교를 도입하는 기법은 예를 들면, 국제 특허출원 공개 제WO 94/029350호, 문헌(Rajagopal, V., et al, Prot. Engin. 10 (1997) 1453-59), 문헌(Kobayashi et al., Nuclear Medicine & Biology 25 (1998) 387-393) 또는 문헌(Schmidt, M., et al., Oncogene 18 (1999) 1711-1721)에 기재되어 있다.

[0085] 따라서, 본 발명의 한 실시양태는 서열번호 33, 서열번호 34 및 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 2가 항체이다.

[0086] 따라서, 본 발명의 한 실시양태는 서열번호 36, 서열번호 37 및 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 2가 항체이다.

[0087] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 2가 항체의 CH3 도메인은 예를 들면, 국제 특허출원 공개 제WO 96/027011호, 문헌(Ridgway J.B., et al., Protein Eng 9 (1996) 617-621) 및 문헌(Merchant, A.M., et al., Nat Biotechnol 16 (1998) 677-681)에 여러 예로 상세히 기재되어 있는 "놉스-인투-홀스" 기술에 의해 변경된다. 이 방법에서, 2개의 CH3 도메인들의 상호작용 표면은 이를 2개의 CH3 도메인들을 함유하는 두 중쇄들의 이중이량체화를 증가시키도록 변경된다. (2개의 중쇄들의) 2개의 CH3 도메인들 각각이 "놉"일 수 있는 반면, 나머지는 "홀"이다. 이황화 가교의 도입은 이중이량체를 안정화시키고(Merchant, A.M., et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al. J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35) 수율을 증가시킨다.

[0088] 본 발명의 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 모든 이중특이적 항체들은 한 중쇄의 CH3 도메인 및 다른 중쇄의 CH3 도메인이 항체 CH3 도메인들 사이의 원래의 계면을 포함하는 계면에서 서로 만나는 것을 특징으로 하고, 이 때 상기 계면은 이중특이적 항체의 형성을 촉진하도록 변경되고, 이 때 상기 변경은

[0089] a) 원래의 계면 내에서 한 중쇄의 CH3 도메인이 이중특이적 항체 내의 다른 중쇄의 CH3 도메인의 원래의 계면과 만나고, 아미노산 잔기가 보다 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 교체되어, 다른 중쇄의 CH3 도메인의 계면 내의 캐비티(cavity)에 위치할 수 있는 돌출부를 한 중쇄의 CH3 도메인의 계면 내에서 발생시키도록, 한 중쇄의 CH3 도메인이 변경되고;

[0090] b) 원래의 계면 내에서 제2 CH3 도메인이 이중특이적 항체의 제1 CH3 도메인의 원래의 계면과 만나고, 아미노산 잔기가 보다 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 교체되어, 제1 CH3 도메인의 계면 내의 돌출부가 위치할 수 있는 캐비티를 제2 CH3 도메인의 계면 내에서 발생시키도록, 다른 중쇄의 CH3 도메인이 변경되는 것

[0091] 을 특징으로 한다.

[0092] 따라서, 본 발명에 따른 항체는 바람직하게는 a)의 전장 항체의 중쇄의 CH3 도메인 및 b)의 전장 항체의 중쇄의 CH3 도메인이 항체 CH3 도메인들 사이의 원래의 계면 내에 변경을 포함하는 계면에서 서로 만나고, 이 때

[0093] i) 한 중쇄의 CH3 도메인에서 아미노산 잔기가 보다 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 교체되어, 다른 중쇄의 CH3 도메인의 계면 내의 캐비티에 위치할 수 있는 돌출부를 한 중쇄의 CH3 도메인의 계면 내에서 발생시키고,

[0094] ii) 다른 중쇄의 CH3 도메인에서 아미노산 잔기가 보다 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 교체되어, 제1 CH3 도메인의 계면 내의 돌출부가 위치할 수 있는 캐비티를 제2 CH3 도메인의 계면 내에서 발생시키는 것

[0095] 을 특징으로 한다.

[0096] 바람직하게는, 보다 큰 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 아르기닌(R), 페닐알라닌(F), 티로신(Y) 및 트립토판(W)으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0097] 바람직하게는, 보다 작은 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 알라닌(A), 세린(S), 쓰레오닌(T) 및 발린(V)으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0098] 본 발명의 한 양태에서, 두 CH3 도메인들은 두 CH3 도메인들 사이의 이황화 가교가 형성될 수 있도록 각각의

CH3 도메인의 상응하는 위치에서 아미노산으로서 시스테인(C)의 도입에 의해 더 변경된다.

[0099] 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 "놉스 쇄"의 CH3 도메인 내에 T366W 돌연변이를 포함하고 "홀 쇄"의 CH3 도메인 내에 T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 포함한다. 예를 들면, Y349C 돌연변이를 "놉스 쇄"의 CH3 도메인 내로 도입하고 E356C 돌연변이 또는 S354C 돌연변이를 "홀 쇄"의 CH3 도메인 내로 도입함으로써 CH3 도메인들 사이의 추가 쇄간 이황화 가교도 사용할 수 있다(Merchant, A.M., et al., Nature Biotech 16(1998) 677-681).

[0100] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 2개의 CH3 도메인들 중 하나 내에 Y349C 및 T366W 돌연변이를 포함하고 상기 2개의 CH3 도메인들 중 나머지 하나 내에 E356C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 2개의 CH3 도메인들 중 하나 내에 Y349C 및 T366W 돌연변이를 포함하고 상기 2개의 CH3 도메인들 중 나머지 하나 내에 S354C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 포함한다(한 CH3 도메인 내의 추가 Y349C 돌연변이, 및 쇄간 이황화 가교를 형성하는 다른 CH3 도메인 내의 추가 E356C 또는 S354C 돌연변이)(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링(Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))). 그러나, 유럽 특허출원 공보 제1 870 459 A1호에 기재된 바와 같은 다른 놈스-인투-홀스 기술을 대안적으로 또는 추가로 이용할 수 있다. 따라서, 이중특이적 항체에 대한 또 다른 예는 "놉스 쇄"의 CH3 도메인 내의 R409D 및 K370E 돌연변이 및 "홀 쇄"의 CH3 도메인 내의 D399K 및 E357K 돌연변이이다(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링(Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))).

[0101] 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 항체는 "놉스 쇄"의 CH3 도메인 내에 T366W 돌연변이를 포함하고 "홀 쇄"의 CH3 도메인 내에 T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 포함하고, 추가로 "놉스 쇄"의 CH3 도메인 내에 R409D 및 K370E 돌연변이를 포함하고 "홀 쇄"의 CH3 도메인 내에 D399K 및 E357K 돌연변이를 포함한다.

[0102] 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 항체는 2개의 CH3 도메인들 중 하나 내에 Y349C 및 T366W 돌연변이를 포함하고 상기 2개의 CH3 도메인들 중 나머지 하나 내에 S354C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 포함하거나, 상기 3가 이중특이적 항체는 2개의 CH3 도메인들 중 하나 내에 Y349C 및 T366W 돌연변이를 포함하고 상기 2개의 CH3 도메인들 중 나머지 하나 내에 S354C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 포함하고, 추가로 "놉스 쇄"의 CH3 도메인 내에 R409D 및 K370E 돌연변이를 포함하고 "홀스 쇄"의 CH3 도메인 내에 D399K 및 E357K 돌연변이를 포함한다.

[0103] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 (실시예 6에 기재된 분석에서 측정된) 하기 성질들 중 하나 이상의 성질을 갖는 것을 특징으로 한다:

[0104] - (마우스 FcRn을 결여하되 인간 FcRn에 대한 반접합성(hemizygous) 형질전환체인 마우스에서 유리체내 적용으로부터 96시간 후) iii)에 기재된 돌연변이를 갖지 않는 상응하는 이중특이적 항체에 의해 더 낮은 혈청 농도를 보이고;

[0105] - (마우스 FcRn을 결여하되 인간 FcRn에 대한 반접합성 형질전환체인 마우스에서 우측 눈에의 유리체내 적용으로부터 96시간 후) iii)에 기재된 돌연변이를 갖지 않는 상응하는 이중특이적 항체에 의해 전체 우측 눈 용해물에서 유사한 (0.8배 내지 1.2배) 농도를 보인다.

[0106] 한 실시양태에서, 이중특이적 2가 항체는 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하고, 이때

[0107] i) 상기 제1 항원 결합 부위가 서열번호 7을 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 포함하고 서열번호 8을 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 포함하고;

[0108] ii) 상기 제2 항원 결합 부위가 서열번호 15를 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 포함하고 서열번호 16을 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 포함하고;

[0109] iii) 이중특이적 항체가 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 포함하는 (인간으로부터 유래된) IgG1 또는 IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역을 포함하고,

[0110] (실시예 6에 기재된 분석에서 측정된) 하기 성질들 중 하나 이상의 성질을 갖는 것을 특징으로 한다:

[0111] - (마우스 FcRn을 결여하되 인간 FcRn에 대한 반접합성 형질전환체인 마우스에서 유리체내 적용으로부터 96시간

후) iii)에 기재된 돌연변이를 갖지 않는 상응하는 이중특이적 항체에 비해 더 낮은 혈청 농도를 보이고;

[0112] - (마우스 FcRn을 결여하되 인간 FcRn에 대한 반접합성 형질전환체인 마우스에서 우측 눈에의 유리체내 적용으로부터 96시간 후) iii)에 기재된 돌연변이를 갖지 않는 상응하는 이중특이적 항체에 비해 전체 우측 눈 용해물에서 유사한 (0.8배 내지 1.2배) 농도를 보인다.

[0113] 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하고, 이때

[0114] i) 상기 제1 항원 결합 부위가 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 잔기 치환을 갖는 서열번호 7을 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 포함하고 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 잔기 치환을 갖는 서열번호 8을 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 포함하고;

[0115] ii) 상기 제2 항원 결합 부위가 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 잔기 치환을 갖는 서열번호 15를 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 포함하고 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 잔기 치환을 갖는 서열번호 16을 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 포함하고;

[0116] iii) 상기 이중특이적 항체가 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 포함하는 (인간으로부터 유래된) IgG1 또는 IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역을 포함하고,

[0117] (실시예 6에 기재된 분석에서 측정된) 하기 성질들 중 하나 이상의 성질을 갖는 것을 특징으로 한다:

[0118] - (마우스 FcRn을 결여하되 인간 FcRn에 대한 반접합성 형질전환체인 마우스에서 유리체내 적용으로부터 96시간 후) iii)에 기재된 돌연변이를 갖지 않는 상응하는 이중특이적 항체에 비해 더 낮은 혈청 농도를 보이고;

[0119] - (마우스 FcRn을 결여하되 인간 FcRn에 대한 반접합성 형질전환체인 마우스에서 우측 눈에의 유리체내 적용으로부터 96시간 후) iii)에 기재된 돌연변이를 갖지 않는 상응하는 이중특이적 항체에 비해 전체 우측 눈 용해물에서 유사한 (0.8배 내지 1.2배) 농도를 보인다.

[0120] 본원에서 사용된 "항체"는 항원 결합 부위를 포함하는 결합 단백질을 지칭한다. 본원에서 사용된 용어 "결합 부위" 또는 "항원 결합 부위"는 리간드가 실제로 결합하는 항체 분자의 영역(들)을 의미한다. 용어 "항원 결합 부위"는 항체 중쇄 가변 도메인(VH) 및 항체 경쇄 가변 도메인(VL)(VH/VL의 쌍)을 포함한다.

[0121] 항체 특이성은 항원의 특정 에피토프에 대한 항체의 선별적 인식을 지칭한다. 천연 항체는 예를 들면, 단일특이적 항체이다.

[0122] 본 발명에 따른 "이중특이적 항체"는 2종의 상이한 항원 결합 특이성을 갖는 항체이다. 본 발명의 항체는 2종의 상이한 항원, 즉 제1 항원으로서 VEGF 및 제2 항원으로서 ANG-2에 대해 특이적이다.

[0123] 본원에서 사용된 용어 "단일특이적" 항체는 동일한 항원의 동일한 에피토프에 각각 결합하는 하나 이상의 결합 부위를 갖는 항체를 의미한다.

[0124] 본원에서 사용된 용어 "가(valent)"는 특정된 수의 결합 부위가 항체 분자에 존재한다는 것을 의미한다. 따라서, 용어 "2가", "4가" 및 "6가"는 각각 2개의 결합 부위, 4개의 결합 부위 및 6개의 결합 부위가 항체 분자에 존재한다는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 바람직하게는 "2가" 항체이다.

[0125] 본원에서 사용된 용어 "VEGF"는 문현(Leung, D.W., et al., Science 246 (1989) 1306-9), 문현(Houck et al., Mol. Endocrin. 5 (1991) 1806-1814), 문현(Keck, P.J., et al., Science 246 (1989) 1309-12) 및 문현(Connolly, D.T., et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 20017-24)에 기재된 바와 같이 인간 혈관 내피 성장인자(VEGF/VEGF-A), 165개 아미노산 인간 혈관 내피세포 성장인자(인간 VEGF165의 전구체 서열의 아미노산 27부터 191까지: 서열번호 17; 아미노산 1 내지 26은 신호 펩티드를 나타냄), 및 관련된 121, 189 및 206 혈관 내피세포 성장인자 동형체; 및 이를 성장 인자들의 천연 대립형질 형태 및 프로세싱된 형태를 지칭한다. VEGF는 종양 및 안내 장애와 관련된 정상적인 및 비정상적인 혈관신생 및 신생혈관형성의 조절에 관여한다(Ferrara, N., et al., Endocr. Rev. 18 (1997) 4-25; Berkman, R.A., et al., J. Clin. Invest. 91 (1993) 153-159; Brown, L.F., et al., Human Pathol. 26 (1995) 86-91; Brown, L.F., et al., Cancer Res. 53 (1993) 4727-4735; Mattern, J., et al., Brit. J. Cancer. 73 (1996) 931-934; and Dvorak, H.F., et al., Am. J. Pathol. 146 (1995) 1029-1039). VEGF는 여러 공급원으로부터 단리되어 있고 여러 동형체를 포함하는 동종이량체성 당단백질이다. VEGF는 내피세포에 대한 고도로 특이적인 유사분열촉진 활성을 보인다.

- [0126] 본원에서 사용될 때 용어 "ANG-2"는 예를 들면, 문헌(Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60) 및 문헌(Cheung, A.H., et al., Genomics 48 (1998) 389-91)에 기재되어 있는 인간 안지오포이에틴-2(ANG-2)(대안적으로 ANGPT2 또는 ANG2로 약칭됨)(서열번호 18)를 지칭한다. 안지오포이에틴-1(서열번호 19) 및 안지오포이에틴-2는 혈관 내피 내에서 선택적으로 발현되는 티로신 키나제의 패밀리인 Tie에 대한 리간드로서 발견되었다(Yancopoulos, G.D., et al., Nature 407 (2000) 242-48). 현재 안지오포이에틴 패밀리의 4개 명확한 구성원들이 존재한다. 안지오포이에틴-3 및 안지오포이에틴-4(Ang-3 및 Ang-4)는 마우스 및 인간에서 동일한 유전자 좌위의 널리 분기된 대응물을 대표할 수 있다(Kim, I., et al., FEBS Let., 443 (1999) 353-56; Kim, I., et al., J Biol Chem 274 (1999) 26523-28). ANG-1 및 ANG-2는 처음에 조직 배양 실험에서 각각 작용제 및 길항제로서 확인되었다(ANG-1에 대해서는 문헌(Davis, S., et al., Cell 87 (1996) 1161-69) 참조; 및 ANG-2에 대해서는 문헌(Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60) 참조). 모든 공지되어 있는 안지오포이에틴들이 주로 Tie2(서열번호 20)에 결합하고, ANG-1 및 ANG-2 둘다가 3 nM(Kd)의 친화성으로 Tie2에 결합한다(Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60).
- [0127] 본 발명의 이중특이적 항체의 항원 결합 부위는 상이한 정도로 항원에 대한 결합 부위의 친화성에 기여하는 6개의 상보성 결정 영역들(CDR)을 함유한다. 3개의 중쇄 가변 도메인 CDR(CDRH1, CDRH2 및 CDRH3) 및 3개의 경쇄 가변 도메인 CDR(CDRL1, CDRL2 및 CDRL3)이 존재한다. CDR 영역들 및 골격 영역들(FR)의 정도는 상기 영역들이 서열들 사이의 가변성에 따라 정의되어 있는 아미노산 서열의 편집된 데이터베이스와의 비교에 의해 결정된다.
- [0128] 본 발명의 항체는 하나 이상의 면역글로불린 클래스의 인간 유래의 면역글로불린 불변 영역을 포함하고, 이때 이러한 면역글로불린 클래스는 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE 클래스, 및 IgG 및 IgA의 경우 이들의 서브클래스, 특히 IgG1 및 IgG4를 포함한다.
- [0129] 본원에서 사용된 용어 "단일클론 항체" 또는 "단일클론 항체 조성물"은 단일 아미노산 조성물의 항체 분자의 제제를 지칭한다.
- [0130] 용어 "키메라 항체"는 통상적으로 재조합 DNA 기법에 의해 제조된, 한 공급원 또는 종으로부터 유래된 가변 도메인, 즉 결합 영역 및 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래된 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 항체를 지칭한다. 뮤린 가변 도메인 및 인간 불변 영역을 포함하는 키메라 항체가 바람직하다. 본 발명에 의해 포괄되는 "키메라 항체"의 다른 바람직한 형태는 특히, C1q 결합 및/또는 Fc 수용체(FcR) 결합과 관련하여 본 발명에 따른 성질을 발생시키도록 불변 영역이 원래의 항체의 불변 영역으로부터 변경되어 있거나 변화되어 있는 키메라 항체이다. 이러한 키메라 항체는 "클래스-전환된 항체"로서도 지칭된다. 키메라 항체는 면역글로불린 가변 영역을 암호화하는 DNA 분절 및 면역글로불린 불변 영역을 암호화하는 DNA 분절을 포함하는 발현된 면역글로불린 유전자의 생성물이다. 키메라 항체의 제조 방법은 당분야에서 잘 공지되어 있는 통상적인 재조합 DNA 및 유전자 형질감염 기법을 포함한다. 예를 들면, 문헌(Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855), 미국 특허 제5,202,238호 및 미국 특허 제5,204,244호를 참조한다.
- [0131] 용어 "인간화된 항체"는 골격 또는 "상보성 결정 영역"(CDR)이 모 면역글로불린의 CDR에 비해 상이한 특이성을 갖는 면역글로불린의 CDR을 포함하도록 변경되어 있는 항체를 지칭한다. 바람직한 실시양태에서, "인간화된 항체"를 제조하기 위해 뮤린 CDR을 인간 항체의 골격 영역 내로 이식한다. 예를 들면, 문헌(Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327) 및 문헌(Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270)을 참조한다. 특히 바람직한 CDR은 키메라 항체에 대해 전술된 바와 같이 항원을 인식하는 서열을 나타내는 CDR에 상응한다. 본 발명에 의해 포괄되는 "인간화된 항체"의 다른 형태는 특히, C1q 결합 및/또는 Fc 수용체(FcR) 결합과 관련하여 본 발명에 따른 성질을 발생시키도록 불변 영역이 원래의 항체의 불변 영역으로부터 추가로 변경되어 있거나 변화되어 있는 인간화된 항체이다.
- [0132] 본원에서 사용된 용어 "인간 항체"는 인간 생식세포주 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하기 위한 것이다. 인간 항체는 최신 기술에서 잘 공지되어 있다(van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). 인간 항체는 면역화 시 내생성 면역글로불린 제조의 부재 하에서 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생성할 수 있거나 인간 항체를 선별할 수 있는 형질전환 동물(예를 들면, 마우스)에서 생성될 수도 있다. 이러한 생식세포주 돌연변이체 마우스 내로의 인간 생식세포주 면역글로불린 유전자 어레이의 전달은 항원 챌린지 시 인간 항체의 생성을 일으킬 것이다(예를 들면, 문헌(Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555), 문헌(Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258), 및 문헌(Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40) 참조). 인간 항체는 과자 디스플레이 라이브러리에서도 생성될 수 있다(Hoogenboom, H.R., and Winter, G.J. Mol. Biol.

227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). 문현(Cole, et al.) 및 문현(Boerner, et al.)의 기법들도 인간 단일클론 항체의 제조를 위해 이용될 수 있다(Cole, A., et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Liss, A.L., p77 (1985); and Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). 본 발명에 따른 키메라 항체 및 인간화된 항체에 대해 이미 언급된 바와 같이, 본원에서 사용된 용어 "인간 항체"는 예를 들면, "클래스 전환", 즉 Fc 부분의 변화 또는 돌연변이(예를 들면, IgG1로부터 IgG4로의 돌연변이 및/또는 IgG1/IgG4 돌연변이)에 의해, 특히, C1q 결합 및/또는 FcR 결합과 관련하여 본 발명에 따른 성질을 발생시키도록 불변 영역에서 변경되어 있는 이러한 항체도 포함한다.

[0133] 본원에서 사용된 용어 "재조합 항체"는 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 단리된 모든 인간 항체들, 예컨대, 숙주 세포, 예컨대, NS0 또는 CHO 세포로부터, 또는 인간 면역글로불린 유전자에 대한 형질전환 동물(예를 들면, 마우스)로부터 단리된 항체, 또는 숙주 세포 내로 형질감염된 재조합 발현 벡터의 사용을 통해 발현된 항체를 포함하기 위한 것이다. 이러한 재조합 항체는 재배열된 형태로 가변 영역 및 불변 영역을 갖는다. 본 발명에 따른 재조합 항체는 생체내 체세포 과다돌연변이를 겪는다. 따라서, 재조합 항체의 VH 및 VL 영역들의 아미노산 서열들은 인간 생식세포주 VH 및 VL 서열들로부터 유래되어 이들과 관련되어 있지만 생체내에서 인간 항체 생식세포주 레퍼토리 내에 천연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0134] 본원에서 사용된 용어 "가변 영역"(경쇄의 가변 도메인(VL) 및 중쇄의 가변 도메인(VH))은 항체와 항원의 결합에 직접적으로 관여하는 경쇄와 중쇄로 구성된 쌍 각각을 의미한다. 가변 인간 경쇄 및 중쇄의 도메인은 동일한 일반 구조를 갖고, 각각의 도메인은 3개의 "초가변 영역"(또는 상보성 결정 영역, CDR)에 의해 연결된, 널리 보존되어 있는 서열을 갖는 4개의 골격 영역(FR)을 포함한다. 골격 영역은 β -시트 입체구조를 채택하고, CDR은 β -시트 구조를 연결하는 루프를 형성할 수 있다. 각각의 쇄에서 CDR은 골격 영역에 의해 그들의 3차원적 구조로 유지되고 다른 쇄의 CDR과 함께 항원 결합 부위를 형성한다. 항체 중쇄 및 경쇄 CDR3 영역은 본 발명에 따른 항체의 결합 특이성/친화성에 있어서 특히 중요한 역할을 수행하므로 본 발명의 추가 목적을 제공한다.

[0135] 용어 "초가변 영역" 또는 "항체의 항원 결합 부분"은 본원에서 사용될 때 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"의 아미노산 잔기를 포함한다. "골격" 또는 "FR" 영역은 본원에서 정의된 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 영역이다. 따라서, 항체의 경쇄 및 중쇄는 N-말단부터 C-말단까지 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 각각의 쇄 상의 CDR은 이러한 골격 아미노산에 의해 분리되어 있다. 특히, 중쇄의 CDR3은 항원 결합에 가장 많이 기여하는 영역이다. CDR 영역 및 FR 영역은 문현(Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))의 표준 정의에 따라 결정된다.

