



등록특허 10-2543878



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년06월14일  
(11) 등록번호 10-2543878  
(24) 등록일자 2023년06월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 16/22* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
*C07K 16/22* (2013.01)  
*A61K 2039/505* (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-7007756  
(22) 출원일자(국제) 2017년08월22일  
심사청구일자 2020년08월14일  
(85) 번역문제출일자 2019년03월18일  
(65) 공개번호 10-2019-0039577  
(43) 공개일자 2019년04월12일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/071104  
(87) 국제공개번호 WO 2018/037000  
국제공개일자 2018년03월01일  
(30) 우선권주장  
62/378,388 2016년08월23일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020150063847 A\*  
WO2015171747 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 11 항

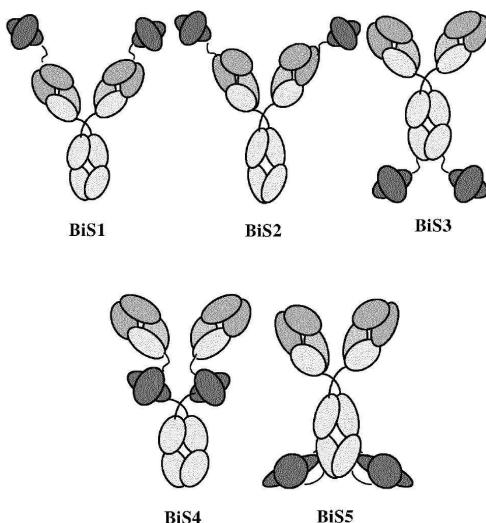
심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 항-V E G F-A 및 항-A N G2 항체 및 이의 용도

**(57) 요 약**

본 발명은 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및 엔지오포이에틴(ANG)에 대한 활성을 갖는 이중특이적 항체, 및 이러한 이중특이적 항체를 제조하고 사용하는 방법에 관한 것이다.

**대 표 도** - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/35 (2013.01)

C07K 2317/522 (2013.01)

C07K 2317/524 (2013.01)

C07K 2317/526 (2013.01)

C07K 2317/53 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

**코프만 카렌**

미국 20878 메릴랜드주 게이티르스부르크 원 메디  
문 웨이 메디뮨 엘엘씨

**플레밍 리안**

미국 20878 메릴랜드주 게이티르스부르크 원 메디  
문 웨이 메디뮨 엘엘씨

**츠이 꽝**

미국 20878 메릴랜드주 게이티르스부르크 원 메디  
문 웨이 메디뮨 엘엘씨

---

**가오 창슈**

미국 20878 메릴랜드주 게이티르스부르크 원 메디  
문 웨이 메디뮨 엘엘씨

**세페다 마리오 에이**

미국 01890 매세츄세츠주 빙체스터 라우렐 힐 레인  
11

**슈왈츠 미텔만 아드리안**

미국 06804 코네티컷주 브룩필드 올드 오크 드라이  
브 9

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

중쇄 상보성 결정 영역 1 내지 3(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3) 및 경쇄 상보성 결정 영역 1 내지 3(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하는 제1 결합 도메인, 및 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체로서, 여기서, 제1 결합 도메인의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 SEQ ID NO: 17 내지 22를 각각 포함하고, 제2 결합 도메인의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 SEQ ID NO: 23 내지 28을 각각 포함하고, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 VEGF189와 비교하여 더 큰 친화성으로 VEGF165에 특이적으로 결합하는 것인 이중특이적 항체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 제1 결합 도메인이 SEQ ID NO: 3 및 9를 각각 포함하는 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 제2 결합 도메인이 SEQ ID NO: 5 및 11을 각각 포함하는 중쇄 및 경쇄를 포함하는, 이중특이적 항체.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 중쇄 아미노산 서열이 SEQ ID NO: 1을 포함하고, 경쇄 아미노산 서열이 SEQ ID NO: 7을 포함하는, 이중특이적 항체.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 이중특이적 항체가 파트 VH-CH1-H-CH2-CH3, VL-CL, 및 하나 이상의 scFv, L1, 또는 선택적으로 L2를 갖는 식을 포함하며, 개별 파트는, VH는 중쇄 가변 도메인이며; CH1은 중쇄 불변 영역 도메인 1이며; H는 힌지 영역이며; CH2는 중쇄 불변 영역 도메인 2이며; CH3은 중쇄 불변 영역 도메인 3이며; VL은 가변 경쇄 도메인이며; CL은 경쇄 불변 도메인이며; L1은 링커이고; L2는 L1과 독립적인 링커이며, 상기 식은 하기의 식일 수 있는, 이중특이적 항체:

- a. VH-CH1-CH2-CH3 및 scFv-L1-VL-CL;
- b. scFv-L1-VH-CH1-CH2-CH3 및 VL-CL;
- c. VH-CH1-CH2-CH3-L1-scFv 및 VL-CL;
- d. VH-CH1-CH2-CH3-L1-scFv-L2 및 VL-CL, 여기서, L1 및 L2는 CH3에 공유 결합됨;
- e. VH-CH1-L1-scFv-L2-CH2-CH3 및 VL-CL, 중쇄는 힌지 영역을 함유하거나 힌지리스일 수 있음.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 식 VH-CH1-CH2-CH3-L1-scFv 및 VL-CL을 포함하는, 이중특이적 항체.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, scFv가 SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열을 포함하는, 이중특이적 항체.

#### 청구항 7

제1항의 이중특이적 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

#### 청구항 8

제1항의 이중특이적 항체를 인코딩하는 핵산을 포함하는, 벡터.

#### 청구항 9

제8항의 벡터를 포함하는, 세포주.

## 청구항 10

제8항의 벡터를 포함하는 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 제1항의 이중특이적 항체를 제조하는 방법.

## 청구항 11

혈관신생의 감소가 필요한 대상체에서 혈관신생을 감소시키는데 사용하기 위한, 제1항의 이중특이적 항체의 유효량을 포함하는 조성물.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 혈관 내피 성장 인자(VEGF; vascular endothelial growth factor) 및 앤지오포이에틴(ANG; angiopoietin)에 대한 활성을 갖는 이중특이적 항체, 및 이러한 항체의 용도에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 기존의 맥관 구조로부터 새로운 혈관의 형성인 혈관신생은 사실상 모든 기관들의 형성 및 생리학적 기능에 필요한 복잡한 생물학적 과정이다. 혈관신생은 배발생, 정상적인 생리학적 성장, 수선 및 병리학적 과정, 예컨대 종양 증식의 필수적인 요소이다. 통상적으로, 혈관신생은 내피 세포에 의한 혈관 발아, 분지화 및 세관 형성을 수반하는(내피 세포(EC)의 활성화, 혈관 탈안정화, 분해 효소의 합성 및 방출, EC 이동, EC 증식, EC 구조화와 분화 및 혈관 성숙과 같은 과정들을 수반하는) 다단계 과정에서 혈관형성 인자와 혈관억제 인자의 국소적인 균형에 의해 긴밀하게 제어된다.