[0136] 본원에서 사용된 용어 "결합" 또는 "특이적 결합"은 정제된 야생형 항원을 사용하는 시험관내 분석, 바람직하게는 플라스몬 공명 분석(비아코어(BIAcore), 지이 헬쓰케어(GE Healthcare, 스웨덴 업살라 소재))에서 항체와 항원(인간 VEGF 또는 인간 ANG-2)의 에피토프의 결합을 지칭한다. 결합의 친화성은 용어 k_a (항체/항원 복합체로부터 항체의 결합에 대한 속도 상수), k_D (해리 상수) 및 $K_D(k_D/k_a)$ 에 의해 정의된다. 한 실시양태에서, 결합 또는 특이적 결합은 10^{-8} 몰/ℓ 이하, 한 실시양태에서 10^{-9} 내지 10^{-13} 몰/ℓ의 결합 친화성(K_D)을 의미한다.

[0137] 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 폴리펩티드 결정인자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피토프 결정인자는 문자의 화학 활성 표면 기, 예컨대, 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 또는 설포닐을 포함하고, 일부 실시양태에서 특정 3차원적 구조 특성 및/또는 특정 전하 특성을 가질 수 있다. 에피토프는 항체에 의해 결합되는 항원의 영역이다.

[0138] 일부 실시양태에서, 항체는 단백질 및/또는 거대분자의 복합체 혼합물에서 그의 표적 항원을 우선적으로 인식 할 때 항원에 특이적으로 결합한다고 주장된다.

[0139] 용어 "전장 항체"는 2개의 "전장 항체 중쇄" 및 2개의 "전장 항체 경쇄"로 구성된 항체를 의미한다. "전장 항체 중쇄"는 N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 중쇄 가변 도메인(VH), 항체 불변 중쇄 도메인 1(CH1), 항체 힌지 영역(HR), 항체 중쇄 불변 도메인 2(CH2) 및 항체 중쇄 불변 도메인 3(CH3)(VH-CH1-HR-CH2-CH3으로서 약칭됨); 및 임의적으로 서브클래스 IgE의 항체의 경우 항체 중쇄 불변 도메인 4(CH4)로 구성된 폴리펩티드이다. 바람직 하게는, "전장 항체 중쇄"는 N-말단에서 C-말단 방향으로 VH, CH1, HR, CH2 및 CH3으로 구성된 폴리펩티드이다. "전장 항체 경쇄"는 N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 경쇄 가변 도메인(VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인(CL)(VL-CL로서 약칭됨)으로 구성된 폴리펩티드이다. 항체 경쇄 불변 도메인(CL)은 κ(카파) 또는 λ(람다)일 수 있다.

2개의 전장 항체 쇄들은 CL 도메인과 CH1 도메인 사이 및 전장 항체 중쇄들의 헌지 영역들 사이의 폴리펩티드간 이황화 결합을 통해 서로 연결된다. 전형적인 전장 항체의 예는 천연 항체, 예컨대, IgG(예를 들면, IgG1 및 IgG2), IgM, IgA, IgD 및 IgE이다. 본 발명에 따른 전장 항체는 단일 종, 예를 들면, 인간으로부터 유래될 수 있거나, 키메라화된 또는 인간화된 항체일 수 있다. 본 발명에 따른 전장 항체는 둘다 동일한 항원에 특이적으로 결합하는 한 쌍의 VH 및 VL에 의해 각각 형성된 2개의 항원 결합 부위를 포함한다. 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단은 상기 중쇄 또는 경쇄의 C-말단에 있는 마지막 아미노산을 의미한다. 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단은 상기 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에 있는 마지막 아미노산을 의미한다.

[0140] 본 발명에서 사용된 용어 "펩티드 연결기"는 바람직하게는 합성 유래의 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 의미한다. 본 발명에 따른 이들 펩티드는 펩티드 연결기를 통해 경쇄의 C-말단을 (제2 항원에 특이적으로 결합하는) 제2 전장 항체의 중쇄의 N-말단에 연결하는 데에 사용된다. 제2 전장 항체 중쇄 및 경쇄 내의 펩티드 연결기는 30개 이상의 아미노산 길이, 바람직하게는 32개 내지 50개 아미노산 길이를 갖는 아미노산 서열을 갖는 펩티드이다. 한 실시양태에서, 펩티드 연결기는 32개 내지 40개 아미노산 길이를 갖는 아미노산 서열을 갖는 펩티드이다. 한 실시양태에서, 상기 연결기는 $(G_xS)_n$ 이고, 이때 G는 글리신이고; S는 세린이고; x는 3이고 n은 8, 9 또는 10이고 m은 0, 1, 2 또는 3이거나; x는 4이고 n은 6, 7 또는 8이고 m은 0, 1, 2 또는 3이고, 바람직하게는 x는 4이고 n은 6 또는 7이고 m은 0, 1, 2 또는 3이고, 보다 바람직하게는 x는 4이고 n은 7이고 m은 2이다. 한 실시양태에서, 상기 연결기는 $(G_4S)_6G_2$ 이다.

[0141] 본원에서 사용된 용어 "불변 영역"은 가변 영역을 제외한 항체의 도메인들 전부를 의미한다. 불변 영역은 항원의 결합에 직접적으로 관여하지 않지만 다양한 이펙터 기능을 나타낸다. 항체는 그의 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 따라 클래스 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 분류되고, 이를 중 몇몇은 서브클래스, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 더 분류될 수 있다. 항체의 상이한 클래스들에 상응하는 중쇄 불변 영역은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 지칭된다. 모든 5종의 항체 클래스들에서 발견될 수 있는 경쇄 불변 영역은 κ (카파) 및 λ (람다)로서 지칭된다.

[0142] 본원에서 사용된 용어 "인간으로부터 유래된 불변 영역" 또는 "인간 불변 영역"은 서브클래스 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 인간 항체의 불변 중쇄 영역, 및/또는 불변 경쇄 카파 또는 람다 영역을 의미한다. 이러한 불변 영역은 최신 기술에서 잘 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌(Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))에 기재되어 있다(예를 들면, 문헌(Johnson, G. and Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218) 및 문헌(Kabat, E.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2785-2788) 또한 참조). 위치 및 돌연변이의 넘버링에 대해 문헌(Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))에 따른 EU 넘버링 시스템(EU 지수)이 본원에서 사용되고 "카바트의 EU 지수에 따른 넘버링"으로서 지칭된다.

[0143] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 인간 IgG1 서브클래스의 불변 영역(인간 IgG1 서브클래스로부터 유래된 불변 영역)을 갖는다.

[0144] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 인간 IgG4 서브클래스의 불변 영역(인간 IgG4 서브클래스로부터 유래된 불변 영역)을 갖는다.

[0145] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 돌연변이 L234A(Leu235Ala), L235A(Leu234Ala) 및 P329G(Pro329Gly)를 갖는 인간 IgG1 서브클래스의 항체이다. 이러한 항체는 감소된 FcR 결합을 갖는다(특히, 이 항체는 FcR γ I, FcR γ II 및 FcR γ III과의 결합을 더 이상 보이지 않는다). 이것은 잠재적인 부작용, 예컨대, 혈전증을 감소시키는 데에 특히 유용하다(Meyer, T., et al., J. Thromb. Haemost. 7 (2009) 171-81). 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 돌연변이 S228P(Ser228Pro), L235E(Leu235Glu) 및 P329G(Pro329Gly)를 갖는 인간 IgG4 서브클래스의 항체이다. 이러한 항체는 상기 표시된 바와 같이 감소된 FcR 결합을 보인다. 이미 기재된 Pro329Ala 돌연변이가 Fc γ RIIIa 샌드위치 상호작용 중 3분의 2만을 제거하는 반면, 본 발명에 따른 항체 내의 Pro329Gly는 Fc 부분과 Fc γ RIII의 결합을 전체적으로 부여한다. 이것은 Fc γ RIII과의 결합이 암 질환의 치료에 도움이 될 수 있으나 다른 혈관 또는 면역학적 질환의 항체 기초 치료에서 심각한 부작용을 야기할 수 있는 세포 사멸을 초래하는 ADCC(항체 의존적 세포 독성)에 관여하기 때문에 특히 유용하다. 따라서, 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G를 갖는 IgG1 서브클래스, 및 돌연변이 S228P, L235E 및 P329G를 갖는 IgG4 서브클래스의 본 발명에 따른 항체는 둘다 FcR γ I, FcR γ II 및 FcR γ III과의 결합을 더 이상

보이지 않기 때문에 특히 유용하다.

[0146] 본원에서 사용된 용어 "돌연변이 AAA를 갖는"은 IgG1 또는 IgG4의 불변 중쇄 영역 내의 돌연변이 I253A(Ile253A1a), H310A(His310A1a) 및 H435A(His435A1a)를 지칭하고, 이때 넘버링은 카바트의 EU 지수를 따른다.

[0147] 본원에서 사용된 용어 "돌연변이 P329G LALA를 갖는"은 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역 내의 돌연변이 L234A(Leu235A1a), L235A(Leu234A1a) 및 P329G(Pro329Gly)를 지칭하고, 이때 넘버링은 카바트의 EU 지수를 따른다. 본원에서 사용된 용어 "돌연변이 SPLE를 갖는"은 IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역 내의 S228P(Ser228Pro) 및 L235E(Leu235Glu)를 지칭하고, 이때 넘버링은 카바트의 EU 지수를 따른다. 본원에서 사용된 용어 "돌연변이 SPLE 및 P239G를 갖는"은 IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역 내의 S228P(Ser228Pro), L235E(Leu235Glu) 및 P329G(Pro329Gly)를 지칭하고, 이때 넘버링은 카바트의 EU 지수를 따른다.

[0148] 본 발명에 따른 항체는 재조합 수단에 의해 생성된다. 따라서, 본 발명의 한 양태는 본 발명에 따른 항체를 암호화하는 핵산이고, 추가 양태는 본 발명에 따른 항체를 암호화하는 상기 핵산을 포함하는 세포이다. 재조합 제조 방법은 최신 기술에서 널리 공지되어 있고 원핵세포 및 진핵세포에서 단백질을 발현하는 단계, 후속적으로 상기 항체를 단리하는 단계 및 통상적으로 약학적으로 허용 가능한 순도까지 정제하는 단계를 포함한다. 숙주 세포에서 상기 언급된 항체를 발현하기 위해, 각각의 변경된 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 핵산을 표준 방법으로 발현 벡터 내로 삽입한다. 적절한 원핵 또는 진핵 숙주 세포, 예컨대, CHO 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, HEK293 세포, COS 세포, PER.C6 세포, 효모 또는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 세포에서 발현을 수행하고, 상기 항체를 세포(용해 후 상청액 또는 세포)로부터 회수한다. 일반적인 항체 재조합 제조 방법은 최신 기술에서 잘 공지되어 있고, 예를 들면, 평론 논문들(Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-160; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880)에 기재되어 있다.

[0149] 따라서, 본 발명의 한 실시양태는 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 제조 방법으로서, 하기 단계들을 포함하는 방법이다:

a) 상기 항체를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 숙주 세포를 형질전환시키는 단계;

b) 상기 항체 분자의 합성을 허용하는 조건 하에서 상기 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

c) 상기 배양물로부터 상기 항체 분자를 회수하는 단계.

[0153] 한 실시양태에서, c)의 회수 단계는 (예를 들면, 사용된 본 발명에 따른 이중특이적 항체 내의 카파 또는 람다 경쇄에 따라 카파 또는 람다 불변 경쇄에 대해 특이적인) 경쇄 불변 도메인 특이적 포획 시약의 사용을 포함한다. 한 실시양태에서, 이 경쇄 특이적 포획 시약은 결합 및 용출 방식으로 사용된다. 이러한 경쇄 불변 도메인 특이적 포획 시약의 예는 예를 들면, 대규모에서 높은 유속 및 낮은 배암을 허용하는 매우 단단한 아가로스 기제 매트릭스에 기초한, 지이 헬쓰캐어/BAC의 카파셀렉트(KappaSelect)™ 및 람다Fab셀렉트(LambdaFabSelect)™이다. 이들은 각각 카파 또는 람다 경쇄의 불변 영역에 결합하는 리간드를 특징으로 한다(즉, 경쇄의 불변 영역을 결여하는 단편은 결합하지 않을 것이다; 도 1). 따라서, 이들 둘다는 경쇄의 불변 영역을 함유하는 다른 표적 분자, 예를 들면, IgG, IgA 및 IgM에 결합할 수 있다. 리간드는 표적 분자와의 결합에 용이하게 이용될 수 있도록 긴 친수성 스페이서 아암(arm)을 통해 매트릭스에 부착된다. 이들은 인간 Ig 카파 또는 람다에 대해 스크리닝되는 단일 쇄 항체 단편에 기초한다.

[0154] 이중특이적 항체를 통상적인 면역글로불린 정제 절차, 예컨대, 단백질 A-세파로스, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피로 배양 배지로부터 적절하게 분리한다. 단일클론 항체를 암호화하는 DNA 및 RNA를 통상적인 절차를 이용하여 용이하게 단리하고 서열결정한다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA 및 RNA의 공급원으로서 작용할 수 있다. 일단 단리되면, DNA를 발현 벡터 내로 삽입할 수 있고, 그 후 상기 발현 벡터를, 면역글로불린 단백질을 달리 생성하지 않는 숙주 세포, 예컨대, HEK293 세포, CHO 세포 또는 골수종 세포 내로 형질감염시켜 숙주 세포에서 재조합 단일클론 항체의 합성을 수득한다.

[0155] 이중특이적 항체의 아미노산 서열 변이체(또는 돌연변이체)는 적절한 뉴클레오티드 변화를 항체 DNA 내로 도입함으로써 또는 뉴클레오티드 합성에 의해 제조된다. 그러나, 이러한 변경은 매우 한정된 범위 내에서만 수행될 수 있다. 예를 들면, 변경은 상기 언급된 항체 특성, 예컨대, IgG 서브클래스 및 항원 결합을 변경시키지 않으나, 재조합 생성의 수율 또는 단백질 안정성을 개선할 수 있거나 정제를 용이하게 할 수 있다.

- [0156] 본원에서 사용된 용어 "숙주 세포"는 본 발명에 따른 항체를 발생시키도록 조작될 수 있는 임의의 종류의 세포 시스템을 의미한다. 한 실시양태에서, HEK293 세포 및 CHO 세포는 숙주 세포로서 사용된다. 본원에서 사용된 표현 "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"은 상호교환적으로 사용되고, 모든 이러한 표현들은 자손을 포함한다. 따라서, 용어 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"는 일차 대상 세포 및 전달의 수와 관계없이 이로부터 유래된 배양물을 포함한다. 모든 자손은 의도적 또는 우발적 돌연변이로 인해 DNA 함량 면에서 정확히 동일하지 않을 수 있다는 것도 이해된다. 최초로 형질전환된 세포에서 스크리닝된 기능 또는 생물학적 활성과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 변이체 자손이 포함된다.
- [0157] NSO 세포에서의 발현은 예를 들면, 문현(Barnes, L.M., et al., Cytotechnology 32 (2000) 109-123) 및 문현(Barnes, L.M., et al., Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270)에 기재되어 있다. 일시적 발현은 예를 들면, 문현(Durocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9)에 기재되어 있다. 가변 도메인의 클로닝은 문현(Orlandi, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837), 문현(Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289) 및 문현(Norderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87)에 기재되어 있다. 바람직한 일시적 발현 시스템(HEK293)은 문현(Schlaeger, E.-J., and Christensen, K., in Cytotechnology 30 (1999) 71-83) 및 문현(Schlaeger, E.-J., in J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199)에 기재되어 있다.
- [0158] 원핵세포에 적합한 조절 서열은 예를 들면, 프로모터, 임의적으로 오퍼레이터 서열 및 리보좀 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 인핸서 및 폴리아데닐화 신호를 이용하는 것으로 공지되어 있다.
- [0159] 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓여 있을 때 "작동가능하게 연결된"다. 예를 들면, 전구서열 또는 분비 리더(leader)에 대한 DNA는 폴리펩티드의 분비에 참여하는 전구단백질로서 발현되는 경우 상기 폴리펩티드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되어 있거나; 프로모터 또는 인핸서는 암호화 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 상기 암호화 서열에 작동가능하게 연결되어 있거나; 리보좀 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 위치되어 있는 경우 암호화 서열에 작동가능하게 연결되어 있다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결되어 있는 DNA 서열들이 인접하여 존재하고 분비 리더의 경우 인접하여 판독 프레임으로 존재한다는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접하여 존재할 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서의 라이케이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오티드 어답터 또는 연결기가 통상적인 관행에 따라 사용된다.
- [0160] 세포 성분 또는 다른 오염물질, 예를 들면, 다른 세포 핵산 또는 단백질을 제거하기 위해 알칼리성/SDS 처리, CsCl 밴딩, 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동 및 당분야에서 잘 공지되어 있는 기타 기법을 포함하는 표준 기법으로 항체의 정제를 수행한다. 문현(Ausubel, F., et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987))을 참조한다. 상이한 방법들, 예컨대, 미생물 단백질을 사용하는 친화성 크로마토그래피(예를 들면, 단백질 A 또는 단백질 G 친화성 크로마토그래피), 이온 교환 크로마토그래피(예를 들면, 양이온 교환(카복시메틸 수지), 음이온 교환(아미노에틸 수지) 및 혼합 방식 교환), (예를 들면, β -미캡토에탄올 또는 다른 SH 리간드를 사용하는) 티오친화성 흡착, (예를 들면, 폐닐-세파로스, 아자-아레노친화성 수지 또는 m-아미노페닐보론산을 사용하는) 소수성 상호작용 또는 방향족 흡착 크로마토그래피, (예를 들면, Ni(II) 및 Cu(II) 친화성 물질을 사용하는) 금속 킬레이트 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 및 전기영동 방법(예컨대, 겔 전기영동, 모세관 전기영동)이 잘 확립되어 있고 단백질 정제를 위해 널리 이용된다(Vijayalakshmi, M., A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).
- [0161] 본 발명에 따른 이중특이적 2가 항체는 VEGF 및 ANG-2 표적화 치료를 필요로 하는 인간 환자에 대한 이점을 보인다.
- [0162] 본 발명에 따른, 인간 VEGF 및 인간 ANG-2에 대한 이중특이적 2가 항체는 귀중한 효능/안전성 프로파일을 가질 수 있고, 항-VEGF 및 항-ANG-2 치료를 필요로 하는 환자에게 이점을 제공할 수 있다.
- [0163] 본 발명의 한 양태는 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약학 조성물이다. 본 발명의 또 다른 양태는 약학 조성물의 제조를 위한 본 발명에 따른 항체의 용도이다. 본 발명의 추가 양태는 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약학 조성물의 제조 방법이다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 약학 담체와 함께 제제화된, 본 발명에 따른 항체를 함유하는 조성물, 예를 들면, 약학 조성물을 제공한다.
- [0164] 본원에서 사용된 "약학 담체"는 생리학적으로 상용가능한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균제, 항진

균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, 담체는 국소 경로를 통해 대상체에게 투여되기에 적합하다. 예를 들면, 항체 또는 이의 조성물은 안내 적용, 예를 들면, 안내 주사, 예컨대, 유리체내 주사에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 이것은 당분야에서 공지되어 있는 표준 절차에 따라 수행될 수 있다. 예를 들면, 문헌(Ritter et al., J. Clin. Invest. 116 (2006) 3266-76), 문헌(Russelakis-Carneiro et al., Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25 (1999) 196-206) 및 문헌(Wray et al., Arch. Neurol. 33 (1976) 183-5)을 참조한다.

[0165] 본 발명의 조성물은 당분야에서 공지되어 있는 다양한 방법으로 투여될 수 있다. 당업자에 의해 인식될 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. 특정 투여 경로로 본 발명의 화합물을 투여하기 위해, 화합물을 그의 불활성화를 방지하는 물질로 코팅하거나 화합물을 그의 불활성화를 방지하는 물질과 함께 투여하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들면, 화합물은 적절한 담체, 예를 들면, 리포좀 또는 희석제에 포함되어 대상체에게 투여될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 희석제는 식염수 및 수성 완충제 용액을 포함한다. 약학 담체는 멸균 수성 용액 또는 분산액, 및 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 약학적 활성 물질을 위한 이러한 매질 또는 물질의 사용은 당분야에서 공지되어 있다.

[0166] 안내 적용 또는 국소 적용을 포함하나 이들로 한정되지 않는 많은 가능한 전달 방식이 이용될 수 있다. 한 실시양태에서, 적용은 안내 적용이고, 결막하 주사, 전방내 주사, 측두 윤부를 통한 전방 내로의 주사, 간질내 주사, 각막내 주사, 망막하 주사, 안구방수 주사, 테논낭하 주사 또는 지속된 전달 장치, 유리체내 주사(예를 들면, 전방, 중간 또는 후방 유리체 주사)를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 한 실시양태에서, 적용은 국소 적용이고, 각막으로 투여되는 점안액을 포함하나 이것으로 한정되지 않는다.

[0167] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체 또는 약학 조성물은 유리체내 적용, 예를 들면, 유리체내 주사를 통해 투여된다. 이것은 당분야에서 공지되어 있는 표준 절차에 따라 수행될 수 있다. 예를 들면, 문헌(Ritter et al., J. Clin. Invest. 116 (2006) 3266-76), 문헌(Russelakis-Carneiro et al., Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25 (1999) 196-206) 및 문헌(Wray et al., Arch. Neurol. 33 (1976) 183-5)을 참조한다.

[0168] 일부 실시양태에서, 본 발명의 치료 키트는 본원에 기재된 약학 조성물에 존재하는 이중특이적 항체의 1회 이상의 용량, 상기 약학 조성물의 유리체내 주사에 적합한 장치, 및 이 주사를 수행하기에 적합한 대상체 및 프로토콜을 상세히 기술하는 설명서를 함유할 수 있다. 이를 실시양태에서, 상기 조성물은 전형적으로 유리체내 주사를 통해 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 이것은 당분야에서 공지되어 있는 표준 절차에 따라 수행될 수 있다. 예를 들면, 문헌(Ritter et al., J. Clin. Invest. 116 (2006) 3266-76), 문헌(Russelakis-Carneiro et al., Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25 (1999) 196-206) 및 문헌(Wray et al., Arch. Neurol. 33 (1976) 183-5)을 참조한다.

[0169] 상기 조성물은 보조제, 예컨대, 보존제, 습윤화제, 유화제 및 분산제도 함유할 수 있다. 미생물이 존재의 방지는 상기 멸균 절차, 및 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 폐놀, 소르브산 등의 포함에 의해 보장될 수 있다. 등장제, 예컨대, 당, 염화나트륨 등을 조성물 내에 포함시키는 것도 바람직할 수 있다. 또한, 주사가능한 약학 제형의 연장된 흡수가 흡수를 지연시키는 물질, 예컨대, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 포함에 의해 달성될 수 있다.

[0170] 선택된 투여 경로와 관계없이 본 발명의 적합한 수화된 형태 및/또는 약학 조성물에서 사용될 수 있는 본 발명의 화합물은 당업자에게 공지되어 있는 통상적인 방법에 의해 약학적으로 허용가능한 제형으로 제제화된다.

[0171] 본 발명의 약학 조성물 중의 활성 성분의 실제 용량 수준은 환자에게 독성을 나타내지 않으면서 구체적인 환자, 조성물 및 투여 방식에 대한 원하는 치료 반응을 달성하기에 효과적인 활성 성분의 양을 수득하도록 변경될 수 있다. 선택된 용량 수준은 사용되는 본 발명의 구체적인 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 구체적인 화합물의 배출 속도, 치료의 지속시간, 사용되는 구체적인 조성물과 함께 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료되는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 과거 병력, 및 의학 분야에서 잘 공지되어 있는 다른 인자들을 포함하는 다양한 약동학적 인자들에 의해 좌우될 것이다.

[0172] 조성물은 조성물이 주사기에 의해 전달될 수 있는 정도까지 멸균성 및 유동성을 가져야 한다. 담체는 물 이외에 바람직하게는 등장성 완충 식염수 용액이다.