[0003] 성인에서, 생리학적 혈관신생은 대체로 상처 치유, 및 암컷의 생식 기능 및 배아 발생의 몇몇 구성성분으로 국한된다. 임의의 비정상적인, 바람직하지 못한 또는 병리학적 혈관신생을 포함하는 질병-관련 혈관신생에서, 혈관형성 인자와 혈관억제 인자 사이의 국소적인 균형은 탈제어되어, 부적절한 및/또는 구조적으로 비정상적인 혈관 형성을 초래한다. 병리학적 혈관신생은 당뇨병성 망막병증, 전선, 암, 류마티스 관절염, 아테롬, 카포시 육종 및 혈관종을 포함한 질병 상태와 연관이 있어 왔다(문헌[Fan et al., 1995, Trends Pharmacology. Science. 16: 57-66; Folkman, 1995, Nature Medicine 1: 27-31]). 암에서, 1 내지 2 mm<sup>3</sup>보다 큰 원발성 및 속발성 종양의 성장은 혈관신생을 필요로 한다(문헌[Folkman, J. New England Journal of Medicine 1995; 33, 1757-1763]).

[0004] VEGF는 강력하고 편재하는 혈관 성장 인자이다. VEGF를 내피 세포에 대한 분비된 미토겐으로서 식별하기 전에, 상기 VEGF는 혈관 투과성 인자로서 식별되었으며, 증식, 이동, 특수화 및 생존을 포함하여 내피 세포 거동의 많은 별개의 양태들을 조절하는 VEGF의 능력을 강조하고 있다(문헌[Ruhrberg, 2003 BioEssays 25:1052-1060]). VEGF 계통(family) 구성원은 VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, 태반 성장 인자(PIGF) 및 내분비선-유래 VEGF(EG-VEGF)를 포함한다. 활성 형태의 VEGF는 동종이량체로서 합성되거나, 다른 VEGF 계통 구성원과의 이종이량체로서 합성된다. VEGF-A는 선택적 스플라이싱에 의해 발생된 6개의 동종형: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 및 VEGF206으로서 존재한다. 이들 동종형은 주로 이들의 생체이용률의 측면에서 상이하며, VEGF165가 지배적인 동종형이다(문헌[Podar, et al. 2005 Blood 105(4):1383-1395]). 배발생 동안, 단계- 및 조직-특이적 비율의 다양한 동종형들을 생성하기 위한 스플라이싱의 제어는 VEGF에 반응한 내피 세포의 별개이고 문맥 의존적인 거동에 대한 풍부한 잠재성을 형성한다.

[0005] VEGF는 정상적인 혈관신생 및 질병-관련 혈관신생(문헌[Jakeman, et al. 1993 Endocrinology: 133,848-859; Kolch, et al. 1995 Breast Cancer Research and Treatment: 36,139-155])과 혈관 투과성(문헌[Connolly, et al. 1989 J. Biol. Chem: 264,20017-20024]) 둘 다의 중요한 자극자인 것으로 여겨진다. 항체를 이용한 VEGF의 봉쇄(sequestration)에 의한 VEGF 작용의 길항작용은 종양 성장의 감소를 초래할 수 있다(문헌[Kim, et al. 1993 Nature: 362,841-844]). VEGF 유전자의 이형접합적 분열(heterozygous disruption)은 혈관화에 있어서 치명적인 결함을 초래하였다(문헌[Carmeliet, et al. 1996 Nature 380:435-439; Ferrara, et al. 1996 Nature 380:439-442]).

[0006] VEGF 계통 외에도, 앤지오포이에틴은 혈관 발달 및 출생후 혈관신생에 관여하는 것으로 생각된다. 앤지오포이에

틴은 천연 발생 효능제, 앤지오포이에틴-1(ANG-1), 뿐만 아니라 천연 발생 길항제, 앤지오포이에틴-2(ANG-2)를 포함한다. ANG-1의 역할은 성인에서 보존되는 것으로 생각되며, 성인에서 상기 ANG-1은 광범위하고 구성적으로 발현된다(문헌[Hanahan, *Science*, 277:48-50 (1997); Zagzag, et al., *Exp Neurology*, 159:391-400 (1999)]). 대조적으로, ANG-2 발현은 주로 혈관 재건 부위로 한정되며, 이 부위에서, ANG-2는 ANG-1의 구성적인 안정화 또는 성숙화 기능을 차단하여, 혈관을 막아 신호에 더 반응성일 수 있는 가소성(plastic) 상태로 되돌리고 그 상태로 유지되게 할 수 있는 것으로 생각된다(문헌[Hanahan, 1997; Holash et al., *Oncogene* 18:5356-62 (1999); Maisonpierre, 1997]). 질병-관련 혈관신생에서 ANG-2 발현의 연구는 혈관 ANG-2 발현을 보여주는 많은 종양 유형들을 확인하였다(문헌[Maisonpierre et al., *Science* 277:55-60 (1997)]). 기능성 연구는, ANG-2가 종양 혈관신생에 관여하고, 마우스 이종이식 모델에서 ANG-2 과발현을 증가된 종양 성장과 연관시킨다고 제안한다(문헌[Ahmad, et al., *Cancer Res.*, 61:1255-1259 (2001)]). 다른 연구는 ANG-2 과발현을 종양 과다혈관성(hypervascularity)과 연관시켰다(문헌[Etoh, et al., *Cancer Res.* 61:2145-53 (2001); Tanaka et al., *Cancer Res.* 62:7124-29 (2002)]).

[0007]

상동성-기초 클로닝 접근법을 사용하여, Valenzuela 등(문헌[Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 2;96(5):1904-9])은 2개의 신규 앤지오포이에틴: 마우스에서 앤지오포이에틴-3(ANG-3) 및 인간에서 앤지오포이에틴-4(ANG-4)를 식별하였다. ANG-3 및 ANG-4가 ANG-1 및 ANG-2의 마우스 및 인간 버전보다 서로로부터 더 구조적으로 분기되기는 하지만, 이들은 동일한 유전자 자리(locus)의 마우스 및 인간 대응물을 나타내는 것으로 보인다. 앤지오포이에틴 계통의 이들 구성원의 생물학에 대해서는 거의 알려진 바가 없다. 예를 들어, ANG-4는 폐에서만 높은 수준으로 발현된다(문헌[Tsigkos, et al., *Expert Opin. Investig. Drugs* 12(6): 933-941 (2003); Valenzuela, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 96:1904-1909 (1999)]). ANG-4 발현 수준은 저산소증에 반응하여 증가하는 것으로 공지되어 있고, 내피 세포 성장 인자는 교모세포종 세포주 및 내피 세포에서 ANG-4 발현 수준의 증가를 초래한다. 그러나, 발현 제어 기전, 및 결과적으로 생리학적 및 질병-관련 혈관신생에 미치는 효과는 공지되어 있지 않다(문헌[Lee, et al., *FASEB J.* 18: 1200-1208 (2004)]).

[0008]

앤지오포이에틴은 혈관 내피 내에서 선택적으로 발현되는 Tie 수용체 티로신 키나제 계통에 대한 리간드로서 처음 발견되었다(문헌[Yancopoulos et al., *Nature* 407:242-48 (2000)]). ANG-1, ANG-2, ANG-3 및 ANG-4는 Tie-2 수용체에 주로 결합하며, 따라서 Tie-2 리간드로서 공지되어 있다. ANG-1이 Tie-2에 결합하면, 자가인산화를 통해 수용체의 티로신 인산화, 및 후속적으로 신호 전달을 통해 수용체의 신호 전달 경로의 활성화를 유도한다(문헌[Maisonpierre, P. et al. 1997 *Science*: 277, 55-60]). ANG-2는 Tie-2 수용체의 ANG-1-유도 키나제 활성화의 경쟁적 억제를 통해 작용하는, ANG-1에 대한 천연 발생 길항제이다(문헌[Hanahan, 1997; Davis et al., *Cell* 87:1161-69 (1996); Maisonpierre et al., *Science* 277:55-60 (1997)]).

[0009]

Tie-2 및 ANG-1의 녹-아웃 마우스 연구는 유사한 표현형을 보여주고, ANG-1에 의해 자극된 Tie-2 인산화가 발생 중인 혈관의 재건 및 안정화를 매개하고, 혈관신생 동안 혈관 성숙, 및 내피 세포-지지 세포 접착의 유지를 촉진한다고 제안한다(문헌[Dumont et al., *Genes & Development*, 8:1897-1909 (1994); Sato, *Nature*, 376:70-74 (1995); (Thurston, G. et al., 2000 *Nature Medicine*: 6, 460-463)]).

[0010]

최근, ANG-1, ANG-2 및/또는 Tie-2는 가능한 항암 치료의 표적으로서 제안되었다(예를 들어, 미국 특허 6,166,185, 5,650,490 및 5,814,464를 참조하며, 각각은 항-Tie-2 리간드 및 수용체 항체를 개시하고 있음). 가용성 Tie-2를 사용한 연구는 설치류에서 종양의 수 및 크기를 저하시키는 것으로 보고되었다. 또한, 일부 그룹은, ANG-2에 결합하는 항체(예를 들어 미국 특허 6,166,185 및 미국 특허 출원 공개 2003/0124129 참조) 및 VEGF-A에 결합하는 항체(예를 들어 미국 특허 8,216,571 참조)의 사용을 보고하였다. 추가로, VEGF-A 및 ANG-2를 표적화하는 예들이 존재한다(예를 들어, WO200197850, WO2007089445 및 미국 특허 8,268,314 참조). 그러나, 보다 관용성이거나 효과적인, VEGF-A 및 ANG-2를 표적화하는 이중특이적 항체에 대한 충족되지 않은 요망이 의학 분야에 존재한다. 보다 구체적으로, 안전성은 적어도 VEGF-A의 표적화와 연관된 독성(예를 들어 혈전색전성 사례(thromboembolic event), 신장 독성 등)에 관한 것이므로, 이러한 안전성을 개선하는 것과 관련된 충족되지 않은 요망이 존재한다. 이를 위해, 본원에 개시된 VEGF-A 및 ANG-2를 표적화하는 이중특이적 항체는 예를 들어, 혈전색전성 사례 및/또는 신장 독성과 관련된 독성의 저하와 더불어, 혈관 탈제어 및 종양 성장을 감소시키는 데 효과적이다.

## 발명의 내용

[0011]

본 발명은 VEGF 및 ANG에 결합하는 이중특이적 항체에 관한 것이다. 나아가, 본 발명은 VEGF 및 ANG에 결합하고, VEGF 및 ANG의 적어도 하나의 생물학적 활성을 감소시키는 이중특이적 항체에 관한 것이다.

더 나아가, 본 발명은 VEGF 및 ANG에 결합하고 종양 성장을 감소시키고/감소시키거나 종양 부피를 감소시키는 이중특이적 항체를 이를 필요로 하는 대상체에게 제공하는 것에 관한 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0012]

- 도 1. 5개의 상이한 이중특이적 항체(BiS) 백분인 BiS1, BiS2, BiS3, BiS4 및 BiS5의 일반적인 구조적 포맷의 개략도를 제시한다. scFv는 진회색으로 도시되어 있고, IgG Fv는 연회색으로 도시되어 있다.
- 도 2. 이중특이적 항체 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2의 개략적인 도면을 제시한다.
- 도 3. 이중특이적 항체 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2의 경쇄에 대한 DNA 및 단백질 서열을 제시한다.
- 도 4. 이중특이적 항체 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2의 중쇄의 DNA 서열을 제시한다.
- 도 5. 이중특이적 항체 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2의 중쇄의 단백질 서열을 제시한다.
- 도 6. 이중특이적 항체 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 용출 프로파일에 대한 대표적인 데이터이다.
- 도 7. 이중특이적 항체 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2에 대한 정제 프로파일에 대한 대표적인 데이터이다.
- 도 8. 이중특이적 항체 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2에 대한 대표적인 SDS-PAGE 젤이다. BsAb는 온전한 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2이며; Ab는 항-VEGF mAb이며; H-BsAb는 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2의 중쇄이며; H-Ab는 항-VEGF mAb의 중쇄이고; L은 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 및 항-VEGF의 경쇄이다.
- 도 9. 이중특이적 항체 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2를 포커싱한 후의 대표적인 데이터이다.
- 도 10. 이중특이적 항체 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2에 대한 전이 온도에 대한 대표적인 데이터이다.
- 도 11. 이중특이적 항체 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2가 VEGF-165 및 ANG-2에 동시적으로 결합하는 데 대한 대표적인 데이터이다.
- 도 12a. ELISA 기초 검정을 사용하여, 이중특이적 항체 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2가 VEGF-165 및 ANG-2에 동시에 결합하는 데에 대한 대표적인 데이터이다.
- 도 12b. ELISA 기초 검정을 사용하여, 이중특이적 항체 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2가 VEGF-165 및 ANG-2에 동시에 결합하는 데에 대한 대표적인 데이터이다.
- 도 13. 이중특이적 항체 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2에 의한 VEGF121에의 결합의 결여를 보여주는 대표적인 데이터이다.
- 도 14. 이중특이적 항체 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2에 의한 VEGF189에의 결합의 결여를 보여주는 대표적인 데이터이다.
- 도 15. 786-0 신세포암종 모델에서 이중특이적 항체 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 존재 하에 종양 부피의 감소를 보여주는 대표적인 데이터이다.
- 도 16. BxPC3 췌장암종 모델에서 이중특이적 항체 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 존재 하에 종양 부피의 감소를 보여주는 대표적인 데이터이다.
- 도 17a. 이중특이적 항체 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 부재 하에 혈관형성을 보여주는 대표적인 데이터이다.
- 도 17b. 이중특이적 항체 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 존재 하에 혈관형성을 보여주는 대표적인 데이터이다.
- 도 18. 이중특이적 항체 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 존재 하에 망막의 주변부(파선)로 향하는 혈관 이동(화살표)의 감소를 보여주는 대표적인 데이터이다. 4X 배율.
- 도 19. BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 존재 하에 혈관 분지화의 감소를 보여주는 대표적인 데이터이다. 20X 배율.
- 도 20a. 항-VEGF 항체 및 이중특이적 항체 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 부재 하에 신장 병상(renal pathology)을 보여주는 대표적인 데이터이다.
- 도 20b. 항-VEGF 항체의 존재 하에 신장 병상 데이터를 보여주는 대표적인 데이터이다.
- 도 20c. 존재하는 이중특이적 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 존재 하에 신장 병상의 감소를 보여주는 대표적인 데이터이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013]

### 정의

[0014]

본 발명을 상세히 기재하기 전에, 본 발명은 특정 조성물 또는 공정 단계로 제한되지 않으며, 변화될 수 있음을 이해한다. 본 명세서 및 첨부된 청구항에 사용된 바와 같이, 단수형("a", "an" 및 "the")은 문맥상 명확하게 다르게 지시하지 않는 한, 복수형을 포함한다. 용어 "일(a)"(또는 "하나(an)"), 뿐만 아니라 용어 "하나 이상" 및 "적어도 하나의"는 본원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 나아가, 양태가 "포함하는"이라는 단어와 함께 본원에 기재된 곳에서는 어디에서나, "~로 구성된" 및/또는 "~로 필수적으로 구성된"에 관하여 기재된 유사한 양태들 또한 제공되는 것으로 이해한다.