[0173] 적절한 유동성은 예를 들면, 코팅제, 예컨대, 레시틴의 사용, 분산액의 경우 요구된 입자 크기의 유지, 및 계면 활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우, 등장제, 예를 들면, 당, 다가알코올, 예컨대, 만니톨 또는 소르비톨, 및 염화나트륨을 조성물 내에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다.

- [0174] 조성물은 결막하 투여를 위한 활성 물질을 포함하는 안과 데포 제제를 포함할 수 있다. 안과 데포 제제는 본질적으로 순수한 활성 물질, 예를 들면, 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 미세입자를 포함한다. 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 포함하는 미세입자는 약학적으로 허용가능한 생체적합성 중합체 또는 지질 캡슐화제 내에 묻혀있을 수 있다. 상기 데포 제제는 연장된 기간에 걸쳐 모든 활성 물질들을 실질적으로 전부 방출시키도록 개조될 수 있다. 존재하는 경우 중합체 또는 지질 매트릭스는 모든 또는 실질적으로 모든 활성 물질의 방출 후 투여 부위로부터 수송되기 위해 충분히 분해되도록 개조될 수 있다. 상기 데포 제제는 약학적으로 허용가능한 중합체 및 용해된 또는 분산된 활성 물질을 포함하는 액체 제제일 수 있다. 주사 시, 상기 중합체는 예를 들면, 겔화 또는 침전에 의해 주사 부위에서 데포를 형성한다.
- [0175] 본 발명의 또 다른 양태는 안 혈관 질환의 치료에 사용되는 본 발명에 따른 이중특이적 항체이다.
- [0176] 본 발명의 한 실시양태는 안 혈관 질환의 치료에 사용되는 본 발명에 따른 이중특이적 항체이다.
- [0177] 본 발명의 또 다른 양태는 안 혈관 질환의 치료에 사용되는 상기 약학 조성물이다.
- [0178] 본 발명의 또 다른 양태는 안 혈관 질환의 치료용 약제의 제조를 위한 본 발명에 따른 항체의 용도이다.
- [0179] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명에 따른 항체를, 안 혈관 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써 안 혈관 질환을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법이다.
- [0180] 용어 "안 혈관 질환" 및 "혈관 눈 질환"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 안내 신생혈관 증후군, 예컨대, 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 황반 부종, 미숙아의 망막병증, 신생혈관 녹내장, 망막 정맥 폐쇄, 중심 망막 정맥 폐쇄, 황반 변성, 연령 관련 황반 변성, 색소성 망막염, 망막 혈관종 증식, 황반 모세혈관확장, 허혈성 망막병증, 홍채 신생혈관형성, 안내 신생혈관형성, 각막 신생혈관형성, 망막 신생혈관형성, 맥락막 신생혈관형성 및 망막 변성을 포함하나 이들로 한정되지 않는다(Garner, A., Vascular diseases, In: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., and Klintworth, G.K., (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp. 1625-1710). 본원에서 사용된 바와 같이, 안 혈관 장애는 눈 조직, 예컨대, 망막 또는 각막의 구조물 내로의 신생 혈관의 변경된 또는 비-조절된 증식 및 침습을 특징으로 하는 임의의 병리학적 상태를 지칭한다. 한 실시양태에서, 안 혈관 질환은 하기 질환들로 구성된 군으로부터 선택된다: 습성 연령 관련 황반 변성(습성 AMD), 건성 연령 관련 황반 변성(건성 AMD), 당뇨병성 황반 부종(DME), 낭모양 황반 부종(CME), 비-증식성 당뇨병성 망막병증(NPDR), 증식성 당뇨병성 망막병증(PDR), 낭모양 황반 부종, 혈관염(예를 들면, 중심 망막 정맥 폐쇄), 유두부종, 망막염, 결막염, 포도막염, 맥락막염, 다초점 맥락막염, 안 히스토플라스마증, 안검염, 건조한 눈(쇼그렌병) 및 다른 안과 질환(이때, 안 질환 또는 장애는 안 신생혈관형성, 혈관 누출 및/또는 망막 부종과 관련되어 있다). 따라서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 습성 AMD, 건성 AMD, CME, DME, NPDR, PDR, 안검염, 건조한 눈 및 포도막염, 바람직하게는 습성 AMD, 건성 AMD, 안검염 및 건조한 눈, 바람직하게는 CME, DME, NPDR 및 PDR, 바람직하게는 안검염 및 건조한 눈, 특히 습성 AMD 및 건성 AMD, 특히 습성 AMD의 예방 및 치료에 유용하다. 일부 실시양태에서, 안 질환은 습성 연령 관련 황반 변성(습성 AMD), 황반 부종, 망막 정맥 폐쇄, 미숙아의 망막병증 및 당뇨병성 망막병증으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0181] 각막 신생혈관형성과 관련된 다른 질환들은 표피 각막결막염, 비타민 A 결핍, 컨택트 렌즈 과다착용, 아토피성 각막염, 상윤부 각막염, 익상편 건성 각막염, 쇼그렌, 여드름장미증, 소수포증, 매독, 마이코박테리아 감염, 지질 변성, 화학적 화상, 세균성 궤양, 진균성 궤양, 단순포진 감염, 대상포진 감염, 원생동물 감염, 카포시 육종, 무렌 궤양, 테리엔 변연부 변성, 변연부 각질용해, 류마티스성 관절염, 전신 루푸스, 다발동맥염, 외상, 베게너 사르코이드증, 공막염, 스티븐 존슨병, 유사천포창 방사상 각막절개술, 및 각막 이식 거부를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0182] 망막/맥락막 신생혈관형성과 관련된 질환은 당뇨병성 망막병증, 황반 변성, 겹상세포빈혈, 사르코이드, 매독, 탄력섬유거짓황색종, 파게트병, 정맥 폐쇄, 동맥 폐쇄, 카로티드 폐쇄성 질환, 만성 포도막염/유리체염, 마이코박테리아 감염, 라임병, 전신흥반루푸스, 미숙아의 망막병증, 색소성 망막염, 망막 부종(황반 부종을 포함함), 일스병, 베체트병, 망막염 또는 맥락막염을 야기하는 감염, 추정된 안 히스토플라스마증, 베스트병, 근시, 시와, 스타르가르트병, 주변포도막염, 만성 망막 탈착, 과다점성 증후군, 톡소포자충증, 외상 및 레이저 후 합병증을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 다른 질환은 피부홍조(각도의 신생혈관형성)와 관련된 질환, 및 모든 형태의 증식성 유리체망막병증을 포함하는 섬유혈관 또는 섬유성 조직의 비정상적인 증식에 의해 야기된 질환을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0183] 미숙아의 망막병증(ROP)은 미숙아로 내어난 신생아에게 영향을 미치는 안 질환이다. 이것은 흉터형성 및 망막

탈착을 초래할 수 있는 망막 혈관의 비-조직화된 성장에 의해 야기되는 것으로 생각된다. ROP는 경미할 수 있고 자연발생적으로 해결될 수 있으나, 심각한 경우 시력상실로 이어질 수 있다. 따라서, 모든 미숙아들은 ROP에 대한 위험에 있고, 매우 낮은 출생 체중은 추가 위험 인자이다. 산소 독성 및 상대적인 저산소증 둘다가 ROP의 발생에 기여할 수 있다.

[0184] 황반 변성은 망막의 황반 영역으로서 공지되어 있는 눈의 내층의 중심이 얇아짐, 위축 및 일부 경우 출혈을 겪는, 주로 노인에서 발견되는 의학적 상태이다. 이것은 미세한 세부사항을 알아보거나, 관찰하거나 안면을 인식하는 능력의 결여를 수반하는 중심 시력의 상실을 초래할 수 있다. 미국 안과 학회에 따르면, 이것은 오늘날 미국에서 50세 이상의 연령을 갖는 개체들에 대한 중심 시력 상실(시각장애)의 주요 원인이다. 보다 젊은 개체들에게 영향을 미치는 일부 황반 퇴행위축이 종종 황반 변성으로서 지칭되지만, 상기 용어는 일반적으로 연령 관련 황반 변성(AMD 또는 ARMD)을 지칭한다.

[0185] 연령 관련 황반 변성은 망막 색소 상피와 기저 맥락막 사이에 드루젠(drusen)으로서 지칭되는 특징적인 황색 침착물이 황반(세밀한 중심 시력을 제공하는 망막의 중심 영역, 망막중심오목으로서도 지칭됨)에서 형성되는 것으로부터 시작된다. 이를 초기 변화(연령 관련 황반병증으로서 지칭됨)를 갖는 대다수의 사람들은 우수한 시력을 갖는다. 드루젠풀을 갖는 사람들은 진행된 AMD를 발전시킬 수 있다. 위험은 드루젠풀이 크고 많을 때 상당히 더 높고 황반 하의 착색된 세포층에서의 교란과 관련되어 있다. 크고 부드러운 드루젠풀은 상승된 콜레스테롤 침착물과 관련되어 있고 콜레스테롤 강하제 또는 레오(Rheo) 절차에 반응할 수 있다.

[0186] 심각한 시력 상실의 원인이 되는 진행된 AMD는 2종의 형태를 갖는다: 건성 및 습성. 진행된 AMD의 건성 형태인 중심 지도모양 위축은 눈의 중심 부분에서 광수용체(막대 및 원뿔)의 상실을 통해 시력 상실을 야기하는, 망막 아래의 망막 색소 상피층까지의 위축으로부터 발생된다. 이 상태에 대한 치료는 이용가능하지 않지만, 고용량의 항산화제, 루테인 및 제아잔틴과 함께 비타민 보충제가 건성 황반 변성의 진행을 늦추고 일부 환자들에서 시력을 개선한다는 것이 국립 안연구소 등에 의해 입증되었다.

[0187] 색소성 망막염(RP)은 일군의 유전적 눈 상태이다. RP에 대한 증상의 진행에서, 야맹증은 일반적으로 수년 또는 짧지어 수십년까지 터널 시력을 앞선다. RP를 갖는 많은 사람들이 그들의 40대 또는 50대까지 법적으로 맹인이 되지 않고 평생 동안 약간의 시력을 보유한다. 나머지 사람들은 RP로부터 완전히 맹인이 되고, 일부 경우 유년기만큼 빠른 시기에 완전히 맹인이 된다. RP의 진행은 각각의 경우 상이하다. RP는 망막의 광수용체(막대 및 원뿔) 및 망막 색소 상피(RPE)의 이상이 점진적인 시력 상실을 유발하는 일군의 유전 장애인 유전 망막 퇴행위축의 일종이다. 영향받은 개체는 먼저 결손 어둠 적응 또는 밤소경증(야맹증)을 경험한 후, 말초 시야(터널 시력으로서 공지되어 있음)의 감소 및 종종 질환의 경과에서 후기에 중심 시력의 상실을 경험한다.

[0188] 황반 부종은 유체 및 단백질 침착물이 망막의 황색 중심 영역인 눈의 황반 위에서 또는 아래에서 축적되어 상기 황반이 두꺼워지고 팽윤되게 할 때 발생한다. 황반이 안구의 뒤에서 망막의 중심 근처에 있을 때 상기 팽윤은 사람의 중심 시력을 왜곡시킬 수 있다. 이 영역은 사람이 직접적으로 시야의 선에 있는 형태, 색채 및 세부사항을 알아볼 수 있게 하기 위해 날카롭고 명확한 중심 시력을 제공하는 조밀하게 팩킹된 원뿔을 보유한다. 낭모양 황반 부종은 낭 형성을 포함하는 황반 부종의 일종이다.

0189] 조합 치료

[0190] 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체 또는 약학 조성물은 본원에 기재된 하나 이상의 안 혈관 질환의 치료를 위해 (추가 치료제 없이) 단독으로 투여된다.

[0191] 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체 또는 약학 조성물은 본원에 기재된 하나 이상의 안 혈관 질환의 치료를 위해 하나 이상의 추가 치료제 또는 치료 방법과 함께 투여된다.

[0192] 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체 또는 약학 조성물은 하나 이상의 추가 치료제와 함께 제제화되고 본원에 기재된 하나 이상의 안 혈관 질환의 치료를 위해 투여된다.

[0193] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 조합 치료는 본 발명에 따른 이중특이적 항체 또는 약학 조성물이 본원에 기재된 하나 이상의 안 혈관 질환의 치료를 위해 하나 이상의 추가 치료제와 함께 순차적으로 투여되는 치료를 포함한다.

[0194] 추가 치료제는 하기 치료제들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다: 트립토파닐-tRNA 신세타제(TrpRS), Eye001(항-VEGF 폐길화된 앱타며), 스쿠알라민, RETAANE™(데포 혼탁액을 위한 아네코르타브(anecortave) 아세테이트; 알콘 인코포레이티드(Alcon, Inc.)), 콤브레타스타틴 A4 전구약물(CA4P), 마쿠젠(MACUGEN)™, 미페프렉스

(MIFEPREX)™(미페프리스톤-ru486), 수브테논(subtenon) 트라이암시놀론 아세토나이드, 유리체내 결정질 트라이암시놀론 아세토나이드, 프리노마스타트(Prinomastat)(AG3340-합성 매트릭스 메탈로프로테이나제 억제제, 화이자(Pfizer)), 플루오시놀론 아세토나이드(플루오시놀론 안내 이식재를 포함함, 바슈 앤드 루/콘트롤 딜리버리 시스템스(Bausch & Lomb/Control Delivery Systems)), VEGFR 억제제(수젠(Sugen)), VEGF-Trap(리제네론/아벤티스(Regeneron/Aventis)), VEGF 수용체 티로신 키나제 억제제, 예컨대, 4-(4-브로모-2-플루오로아닐리노)-6-메톡시-7-(1-메틸페페리딘-4-일메톡시)퀴나졸린(ZD6474), 4-(4-플루오로-2-메틸인돌-5-일옥시)-6-메톡시-7-(3-피롤리딘-1-일프로포시)퀴나졸린(AZD2171), 바탈라닙(PTK787) 및 SU1 1248(수니티닙), 리노마이드, 및 인테그린 v. 베타.3 기능의 억제제 및 안지오스타틴.

[0195]

본 발명에 따른 이중특이적 항체 또는 약학 조성물과 함께 사용될 수 있는 다른 약학 치료는 하기 치료들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다: 비-열 레이저의 사용과 함께 비수다인(VISUDYNE)™, PKC 412, 엔도비온(Endovion)(뉴로서치(NeuroSearch) A/S), 신경영양 인자(예를 들면, 신경아교세포 유래의 신경영양 인자 및 섬모 신경영양 인자를 포함함), 다이아타제(diatazem), 도르졸라마이드(dorzolamide), 포토트롭(Phototrop), 9-시스-레티날(cis-retinal), 포스폴린 요오다이드 또는 에코티오페이트 또는 카보닉 안하이드라제(carbonic anhydrase) 억제제를 비롯한 안약(에코 치료를 포함함), AE-941(아테나 라보라토리스 인코포레이티드(AEterna Laboratories, Inc.)), 시르나(Sirna)-027(시마 쎄라퓨틱스 인코포레이티드(Sima Therapeutics, Inc.)), 폐갑타닙(pegaptanib)(넥스스타 파마슈티칼스(NeXstar Pharmaceuticals)/길리드 사이언시스(Gilead Sciences)), 뉴로트로핀(예를 들면, NT-4/5를 포함함(제넨테크(Genentech)), Cand5(액큐어티 파마슈티칼스(Acuity Pharmaceuticals)), INS-37217(인스파이어 파마슈티칼스(Inspire Pharmaceuticals)), 인테그린 길항제(제리니 아게(Jerini AG) 및 애보트 라보라토리스(Abbott Laboratories)의 인테그린 길항제를 포함함), EG-3306(아크 쎄라퓨틱스 리미티드(Ark Therapeutics Ltd.)), BDM-E(바이오다이엠 리미티드(BioDiem Ltd.)), 탈리도마이드(thalidomide)(예를 들면, 엔트레메드 인코포레이티드(EntreMed, Inc.)에 의해 사용된 바와 같음), 카디오토로핀(cardiotrophin)-1(제넨테크), 2-메톡시에스트라다이올(알레르간(Allergan)/오클렉스(Oculex)), DL-8234(토레이 인더스트리스(Toray Industries)), NTC-200(뉴로텍(Neurotech)), 테트라티오몰리브데이트(미시간 대학), LYN-002(린케우스 바이오텍(Lynkeus Biotech)), 마이크로알갈(microalgal) 화합물(아쿠아서치(Aquasearch)/알바니(Albany), 메라 파마슈티칼스(Mera Pharmaceuticals)), D-9120(셀텍 그룹 핵(Celltech Group pic)), ATX-S10(하마마쓰 포토닉스(Hamamatsu Photonics)), TGF-베타 2(젠파임(Genzyme)/셀트릭스(Celtrix)), 티로신 키나제 억제제(알레르간, 수젠, 화이자), NX-278-L(넥스스타 파마슈티칼스/길리드 사이언시스), Opt-24(옵티스 프랑스 에스에이(OPTIS France SA)), 망막 세포 신경절 신경보호제(코젠틱 뉴로사이언시스(Cogent Neurosciences)), N-니트로피라졸 유도체(텍사스 에이엔드эм 유니버시티 시스템(Texas A&M University System)), KP-102(크레니트스카이 파마슈티칼스(Krenitsky Pharmaceuticals)), 사이클로스포린 A, 티미티드(Timited) 망막 전위, 광역학 치료(예를 들면, 수용체-표적화된 PDT(브리스톨-메이어스 스퀴브 컴파니(Bristol-Myers Squibb, Co.)); PDT와 함께 주사될 포퍼미(porfimer) 나트륨; 베르테포핀(verteporfin)(큐엘티 인코포레이티드(QLT Inc.)); PDT와 함께 로스타포핀(rostatoporphyrin)(미라벤트 메디칼 테크놀로지스(Miravent Medical Technologies)); PDT와 함께 탈라포핀(talaporfin) 나트륨(니폰 페트롤레움(Nippon Petroleum)); 및 모텍사핀루테피움(motexafin lutetium)(파마사이클릭스 인코포레이티드(Pharmacyclics, Inc.))을 포함함), 안티센스 올리고뉴클레오티드(예를 들면, 노바갈리 파마 에스에이(Novagali Pharma SA)에 의해 시험된 제품, 및 ISIS-13650(이이시스 파마슈티칼스(Isis Pharmaceuticals))을 포함함), 레이저 광응고, 드루젠 레이저링, 황반 원공 수술, 황반 전위 수술, 이식가능한 소형 망원경, 파이-모션(Phi-Motion) 혈관조영술(마이크로레이저 치료 및 영양세포 혈관 치료로서도 공지되어 있음), 양성자 광선 치료, 미세자극 치료, 망막 탈착 및 유리체 수술, 공막돌출술, 황반하 수술, 경동공 온열치료, 광시스템 I 치료, RNA 간섭(RNAi)의 이용, 체외 혈액분리반출(막 분별 여과 및 유동치료로서도 공지되어 있음), 마이크로칩 이식, 줄기세포 치료, 유전자 대체 치료, 리보자임 유전자 치료(저산소증 반응 요소를 위한 유전자 치료(옥스포드 바이오메디카(Oxford Biomedica)); 렌티팍(Lentipak)(제네티克斯(Genetix)); 및 PDEF 유전자 치료(젠펙(GenVec))를 포함함), 광수용체/망막 세포 이식(이식가능한 망막 상피세포(다이아크린 인코포레이티드(Diacrin, Inc.)); 및 망막 세포 이식물(셀 제네시스 인코포레이티드(Cell Genesys, Inc.))을 포함함) 및 침술.

[0196]

문헌(Carmeliet and Jain, 2000, Nature 407:249-257)에 나열된 항-혈관신생 물질들을 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 항-혈관신생 물질이 본 발명에 따른 이중특이적 항체 또는 약학 조성물과 함께 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항-혈관신생 물질은 또 다른 VEGF 길항제 또는 VEGF 수용체 길항제, 예컨대, VEGF 변이체, 가용성 VEGF 수용체 단편, VEGF 또는 VEGFR을 차단할 수 있는 앱타머, 중화 항-VEGFR 항체, VEGFR 티로신 키나제의 저분자량 억제제 및 이들의 임의의 조합물이고, 이들은 항-VEGF 앱타머(예를 들면, 폐갑타닙) 및 가용성

재조합 유인 수용체(예를 들면, VEGF 트랩)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-혈관신생 물질은 코르티코스테로이드, 혈관신생억제성 스테로이드, 아네코르타브 아세테이트, 안지오스타틴, 엔도스타틴, VEGFR 또는 VEGF 리간드의 발현을 감소시키는 작은 간섭 RNA, 티로신 키나제 억제제를 사용한 후-VEGFR 차단, MMP 억제제, IGFBP3, SDF-1 차단제, PEDF, 감마-세크레타제, 멜타 유사 리간드 4, 인테그린 길항제, HIF-1 알파 차단, 단백질 키나제 CK2 차단, 및 혈관 내피 캐드헤린(CD-144) 및 간질 유래의 인자(SDF)-I 항체의 사용에 의한 신생혈관형성 부위로 항하는 줄기세포(즉, 내피 전구세포)의 억제를 포함한다. VEGF 수용체를 표적화하는 소분자 RTK 억제제(PTK787을 포함함)도 사용될 수 있다. 반드시 항-VEGF 화합물은 아니지만 신생혈관형성에 대한 활성을 갖는 물질도 사용될 수 있고 소염 약물, m-Tor 억제제, 라파마이신, 에버辱리무스, 템시辱리무스, 사이클로스포린, 항-TNF 물질, 항-보체 물질 및 비-스테로이드성 소염제를 포함할 수 있다. 신경보호성을 나타내고 건성 황반 변성의 진행을 잠재적으로 감소시킬 수 있는 물질, 예컨대, "뉴로스테로이드"로서 지칭되는 부류의 약물도 사용될 수 있다. 이들은 데하이드로에피안드로스테론(DHEA)(상표명: 프라스테라(Prastera)(R) 및 피델린(Fidelin)(R)), 데하이드로에피안드로스테론 설페이트 및 프레그네놀론 설페이트와 같은 약물을 포함한다. 임의의 조합물로 PDT, 폐갑타닙 나트륨, 아연 또는 항산화제(들)와 함께 또는 단독으로 사용되는 베르테포린을 포함하나 이것으로 한정되지 않는 임의의 AMD(연령 관련 황반 변성) 치료제가 본 발명에 따른 이중특이적 항체 또는 약학 조성물과 함께 사용될 수 있다.

[0197] 용어 "대상체" 및 "환자"는 상호교환적으로 사용되고, 포유동물, 예컨대, 인간 환자 및 비-인간 영장류뿐만 아니라 실험 동물, 예컨대, 토끼, 래트 및 마우스, 및 다른 동물도 지칭한다. 동물은 모든 척추동물, 예를 들면, 포유동물 및 비-포유동물, 예컨대, 개, 고양이, 양, 소, 돼지, 토끼, 닭 등을 포함한다. 본 발명의 치료 방법을 실시하기에 바람직한 대상체는 인간이다. 치료를 필요로 하는 대상체는 안 혈관 질환 또는 장애를 이미 앓고 있는 환자뿐만 아니라 이러한 장애를 발생시키기 쉬운 환자도 포함한다.

[0198] 본원에서 사용된 표현 "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"은 상호교환적으로 사용되고, 모든 이러한 표현들은 자손을 포함한다. 따라서, 용어 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"는 일차 대상 세포 및 전달의 수와 관계없이 이로부터 유래된 배양물을 포함한다. 모든 자손은 의도적 또는 우발적 돌연변이로 인해 DNA 함량 면에서 정확히 동일하지 않을 수 있다는 것도 이해된다. 최초로 형질전환된 세포에서 스크리닝된 기능 또는 생물학적 활성과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 변이체 자손이 포함된다. 상이한 표현이 의도되는 경우, 이것은 문맥으로부터 명확할 것이다.