[0015]

상보성 결정 영역(CDR)은 항체가 이의 항원에 결합하는 것을 책임진다. CDR은 당업계에서 많은 방법들에 의해 결정된다(Kabat(문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]); Chothia(문헌[Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]); IMGT(ImMunoGeneTics)(문헌[Lefranc, M.P. et al., Dev. Comp. Immunol. 27: 55-77 (2003)]) 및 다른 방법들 포함). 특이적인 CDR 서열이 본원에서 언급되고 청구되더라도, 본 발명은 또한, 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 정의된 CDR 서열을 포함한다.

[0016]

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 제한 없이, 인간, 및 비-인간 영장류, 예컨대 침팬지 및 다른 유인원 및 원숭이 종을 포함한 다른 영장류를 포함하여 척삭동물(cordata) 아문의 임의의 구성원을 지칭하고; 가축, 예컨대 소, 양, 돼지, 염소 및 말; 애완 동물, 예컨대 개 및 고양이; 마우스, 래트 및 기니피그와 같은 설치류를 포함하는 실험 동물; 애완용, 야생 및 사냥용 새, 예컨대 닭, 칠면조 및 다른 가금류, 오리, 거위 등이 또한, 비제한적인 예이다.

[0017]

### 이중특이적 항체

[0018]

본 발명의 적합한 이중특이적 항체는 임의의 아이소타입(예를 들어 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 서브-아이소타입(예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 알로타입(예를 들어 Gm, 예를 들어 G1m(f, z, a 또는 x), G2m(n), G3m(g, b, 또는 c), Am, Em, 및 Km(1, 2 또는 3))일 수 있거나 이로부터 유래된다. 이러한 항체는 경쇄 불변 영역의 아미노산 서열을 기초로 하여 람다 사슬 또는 카파 사슬로서 분류된 경쇄를 포함할 수 있다. 도 1은 5개의 상이한 이중특이적 백본(BiS)의 배향의 개략도를 보여준다(예를 들어 PCT 특허 출원 PCT/US2016/035026 및 PCT/US2015/025232 참조). scFv 내의 특이적인 링커, 및 scFv를 본 발명의 이중특이적 항체의 특정 부위(예를 들어 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS)에 연결하는 링커가 기재되어 있다. 그러나, scFv 내, 또는 scFv를 본 발명의 이중특이적 항체의 임의의 특정 부위에 연결하는 임의의 적합한 링커가 사용될 수 있다(예를 들어 PCT 특허 출원 PCT/US2016/035026 및 PCT/US2015/025232 참조).

[0019]

### 결합 분자의 생성

[0020]

본원에 기재된 이중특이적 항체의 생성 및 스크리닝을 위한 재조합 DNA 방법은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어 미국 특허 4,816,567). 이중특이적 항체를 인코딩하는 DNA, 예를 들어 VH 도메인, VL 도메인, 단일 사슬 가변 단편(scFv) 또는 이들의 조합을 인코딩하는 DNA가 적합한 발현 벡터 내로 삽입될 수 있으며, 그 후에 이러한 벡터는 항체를 생성하지 않는 적합한 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이 세포, 시미안(simian) COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 골수종 세포 내로 형질감염되어, 본 발명의 이중특이적 항체가 수득될 수 있다.

[0021]

적합한 발현 벡터가 당업계에 공지되어 있다. 발현 벡터는 프로모터에 연결된 이중특이적 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 이러한 벡터는 항체 분자의 불변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고(예를 들어 미국 특허 5,981,216; 5,591,639; 5,658,759 및 5,122,464 참조), 항체의 가변 도메인은 전체 중쇄(scFv 부분 포함), 전체 경쇄, 또는 전체 중쇄와 전체 경쇄 둘 다의 발현을 위해 이러한 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 발현 벡터는 종래의 기술에 의해 숙주 세포에 전이될 수 있고, 전이된 세포는 종래의 기술에 의해 배양되어, 이중특이적 항체를 생성할 수 있다.

[0022]

재조합 항체의 발현을 위한 숙주로서 적합한 포유류 세포주는 당업계에 공지되어 있고, 비제한적으로 CHO 세포, HeLa 세포, 베이비 햄스터 신장(BHK) 세포, 원숭이 신장 세포(COS), 인간 간세포암종 세포(예를 들어 Hep G2), 인간 상피 신장 293 세포 및 많은 다른 세포주들을 포함하여 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection)으로부터 입수 가능한 많은 불멸화된 세포주를 포함한다. 상이한 숙주 세포는 단백질 및 유전자 생성물의 번역-후 프로세싱 및 변형을 위한 특징적이고 특이적인 기전을 가진다. 이중특이적 항체의 올바른 변형

및 프로세싱을 보장하기 위해 적절한 세포주 또는 숙주 시스템이 선택될 수 있다. 이를 위해, 유전자 생성물의 1차 전사체의 적절한 프로세싱, 글리코실화 및 인산화를 위한 세포 머시너리를 갖는 진핵 숙주 세포가 사용될 수 있다. 이러한 포유류 숙주 세포로는 CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, NS0(임의의 기능적 면역글로불린 사슬을 내인성으로 생성하지 않는 뮤린 골수종 세포주), SP20, CRL7030 및 Hs78Bst 세포가 있다. 인간 림프구를 불멸화시킴으로써 개발된 인간 세포주는 모노클로날 항체를 재조합적으로 생성하는 데 사용될 수 있다. 인간 세포주 PER.C6®(Cruce11, 네덜란드 소재)이 모노클로날 항체를 재조합적으로 생성하는 데 사용될 수 있다. 재조합 항체의 발현을 위해 숙주로서 사용될 수 있는 추가의 세포주로는, 곤충 세포(예를 들어 Sf21/Sf9, 트리코플루시아니(Trichoplusiani) Bti-Tn5b1-4), 또는 효모 세포(예를 들어 에스. 세레비지애(S. cerevisiae), 피치아(Pichia), US7326681 등), 식물 세포(US20080066200) 또는 닭 세포(WO2008142124)가 있다.

[0023]

이중특이적 항체는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 세포주에서 안정하게 발현될 수 있다. 안정한 발현은 재조합 단백질의 장기적인 고수율 생성에 사용될 수 있다. 안정한 발현을 위해, 숙주 세포는 발현 조절 요소(예를 들어 프로모터, 인핸서, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위 등) 및 선별 마커 유전자를 포함하는 적절하게 조작된 벡터에 의해 형질변환될 수 있다. 외래 DNA의 도입 후, 세포를 농화된 배지 내에서 1 내지 2일 동안 성장시키고, 그 후에 선별 배지로 교환하는 것이 허용된다. 재조합 플라스미드 내의 선별 마커는 선별에 대한 내성을 부여하고, 이러한 플라스미드를 세포의 염색체 내로 안정하게 통합시킨 세포가 성장하여 증식소(foci)를 형성할 수 있게 하며, 이러한 증식소가 결과적으로 클로닝되고 세포주 내로 확장될 수 있다. 안정한 세포주를 고수율로 생성하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 일반적으로 상업적으로 입수 가능하다. 일시적인 발현은 또한, 당업계에 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 일시적인 형질감염은, 세포 내에 도입된 핵산이 해당 세포의 게놈 또는 염색체 DNA 내로 통합되지 않고, 상기 세포에서 염색체와 요소로서(예를 들어 에피솜(episome)으로서) 유지되는 과정이다.

[0024]

안정하게 또는 일시적으로 형질감염된 이중특이적 항체를 발현하는 세포주는 당업계에 공지된 세포 배양 배지 및 조건에서 유지되어, 이중특이적 항체의 발현 및 생성을 초래할 수 있다. 세포 배양 배지는 예를 들어, DMEM 또는 Ham's F12를 포함한 상업적으로 입수 가능한 배지 제제를 기초로 할 수 있다. 또한, 세포 배양 배지는 세포 성장 및 생물학적 단백질 발현 둘 다에서의 증가를 지지하도록 변형될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "세포 배양 배지", "배양 배지" 및 "배지 제제"는 다세포 유기체 또는 조직 외부의 인공적인 시험관내 환경에서 세포의 유지, 성장, 전파 또는 확장을 위한 영양액을 지칭한다. 세포 성장을 촉진하도록 제제화된 세포 배양 성장 배지 또는 재조합 단백질 생성을 촉진하도록 제제화된 세포 배양 성장 배지를 포함한 세포 배양 배지는 특이적인 세포 배양 용도용으로 최적화될 수 있다. 영양소, 성분 및 구성성분이라는 용어는 세포 배양 배지를 구성하는 구성분을 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 세포주는 유가식(fed batch) 방법을 사용하여 유지될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "유가식 방법"은, 처음에 기본 배지와 함께 인큐베이션된 후, 세포 배양물에 추가 영양소가 공급되는 방법을 지칭한다. 예를 들어, 유가식 방법은 주어진 기간 내에 결정된 공급 스케줄에 따라 보충 배지를 추가하는 단계를 포함할 수 있다. 따라서, "유가식 세포 배양"은, 처음에 세포, 전형적으로 포유류, 및 배양 배지를 배양 용기에 공급하고, 배양 동안 추가의 배양 영양소를 연속적으로 또는 별개의 증분으로 배양물에 공급하되, 배양 종결 전에 세포 및/또는 생성물을 주기적으로 수합하거나 수합하지 않는 세포 배양을 지칭한다.

[0025]

세포 배양 배지 및 이러한 배지에 함유된 영양소는 당업계에 공지되어 있다. 세포 배양 배지는 기본 배지, 및 변형된 기본 배지를 초래하는 적어도 하나의 가수분해물, 예를 들어 대두-기초 가수분해물, 효모-기초 가수분해물, 또는 2가지 유형의 가수분해물들의 조합을 포함할 수 있다. 추가 영양소는 기본 배지, 예컨대 농축된 기본 배지만 포함할 수 있거나, 가수분해물 또는 농축된 가수분해물만 포함할 수 있다. 적합한 기본 배지로는 둘베코스 모디파이드 이글스 배지(DMEM), DME/F12, 미니멀 이센셜 배지(MEM), 베이잘 배지 이글(BME), RPMI 1640, F-10, F-12, α-미니멀 이센셜 배지(α-MEM), 글래스고스 미니멀 이센셜 배지(G-MEM), PF CHO(예를 들어 CHO 단백질 무함유 배지(Sigma) 또는 CHO 세포 단백질-무함유용 EX-CELL™ 325 PF CHO 혈청-무함유 배지(SAFC Bioscience) 참조) 및 이스코브스 모디파이드 둘베코스(Iscove's Modified Dulbecco's) 배지가 있다. 사용될 수 있는 기본 배지의 다른 예로는 BME 기본 배지(Gibco-Invitrogen; 또한, 문헌[Eagle, H (1965) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89, 36] 참조); 둘베코스 모디파이드 이글 배지(DMEM, 분말)(Gibco-Invitrogen(# 31600); 또한, 문헌[Dulbecco and Freeman(1959) Virology. 8:396; Smith et al. (1960) Virology. 12:185. Tissue Culture Standards Committee, In Vitro 6:2, 93] 참조); CMRL 1066 배지(Gibco-Invitrogen (#11530); 또한, 문헌[Parker et al. (1957) Special Publications, N.Y. Academy of Sciences, 5:303] 참조)가 있다.

- [0026] 기본 배지는 혈청-무함유일 수 있으며, 이는, 상기 배지가 혈청(예를 들어 태아 소 혈청(FBS), 말 혈청, 염소 혈청, 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 동물-유래 혈청)을 함유하지 않거나 동물 단백질 무함유 배지 또는 화학적으로 한정된 배지임을 의미한다.
- [0027] 기본 배지는 표준 기본 배지에서 확인되는 소정의 비-영양 구성성분, 예컨대 다양한 무기 및 유기 완충제, 계면 활성제(들) 및 소듐 클로라이드를 제거하기 위해 변형될 수 있다. 기본 세포 배지로부터의 이러한 구성성분의 제거는 잔여 영양 구성성분의 증가된 농축을 허용하고, 전반적인 세포 성장 및 단백질 발현을 개선할 수 있다. 또한, 생략된 구성성분은 세포 배양 조건의 요건에 따라, 변형된 기본 세포 배지를 함유하는 세포 배양 배지 내에 다시 첨가될 수 있다. 세포 배양 배지는 변형된 기본 세포 배지, 및 하기 영양소, 철 공급원, 재조합 성장 인자; 완충제; 계면활성제; 삼투몰농도 제어제; 에너지 공급원; 및 비-동물 가수분해물 중 적어도 하나를 함유 할 수 있다. 또한, 변형된 기본 세포 배지는 아미노산, 비타민, 또는 아미노산과 비타민 둘 다의 조합을 선택적 으로 함유할 수 있다. 변형된 기본 배지는 L-글루타민과 같은 글루타민 및/또는 메톡트렉세이트를 추가로 함유 할 수 있다.
- [0028] 정제 및 단리
- [0029] 일단 이중특이적 항체가 생성되면, 이러한 항체는 당업계에 공지된 면역글로불린 분자 정제 방법에 의해, 예를 들어 크로마토그래피(예를 들어 이온 교환, 친화성, 특히 특이적인 항원 단백질 A 또는 단백질 G에 대한 친화성, 및 사이징 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 차별적인 용해성에 의해, 또는 단백질 정제를 위한 임의의 다른 표준 기술에 의해 정제될 수 있다. 나아가, 본 발명의 이중특이적 항체는 이종성 폴리펩타이드 서열(본원에서 "태그"로 지칭됨)에 융합되어, 정제를 용이하게 할 수 있다.
- [0030] 용도
- [0031] 본 발명의 이중특이적 항체는 많은 방식들로 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 이중특이적 항체는 VEGF, ANG, 또는 이를 단백질의 임의의 조합에 결합하여, 이로써 VEGF, ANG, 또는 이를 활성의 임의의 조합의 적어도 하나의 생물학적 활성을 감소시키는 데 사용될 수 있다. 보다 특히, 본 발명의 이중특이적 항체는 VEGF-165, ANG-2, 또는 이를 단백질의 임의의 조합에 결합하여, 이로써 VEGF-165, ANG-2, 또는 이를 활성의 임의의 조합의 적어도 하나의 생물학적 활성을 감소시키는 데 사용될 수 있으며, 이를 감소는 이들의 각각의 수용체의 활성화 또는 인산화의 감소 및/또는 세포 탈제어와 관련하여 혈관신생의 감소를 포함할 수 있다.
- [0032] 예시적인 구현예
- [0033] 본 발명의 일 구현예는 본원에 기재된 이중특이적 항체의 중쇄 상보성 결정 영역 1 내지 3(즉, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3) 및 경쇄 상보성 결정 영역 1 내지 3(즉, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하는 제1 결합 도메인, 및 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인으로서, 여기서, 제1 결합 도메인은 VEGF-A에 결합하고, 제2 결합 도메인은 ANG-2에 결합한다. 추가 구현예에서, 이중특이적 항체는 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2이다.
- [0034] 또 다른 구현예는 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제1 결합 도메인, 및 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로서, 여기서, 제1 결합 도메인은 VEGF-A에 결합하며, 제2 결합 도메인은 ANG-2에 결합하고, 이중특이적 항체는 VEGF165에 결합한다. 추가 구현예에서, 이중특이적 항체는 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2이다.
- [0035] 또 다른 구현예는 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제1 결합 도메인, 및 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로서, 여기서, 제1 결합 도메인은 VEGF-A에 결합하며, 제2 결합 도메인은 ANG-2에 결합하고, 이중특이적 항체는 VEGF121과 비교하여 더 큰 친화성으로 VEGF165에 결합한다. 추가 구현예에서, 이중특이적 항체는 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2이다.
- [0036] 또 다른 구현예는 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제1 결합 도메인, 및 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로서, 여기서, 제1 결합 도메인은 VEGF-A에 결합하며, 제2 결합 도메인은 ANG-2에 결합하고, 이중특이적 항체는 VEGF189과 비교하여 더 큰 친화성으로 VEGF165에 결합한다. 추가 구현예에서, 이중특이적 항체는 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2이다.