[0199] 본원에서 사용된 용어 "형질전환"은 숙주 세포 내로의 벡터/핵산의 전달 과정을 지칭한다. 가공할만한 세포벽 차단막을 갖지 않는 세포가 숙주 세포로서 사용되는 경우, 형질감염은 예를 들면, 문헌(Graham, F.L., Van der Eb, A.J., Virology 52 (1973) 546-467)에 기재된 바와 같은 인산칼슘 침전 방법에 의해 수행된다. 그러나, DNA를 세포 내로 도입하는 다른 방법, 예컨대, 핵 주입 또는 원형질체 융합도 이용될 수 있다. 원핵세포, 또는 실질적인 세포벽 구축물을 함유하는 세포가 사용되는 경우, 예를 들면, 한 형질감염 방법은 문헌(Cohen, S.N., et al, PNAS. 69 (1972) 2110-2114)에 기재된 바와 같이 염화칼슘을 이용하는 칼슘 처리이다.

[0200] 본원에서 사용된 "발현"은 핵산이 mRNA로 전사되는 과정, 및/또는 그 후 전사된 mRNA(전사체로서도 지칭됨)가 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질로 번역되는 과정을 지칭한다. 전사체 및 암호화된 폴리펩티드는 유전자 생성물로서 총칭된다. 폴리뉴클레오티드가 계놈 DNA로부터 유래되는 경우, 진핵세포에서의 발현은 mRNA의 스팡라이싱을 포함할 수 있다.

[0201] "벡터"는 삽입된 핵산 분자를 숙주 세포 내로 및/또는 숙주 세포 사이에 전달하는 핵산 분자, 특히 자가 복제 핵산 분자이다. 상기 용어는 주로 DNA 또는 RNA를 세포 내로 삽입(예를 들면, 염색체 삽입)시키는 기능을 하는 벡터, 주로 DNA 또는 RNA를 복제하는 기능을 하는 복제 벡터, 및 DNA 또는 RNA를 전사하고/하거나 번역하는 기능을 하는 발현 벡터를 포함한다. 기재된 기능들 중 하나 초과의 기능을 제공하는 벡터도 포함된다.

[0202] "발현 벡터"는 적절한 숙주 세포 내로 도입되었을 때 폴리펩티드로 전사되고 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드이다. "발현 시스템"은 통상적으로 원하는 발현 생성물을 생성하는 기능을 할 수 있는 발현 벡터를 포함하는 적합한 숙주 세포를 지칭한다.

[0203] 하기 실시예, 서열목록 및 도면은 본 발명의 이해를 돋기 위해 제공되고, 본 발명의 진정한 범위는 첨부된 특허 청구범위에 기재되어 있다. 본 발명의 사상을 벗어나지 않으면서 기재된 절차를 변경시킬 수 있다는 것이 이해된다.

서열목록 (아미노산 서열)의 설명

서열번호	1	중쇄 CDR3H, <VEGF>라니비주맙
서열번호	2	중쇄 CDR2H, <VEGF>라니비주맙
서열번호	3	중쇄 CDR1H, <VEGF>라니비주맙
서열번호	4	경쇄 CDR3L, <VEGF>라니비주맙
서열번호	5	경쇄 CDR2L, <VEGF>라니비주맙
서열번호	6	경쇄 CDR1L, <VEGF>라니비주맙
서열번호	7	중쇄 가변 도메인 VH, <VEGF>라니비주맙
서열번호	8	경쇄 가변 도메인 VL, <VEGF>라니비주맙
서열번호	9	중쇄 CDR3H, <ANG-2> Ang2i_LC10 변이체
서열번호	10	중쇄 CDR2H, <ANG-2> Ang2i_LC10 변이체
서열번호	11	중쇄 CDR1H, <ANG-2> Ang2i_LC10 변이체
서열번호	12	경쇄 CDR3L, <ANG-2> Ang2i_LC10 변이체
서열번호	13	경쇄 CDR2L, <ANG-2> Ang2i_LC10 변이체
서열번호	14	경쇄 CDR1L, <ANG-2> Ang2i_LC10 변이체
서열번호	15	중쇄 가변 도메인 VH, <ANG-2> Ang2i_LC10 변이체
서열번호	16	경쇄 가변 도메인 VL, <ANG-2> Ang2i_LC10 변이체
서열번호	17	인간 혈관 내피 성장인자(VEGF); 인간 VEGF165 의 전구체 서열
서열번호	18	인간 안지오포이에틴-2(ANG-2)
서열번호	19	인간 안지오포이에틴-1(ANG-1)
서열번호	20	인간 Tie-2 수용체
서열번호	21	AAA 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2>CrossMAb IgG1(VEGFang2-0012)의 중쇄 1
서열번호	22	AAA 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1(VEGFang2-0012)의 중쇄 2
서열번호	23	AAA 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1(VEGFang2-0012)의 경쇄 1
서열번호	24	AAA 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1(VEGF-Ang2-0012)의 경쇄 2
서열번호	25	AAA 돌연변이 및 P329G LALA 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1(VEGFang2-0016)의 중쇄 1

[0204]

서열번호	26	AAA 돌연변이 및 P329G LALA 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1(VEGFang2-0016)의 중쇄 2
서열번호	27	AAA 돌연변이 및 P329G LALA 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1(VEGFang2-0016)의 경쇄 1
서열번호	28	AAA 돌연변이 및 P329G LALA 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1(VEGFang2-0016)의 경쇄 2
서열번호	29	AAA 돌연변이 및 SPLE 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 의 중쇄 1
서열번호	30	AAA 돌연변이 및 SPLE 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 의 중쇄 2
서열번호	31	AAA 돌연변이 및 SPLE 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 의 경쇄 1
서열번호	32	AAA 돌연변이 및 SPLE 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 의 경쇄 2
서열번호	33	AAA 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 의 중쇄 1
서열번호	34	AAA 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 의 중쇄 2
서열번호	35	AAA 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 의 경쇄 1
서열번호	36	AAA 돌연변이 및 SPLE 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 의 중쇄 1
서열번호	37	AAA 돌연변이 및 SPLE 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 의 중쇄 2
서열번호	38	AAA 돌연변이 및 SPLE 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 의 경쇄 1
서열번호	39	<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 야생형(AAA 돌연변이를 갖지 않음)(VEGFang2-0201)의 중쇄 1
서열번호	40	<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 야생형(AAA 돌연변이를 갖지 않음)(VEGFang2-0201)의 중쇄 2
서열번호	41	<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 야생형(AAA 돌연변이를 갖지 않음)(VEGFang2-0201)의 경쇄 1
서열번호	42	<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 야생형(AAA 돌연변이를 갖지 않음)(VEGFang2-0201)의 경쇄 2
서열번호	43	P329G LALA 돌연변이만을 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1(AAA 돌연변이를 갖지 않음)(VEGFang2-0015)의 중쇄 1

[0205]

서열번호	44	P329G LALA 돌연변이만을 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1(AAA 돌연변이를 갖지 않음)(VEGFang2-0015)의 중쇄 2
서열번호	45	P329G LALA 돌연변이만을 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1(AAA 돌연변이를 갖지 않음)(VEGFang2-0015)의 경쇄 1
서열번호	46	P329G LALA 돌연변이만을 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1(AAA 돌연변이를 갖지 않음)(VEGFang2-0015)의 경쇄 2
서열번호	47	카파 경쇄 불변 영역
서열번호	48	람다 경쇄 불변 영역
서열번호	49	인간 IgG1로부터 유래된 중쇄 불변 영역
서열번호	50	인간 IgG4로부터 유래된 중쇄 불변 영역

[0206]

- [0207] 이하에 본 발명의 실시양태들이 나열되어 있다:
- [0208] 1. 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 항체로서, 이때
- [0209] i) VEGF에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위가 서열번호 1의 CDR3H 영역, 서열번호 2의 CDR2H 영역 및 서열번호 3의 CDR1H 영역을 중쇄 가변 도메인 내에 포함하고, 서열번호 4의 CDR3L 영역, 서열번호 5의 CDR2L 영역 및 서열번호 6의 CDR1L 영역을 경쇄 가변 도메인 내에 포함하고;
- [0210] ii) ANG-2에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위가 서열번호 9의 CDR3H 영역, 서열번호 10의 CDR2H 영역 및 서열번호 11의 CDR1H 영역을 중쇄 가변 도메인 내에 포함하고, 서열번호 12의 CDR3L 영역, 서열번호 13의 CDR2L 영역 및 서열번호 14의 CDR1L 영역을 경쇄 가변 도메인 내에 포함하고;
- [0211] iii) 상기 이중특이적 항체가 돌연변이 I253A, H310A 및 H435A(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 포함하는 (인간으로부터 유래된) 인간 IgG1 또는 인간 IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역을 포함하는, 이중특이적 항체.
- [0212] 2. 실시양태 1에 있어서,
- [0213] i) VEGF에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위가 서열번호 7의 아미노산 서열을 중쇄 가변 도메인 VH로서 포함하고 서열번호 8의 아미노산 서열을 경쇄 가변 도메인 VL로서 포함하고,
- [0214] ii) ANG-2에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위가 서열번호 15의 아미노산 서열을 중쇄 가변 도메인 VH로서 포함하고 서열번호 16의 아미노산 서열을 경쇄 가변 도메인 VL로서 포함하는, 이중특이적 항체.
- [0215] 3. 실시양태 1 또는 2에 있어서,
- [0216] iii)의 불변 중쇄 영역이 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역인, 이중특이적 항체.
- [0217] 4. 실시양태 3에 있어서,
- [0218] IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역이 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 추가로 포함하는, 이중특이적 항체.
- [0219] 5. 실시양태 1 또는 2에 있어서,
- [0220] iii)의 불변 중쇄 영역이 IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역인, 이중특이적 항체.
- [0221] 6. 실시양태 5에 있어서,
- [0222] IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역이 돌연변이 S228P 및 L235E(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 추가로 포함하는, 이중특이적 항체.
- [0223] 7. 실시양태 5에 있어서,
- [0224] IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역이 돌연변이 S228P, L235E 및 P329G(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 추가로 포함하는, 이중특이적 항체.
- [0225] 8. 실시양태 1 내지 7 중 어느 한 실시양태에 따른 항체를 포함하는 약학 조성물.
- [0226] 9. 실시양태 1 내지 7 중 어느 한 실시양태에 있어서,
- [0227] 안 혈관 질환의 치료에 사용되는 이중특이적 항체.
- [0228] 10. 안 혈관 질환의 치료용 약제의 제조를 위한 실시양태 1 내지 7 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이적 항체의 용도.
- [0229] 11. 실시양태 9 또는 10에 있어서,
- [0230] 항체가 유리체내 적용을 통해 투여되는, 이중특이적 항체.
- [0231] 12. 실시양태 1 내지 7 중 어느 한 실시양태에 따른 항체를, 안 혈관 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써 안 혈관 질환을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법.
- [0232] 13. 실시양태 1 내지 7 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이적 항체를 암호화하는 핵산.
- [0233] 14. 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 실시양태 13에 따른 핵산을 발현할 수 있는, 실시양태 13에 따른 핵산을 함

유하는 발현 벡터.

[0234] 15. 실시양태 14에 따른 벡터를 포함하는 원핵 또는 진핵 숙주 세포.

[0235] 16. 실시양태 1 내지 7 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이적 항체를 제조하는 방법으로서, 하기 단계들을 포함하는 방법:

[0236] a) 상기 항체를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 숙주 세포를 형질전환시키는 단계;

[0237] b) 상기 항체 분자의 합성을 허용하는 조건 하에서 상기 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

[0238] c) 상기 배양물로부터 상기 항체 분자를 회수하는 단계.

[0239] 17. 실시양태 16에 따른 방법에 의해 수득된 이중특이적 항체.

[0240] 18. 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 2가 항체로서, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 2가 항체.

[0241] 19. 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 2가 항체로서, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 2가 항체.

[0242] 20. 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 2가 항체로서, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31 및 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 2가 항체.

[0243] 실현 절차

[0244]

[표 1]

이중특이적 항체들 및 이들 각각의 서열

설명	단축명	서열
AAA 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1	VEGFang2-0012	서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 야생형(AAA 돌연변이를 갖지 않음)	VEGFang2-0201-	서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42
AAA 돌연변이 및 P329G LALA 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1	VEGFang2-0016	서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28
P329G LALA 돌연변이만을 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1(AAA 돌연변이를 갖지 않음)	VEGFang2-0015	서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46
AAA 돌연변이 및 SPLE 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4	--	서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32
AAA 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1	-	서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35
AAA 돌연변이 및 SPLE 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4	-	서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38

[0245]

[0246]

본원에서 사용된 용어 "돌연변이 AAA를 갖는"은 IgG1 또는 IgG4의 불변 중쇄 영역 내의 돌연변이 I253A(Ile253Ala), H310A(His310Ala) 및 H435A(His435Ala)(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 지칭하고, 본원에서 사용된 용어 "돌연변이 P329G LALA를 갖는"은 IgG 서브클래스의 불변 중쇄 영역 내의 돌연변이 L234A(Leu235Ala), L235A(Leu234Ala) 및 P329G(Pro329Gly)(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 지칭하고, 본원에서 사용된 용어 "돌연변이 SPLE를 갖는"은 IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역 내의 S228P(Ser228Pro) 및 L235E(Leu235Glu)(카바트의 EU 지수에 따른 넘버링)를 지칭한다는 것을 인지해야 한다.

[0247]

실시예

[0248]

재료 및 일반적인 방법

[0249]

인간 면역글로불린 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오티드 서열에 대한 일반적인 정보는 문헌(Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))에서 제공되어 있다. 항체 쇄의 아미노산은 EU 넘버링에 따라 넘버링되고 지칭된다(Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

[0250] 재조합 DNA 기법

[0251] 문현(Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, (1989))에 기재된 바와 같이 표준 방법을 이용하여 DNA를 조작하였다. 분자생물학 시약을 제조자의 설명서에 따라 사용하였다.

[0252] 유전자 합성

[0253] 원하는 유전자 분절은 진아트(Geneart)(독일 레겐스부르크 소재)에서 주어진 요건에 따라 주문되었다.

[0254] DNA 서열결정

[0255] 메디게노믹스 게엠베하(Medigenomix GmbH)(독일 마르틴스리에드 소재) 및 세퀴서브 게엠베하(Sequiseq GmbH)(독일 바터스테텐 소재)에서 수행된 이중 가닥 서열결정으로 DNA 서열을 결정하였다.

[0256] DNA 및 단백질 서열 분석 및 서열 데이터 관리

[0257] GCG(제네티克斯 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group), 미국 위스콘신주 매디슨 소재)의 소프트웨어 팩키지 버전 10.2 및 인포맥스(Informax)의 벡터 NTI 어드밴스 스위트(Advance suite) 버전 8.0을 서열 생성, 맵핑, 분석, 해독 및 예증을 위해 사용하였다.

[0258] 발현 벡터

[0259] 기재된 항체들의 발현을 위해, CMV-인트론 A 프로모터를 갖거나 갖지 않는 cDNA 구성 또는 CMV 프로모터를 갖는 게놈 구성에 기초한 (예를 들면, HEK293-F 세포에서의) 일시적 발현용 발현 플라스미드의 변이체들을 적용하였다.

[0260] 벡터는 항체 발현 카세트 이외에 하기 요소들을 함유하였다:

- 에스케리키아 콜라이에서 이 플라스미드의 복제를 가능하게 하는 복제기점,

[0261]

- 에스케리키아 콜라이에서 앰피실린 내성을 부여하는 β -락타마제 유전자, 및

[0262]

- 진핵세포에서 선별 마커로서 머스 머스큘러스(*Mus musculus*)로부터의 다이하이드로폴레이트 리اكت제 유전자.

[0263] 항체 유전자의 전사 유닛은 하기 요소들로 구성되었다:

- 5' 말단에서 독특한 제한 부위(들),

[0264]

- 인간 사이토메갈로바이러스로부터의 즉시 초기 인핸서 및 프로모터,

[0265]

- cDNA 구성의 경우 인트론 A 서열,

[0266]

- 인간 항체 유전자의 5'-비변역 영역,

[0267]

- 면역글로불린 중쇄 신호 서열,

[0268]

- 면역글로불린 엑손-인트론 구성을 cDNA 또는 게놈 조직화로서 갖는 인간 항체 쇄(야생형 또는 도메인 교환을 가짐),

[0269]

- 폴리아데닐화 신호 서열을 갖는 3'-비변역 영역, 및

[0270]

- 3' 말단에서의 독특한 제한 부위(들).

[0271] 하기 기재된 바와 같이 항체 쇄를 포함하는 융합 유전자들을 PCR 및/또는 유전자 합성으로 발생시키고, 예를 들면, 각각의 벡터 내의 독특한 제한 부위를 사용하여 일치하는 핵산 분절들을 연결함으로써 공지되어 있는 재조합 방법 및 기법으로 조립하였다. 서브클로닝된 핵산 서열을 DNA 서열결정으로 검증하였다. 일시적 형질감염을 위해 보다 많은 양의 플라스미드를 형질전환된 에스케리키아 콜라이 배양물로부터 플라스미드 제조로 제조하였다(뉴클레오본드 에이엑스(Nucleobond AX), 마슈레이-나겔(Macherey-Nagel)).

[0272] 세포 배양 기법

[0273] 표준 세포 배양 기법을 문현(Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc)에 기재된 바와 같이 이용하였다.

[0276] 이하에 기재된 바와 같이 혼탁액으로 생장하는 HEK293-F 세포에서 각각의 발현 플라스미드를 일시적으로 공형질 감염(co-transfection)시켜 이중특이적 항체를 발현하였다.

실시예 1

발현 및 정제

HEK293-F 시스템에서의 일시적 형질감염

[0280] HEK293-F 시스템(인비트로겐(Invitrogen))을 제조자의 설명서에 따라 사용하여 (예를 들면, 중쇄 및 변경된 중쇄뿐만 아니라 상응하는 경쇄 및 변경된 경쇄를 암호화하는) 각각의 플라스미드를 사용한 일시적 형질감염으로 이중특이적 항체를 발생시켰다. 요약하건대, 진탕 플라스크 또는 교반된 발효기 내의 무혈청 프리스타일(FreeStyle)TM 293 발현 배지(인비트로겐)에서 혼탁액으로 생장하는 HEK293-F 세포(인비트로겐)를 4개의 발현 플라스미드와 293펙틴(fectin)TM 또는 펙틴(인비트로겐)의 혼합물로 형질감염시켰다. 2 ℥ 진탕 플라스크(코닝(Corning))의 경우, HEK293-F 세포를 600 mL 중의 1.0E*6개 세포/mL의 밀도로 시딩하고 120 rpm 및 8% CO₂에서 항온처리하였다. 다음 날, 세포를 약 1.5E*6개 세포/mL의 세포 밀도에서 하기 A와 B의 혼합물을 약 42 mL로 형질감염시켰다: A) 등물 비로 각각 중쇄 또는 변경된 중쇄 및 상응하는 경쇄를 암호화하는 600 µg 총 플라스미드 DNA(1 µg/mL)를 갖는 20 mL Opti-MEM(인비트로겐), 및 B) 20 mL Opti-MEM + 1.2 mL 293펙틴 또는 펙틴(2 µL/mL). 글루코스 소비에 따라 글루코스 용액을 발현 과정 동안 첨가하였다. 분비된 항체를 함유하는 상청액을 5일 내지 10일 후 회수하고 항체를 상청액으로부터 직접적으로 정제하였거나 상청액을 동결하여 저장하였다.

정제

[0282] 맵셀렉트슈어(MabSelectSure)-세파로스TM(비-AAA 돌연변이체의 경우)(지이 헬쓰케어, 스웨덴 소재) 또는 카파셀렉트(kappaSelect)-아가로스(AAA 돌연변이체의 경우)(지이 헬쓰케어, 스웨덴 소재)를 사용하는 친화성 크로마토그래피, 부틸-세파로스(지이 헬쓰케어, 스웨덴 소재)를 사용하는 소수성 상호작용 크로마토그래피 및 수퍼넥스 200 크기 배제(지이 헬쓰케어, 스웨덴 소재) 크로마토그래피로 세포 배양물 상청액으로부터 이중특이적 항체를 정제하였다.

[0283] 요약하건대, 멸균 여과된 세포 배양물을 상청액을 PBS 완충제(10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl 및 2.7 mM KCl, pH 7.4)로 평형화된 맵셀렉트슈어 수지 상에 포획하고 평형화 완충제로 세척하고 pH 3.0에서 25 mM 나트륨 시트레이트로 용출하였다. AAA 돌연변이체를 25 mM 트라이스 및 50 mM NaCl(pH 7.2)로 평형화된 카파셀렉트 수지 상에서 포획하고 평형화 완충제로 세척하고 25 mM 나트륨 시트레이트(pH 2.9)로 용출하였다. 용출된 단백질 분획을 풀링하고 2 M 트라이스(pH 9.0)로 중화시켰다. 1.6 M 암모늄 살레이트 용액을 0.8 M 암모늄 살레이트의 최종 농도까지 첨가함으로써 소수성 상호작용 크로마토그래피용 항체 풀을 제조하고 아세트산을 사용하여 pH를 pH 5.0으로 조절하였다. 부틸-세파로스 수지를 35 mM 나트륨 아세테이트 및 0.8 M 암모늄 살레이트(pH 5.0)로 평형화시킨 후, 항체를 상기 수지에 적용하고 평형화 완충제로 세척하고 35 mM 나트륨 아세테이트(pH 5.0)까지 선형 구배로 용출하였다. 이중특이적 항체 함유 분획을 풀링하고, 20 mM 히스티딘 및 140 mM NaCl(pH 6.0)로 평형화된 수퍼넥스 200 26/60 GL(지이 헬쓰케어, 스웨덴 소재) 컬럼을 사용하는 크기 배제 크로마토그래피로 더 정제하였다. 이중특이적 항체 함유 분획을 풀링하고 비바스핀(Vivaspin) 한외여과 장치(사르토리우스 스테דים 바이오텍 에스에이(Sartorius Stedim Biotech S.A.), 프랑스 소재)를 이용하여 요구된 농도까지 농축하고 -80°C에서 저장하였다.

[표 2]

이중특이적 <VEGF-ANG-2> 항체의 수율

	VEGFang2-0015 (AAA 돌연변이를 갖지 않음)	VEGFang2-0016 (AAA 돌연변이를 가짐)
역가 상청액	64 µg/mL, (2 ℥ = 128 mg)	n.a.(2 ℥ 규모)
단백질 A(맵셀렉트슈어)	118 mg(약 70% 단량체)	n.a.
카파셀렉트	n.a.	117 mg(약 83% 단량체)
부틸 세파로스	60 mg	57 mg
SEC	35 mg(>95% 단량체)	38 mg(>95% 단량체)

[0285]

[0286] 순도 및 항체 온전성을 각각의 정제 단계 후 마이크로플루이딕 랩칩 기술(칼리퍼 라이프 사이언스(Caliper Life Science), 미국 소재)을 이용하여 CE-SDS로 분석하였다. 제조자의 설명서에 따라 HT 단백질 발현 시약 키트를 사용하여 CE-SDS 분석을 위해 5 μl 의 단백질 용액을 제조하고 HT 단백질 발현 칩을 사용하여 랩칩 GXII 시스템 상에서 분석하였다. 랩칩 GX 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0287]

[표 3]
**CE-SDS에 의해 확인된, 상이한 순차적 정제 단계들에 의한 전형적인
부산물의 제거**

정제 단계	VEGFang2-0015						VEGFang2-0016					
	% 피크 면적** 분석: CE-SDS (칼리퍼 랩칩 GXII)											
	mab	$\frac{3}{4}$ ab	(HC)2	$\frac{1}{2}$ ab	(LC)2	LC	mab	$\frac{3}{4}$ ab	(HC)2	$\frac{1}{2}$ ab	(LC)2	LC
맙셀렉트 슈어	55.7	19	10.6	9.8	3.5	0.9	-	-	-	-	-	-
카파셀렉 트	-	-	-	-	-	-	63	13.4	3.5	6.1	5.8	7.4
부틸 세파로스	81.4	1.9	2.3	8.2	3.6	1.8	76.2	1.3	0.7	8.3	7.7	5.8
수퍼텍스 200 SEC	92.4	1.8	2.6	1.4	0.5	0.5	99	1.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

[0288]

[0289] 25°C에서 2xPBS(20 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 274 mM NaCl 및 5.4 mM KC1, pH 7.4) 런닝 완충제에서 수퍼텍스 200 분석 크기 배제 컬럼(지이 헬쓰케어, 스웨덴 소재)을 사용하는 고성능 SEC로 항체 샘플의 응집체 함량을 분석하였다. 25 μg 의 단백질을 0.75 $\text{mL}/\text{분}$ 의 유속으로 상기 컬럼 상에 주입하고 50분에 걸쳐 등용매 용출하였다.