- [0037] 또 다른 구현예는 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제1 결합 도메인, 및 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로서, 여기서, 제1 결합 도메인은 VEGF-A에 결합하며, 제2 결합 도메인은 ANG-2에 결합하고, 이중특이적 항체는 VEGF121 및 VEGF189와 비교하여 더 큰 친화성으로 VEGF165에 결합한다. 추가 구현예에서, 이중특이적 항체는 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2이다.
- [0038] 또 다른 구현예는 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제1 결합 도메인, 및 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로서, 여기서, 제1 결합 도메인은 VEGF-A에 결합하며, 제2 결합 도메인은 ANG-2에 결합하고, 이중특이적 항체는 인간 VEGFR2 인산화, 뮤린 VEGFR2 인산화, 또는 인간 및 뮤린 VEGFR2 인산화 둘 다를 감소시킨다. 추가 구현예에서, 이중특이적 항체는 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2이다.
- [0039] 또 다른 구현예는 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제1 결합 도메인, 및 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로서, 여기서, 제1 결합 도메인은 VEGF-A에 결합하며, 제2 결합 도메인은 ANG-2에 결합하고, 이중특이적 항체는 인간 Tie2 수용체 인산화를 감소시킨다. 추가 구현예에서, 이중특이적 항체는 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2이다.
- [0040] 또 다른 구현예는 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제1 결합 도메인, 및 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로서, 여기서, 제1 결합 도메인은 VEGF-A에 결합하며, 제2 결합 도메인은 ANG-2에 결합하고, 이중특이적 항체는 혈관신생을 감소시킨다.
- [0041] 또 다른 구현예는 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제1 결합 도메인, 및 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로서, 여기서, 제1 결합 도메인은 VEGF-A에 결합하며, 제2 결합 도메인은 ANG-2에 결합하고, 이중특이적 항체는 종양을 갖는 대상체에게 제공된 결과 종양 성장을 감소시키거나, 종양 부피를 감소시키거나, 종양 성장을 감소시키고 종양 부피를 감소시킨다. 추가 구현예에서, 이중특이적 항체는 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2이다.
- [0042] 또 다른 구현예는 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제1 결합 도메인, 및 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로서, 여기서, 제1 결합 도메인은 VEGF-A에 결합하며, 제2 결합 도메인은 ANG-2에 결합하고, 이중특이적 항체는 제2 결합 도메인의 제조에 사용된 부모 ANG-2 항체보다 더 큰 친화성으로 ANG-2에 결합한다. 보다 특정한 구현예에서, ANG-2에 대한 제2 결합 도메인의 결합 친화성은 약 1배 내지 약 20배만큼 증가된다. 보다 더 특정한 구현예에서, ANG-2에 대한 제2 결합 도메인의 결합 친화성은 약 1배, 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 약 10배, 약 11배, 약 12배, 약 13배, 약 14배, 약 15배, 약 16배, 약 17배, 약 18배, 약 19배 또는 약 20배만큼 증가된다. 추가 구현예에서, 이중특이적 항체는 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2이다.
- [0043] 또 다른 구현예는 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제1 결합 도메인, 및 본원에 기재된 이중특이적 항체의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로서, 여기서, 제1 결합 도메인은 VEGF-A에 결합하며, 제2 결합 도메인은 ANG-2에 결합하고, 이중특이적 항체는, VEGF165에 결합하는 것, VEGF121과 비교하여 더 큰 친화성으로 VEGF165에 결합하는 것, VEGF189와 비교하여 더 큰 친화성으로 VEGF165에 결합하는 것, VEGF121 및 VEGF189와 비교하여 더 큰 친화성으로 VEGF165에 결합하는 것, 인간 VEGFR2 인산화를 감소시키는 것, 뮤린 VEGFR2 인산화를 감소시키는 것, 인간 및 뮤린 VEGFR2 인산화를 감소시키는 것, 인간 Tie2 수용체 인산화를 감소시키는 것, 혈관신생을 감소시키는 것, 종양 성장을 감소시키는 것, 종양 부피를 감소시키는 것, 종양 성장을 감소시키고 종양 부피를 감소시키는 것, 및 제2 결합 도메인의 제조에 사용된 부모 ANG-2 항체와 비교하여 제2 결합 도메인을 통해 ANG-2에 대한 친화성을 증가시키는 것을 포함한 본원에 기재된 특징들 중 하나 이상 또는 임의의 조합을 가진다. 추가 구현예에서, 이중특이적 항체는 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2이다.
- [0044] 또 다른 구현예는 식 VH-CH1-H-CH2-CH3을 갖는 항체 중쇄를 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이며, 여기서, VH는 중쇄 가변 도메인이며, CH1은 중쇄 불변 영역 도메인 1이며, H는 헌지 영역이며, CH2는 중쇄 불변 영역 도

메인 2이고, CH3은 중쇄 불변 영역 도메인 3이다. 또 다른 추가 구현예에서, 이중특이적 항체는 식 VL-CL을 갖는 항체 경쇄를 포함하며, 여기서, VL은 가변 경쇄 도메인이고, CL은 경쇄 불변 도메인이다. 또 다른 보다 추가의 구현예에서, 이중특이적 항체는 식 VH-CH1-H-CH2-CH3 및 VL-CL을 가진다. 추가 구현예에서, 이중특이적 항체는 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2이다.

[0045] 또 다른 구현예는 식 VH-CH1-H-CH2-CH3 및 VL-CL을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이며, 여기서, 하나 이상의 scFv 분자는 항체 중쇄 또는 항체 경쇄의 하나 이상의 N-종결 부분에 공유 부착된다. 또 다른 추가 구현예에서, 하나 이상의 scFv 분자는 이중특이적 항체의 하나 이상의 VL의 N-종결 도메인에 공유 부착된다. 보다 특정한 구현예에서, 이중특이적 항체는 식 VH-CH1-H-CH2-CH3 및 scFv-L1-VL-CL을 포함하며, 여기서, L1은 링커이고, 다른 다양한 파트들은 이전에 기재되어 있다. 또 다른 보다 특정한 구현예에서, 이중특이적 항체는 식 scFv-L1-VH-CH1-CH2-CH3 및 VL-CL을 포함한다.