[0290]

유사하게, <VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체 VEGFang2-0012 및 VEGFang2-0201을 제조하고 하기 수율로 정제하였다:

	VEGFang2-0012 (AAA 돌연변이를 가짐)	VEGFang2-0201 (AAA 돌연변이를 갖지 않음)
역가//양	-	36 $\mu\text{g}/\text{mL}/72 \text{ mg}$
규모	2.1 ℓ	2 ℓ
단백질 A (맙셀렉트슈어)	-	66 mg(약 95% 단량체)
카파셀렉트	43 mg(약 65% 단량체)	-
부틸 세파로스	-	45 mg
SEC	14 mg	21 mg(> 98% 단량체)
수율 하이드록실아파타이트	8.5 mg(> 98% 단량체)	
총 수율(회수)	8.5 mg(20%)	21 mg(30%)

[0291]

[0292] AAA 돌연변이 및 SPLE 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체 <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4(서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32), AAA 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1(서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35), 및 AAA 돌연변이 및 SPLE 돌연변이를 갖는 <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4(서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38)도 유사하게 제조되고 정제될 수 있다.

[0293]

실시예 2

[0294] 분석 및 개발가능성

[0295] 소규모 DLS-기초 점도 측정

[0296] 점도 측정을 본질적으로 문헌(He, F. et al., Analytical Biochemistry 399 (2009) 141-3)에 기재된 바와 같이 수행하였다. 요약하건대, 샘플을 200 mM 아르기닌 석시네이트(pH 5.5)에 다양한 단백질 농도로 농축한 후, 폴리스티렌 라텍스 비드(300 nm 직경) 및 폴리소르베이트 20(0.02% 부피/부피)을 첨가하였다. 0.4 μm 필터 플레이트를 통한 원심분리로 샘플을 광학 384웰 플레이트 내로 옮기고 파라핀 오일로 덮었다. 상기 라텍스 비드의 겉보기 직경을 25°C에서 동적 광 산란으로 측정하였다. 용액의 점도를 $\eta = \eta_0((rh/rh_0))$ (η : 점도; η_0 : 물의 점도; rh : 라텍스 비드의 겉보기 수력학적 반경; rh_0 : 물에서 라텍스 비드의 수력학적 반경)로서 계산할 수 있다.

[0297] 동일한 농도에서 다양한 샘플들을 비교하기 위해, 점도-농도 데이터를 무니(Mooney) 수학식(수학식 1)으로 피팅하였고, 이에 따라 데이터를 내삽하였다:

[0298] [수학식 1]

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

[0300] 상기 식에서,

[0301] S는 단백질의 수력학적 상호작용 파라미터이고; K는 자가-응집 인자이고; Φ 는 용해된 단백질의 부피 분율이다.

[0302] 결과는 도 2에 제시되어 있다. Fc 부분 내에 AAA 돌연변이를 갖는 VEGFang2-0016은 Fc 부분 내에 AAA 돌연변이를 갖지 않는 VEGFang2-0015에 비해 모든 측정된 온도에서 더 낮은 점도를 보인다.

[0303] DLS 응집 시작 온도

[0304] 샘플을 20 mM 히스티딘/히스티딘 클로라이드 및 140 mM NaCl(pH 6.0)에서 1 mg/ml의 농도로 제조하고 0.4 μm 필터 플레이트를 통한 원심분리로 광학 384웰 플레이트 내로 옮기고 파라핀 오일로 덮었다. 샘플이 25°C부터 80°C까지 0.05°C/분의 속도로 가열되는 동안 수력학적 반경을 동적 광 산란으로 반복하여 측정하였다. 응집 시작 온도는 수력학적 반경이 증가하기 시작하는 온도로서 정의된다. 결과는 도 3에 제시되어 있다. 도 3에서, AAA 돌연변이를 갖지 않는 VEGFang2-0015 대 Fc 부분 내에 AAA 돌연변이를 갖는 VEGFang2-0016의 응집이 제시되어 있다. VEGFang2-0016은 61°C의 응집 시작 온도를 보여준 반면, AAA 돌연변이를 갖지 않는 VEGFang2-0015는 60°C의 시작 온도를 보여주었다.

[0305] DLS 시간 경과

[0306] 샘플을 20 mM 히스티딘/히스티딘 클로라이드 및 140 mM NaCl(pH 6.0)에서 1 mg/ml의 농도로 제조하고 0.4 μm 필터 플레이트를 통한 원심분리로 광학 384웰 플레이트 내로 옮기고 파라핀 오일로 덮었다. 샘플이 최대 145시간 동안 50°C의 일정한 온도에서 유지되는 동안 수력학적 반경을 동적 광 산란으로 반복하여 측정하였다. 이 실험에서, 승온에서 천연 비-폴딩된 단백질의 응집 경향은 시간 경과에 따른 평균 입자 직경의 증가를 초래하였을 것이다. 이 DLS-기초 방법은 응집체들이 산란된 광 강도에 과도하게 기여하기 때문에 응집체들에 대해 매우 민감하다. 심지어 50°C(응집 시작 온도에 가까운 온도, 상기 참조)에서 145시간 후, 0.5 nm 미만의 평균 입자 직경 증가만이 VEGFang2-0015 및 VEGFang2-0016 둘다에 대해 발견되었다.

[0307] 100 mg/ml로 40°C에서 7일 동안 저장(HMW 증가)

[0308] 샘플을 200 mM 아르기닌 석시네이트(pH 5.5)에서 100 mg/ml의 최종 농도까지 농축하고 멸균 여과하고 40°C에서 7일 동안 정지 상태로 저장하였다. 저장 전 및 후, 고분자량 종 및 저분자량 종(각각 HMW 및 LMW)의 함량을 크기 배제 크로마토그래피로 측정하였다. 저장된 샘플과 제조 직후 측정된 샘플 사이에 HMW 및 LMW 함량의 차이를 각각 "HMW 증가" 및 "LMW 증가"로서 보고하였다. 결과는 표 4 및 도 4에 제시되어 있는데, 표 4 및 도 4는 VEGFang2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음)가 VEGF Ang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)에 비해 더 높은 주 피크 감소 및 더 높은 HMW 증가를 보인다는 것을 보여준다. 놀랍게도, VEGF Ang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)은 VEGFang2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음)에 비해 더 낮은 응집 경향을 보였다.

[0309]

[표 4]

40°C에서 7 일 후 레타 주 피크, HMW 피크 및 LMW 피크

	델타_면적%(40°C-(-80°C))		
	주 피크	HMW	LMW
VEGFang2-0015 (-AAA 돌연변이)	-3.56	2.89	0.67
VEGFang2-0016 (+AAA 돌연변이)	-1.74	1.49	0.25

[0310]

[0311]

25°C에서 비아코어® T100 또는 T200 기기(지이 헬쓰케어)를 이용하여 표면 플라스몬 공명(SPR)으로 항-VEGF 및 항-Ang2 이중특이적 항체의 기능성 분석을 평가하였다. 비아코어® 시스템은 분자 상호작용의 연구용으로 잘 확립되어 있다. SPR-기술은 금 코팅된 바이오센서 칩의 표면에 가까운 굴절 지수의 측정에 기초한다. 굴절 지수의 변화는 고정된 리간드와 용액으로 주입된 분석물의 상호작용에 의해 야기된 표면 상의 질량 변화를 표시한다. 분자가 표면 상의 고정된 리간드에 결합하는 경우 질량이 증가하고, 역으로 분석물이 고정된 리간드로부터 해리되는 경우(복합체 해리를 반영함) 질량이 감소한다. SPR은 리간드/분석물 결합의 연속적인 실시간 모니터링 및 이로써 결합 속도 상수(k_a), 해리 속도 상수(k_d) 및 평형 상수(K_D)의 측정을 가능하게 한다.

[0312]

실시예 3

[0313]

VEGF, Ang2, FcγR 및 FcRn과의 결합

[0314]

종-교차반응성의 평가를 포함하는 VEGF 동형체 동력학적 친화성

[0315]

지이 헬쓰케어에 의해 공급된 아민 커플링 키트를 사용하여 pH 5.0에서 약 12000 공명 유닛(RU)의 포획 시스템 ($10 \mu\text{l}/\text{ml}$ 염소 항-인간 F(ab')₂; 주문 코드: 28958325; 지이 헬쓰케어 바이오-사이언시스 아베(GE Healthcare Bio-Sciences AB), 스웨덴 소재)을 CM5 칩(지이 헬쓰케어 BR-1005-30) 상에 커플링시켰다. 샘플 및 시스템 완충제는 PBS-T(0.05% 트윈20을 포함하는 10 mM 포스페이트 완충 식염수)(pH 7.4)이었다. 유동 셀을 25°C로 설정하고, 샘플 블록을 12°C로 설정하고 런닝 완충제로 2회 프라이밍하였다. 50 nM 용액을 $5 \mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 30 초 동안 주입하여 이중특이적 항체를 포획하였다. 용액 중의 다양한 농도의 인간 hVEGF121, 마우스 mVEGF120 또는 래트 rVEGF164를 1:3 희석물로 300 nM부터 시작하여 $30 \mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 300초 동안 주입함으로써 결합을 측정하였다. 해리 상을 최대 1200초 동안 모니터링하고 샘플 용액으로부터 런닝 완충제로 전환시킴으로써 유발하였다. $30 \mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 글리신(pH 2.1) 용액을 사용하여 60초 동안 세척함으로써 표면을 재생시켰다. 염소 항-인간 F(ab')₂ 표면으로부터 수득된 반응을 공제함으로써 벌크 굴절 지수 차이를 보정하였다. 블랭크 주입도 공제하였다(= 이중 표준화). 겉보기 K_D 및 다른 동력학적 파라미터의 계산을 위해 랭류어 1:1 모델을 이용하였다. 결과는 표 5에 제시되어 있다.

[0316]

종-교차반응성의 평가를 포함하는 Ang2 용액 친화성

[0317]

용액 친화성은 평형 혼합물에서 자유 상호작용 파트너의 농도를 측정함으로써 상호작용의 친화성을 측정한다. 용액 친화성 분석은 일정한 농도로 유지된 <VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체를 다양한 농도의 리간드(= Ang2)와 혼합하는 단계를 포함한다. 지이 헬쓰케어에 의해 공급된 아민 커플링 키트를 사용하여 최대 가능한 공명 유닛 (예를 들면, 17000 공명 유닛(RU))의 항체를 pH 5.0에서 CM5 칩(지이 헬쓰케어 BR-1005-30) 표면 상에 고정시켰다. 샘플 및 시스템 완충제는 pH 7.4의 HBS-P이었다. 유동 셀을 25°C로 설정하고 샘플 블록을 12°C로 설정하고 런닝 완충제로 2회 프라이밍하였다. 보정 곡선을 발생시키기 위해, 증가하는 농도의 Ang2를, 고정된 <VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체를 함유하는 비아코어 유동 셀 내로 주입하였다. 결합된 Ang2의 양을 공명 유닛 (RU)으로서 측정하여 농도에 대해 작도하였다. 각각의 리간드의 용액(<VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체의 경우 0 nM부터 200 nM까지 11개 농도)을 10 nM Ang2와 함께 항온처리하고 실온에서 평형에 도달하게 하였다. 공지된 양의 Ang2를 갖는 용액의 반응을 측정하기 전 및 후에 발생된 보정 곡선으로부터 자유 Ang2 농도를 측정하였다. 자유 Ang2 농도를 y-축으로서 사용하고 억제될 항체의 농도를 x-축으로서 사용하는 모델 201을 사용하여 4-파라미터 피트를 XLfit4(IDBS 소프트웨어)로 설정하였다. 이 곡선의 변곡점을 측정함으로써 친화성을 계산하였다. $30 \mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 0.85% H_3PO_4 용액을 사용하여 30초 동안 1회 세척함으로써 표면을 재생시켰다. 블랭크-커플링된 표면으로부터 수득된 반응을 공제함으로써 벌크 굴절 지수 차이를 보정하였다. 결과는 표 6에 제시되어

있다.

[0318] FcRn 정상 상태 친화성

FcRn 측정을 위해, 정상 상태 친화성을 이용하여 이중특이적 항체를 서로 비교하였다. 인간 FcRn을 커플링 완충제($10 \mu\text{l}/\text{ml}$, 나트륨 아세테이트 pH 5.0)로 희석하고, 비아코어 위자드를 이용하는 표적화된 고정 절차로 200 RU의 최종 반응까지 C1-칩(지이 헬쓰케어 BR-1005-35) 상에 고정시켰다. 유동 셀을 25°C로 설정하고 샘플 블록을 12°C로 설정하고 런닝 완충제로 2회 프라이밍하였다. 샘플 및 시스템 완충제는 PBS-T(0.05% 트윈20을 포함하는 10 mM 포스페이트 완충 식염수)(pH 6.0)이었다. 각각의 항체에 대한 상이한 IgG 농도를 평가하기 위해, 62.5 nM, 125 nM, 250 nM 및 500 nM의 농도를 제조하였다. 유속을 30 $\mu\text{l}/\text{분}$ 으로 설정하였고, 180초의 결합 시간을 선택하면서 상이한 샘플들을 칩 표면 상에 연속적으로 주입하였다. 표면을 30 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 60초 동안 주입된 PBS-T(pH 8)로 재생시켰다. 블랭크 표면으로부터 수득된 반응을 공제함으로써 벌크 굴절 지수 차이를 보정하였다. 완충제 주입도 공제하였다(= 이중 표준화). 정상 상태 친화성의 계산을 위해, 비아-에밸루션 (Bia-Evaluation) 소프트웨어로부터의 방법을 이용하였다. 요약하건대, RU 값(RU_{최대})을 분석된 농도에 대해 작도하여 용량-반응 곡선을 생성하였다. 2-파라미터 피트를 기초로 상부 점근선을 계산하여 절반-최대 RU 값 및 이로써 친화성의 측정을 가능하게 하였다. 결과는 도 5 및 표 7에 제시되어 있다. 유사하게, 사이노몰구스, 마우스 및 토끼 FcRn에 대한 친화성을 측정할 수 있다.

[0320] FcγRIIIa 측정

FcγRIIIa 측정을 위해, 직접적인 결합 분석을 이용하였다. 지이 헬쓰케어에 의해 공급된 아민 커플링 키트를 사용하여 약 3000 공명 유닛(RU)의 포획 시스템($1 \mu\text{l}/\text{ml}$ 펜타-His; 큐아젠(Quiagen))을 pH 5.0에서 CM5 칩(지이 헬쓰케어 BR-1005-30) 상에 커플링시켰다. 샘플 및 시스템 완충제는 HBS-P(pH 7.4)이었다. 유동 셀을 25°C로 설정하고 샘플 블록을 12°C로 설정하고 런닝 완충제로 2회 프라이밍하였다. 5 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 60초 동안 100 nM 용액을 주입함으로써 FcγRIIIa-His-수용체를 포획하였다. 30 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 180초 동안 100 nM의 이중특이적 항체 또는 단일특이적 대조군 항체(IgG1 서브클래스 및 IgG4 서브클래스 항체의 경우 항-Dig)를 주입함으로써 결합을 측정하였다. 30 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 글리신(pH 2.5) 용액을 사용하여 120초 동안 세척함으로써 표면을 재생시켰다. FcγRIIIa 결합이 랭류어 1:1 모델과 상이하기 때문에, 결합/비-결합만을 이 분석으로 확인하였다. 유사한 방식으로 FcγRIa 및 FcγRIIIa 결합을 확인할 수 있다. 결과는 도 6에 제시되어 있는데, 이때 당연히 돌연변이 P329G LALA의 도입에 의해 FcγRIIIa와의 결합이 더 이상 검출될 수 없었다는 결론이 도출된다.

[0322] <VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체에 대한 독립적인 VEGF 및 Ang2 결합의 평가

지이 헬쓰케어에 의해 공급된 아민 커플링 키트를 사용하여 약 3500 공명 유닛(RU)의 포획 시스템($10 \mu\text{l}/\text{ml}$ 염소 항-인간 IgG; 지이 헬쓰케어 바이오-사이언시스 아베, 스웨덴 소재)을 pH 5.0에서 CM4 칩(지이 헬쓰케어 BR-1005-34) 상에 커플링시켰다. 샘플 및 시스템 완충제는 PBS-T(0.05% 트윈20을 포함하는 10 mM 포스페이트 완충 식염수)(pH 7.4)이었다. 유동 셀의 온도를 25°C로 설정하고 샘플 블록의 온도를 12°C로 설정하였다. 포획 전에, 유동 셀을 런닝 완충제로 2회 프라이밍하였다.

5 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 60초 동안 10 nM 용액을 주입하여 이중특이적 항체를 포획하였다. 순차적으로 또는 동시에 (30 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로) 첨가된 각각의 리간드에 대한 활성 결합 능력을 측정함으로써 각각의 리간드와 이중특이적 항체의 독립적인 결합을 분석하였다.

[0325] 1. 180초 동안 200 nM의 농도로 인간 VEGF를 주입한다(항원의 단일 결합을 확인한다).

[0326] 2. 180초 동안 100 nM의 농도로 인간 Ang2를 주입한다(항원의 단일 결합을 확인한다).

[0327] 3. 180초 동안 200 nM의 농도로 인간 VEGF를 주입한 후 180초 동안 100 nM의 농도로 인간 Ang2를 추가 주입한다 (VEGF의 존재 하에서 Ang2의 결합을 확인한다).

[0328] 4. 180초 동안 100 nM의 농도로 인간 Ang2를 주입한 후 200 nM의 농도로 인간 VEGF를 추가 주입한다(Ang2의 존재 하에서 VEGF의 결합을 확인한다).

[0329] 5. 180초 동안 200 nM의 농도의 인간 VEGF 및 100 nM의 농도의 인간 Ang2를 동시 주입한다(VEGF 및 Ang2의 결합을 동시에 확인한다).

[0330] 30 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 3 M MgCl₂ 용액을 사용하여 60초 동안 세척함으로써 표면을 재생시켰다. 염소 항-인간

IgG 표면으로부터 수득된 반응을 공제함으로써 벌크 굴절 지수 차이를 보정하였다.

[0331] 방법 3, 4 및 5의 발생된 최종 신호가 방법 1 및 2의 개별 최종 신호의 합계와 동일하거나 유사한 경우 이중특이적 항체는 두 항원들에 서로 독립적으로 결합할 수 있다. 결과는 표 9에 제시되어 있는데, 이때 두 항체 VEGFang2-0016 및 VEGFang2-0012가 VEGF 및 Ang2에 서로 독립적으로 결합할 수 있다는 것이 입증된다.

<VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체에 대한 동시적인 VEGF 및 Ang2 결합의 평가

[0333] 첫째, 지이 헬쓰케어에 의해 공급된 아민 커플링 키트를 사용하여 약 1600 공명 유닛(RU)의 VEGF($20 \mu\text{l}/\text{m}\ell$)를 pH 5.0에서 CM4 칩(지이 헬쓰케어 BR-1005-34) 상에 커플링시켰다. 샘플 및 시스템 완충제는 PBS-T(0.05% 트리아이디움산)을 포함하는 10 mM 포스페이트 완충 식염수(pH 7.4)이었다. 유동 셀을 25°C로 설정하고 샘플 블록을 12°C로 설정하고 렌닝 완충제로 2회 프라이밍하였다. 둘째, 30 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 180초 동안 50 nM의 이중특이적 항체 용액을 주입하였다. 셋째, 30 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 180초 동안 hAng-2를 주입하였다. hAng-2의 결합 반응은 VEGF에 결합된 이중특이적 항체의 양에 의해 좌우되고 동시적인 결합을 보여준다. 30 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 0.85% H₃PO₄ 용액을 사용하여 60초 동안 세척함으로써 표면을 재생시켰다. 동시적인 결합은 이전에 VEGF에 결합된 <VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체에 대한 hAng-2의 추가 특이적 결합 신호에 의해 입증된다. 두 이중특이적 항체 VEGFang2-0015 및 VEGFang2-0016의 경우, <VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체에 대한 동시적인 VEGF 및 Ang2 결합이 검출될 수 있었다(데이터는 제시되어 있지 않음).

[0334]

[표 5]

결과: 상이한 종들로부터의 VEGF 동형체들에 대한 동역학적 친화성

	VEGFang2-0015 - 결보기 친화성	VEGFang2-0016 - 결보기 친화성	VEGFang2-0012 - 결보기 친화성	VEGFang2-0201 - 결보기 친화성
인간 VEGF 121	$\leq 1 \text{ pM}$ (비아코어 요건을 벗어남)			
마우스 VEGF 120	결합 부재	결합 부재	결합 부재	결합 부재
래트 VEGF 164	13 nM	14 nM	24 nM	35 nM

[0335]

[표 6]

결과: Ang2에 대한 용액 친화성

	VEGFang2-0015 K _D [nM]	VEGFang2-0016 K _D [nM]	VEGFang2-0012 K _D [nM]	VEGFang2-0201 K _D [nM]
인간 Ang2	8	20	20	tbd
사이노몰구스 Ang2	5	13	10	tbd
마우스 Ang2	8	13	8	tbd
토끼 Ang2	4	11	8	tbd

[0337]

[0338]

[표 7]

결과: <VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체의 FcRn에 대한 친화성

	VEGFang2-0015 [친화성]	VEGFang2-0016 [친화성]	VEGFang2-0012 [친화성]	VEGFang2-0201 [친화성]
인간 FcRn	0.8 μM	결합 부재	결합 부재	0.8 μM
사이노몰구스 FcRn	0.9 μM	결합 부재	결합 부재	1.0 μM
마우스 FcRn	0.2 μM	결합 부재	결합 부재	0.2 μM

[0339]

[0340]

[표 8]

결과: FcγRI 내지 FcγIIIa 와의 결합

	VEGFang2-0015	VEGFang2-0016	VEGFang2-0012	VEGFang2-0201
FcγRIa	결합 부재	결합 부재	결합	결합
FcγRIIa	결합 부재	결합 부재	결합 부재	결합
FcγRIIIa	결합 부재	결합 부재	결합 부재	결합

[0341]

[0342]

[표 9]

결과: <VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체에 대한 VEGF 및 Ang2의 독립적인 결합

	1) Ang2 [RU _{최대}]	2) VEGF [RU _{최대}]	3) 먼저 VEGF, 이어서 Ang2 [RU _{최대}]	4) 먼저 Ang2, 이어서 VEGF [RU _{최대}]	5) 동시주입 Ang2+ VEGF [RU _{최대}]
VEGFang2-0016	174	50	211	211	211
VEGFang2-0012	143	43	178	177	178

[0343]

실시예 4

[0344]

질량 분광측정

[0345]

[0346]

본 단락은 정확한 조립을 강조하면서 <VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체의 특징규명을 기술한다. 탈글리코실화된 온전한 또는 IdeS(스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)의 IgG 분해 효소)-분해된 <VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체의 전기분무 이온화 질량 분광측정(ESI-MS)으로 예측된 일차 구조를 확인하였다. 37°C에서 100 mmol/l NaH₂PO₄/Na₂HPO₄(pH 7.1)에서 100 μg의 정제된 항체를 2 μg의 IdeS 프로테아제(로슈)와 함께 5시간 동안 항온처리함으로써 IdeS 분해를 수행하였다. 그 후, 37°C에서 100 mmol/l NaH₂PO₄/Na₂HPO₄(pH 7.1)에서 1 mg/ml의 단백질 농도로 N-글리코시다제 F, 뉴라미니다제 및 O-글리코시다제(로슈)를 사용하여 항체를 최대 16시간 동안 탈글리코실화한 후, 세파텍스 G25 컬럼(지이 헬쓰케어) 상에서 HPLC를 통해 탈염시켰다. 트라이버사 나노메이트(Trivesta NanoMate) 공급원(애드비온(Advion))을 갖춘 maXis 4G UHR-QTOF MS 시스템(브루커 달토닉(Bruker Daltonik)) 상에서 ESI-MS를 통해 총 질량을 측정하였다.

[0347]

IdeS로 분해되고 탈글리코실화된 분자(표 10) 또는 온전한 탈글리코실화된 분자(표 11)에 대해 수득된 질량은 2개의 상이한 경쇄 LC_{Ang2} 및 LC_{루센티스} 및 2개의 상이한 중쇄 HC_{Ang2} 및 HC_{루센티스}로 구성된 <VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체에 대한 아미노산 서열로부터 유추된 예측된 질량에 상응한다.

[0348]

[표 10]

탈글리코실화되고 IdeS로 분해된 이중특이적 <VEGF/ANG2> 항체
VEGFang2-0201(AAA 돌연변이를 갖지 않음) 및 VEGFang2-0012(AAA
돌연변이를 가짐)의 질량

샘플	<VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체의 F(ab') ₂		<VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체의 탈글리코실화된 Fc	
	예측된 평균 질량[Da]	관찰된 평균 질량[Da]	예측된 평균 질량[Da]	관찰된 평균 질량[Da]
VEGFang2-0201	99360.8	99360.7	47439.2	47430.1
VEGFang2-0012	99360.8	99361.1	47087.7	47082.0

[0349]

[0350]

[표 11]

탈글리코실화된 <VEGF/ANG2> 항체 VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를
가짐) 및 VEGFang2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음)의 질량

	탈글리코실화된 <VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체	
	예측된 평균 질량[Da]	관찰된 평균 질량[Da]
VEGFang2-0016	146156.9	146161.2
VEGFang2-0015	146505.3	146509.4

[0351]

실시예 5

FcRn 크로마토그래피

스트렙타비딘 세파로스에의 커플링:

1 g의 스트렙타비딘 세파로스(지이 헬쓰케어)를 바이오티닐화되고 투석된 수용체에 첨가하고 진탕하면서 2시간 동안 항온처리하였다. 수용체 유도체화된 세파로스를 1 mL XK 컬럼(지이 헬쓰케어)에 충전시켰다.

[0356]

FcRn 친화성 컬럼을 이용하는 크로마토그래피:

조건:

컬럼 치수: 50 mm x 5 mm

총 높이: 5 cm

적재: 50 µg 샘플

평형화 완충제: pH 5.5로 조절된, 50 mM NaCl을 갖는 20 mM MES

용출 완충제: pH 8.8로 조절된, 150 mM NaCl을 갖는 20 mM 트라이스/HCl

용출: 7.5 CV 평형화 완충제, 30 CV 내지 100% 용출 완충제, 10 CV 용출 완충제

Hu FcRn 친화성 컬럼 크로마토그래피

하기 표에는 인간 FcRn을 포함하는 친화성 컬럼 상에서의 <VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체의 체류 시간이 제시되어 있다. 상기 조건을 이용하여 데이터를 수득하였다. 하기 표에는 인간 FcRn 상에서의 <VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체의 체류 시간이 제시되어 있다.

[0366]

[표 12]

결과: <VEGF-ANG-2> 이중특이적 항체의 체류 시간

항체	체류 시간[분]
VEGFAng2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음)	78.5
VEGFAng2-0201(AAA 돌연변이를 갖지 않음)	78.9
VEGFAng2-0012(AAA 돌연변이를 가짐)	2.7(빈-피크)
VEGFAng2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)	2.7(빈-피크)

[0367]

실시예 6**약동학적(PK) 성질**

인간 FcRn에 대한 형질전환 FcRn 마우스를 사용하여 수득한 PK 데이터

생활상

본 연구는 암컷 C57BL/6J 마우스(배경); 및 FcRn을 결여하되 인간 FcRn에 대한 반접합성 형질전환체인 마우스(huFcRn, 계통 276 -/tg)를 포함하였다.

파트 1동물 당 2 μl 의 적절한 용액(즉, 동물 당 21 μg 화합물(VEGFAng2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음)) 또는 동물 당 23.6 μg 화합물(VEGFAng2-0016(AAA 돌연변이를 가짐))))을 모든 마우스들의 우측 눈 내의 유리체내로 1회 주사하였다.

마우스들을 각각 6마리의 동물들로 구성된 2개의 군으로 할당하였다. 투약 후 2시간, 24시간 및 96시간에서 군 1로부터 혈액 샘플을 채취하고 투약 후 7시간, 48시간 및 168시간에서 군 2로부터 혈액 샘플을 채취하였다.

나노리터 주사를 위한 나노필 마이크로시린지(NanoFil Microsyringe) 시스템(월드 프리시전 인스트루먼츠 인코 포레이티드(World Precision Instruments, Inc.), 독일 베를린 소재)을 이용하여 우측 마우스 눈의 수정체 내로의 주사를 수행하였다. 마우스들을 2.5% 이소플루란으로 마취하고 마우스 눈의 가시화를 위해 40배 확대율 및 고리-광을 갖는 레이카(Leica) MZFL 3 현미경을 레이카 KL 2500 LCD 전광과 함께 이용하였다. 그 후, 35-계이지 바늘을 이용하여 2 μl 의 화합물을 주사하였다.

혈청 중의 화합물 수준을 측정하기 위해 각각의 동물로부터 반대쪽 눈의 안구뒤 정맥얼기를 통해 혈액을 채취하였다.

실온에서 1시간 동안 놓아둔 후 4°C에서 3분 동안 원심분리하여(9300xg) 혈액으로부터 50 μl 이상의 혈청 샘플을 수득하였다. 원심분리 직후 혈청 샘플을 동결시키고 분석할 때까지 -80°C에서 동결된 상태로 저장하였다. 군 1의 동물들의 처리된 눈을 처리 후 96시간에서 단리하고 군 2의 동물들의 처리된 눈을 처리 후 168시간에서 단리하였다. 샘플을 분석할 때까지 -80°C에서 동결된 상태로 저장하였다.**파트 2**동물 당 200 μl 의 적절한 용액(즉, 동물 당 21 μg 화합물(VEGFAng2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음)) 또는 동물 당 23.6 μg 화합물(VEGFAng2-0016(AAA 돌연변이를 가짐))))을 모든 마우스들에게 꼬리 정맥을 통해 정맥내로 1회 주사하였다.

마우스들을 각각 5마리의 동물들로 구성된 2개의 군으로 할당하였다. 투약 후 1시간, 24시간 및 96시간에서 군 1로부터 혈액 샘플을 채취하고 투약 후 7시간, 48시간 및 168시간에서 군 2로부터 혈액 샘플을 채취하였다. 혈청 중의 화합물 수준을 측정하기 위해 각각의 동물로부터 안구뒤 정맥얼기를 통해 혈액을 채취하였다.

실온에서 1시간 동안 놓아둔 후 4°C에서 3분 동안 원심분리하여(9300xg) 혈액으로부터 50 μl 이상의 혈청 샘플을 수득하였다. 원심분리 직후 혈청 샘플을 동결시키고 분석할 때까지 -80°C에서 동결된 상태로 저장하였다.**전체 눈 용해물의 제조(마우스)**

실험 동물의 전체 눈을 물리화학적으로 분해시켜 눈 용해물을 수득하였다. 기계적 파괴를 위해, 각각의 눈을

원뿔형 바닥을 갖는 1.5 ml 마이크로바이알 내로 옮겼다. 동결 및 해동 후, 눈을 1 ml 세포 세척 완충제(바이오-라드(Bio-Rad), 바이오-플렉스(Bio-Plex) 세포 용해 키트, 카탈로그 번호 171-304011)로 1회 세척하였다. 하기 단계에서, 500 μ l의 새로 제조된 세포 용해 완충제를 첨가하고 1.5 ml 조직 분쇄 막자(킴블 체이스(Kimble Chase), 1.5 ml 막자, 제품 번호 749521-1500)를 이용하여 눈을 분쇄하였다. 그 다음, 혼합물을 5회 동결하고 해동하고 다시 분쇄하였다. 남은 조직으로부터 용해물을 분리하기 위해, 샘플을 4500xg에서 4분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후, 상청액을 수집하고 정량 ELISA에서 추가 분석할 때까지 -20°C에서 저장하였다.

[0385] 분석

[0386] 마우스 혈청 및 눈 용해물 중의 <VEGF/ANG-2> 항체의 농도를 효소-연결된 면역흡착 분석(ELISA)으로 측정하였다.

[0387] 마우스 혈청 샘플 및 눈 용해물에서 <VEGF/ANG-2> 항체를 정량하기 위해, 포획 항체 및 검출 항체로서 사용된 바이오티닐화된 단일클론 항체 및 디곡시게닌화된 단일클론 항체를 사용하는 표준 고체상 연속 샌드위치 면역분석을 수행하였다. 분석물의 이중특이성의 온전함을 검증하기 위해, 바이오티닐화된 포획 항체는 항-VEGF 결합 부위를 인식하는 반면, 디곡시게닌화된 검출 항체는 분석물의 항-Ang2 결합 부위에 결합할 것이다. 그 다음, 스트렙타비딘으로 코팅된 마이크로타이터 플레이트(SA-MTP)의 고체상에서 포획 항체, 분석물 및 검출 항체로 이루어진 결합된 면역 복합체를 항-디곡시게닌 항체에 커플링된 호스라디쉬-페록시다제로 검출하였다. SA-MTP로부터 비-결합된 물질을 세척하고 ABTS-기질을 첨가한 후, 수득된 신호는 SA-MTP의 고체상에 결합된 분석물의 양에 비례한다. 그 다음, 동시에 분석된 보정제를 참조하면서 샘플의 측정된 신호를 농도로 전환함으로써 정량을 수행하였다.

[0388] 제1 단계에서, MTP-진탕기 상에서 500 rpm에서 1시간 동안 1 μ g/ml의 농도로 웰 당 100 μ l의 바이오티닐화된 포획 항체 용액(mAb<Id<VEGF>>M-2.45.51-IgG-Bi(DDS))을 사용하여 SA-MTP를 코팅하였다. 한편, 보정제, QC-샘플 및 샘플을 제조하였다. 보정제 및 QC-샘플을 2% 혈청 매트릭스까지 희석하고; 신호가 보정제의 선형 범위 내에 있을 때까지 샘플을 희석하였다.

[0389] SA-MTP를 포획 항체로 코팅한 후, 플레이트를 웰 당 300 μ l의 세척 완충제로 3회 세척하였다. 그 후, 웰 당 100 μ l의 보정제, QC-샘플 및 샘플을 SA-MTP 상에 펴랫팅하고 500 rpm에서 1시간 동안 다시 항온처리하였다. 분석물을 SA-MTP의 고체상에 포획 항체를 통해 그의 항-VEGF 결합 부위로 결합하였다. 항온처리 및 플레이트의 세척에 의한 비-결합된 분석물의 제거 후, 250 ng/ml의 농도로 웰 당 100 μ l의 제1 검출 항체(mAb<Id-<Ang2>>M-2.6.81-IgG-Dig(XOSu))를 SA-MTP에 첨가하였다. 다시, 플레이트를 진탕기 상에서 500 rpm에서 1시간 동안 항온처리하였다. 세척 후, 50 mU/ml의 농도로 웰 당 100 μ l의 제2 검출 항체(pAb<디곡시게닌>S-Fab-POD(poly))를 SA-MTP의 웰에 첨가하고, 플레이트를 500 rpm에서 1시간 동안 다시 항온처리하였다. 여분의 검출 항체를 제거하기 위한 최종 세척 단계 후, 웰 당 100 μ l의 기질(ABTS)을 첨가하였다. 항체-효소 접합체는 ABTS® 기질의 발색 반응을 촉진한다. 그 다음, 405 nm 파장(기준 파장: 490 nm([405/490] nm))에서 ELISA 판독기로 신호를 측정하였다.

[0390] 약동학적 평가

[0391] 약동학적 평가 프로그램 윈놀린(WinNonlin)TM(파사이트(Pharsight))), 버전 5.2.1을 이용하여 비-구획 분석으로 약동학적 파라미터를 계산하였다.

[0392] 결과: A) 혈청 농도

[0393] 혈청 농도에 대한 결과는 표 13 내지 16, 및 도 7b 및 7c에 제시되어 있다.

[0394]

[표 13]

VEGFang2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음): 유리체내 및 정맥내 적용 후 혈청 농도의 비교

ID	<u>유리체내 적용 후 혈청 농도</u>	<u>정맥내 적용 후 혈청 농도</u>
	평균 농도 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	평균 농도 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
1 시간		17.7
2 시간	9.8	
7 시간	10.4	12.1
24 시간	6.4	8.3
48 시간	6.5	6.9
96 시간	3.4	4.1
168 시간	2.9	2.7

[0395]

[표 14]

VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐): 유리체내 및 정맥내 적용 후 혈청 농도의 비교

ID	<u>유리체내 적용 후 혈청 농도</u>	<u>정맥내 적용 후 혈청 농도</u>
	평균 농도 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	평균 농도 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
1 시간		18.4
2 시간	7.0	
7 시간	8.7	10.0
24 시간	2.2	3.3
48 시간	1.0	1.0
96 시간	0.1	0.1
168 시간	0.0	0.0

[0397]

[표 15]

VEGFang2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음) 및 VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐): 유리체내 적용 후 혈청 농도의 비교

ID	VEGFang2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음)	VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)
	평균 농도 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	평균 농도 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
2 시간	9.8	7.0
7 시간	10.4	8.7
24 시간	6.4	2.2
48 시간	6.5	1.0
96 시간	3.4	0.1
168 시간	2.9	0.0

[0399]

[0400]

[표 16]

VEGFang2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음) 및 VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐): 정맥내 적용 후 혈청 농도의 비교

	VEGFang2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음)	VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)
ID	평균 농도 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	평균 농도 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
1 시간	17.7	18.4
7 시간	12.1	10.0
24 시간	8.3	3.3
48 시간	6.9	1.0
96 시간	4.1	0.1
168 시간	2.7	0.0

[0401]

결과: B) 좌측 눈 및 우측 눈의 눈 용해물에서의 농도

[0403]

눈 용해물에서의 농도에 대한 결과는 표 17 및 18, 및 도 7d 및 7e에 제시되어 있다.

[0404]

[표 17a]

우측 눈 내로의 유리체내 적용 후 눈 용해물에서 VEGFang2-0015(AAA
돌연변이를 갖지 않음)의 농도

n=6 마우스들로부터의 평균 농도 값		
ID	평균 농도 [ng/mL]	
96 시간	좌측 눈	8.7
	우측 눈	46.1
168 시간	좌측 눈	4.3
	우측 눈	12.9

[0405]

[표 17b]

정맥내 적용 후 눈 용해물에서 VEGFang2-0015(AAA 돌연변이를 갖지
않음)의 농도

n=5 마우스들로부터의 평균 농도 값		
ID	평균 농도 [ng/mL]	
96 시간	좌측 눈	4.2
	우측 눈	7.5
168 시간	좌측 눈	3.4
	우측 눈	6.1

[0407]

[0408]

[표 18a]

우측 눈 내로의 유리체내 적용 후 눈 용해물에서 VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)의 농도

n=5 마우스들로부터의 평균 농도 값		
ID	평균 농도 [ng/ml]	
96 시간	좌측 눈	0.3
	우측 눈	34.5
168 시간	좌측 눈	0.1
	우측 눈	9.0

[0409]

[표 18b]

정맥내 적용 후 눈 용해물에서 VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)의 농도

n=5 마우스들로부터의 평균 농도 값		
ID	평균 농도 [ng/ml]	
96 시간	좌측 눈	0.0
	우측 눈	0.1
168 시간	좌측 눈	0.0
	우측 눈	0.1

[0411]

결과의 요약:

[0413]

유리체내 적용 후, 본 발명에 따른 이중특이적 <VEGF/ANG-2> 항체인 VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)은 AAA 돌연변이를 갖지 않는 이중특이적 <VEGF/ANG-2> 항체인 VEGFang2-0015에 비해 눈 용해물에서 (96시간 및 168시간 후) 유사한 농도를 보인다.

[0414]

또한, 유리체내 적용 후, 본 발명에 따른 이중특이적 <VEGF/ANG-2> 항체인 VEGFang2-0016(AAA 돌연변이를 가짐)은 AAA 돌연변이를 갖지 않는 이중특이적 <VEGF/ANG-2> 항체인 VEGFang2-0015에 비해 혈청에서 보다 빠른 제거 및 보다 짧은 반감기도 보인다.

[0415]

실시예 7

[0416]

마우스 각막 마이크로포켓 혈관신생 분석

[0417]

서열번호 7 및 서열번호 8의 항-VEGF VH 및 VL, 및 서열번호 15 및 서열번호 16의 항-ANG-2 VH 및 VL을 갖는 이중특이적 <VEGF/ANG-2> 항체가 생체내에서 VEGF-유도된 혈관신생에 미치는 항-혈관신생 효과를 시험하기 위해, 본 발명자들은 마우스 각막 혈관신생 분석을 수행하였다. 이 분석에서, VEGF-함침된 나일라플로 (Nylaflo) 원반을 윤부 혈관으로부터 고정된 거리를 두고 무혈관 각막의 포켓 내로 이식하였다. 혈관은 발생하는 VEGF 구배를 향하여 각막 내로 즉시 성장하였다. 8주령 내지 10주령의 암컷 Balb/c 마우스들을 찰스 리버 (Charles River)(독일 슐츠펠트 소재)로부터 구입하였다. 프로토콜을 문현(Rogers, M.S., et al., Nat. Protoc. 2 (2007) 2545-2550)에 기재된 방법에 따라 변경시켰다. 요약하건대, 마취된 마우스에서 수술용 칼 및 날카로운 집게를 이용하여 윤부부터 각막의 상부까지 약 1 mm에서 약 500 μ m의 폭을 갖는 마이크로포켓을 현미경 하에서 만들었다. 0.6 mm의 직경을 갖는 원반(나일라플로®, 팔 코포레이션(Pall Corporation), 미국 미시간주 소재)을 이식하고 이식 영역의 표면을 매끄럽게 하였다. 원반을 30분 이상 동안 상응하는 성장인자 또는 비히클과 함께 항온처리하였다. 3일, 5일 및 7일(또는 대안적으로 단지 3일, 5일 또는 7일) 후, 눈을 촬영하고 혈관 반응을 측정하였다. 각막의 총 면적 당 신생 혈관의 면적의 백분율을 계산함으로써 분석을 정량하였다.

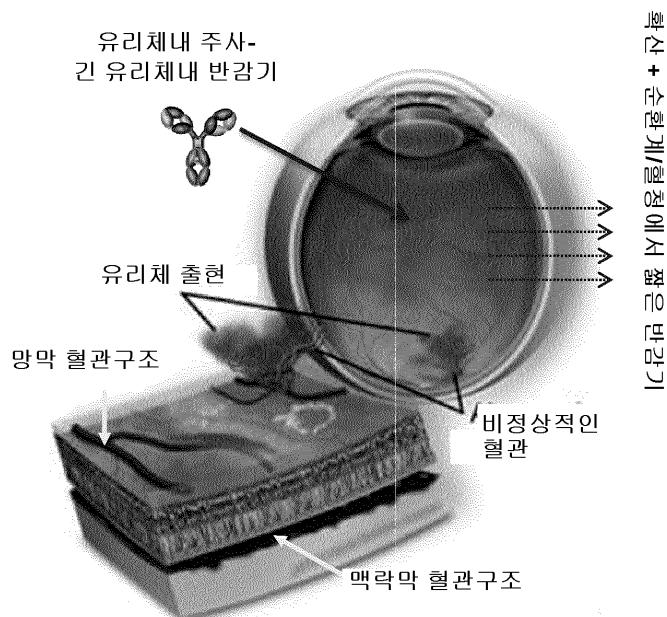
[0418]

원반을 300 ng의 VEGF, 또는 대조군으로서 PBS로 적재하고 7일 동안 이식시켰다. 윤부부터 원반까지 혈관의 과다성장을 3일째 날, 5일째 날 및/또는 7일째 날에 시간의 경과에 따라 모니터링하였다. 원반 이식 1일 전, 생체내에서 VEGF-유도된 혈관신생에 대한 항-혈관신생 효과를 시험하기 위해 항체를 10 mg/kg의 용량으로 정맥내

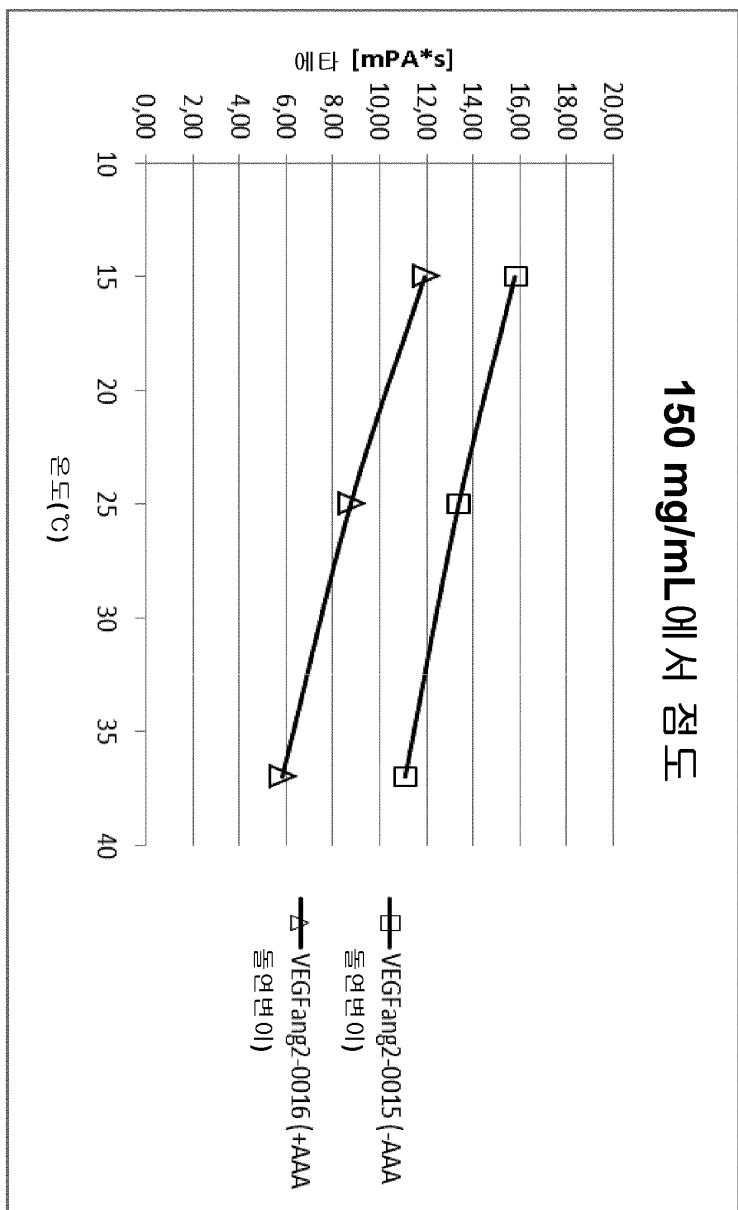
로 투여하였다(정맥내 적용으로 인해, AAA 돌연변이에 의해서만 VEGFang2-0016과 구별되고 효능을 매개하기 위한 동일한 항-VEGF 및 항-ANG-2 VH들 및 VL들을 갖는 혈청 안정성 VEGFang2-0015(AAA 돌연변이를 갖지 않음)가 대용물로서 사용된다). 대조군의 동물들은 비히클을 제공받았다. 적용 부피는 10 ml/kg이었다.