[0046] 또 다른 구현예는 식 VH-CH1-H-CH2-CH3 및 VL-CL을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이며, 여기서, 하나 이상의 scFv 분자는 항체 중쇄의 하나 이상의 C-종결 부분에 공유 부착된다. 보다 특정한 구현예에서, 이중특이적 항체는 식 VH-CH1-CH2-CH3-L1-scFv 및 VL-CL을 포함한다. 또 다른 보다 특정한 구현예에서, 이중특이적 항체는 식 VH-CH1-CH2-CH3-L1-scFv-L2 및 VL-CL을 포함하며, 여기서, L2는 링커이고 L1과 독립적이며, L1 및 L2는 CH3에 공유 결합되고, 다른 다양한 파트들은 이전에 기재되어 있다. 또 다른 추가의 보다 특정한 구현예에서, 이중특이적 항체는 식 VH-CH1-L1-scFv-L2-CH2-CH3 및 VL-CL을 포함하며, 여기서, L1 및 L2는 독립적인 링커이고, 중쇄는 헌지 영역을 함유할 수 있거나 헌지리스일 수 있다. 추가 구현예에서, 이중특이적 항체는 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2이다.

[0047] 구체적인 구현예에서, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제1 결합 도메인; 및 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 존재하며, 여기서, 제1 결합 도메인 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 SEQ ID NO: 17 내지 22를 각각 포함하고, 제2 결합 도메인 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 SEQ ID NO: 23 내지 28을 각각 포함한다.

[0048] 또 다른 구체적인 구현예에서, SEQ ID NO: 3 및 9를 각각 포함하는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 제1 결합 도메인, 및 SEQ ID NO: 5 및 11을 각각 포함하는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 존재한다.

[0049] 또 다른 구체적인 구현예에서, SEQ ID NO: 1을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 7을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 이중특이적 항체가 존재한다.

[0050] 또 다른 구체적인 구현예에서, 파트 VH-CH1-H-CH2-CH3, VL-CL, 및 하나 이상의 scFv, L1, 또는 선택적으로 L2를 갖는 식을 포함하는 이중특이적 항체가 존재하며, 여기서, 상기 식은 하기의 식일 수 있다:

[0051] a. VH-CH1-CH2-CH3 및 scFv-L1-VL-CL;

[0052] b. scFv-L1-VH-CH1-CH2-CH3 및 VL-CL;

[0053] c. VH-CH1-CH2-CH3-L1-scFv 및 VL-CL;

[0054] d. VH-CH1-CH2-CH3-L1-scFv-L2 및 VL-CL, 여기서, L1 및 L2는 CH3에 공유 결합됨;

[0055] e. VH-CH1-L1-scFv-L2-CH2-CH3 및 VL-CL, 중쇄는 헌지 영역을 함유하거나 헌지리스일 수 있음.

[0056] 또 다른 구체적인 구현예에서, 식 VH-CH1-CH2-CH3-L1-scFv 및 VL-CL을 포함하는 이중특이적 항체가 존재한다.

[0057] 또 다른 구체적인 구현예에서, SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함하는 이중특이적 항체가 존재한다.

[0058] 또 다른 구체적인 구현예에서, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제1 결합 도메인; 및 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 서열이 존재하며, 여기서, 제1 결합 도메인 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 SEQ ID NO: 17 내지 22를 각각 포함하고, 제2 결합 도메인 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 SEQ ID NO: 23 내지 28을 각각 포함한다.

[0059] 또 다른 구체적인 구현예에서, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제1 결합 도메인;

및 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터가 존재하며, 여기서, 제1 결합 도메인 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 SEQ ID NO: 17 내지 22를 각각 포함하고, 제2 결합 도메인 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 SEQ ID NO: 23 내지 28을 각각 포함한다.

[0060] 또 다른 구체적인 구현예에서, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제1 결합 도메인; 및 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 포함하는 세포가 존재하며, 여기서, 제1 결합 도메인 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 SEQ ID NO: 17 내지 22를 각각 포함하고, 제2 결합 도메인 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 SEQ ID NO: 23 내지 28을 각각 포함한다.

[0061] 또 다른 구체적인 구현예에서, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제1 결합 도메인; 및 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 포함하는 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 이중특이적 항체를 제조하는 방법이 존재하며, 여기서, 제1 결합 도메인 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 SEQ ID NO: 17 내지 22를 각각 포함하고, 제2 결합 도메인 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 SEQ ID NO: 23 내지 28을 각각 포함한다.

[0062] 또 다른 구체적인 구현예에서, 이중특이적 항체를 대상체에게 제공하는 단계를 포함하는, 혈관신생을 감소시키는 방법이 존재하며, 여기서, 이중특이적 항체는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제1 결합 도메인; 및 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함하며, 제1 결합 도메인 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 SEQ ID NO: 17 내지 22를 각각 포함하고, 제2 결합 도메인 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 SEQ ID NO: 23 내지 28을 각각 포함한다.

## 서열

SEQ ID NO	서열	설명
1	EVQLLESGGVLVQPGGLRLSCAASGFTFSWYEMYWVRQAPGKLEWVSSISPSGGWMTYADSVKGRFTI S RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATPLYSSDGLSA GDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVPPLAPS SKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLVSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKD TLMSRTPEVTVVVD VS HEDPEVFKPNWYDGVEVHNAAKTPKREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAQGPQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDI AVEWE NGQNPENNYKTT PVPVLDSDGSFFLKS LTVDKSRWQQGNVFCSV MHEALHNHYTQKSLSI SPKGKGSSGGGSE I VLTQSPGTLISLSPGERATLSCR ASQSI TGSYLAWYQQPKPQAPRLLITGASSWATGIPDPRFGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQYSSSPITFGCTRLIEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSQVQL VESGGVVQPGRLSLS CAASGFTFT NYGMHWRQAPGKCLEWVAVISHDGNNK YYDVS VKG RFTI S RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIDFWSGLNWFDP WGQTLTVVSS	Bi S3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 중쇄의 아미노산 서열
2	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTGGTACGCTGGTGGTTCTTA CGTCTTCTCTGGCTGCCTCCGGATTCACTTTCTCTGGTACGGAGATGTATGG GTTGCGCAAGCTCTGGTAAAGGTTGGAGTGGGTTCTCTCTATCTCTCTCT GGTGGCTGGACTATGTTGCTGACTCTGGTAAAGGCTGGTCACTATCTCTAGA GACA ACTCTAAGAATACTCTACTTGAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGAC ACGGCGTGTATACTGTGGCACCCCTGTATAGCAGTGACGGCTTTCGGCG GGGGATATCTGGCCAAGGGACAATGTGTCACCGTCAAGCCGTCGACCAAG GGCCC ATCCGCTCTCCCCCTGGCACCCCTCTCAAGAGCACCTCTGGGGCACA GCGGCCCTGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCGTCACGGTGTCC TGGA ACTCAGCGCTCTGACCAGCGCGTGCACACCTCCCGCTGTCTACAG TCCTCAGGACTCTACCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCAGCAGCTG GGCACCCAGACCTACATCGCAAGTGAATACAAGCCGCAACCAAGGTG GACAAGAGAGTTGAGCCAAATCTTGACAAAGCTCACACATGCCACCGTGC CCAGCAGCTGAACTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCAAAACCC AAGGCAACCTCATGTCCTCCGGACCCCTGAGGTCACTGGTACGGTGTGGAC GTGAGGCCAGAAGCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAG GTGCAATGCAAGACAACAGCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCA CGCTCTCACCGTCTGACCAGACTGGTGAATGGCAAGGAGTAC AA GTGCAAGGCTCCACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAGGGCAGCCCGAGAACACAGGTCTACACCTGCCCTGGTCAAGGCTTCTAT CCCAGCAGCATCGCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACACTAC AAGACCA CGCCTCCCGTGTGACTCGACCGCTCCAGGGCTCTTCTCTATAGCAAG CTCACCGTGGACAGAGCAGGTGCGCACAGGGGAACGTTCTCATGCTCCGT ATGATGAGGCTCTGACAAACACTACAGCGAGAAGAGCCTCTCCCTGCTCCG GGTAAAGGCGAGGGGGTACCGCGAGGGGGCTCTGAGATCGTGTGACCCAG AGCCGGCGACCCCTGAGCTGGAGGGAGAGCAACCCCTGAGCTGCCG GCCAGCGACTCATCGCCGAGCTACCTGGCTTGTATCAGCAAGCCCGA CAGGCCCCAGACTGCTGATCACGGCGTTCAGCTGGCCACCGCATCCCC GACAGATTCAGCGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTAGGATCAGCAGA	Bi S3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 중쇄의 뉴클레오파이드 서열