도면

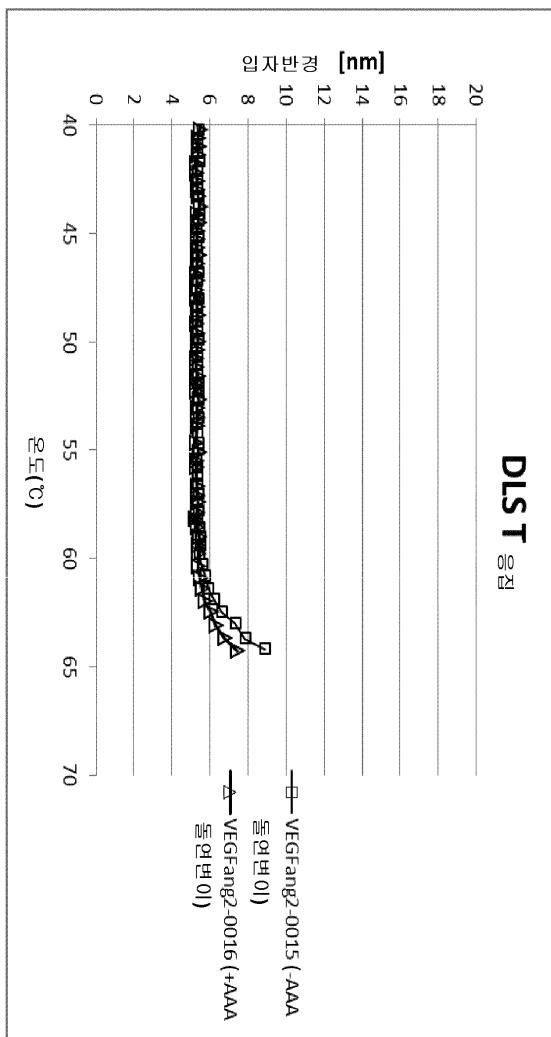
도면1



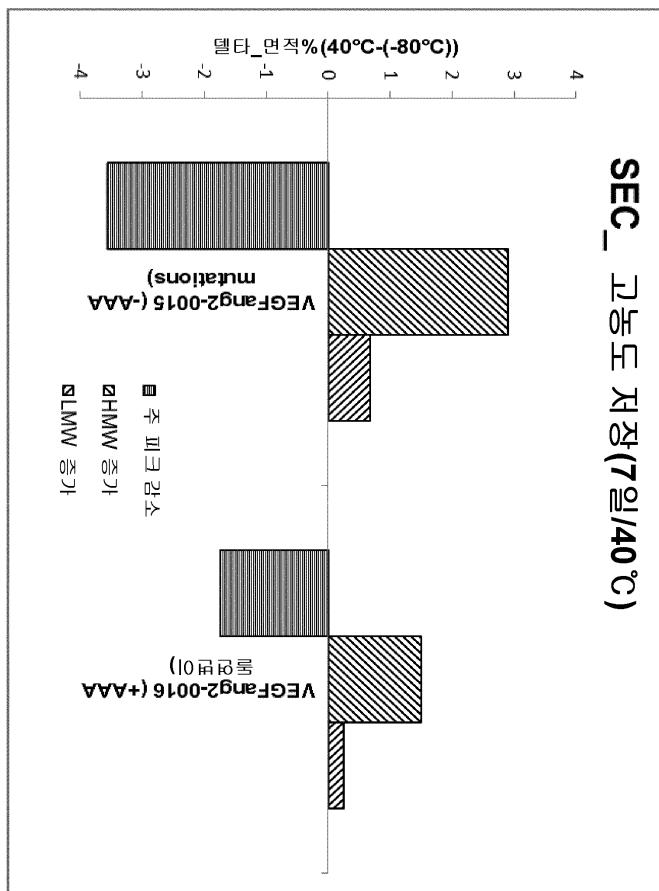
도면2



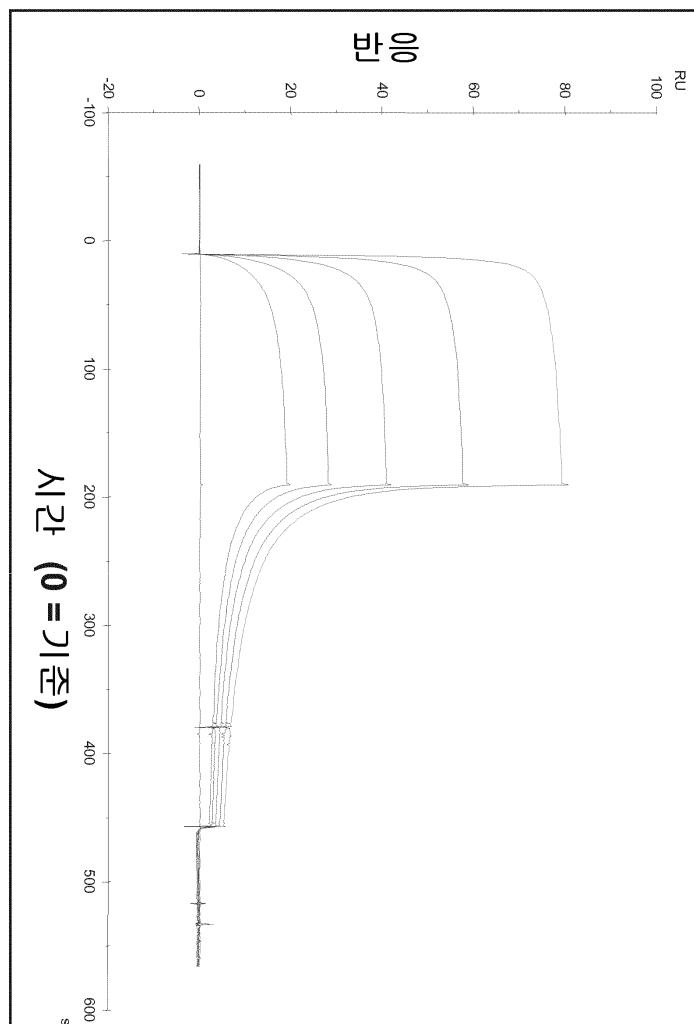
도면3



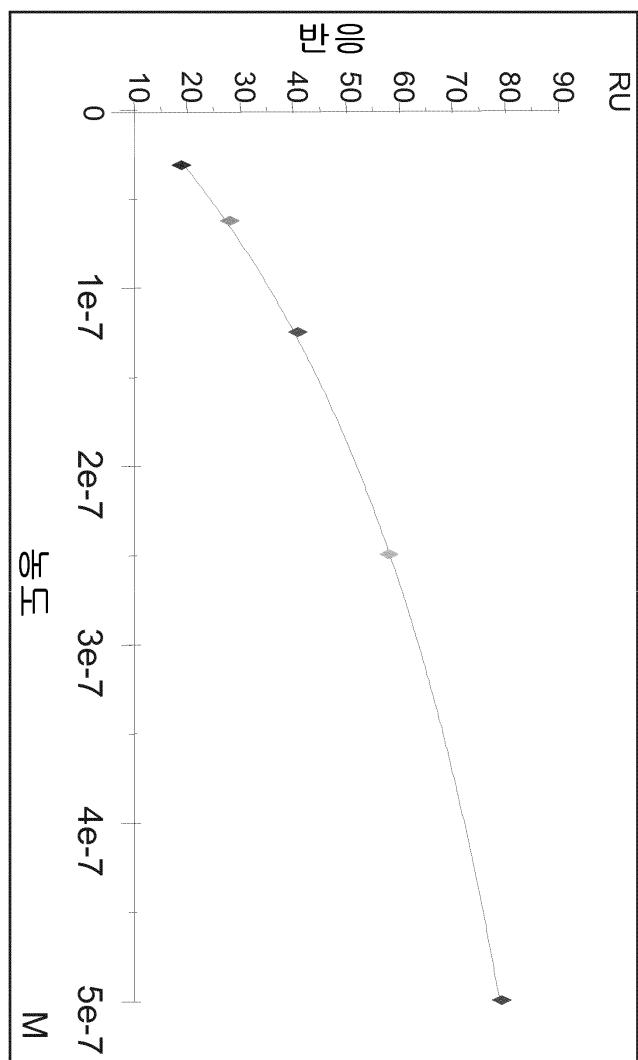
도면4



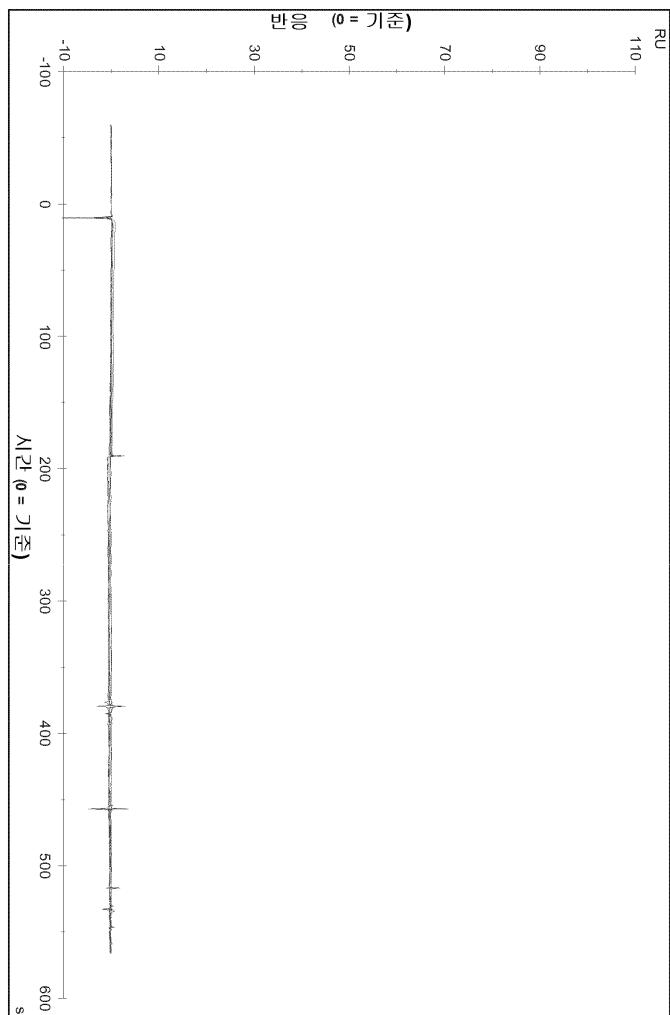
도면5a



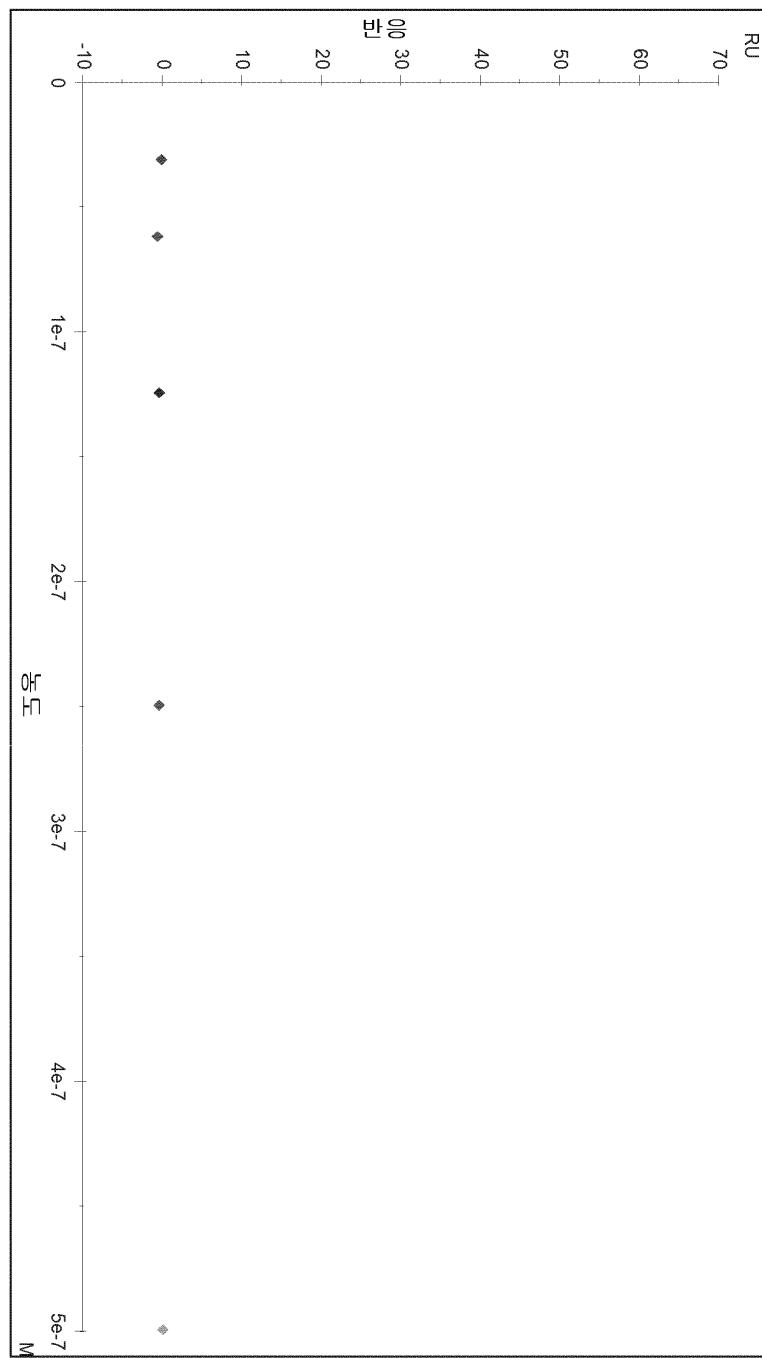
도면5b



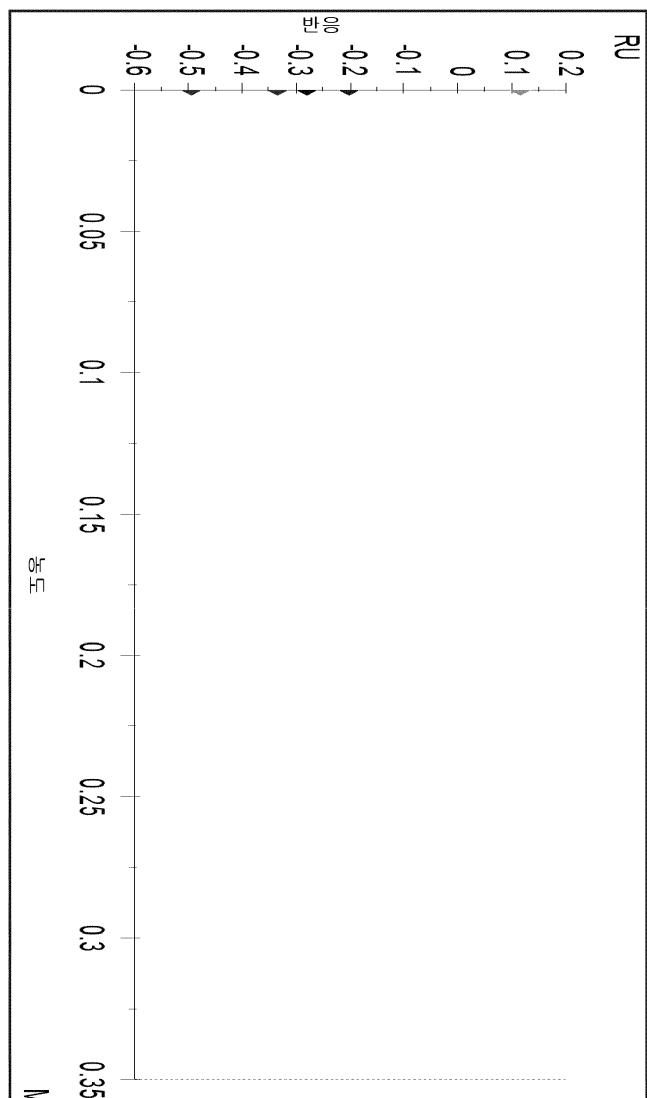
도면5c



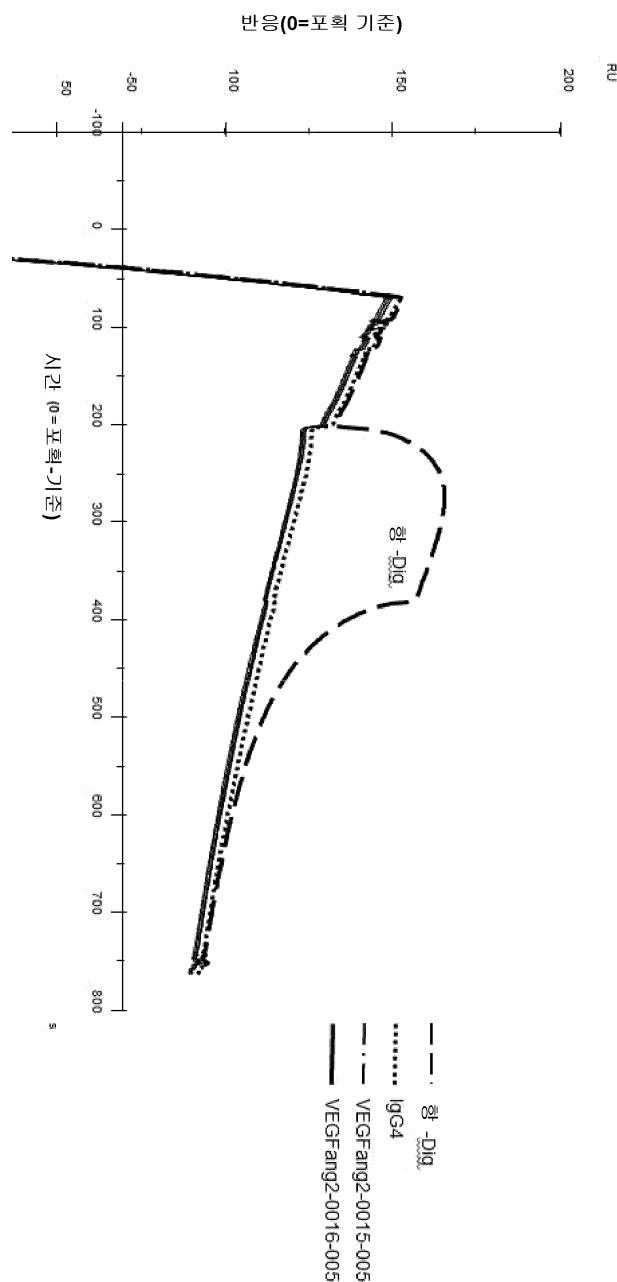
도면5d



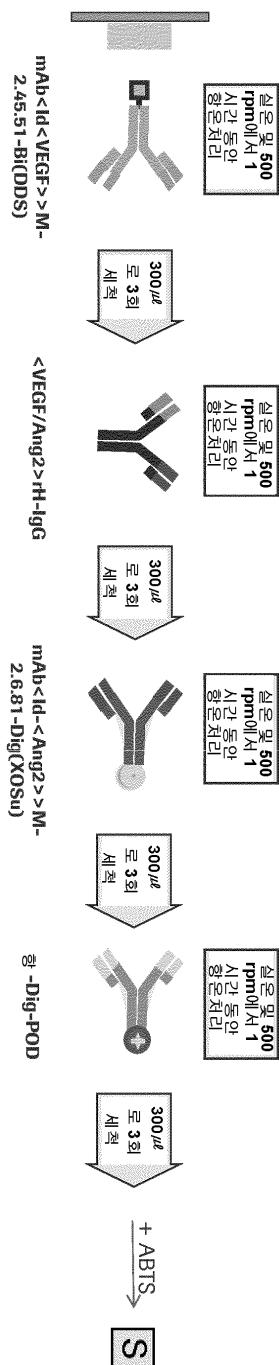
도면5e



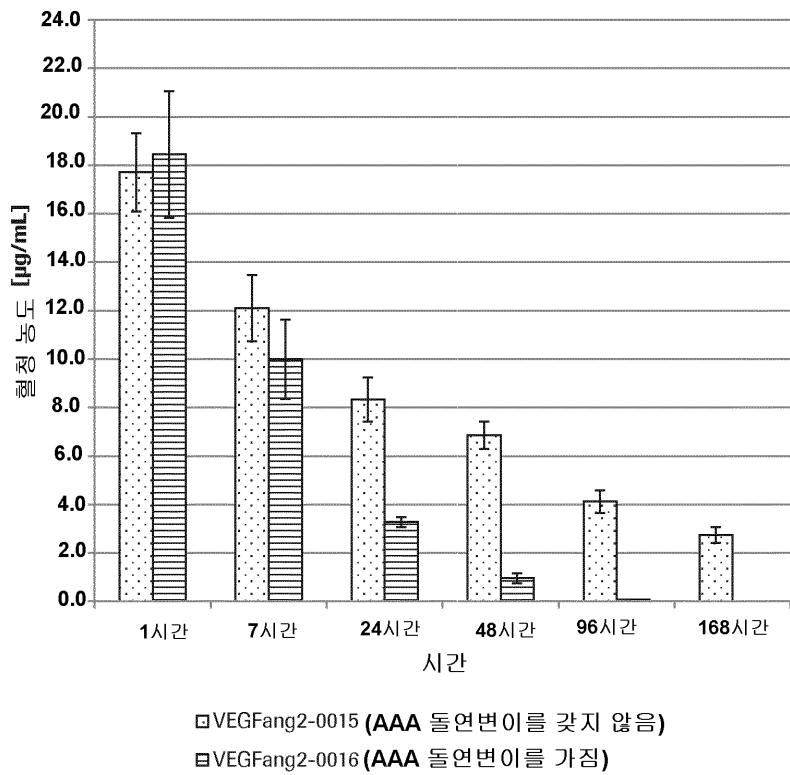
도면6



도면 7a

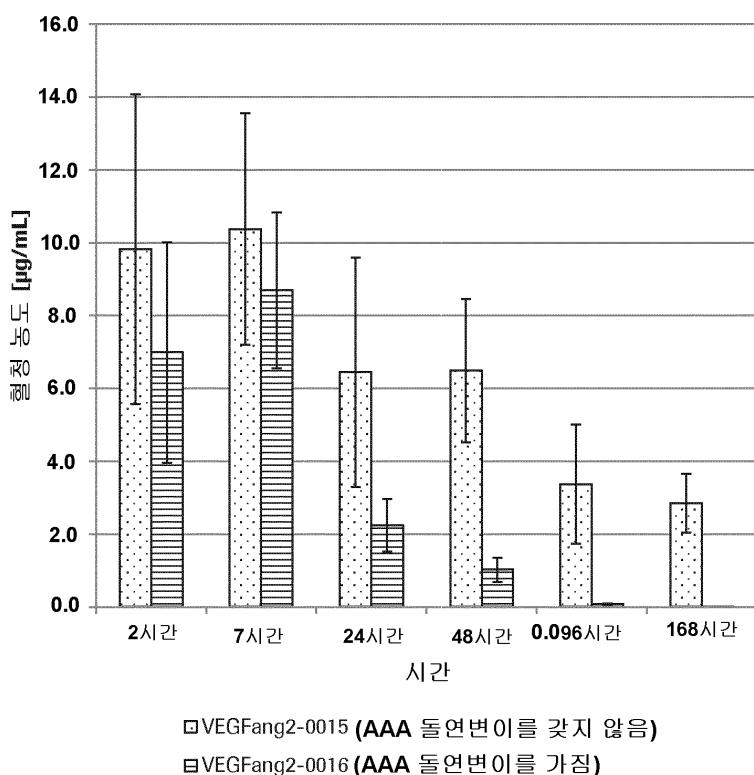


도면7b



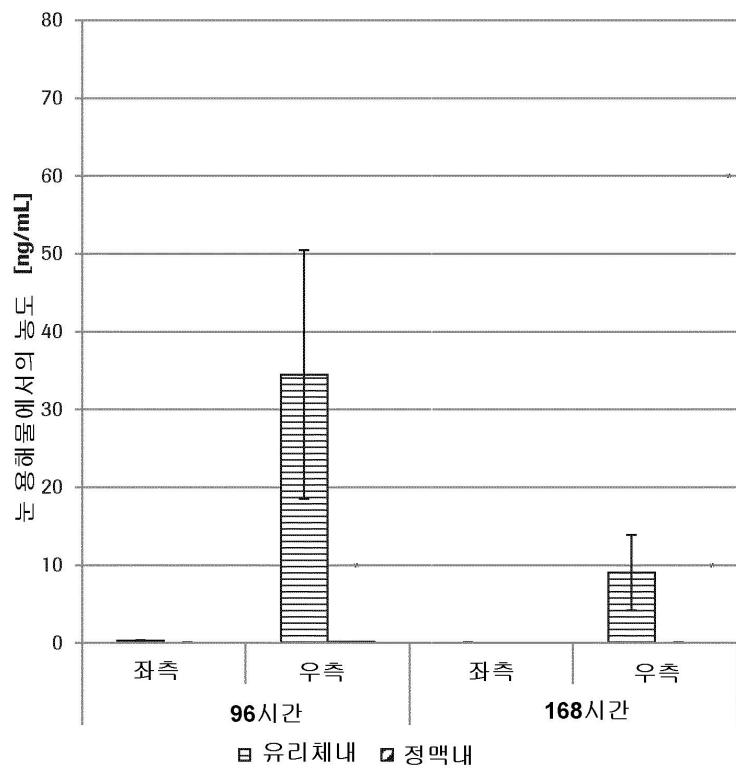
□VEGFang2-0015 (AAA 돌연변이를 갖지 않음)
▨VEGFang2-0016 (AAA 돌연변이를 가짐)

도면7c

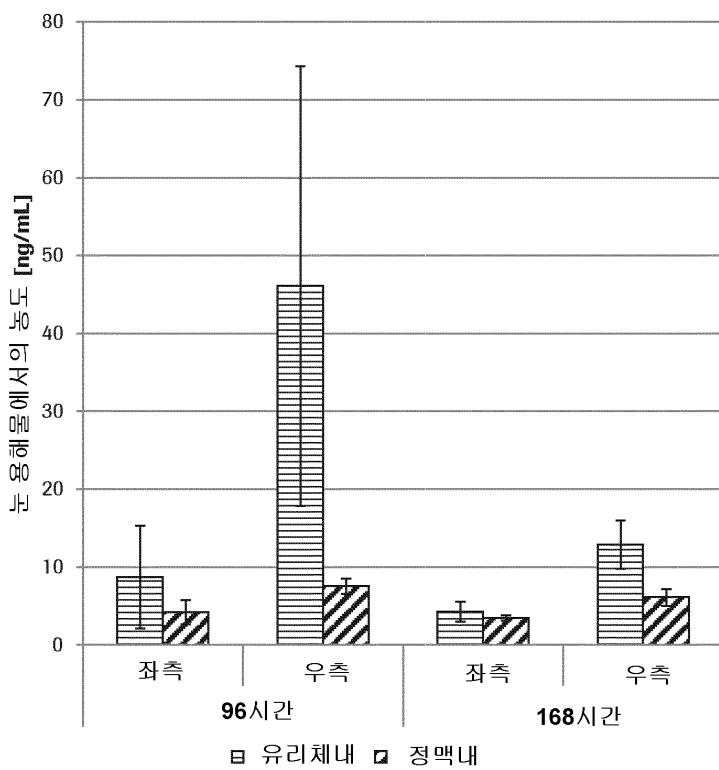


□VEGFang2-0015 (AAA 돌연변이를 갖지 않음)
▨VEGFang2-0016 (AAA 돌연변이를 가짐)

도면7d



도면7e



서 열 목 록

<110> Roche Glycart AG

<120> Bispecific anti-VEGF/anti-ANG-2 antibodies and their use in the treatment of ocular vascular diseases

<130> 31094 WO

<140> PCT/EP2013/064672

<141> 2013-07-11

<150> EP12176299.1

<151> 2012-07-13

<160> 50

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR3H, <VEGF>ranibizumab

<400> 1

Tyr Pro Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

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

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR2H, <VEGF>ranibizumab

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR1H, <VEGF>ranibizumab

<400> 3

His Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR3L,

<VEGF>ranibizumab

<400> 4

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR2L, <VEGF>ranibizumab

<400> 5

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR1L, <VEGF>ranibizumab

<400> 6

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 7

<211

> 123

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain VH, <VEGF>ranibizumab

<400> 7

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

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> light chain variable domain VL, <VEGF>ranibizumab
 <400> 8
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR3H, <ANG-2> Ang2i_LC10 variant

<400> 9

Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly

1 5 10 15

Ala Phe Asp Ile

20

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR2H, <ANG-2> Ang2i_LC10 variant

<400> 10

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

1 5 10 15

Gly

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR1H, <ANG-2> Ang2i_LC10 variant

<400> 11

Gly Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR3L, <ANG-2> Ang2i_LC10 variant

<400> 12

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val

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

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR2L, <ANG-2> Ang2i_LC10 variant

<400> 13

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser

1	5
---	---

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR1L, <ANG-2> Ang2i_LC10 variant

<400> 14

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His

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

<210> 15

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial

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

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20	25	30
----	----	----

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr

100 105 110

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

115 120 125

Ser

<210> 16

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain variable domain VL,

<ANG-2> Ang2i_LC10 variant

<400> 16

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

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

	100	105	110	
<210>	17			
<211>	191			
<212>	PRT			
<213>	Homo sapiens			
<400>	17			
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu				
	1	5	10	
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	Glu	
Val	Val	Lys	Phe	
Met	Asp	Val	Tyr	
	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	Gln	Ile	
Met	Arg	Ile	Lys	
	Pro	His	Pro	
Gln	Gly	Gln	Asn	
His	Ile	Gly	Glu	
Glu	Met	Ser	Phe	
Leu	Gln	His	Asn	
	100	105	110	
Gly	Gln	Asn	Lys	
	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	
His	Leu	Phe	Val	
Gln	Asp	Pro	Gln	
	145	150	155	160
Cys	Lys	Cys	Ser	
Cys	Lys	Asn	Thr	
Asp	Ser	Arg	Cys	
Cys	Lys	Ala	Arg	
	165	170	175	
Leu	Glu	Leu	Asn	
Glu	Arg	Thr	Cys	
Arg	Cys	Asp	Lys	
	Pro	Arg	Arg	
	180	185	190	
<210>	18			
<211>	496			

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Trp Gln Ile Val Phe Phe Thr Leu Ser Cys Asp Leu Val Leu Ala

1 5 10 15

Ala Ala Tyr Asn Asn Phe Arg Lys Ser Met Asp Ser Ile Gly Lys Lys

20 25 30

Gln Tyr Gln Val Gln His Gly Ser Cys Ser Tyr Thr Phe Leu Leu Pro

35 40 45

Glu Met Asp Asn Cys Arg Ser Ser Ser Pro Tyr Val Ser Asn Ala

50 55 60

Val Gln Arg Asp Ala Pro Leu Glu Tyr Asp Asp Ser Val Gln Arg Leu

65 70 75 80

Gln Val Leu Glu Asn Ile Met Glu Asn Asn Thr Gln Trp Leu Met Lys

85 90 95

Leu Glu Asn Tyr Ile Gln Asp Asn Met Lys Lys Glu Met Val Glu Ile

100 105 110

Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn Gln Thr Ala Val Met Ile Glu Ile Gly

115 120 125

Thr Asn Leu Leu Asn Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys Leu Thr Asp

130 135 140

Val Glu Ala Gln Val Leu Asn Gln Thr Thr Arg Leu Glu Leu Gln Leu

145 150 155 160

Leu Glu His Ser Leu Ser Thr Asn Lys Leu Glu Lys Gln Ile Leu Asp

165 170 175

Gln Thr Ser Glu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Lys Asn Ser Phe Leu Glu

180 185 190

Lys Lys Val Leu Ala Met Glu Asp Lys His Ile Ile Gln Leu Gln Ser

195 200 205

Ile Lys Glu Glu Lys Asp Gln Leu Gln Val Leu Val Ser Lys Gln Asn

210 215 220

Ser Ile Ile Glu Glu Leu Glu Lys Lys Ile Val Thr Ala Thr Val Asn
 225 230 235 240
 Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln His Asp Leu Met Glu Thr Val Asn
 245 250 255

 Asn Leu Leu Thr Met Met Ser Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asp Pro Thr
 260 265 270
 Val Ala Lys Glu Glu Gln Ile Ser Phe Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe
 275 280 285
 Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn
 290 295 300
 Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly
 305 310 315 320

 Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln
 325 330 335
 Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu
 340 345 350
 Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg
 355 360 365
 Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr
 370 375 380

 Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg
 385 390 395 400
 Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile
 405 410 415
 Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys
 420 425 430
 Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp
 435 440 445

 Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln
 450 455 460
 Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser

465 470 475 480

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

485 490 495

<210> 19

<211> 498

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Thr Val Phe Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Ala Ile Leu Thr His

1 5 10 15

Ile Gly Cys Ser Asn Gln Arg Arg Ser Pro Glu Asn Ser Gly Arg Arg

20 25 30

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

35 40 45

Glu His Asp Gly Asn Cys Arg Glu Ser Thr Thr Asp Gln Tyr Asn Thr

50 55 60

Asn Ala Leu Gln Arg Asp Ala Pro His Val Glu Pro Asp Phe Ser Ser

65 70 75 80

Gln Lys Leu Gln His Leu Glu His Val Met Glu Asn Tyr Thr Gln Trp

85 90 95

Leu Gln Lys Leu Glu Asn Tyr Ile Val Glu Asn Met Lys Ser Glu Met

100 105 110

Ala Gln Ile Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr Met Leu

115 120 125

Glu Ile Gly Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

Ile Gln Leu Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln

165 170 175

Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser

180 185 190

Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu

195 200 205

Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr

210 215 220

Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala

225 230 235 240

Thr Thr Asn Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu Met Asp

245 250 255

Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu

260 265 270

Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp

275 280 285

Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile

290 295 300

Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg

370 375 380

Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn

385 390 395 400

Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser

405 410 415

Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn

420 425 430

Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp

435

440

445

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

450

455

460

Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys

465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu

485

490

495

Asp Phe

<210> 20

<211> 1124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ser Gly Thr Val Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu

20 25 30

Pro Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly

35 40 45

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

50 55 60

Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg

65 70 75 80

Glu Trp Ala Lys Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile

85 90 95

Asn Gly Ala Tyr Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg

100 105 110

Ile Arg Thr Met Lys Met Arg Gln Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr

115 120 125

Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn Ile Ser Phe Lys

130	135	140
Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser		
145	150	155
Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val		
165	170	175
His Leu Pro His Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg		
180	185	190
Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val		
195	200	205
Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn His Leu Cys		
210	215	220
Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys		
225	230	235
Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu		
245	250	255
Leu His Thr Phe Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu		
260	265	270
Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser		
275	280	285
Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys His Pro		
290	295	300
Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly		
305	310	315
Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln		
325	330	335
Gly Leu Gln Cys Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Thr Pro Lys Ile		
340	345	350
Val Asp Leu Pro Asp His Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys Phe Asn Pro		
355	360	365
Ile Cys Lys Ala Ser Gly Trp Pro Leu Pro Thr Asn Glu Glu Met Thr		
370	375	380

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Ser Glu Asp Leu Thr Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro

625	630	635	640
Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val			
645	650	655	
Ile Ser Trp Thr Ile Leu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Thr Ile			
660	665	670	
Arg Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Val Asp Val Lys			
675	680	685	
Ile Lys Asn Ala Thr Ile Thr Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro			
690	695	700	
Glu Thr Ala Tyr Gln Val Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser			
705	710	715	720
Ser Asn Pro Ala Phe Ser His Glu Leu Val Thr Leu Pro Glu Ser Gln			
725	730	735	
Ala Pro Ala Asp Leu Gly Gly Lys Met Leu Leu Ile Ala Ile Leu			
740	745	750	
Gly Ser Ala Gly Met Thr Cys Leu Thr Val Leu Leu Ala Phe Leu Ile			
755	760	765	
Ile Leu Gln Leu Lys Arg Ala Asn Val Gln Arg Arg Met Ala Gln Ala			
770	775	780	
Phe Gln Asn Val Arg Glu Glu Pro Ala Val Gln Phe Asn Ser Gly Thr			
785	790	795	800
Leu Ala Leu Asn Arg Lys Val Lys Asn Asn Pro Asp Pro Thr Ile Tyr			
805	810	815	
Pro Val Leu Asp Trp Asn Asp Ile Lys Phe Gln Asp Val Ile Gly Glu			
820	825	830	
Gly Asn Phe Gly Gln Val Leu Lys Ala Arg Ile Lys Lys Asp Gly Leu			
835	840	845	
Arg Met Asp Ala Ala Ile Lys Arg Met Lys Glu Tyr Ala Ser Lys Asp			
850	855	860	
Asp His Arg Asp Phe Ala Gly Glu Leu Glu Val Leu Cys Lys Leu Gly			
865	870	875	880

His His Pro Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Glu His Arg Gly
 885 890 895
 Tyr Leu Tyr Leu Ala Ile Glu Tyr Ala Pro His Gly Asn Leu Leu Asp
 900 905 910

Phe Leu Arg Lys Ser Arg Val Leu Glu Thr Asp Pro Ala Phe Ala Ile
 915 920 925
 Ala Asn Ser Thr Ala Ser Thr Leu Ser Ser Gln Gln Leu Leu His Phe
 930 935 940
 Ala Ala Asp Val Ala Arg Gly Met Asp Tyr Leu Ser Gln Lys Gln Phe
 945 950 955 960
 Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn Tyr
 965 970 975

Val Ala Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ser Arg Gly Gln Glu Val Tyr
 980 985 990
 Val Lys Lys Thr Met Gly Arg Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Ile Glu
 995 1000 1005
 Ser Leu Asn Tyr Ser Val Tyr Thr Thr Asn Ser Asp Val Trp Ser
 1010 1015 1020
 Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Val Ser Leu Gly Gly Thr Pro
 1025 1030 1035

Tyr Cys Gly Met Thr Cys Ala Glu Leu Tyr Glu Lys Leu Pro Gln
 1040 1045 1050
 Gly Tyr Arg Leu Glu Lys Pro Leu Asn Cys Asp Asp Glu Val Tyr
 1055 1060 1065
 Asp Leu Met Arg Gln Cys Trp Arg Glu Lys Pro Tyr Glu Arg Pro
 1070 1075 1080
 Ser Phe Ala Gln Ile Leu Val Ser Leu Asn Arg Met Leu Glu Glu
 1085 1090 1095

Arg Lys Thr Tyr Val Asn Thr Thr Leu Tyr Glu Lys Phe Thr Tyr
 1100 1105 1110
 Ala Gly Ile Asp Cys Ser Ala Glu Glu Ala Ala

1115 1120

<210> 21

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain 1 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 with AAA mutations
(VEGFang2-0012)

<400> 21

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

50	55	60
----	----	----

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

165	170	175
-----	-----	-----

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

180	185	190
-----	-----	-----

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val

195 200 205

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

210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu

305 310 315 320

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

325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys

450

<210> 22

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy

chain 2 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 with AAA mutations

(VEGFang2-0012)

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr

100 105 110

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

115 120 125

Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

195 200 205

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

210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His

225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

245 250 255

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

260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

275 280 285

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

290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

305 310 315 320

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

325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

420	425	430
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
435	440	445
His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
450	455	460
<210> 23		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> Light chain 1 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 with AAA mutations (VEGFang2-0012)		
<400> 23		
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
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
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		

145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
165	170	175	
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
180	185	190	
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
195	200	205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210			

<210> 24

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Light chain 2 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 with AAA mutations
(VEGF-Ang2-0012)

<400> 24

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val

20	25	30
----	----	----

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser

100	105	110
-----	-----	-----

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr

115	120	125
-----	-----	-----

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

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

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

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

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

Glu Pro Lys Ser Cys

210

<210> 25

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain 1 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 with AAA mutations
 and P329G LALA mutations (VEGFang2-0016)

<400> 25

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

1 5 10 15

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

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

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

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

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

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

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

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

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

385 390 395 400

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

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys

450

<210

> 26

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain 2 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 with AAA mutations

and P329G LALA mutations (VEGFang2-0016)

<400> 26

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

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

35 40 45

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

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

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

85	90	95
Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr		
100	105	110
Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser		
115	120	125
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
130	135	140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
145	150	155
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
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val		
245	250	255
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr		
260	265	270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
275	280	285
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
290	295	300
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
305	310	315
Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
325	330	335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

<210> 27

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Light chain 1 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 with AAA mutations

and P329G LALA mutations (VEGFang2-0016)

<400

> 27

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 28

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Light chain 2 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 with AAA mutations
 and P329G LALA mutations (VEGFang2-0016)

<400> 28

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr

35	40	45
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser		
50	55	60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly		
65	70	75
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His		

85	90	95
Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser		
100	105	110
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
115	120	125
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
130	135	140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
145	150	155
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 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
180	185	190
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
195	200	205

Glu Pro Lys Ser Cys

210		
<210> 29		
<211> 450		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> Heavy chain 1 of <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG4 with AAA mutations		
and with SPLE mutations		
<400> 29		

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 210 215 220
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu

260	265	270
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu		
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys		
340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
355	360	365
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
385	390	395
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp		
405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
420	425	430
Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu		
435	440	445
Gly Lys		
450		
<210> 30		
<211> 460		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> Heavy chain 2 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 with AAA mutations		
and with SPLE mutations		
<400> 30		

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr

100 105 110

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

115 120 125

Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

245	250	255
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val		
260	265	270
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe		
275	280	285
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
290	295	300
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
305	310	315
Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
325	330	335
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
340	345	350
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln		
355	360	365
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly		
370	375	380
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
385	390	395
400		
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
405	410	415
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu		
420	425	430
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala		
435	440	445
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
450	455	460
<210> 31		
<211		
> 214		
<212> PRT		
<213> Artificial		

<220><223> Light chain 1 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 with AAA mutations
and with SPLE mutations

<400> 31

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 32

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Light chain 2 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 with AAA mutations
and with SPLE mutations

<400> 32

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

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

195

200

205

Glu Ser Lys Tyr Gly

210

<210> 33

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain 1 of <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 with AAA mutations

<400> 33

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

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

50

55

60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly

130

135

140

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

145

150

155

160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

165

170

175

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

180	185	190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val		
195	200	205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys		
210	215	220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		
225	230	235
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
245	250	255
Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
260	265	270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
290	295	300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu		
305	310	315
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
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu		
405	410	415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
420	425	430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 34
 <211> 705
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Heavy chain 2 of <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 with AAA mutations
 <400> 34
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln

 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95
 Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
 115 120 125
 Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly

 130 135 140
 Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Thr Thr 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 Ser Gly Gly Gly Ser
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu
 245 250 255
 Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 260 265 270
 Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 275 280 285
 Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
 290 295 300
 Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
 305 310 315 320
 Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp
 325 330 335
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Asp
 340 345 350
 Ser Ser Gly 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
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
485	490	495
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser		
500	505	510
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
515	520	525
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
530	535	540
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
545	550	555
Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
565	570	575
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
580	585	590
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
595	600	605
Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp		
610	615	620
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
625	630	635
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
645	650	655
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
660	665	670

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

675 680 685

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

690 695 700

Lys

705

<210> 35

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Light chain 1 of <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 with AAA mutations

<400> 35

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 36

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain 1 of <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 with AAA mutations

and with SPLE mutations

<400> 36

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser

130	135	140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
145	150	155
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 Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val		
195	200	205
Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys		
210	215	220
Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly		
225	230	235
240		
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
320		
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu		
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys		
340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
355	360	365
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
370	375	380

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

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

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

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

Gly Lys

450

<210> 37

<211> 702

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain 2 of <VEGF-ANG-2

> OAscFab IgG4 with AAA mutations and

with SPLE mutations

<400> 37

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

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

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

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

50 55 60

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

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

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

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln

115 120 125

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

130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly

145 150 155 160

Val Glu Thr Thr 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 Ser Gly Gly Gly Ser

210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu

245 250 255

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

260 265 270

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

275 280 285

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr

290 295 300

Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr

305 310 315 320

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp

325 330 335

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Asp

340 345 350

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

355 360 365

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

370 375 380

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

385 390 395 400

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

405 410 415

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

420 425 430

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

435 440 445

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

450 455 460

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

465 470 475 480

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe

485 490 495

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

500 505 510

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

515 520 525

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

530 535 540

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

545 550 555 560

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

565 570 575

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

580 585 590

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

595 600 605

Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
 610 615 620
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

625 630 635 640
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 645 650 655
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 660 665 670
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 675 680 685
 Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

690 695 700
 <210> 38
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Light chain 1 of <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 with AAA mutations
 and with SPLE mutations

<400> 38
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95

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

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 39

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain 1 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 wild type (without

AAA mutations) (VEGFang2-0201)

<400> 39

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450
<210> 40
<211> 463
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Heavy chain 2 of <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 wild type (without
 AAA mutations) (VEGFang2-0201)
<400> 40
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr 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
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
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		400
405	410	415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
420	425	430
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
435	440	445
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
450	455	460
<210> 41		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> Light chain 1 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 wild type (without		

AAA mutations) (VEGFang2-0201)

<400> 41			
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr			
20	25	30	

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 42

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Light chain 2 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 wild type (without
AAA mutations) (VEGFang2-0201)

<400> 42

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

1	5	10	15												
Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Gly	Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Val
20				25											
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Val	Tyr
35					40										
Asp	Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
50					55										
Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly
65					70				75						
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His															
85				90											
Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	
100					105										
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr
115					120										
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
130				135											
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val															
145				150				155							
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
165					170										
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	
180					185										
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val
195					200										
Glu Pro Lys Ser Cys															
210															
<210>	43														
<211>	453														
<212>	PRT														
<213>	Artificial														

<220><223> Heavy chain 1 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 with P329G LALA mutations only (without AAA mutations) (VEGFang2-0015)

<400> 43

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

165 170 175

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

180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val

195 200 205

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

210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
 225 230 235 240
 Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 44
 <211> 463

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain 2 of <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 with P329G LALA mutations only (without AAA mutations) (VEGFang2-0015)

<400> 44

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

130	135	140
-----	-----	-----

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

180	185	190
-----	-----	-----

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

195	200	205
-----	-----	-----

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His
 225 230 235 240
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 245 250 255

 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320

 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys
 325 330 335
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
 355 360 365
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
 370 375 380

 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 405 410 415
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 420 425 430
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445

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

450	455	460	
<210> 45			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220><223> Light chain 1 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 with P329G LALA			
mutations only (without AAA mutations) (VEGFang2-0015)			
<400> 45			
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr			
20 25 30			
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp			
85 90 95			
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
100	105	110	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
115	120	125	
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
130	135	140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145 150 155 160			
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
165	170	175	
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
180	185	190	

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 46

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Light chain 2 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 with P329G LALA
mutations only (without AAA mutations) (VEGFang2-0015)

<400> 46

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

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser

100 105 110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr

115 120 125

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

130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

180 185 190

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

195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys

210

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 48

<211> 105

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 48

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu

1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe

20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val

35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys

50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser

65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu

85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 49

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

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

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 50

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325