[0063]

SEQ ID NO	서열	설명
	CTGGAGCCGAGGACTTCGCCGTGACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCAGCCCC ATCACCTCGGAtgcGGCACCGAGCTGGAGATCAAGGGGGAGGGGGCTCTGGG GGAGGGGGCAGCGGGGGGGAGGATCTGGGGAGGGGGCAGCCAGGTGCAAGCTG GTCAAGTGTGGCGCGGAGGTGGTGCAAGCCCGAGAAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAACCGCTTCACCTCACCAACTACCGCATGCAC TGCGTCCGCCAGGCC CCTGGCAAGtGCCTGGAGTGGGTGGCCGTGATCAGCCACGACGGCAACAACAAAG TACTACGTGGACAGCGTAAGGGCAGATTCAACCATCAGCAGGGACAACAGCAAG AACACCCCTGACCTCAGATGAACAGCTGAGAGCCGAGGAACCGCCGTGAC TACTGCCAGAGAGGGCATCGACTTTGGAGCCGCTGAATTGGTTGACCCC TGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCCAG	
3	EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYEMYWRQAPGKLEWVSSISPS GGWMTMYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCATPLYSSDGLSA GDIWGQGTMTVSS	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 1 결합 도메인 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
4	GAAGTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGCTTGTCAAGCCTGGTGGTTCTTA CGTCTTCTTGGCTGCTCCGGATTCACTTCTCTGGTACAGAGATGTTATGG GTTCGCAAGCTCCTGGTAAAGGTTGGTAGGGTTCTCTATCTCTCTCT GGTGGCTGGACTATGATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCAACTCTAGA GACAACCTAAGAATACTCTACTTGAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGAC ACGGCCGTGATTACTGTGCGACCCCTGTGATAGCATGACGGGCTTCGGCG GGGGATATCTGGGCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCAAGC	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 1 결합 도메인 중쇄 가변 도메인의 뉴클레오타이드 서열
5	QVQLVESGGVVQPGRSRLSCAASGFTFTNYGMHWRQAPGKCLEWVAVISHD GNNKYYVDVSKGRFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAREGIDFWSGLN WFDPWGQGTLTVSS	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 2 결합 도메인 중쇄의 아미노산 서열
6	CAGGTGCACTGGTCGAGTCTGGCGCGGAGTGGTGCAAGCCGGCAGAAGCTG AGACTGAGCTGCGCCGGCAGCGCTTACCTCACCAACTACGGCATGCACTGG GTCCGCCAGGCCCTGGCAAGTGCCTGGAGTGGTGGCCGTGATCAGCACGAC GGCAACACAAGTAACAGTGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCAACCATCAGCAGG GACAACAGCAAGAACACCCCTGACCTCCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACCGCCGTGACTACTGCAGCAGAGAGGGCATCGACTTTGGAGCCGCTGAAT TGGITCGACCCCTGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCCAGC	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 2 결합 도메인 중쇄의 뉴클레오타이드 서열
7	EIVLTQSPATLSSLSPGERATLSCRASQSVPHSYLAQYQKPCQAPRLLIYGASS RATGIPDRFSGSGSTDFTLTSRLEPEDFAVYYCQQSYRIPSFQGQTRLEIKR TVAAPSVIFPPSDEQQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDTYSLSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 경쇄의 아미노산 서열
8	GAGATCGTGTGACCCAGTCTCCAGGCCACCTCTTGTCTCCAGGGGAAAGA GCCACCCCTCTCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTACAGCAGCTACTTAGCCTGG TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCTCATCTATGGTGCATCCAGC AGGGCACTGGCATCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGACAGACTTC ACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTCAGTTACTGTCAA CAGAGTACCGCACCCCTCTGGCCAAGGGACACGACTGGAGATAAACGT ACGGTGGCTGACCATCTGTCTTCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAACTGCTCTGTGTGCGCTGCTGAATAACTCTATCCCAGAGAGGCC AAAGTACAGTGGAGGTGATAACGCCCTCAATGGGTAACCTCCAGGAGAGT GTCACAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCATGAC CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGAGCTGCCGTACAAAGAGCTCAACAGGGAGAGTGT	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 경쇄의 뉴클레오타이드 서열

[0064]

SEQ ID NO	서열	설명
9	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVHSSYLAWYQQKPGQAPRLLITYGASS RATGIPDRAFTSGSGSGTDFTLTSRLEPEDFAVYYCQQSYRTPSFGQQGTRLEIK	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 1 결합 도메인 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
10	GAGATCGTGTGACCCAGTCTCCAGCCACCCCTCTTTGTCTCCAGGGAAAGA GCCACCCCTCTCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTACAGCACGACTTAGCTTG TACCAAGCAGAAACCTGGCAGGCTCCCATCTATGGTGCATCCAGC AGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTAGTGGCAGTGGGCTGGGACAGACTC ACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCTGAAGATTTCAGITTACTACTGTCAA CAGAGTACCCGACCCCTCCCTGGCCAAGGGACACGACTGGAGATAAA	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 1 결합 도메인 경쇄 가변 도메인의 뉴클레오타이드 서열
11	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSITGSYLAWYQQKPGQAPRLLITYGASS WATGIPDRAFTSGSGSGTDFTLTSRLEPEDFAVYYCQQYSSPITFGCGTRLEIK	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 2 결합 도메인 경쇄 도메인의 아미노산 서열
12	GAGATCGTGTGACCCAGAGCCCCGGCACCTGAGCCCTGGCGAGAGA GCCACCCCTGAGCTGCCGGGAGCCAGTCCATCACCGCAGCTACCTGGCTTG TATCAGCAGAACGCCGGACAGGCCCGGAGACTGCTGATCACGGGCTCCAGC TGGGCCACCGGCATCCCGACAGATTCAAGCAGCGCAGCGGCTCCGGCACCGACTC ACCCTGACCACATCAGCAGACTGGAGCCGAGGACTTCGGCGTGTACTACTGCCAG CAGTACACCCAGCAGCCCCATCACCTTCGGA1gcGGCACCGAGCTGGAGATCAAG	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 2 결합 도메인 경쇄 도메인의 뉴클레오타이드 서열
13	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSITGSYLAWYQQKPGQAPRLLITYGASS WATGIPDRAFTSGSGSGTDFTLTSRLEPEDFAVYYCQQYSSPITFGCGTRLEIK GGGGSGGGSGGGGGGGGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTNYGM HWVRQAPGKCLEWAVI SHDGNKYYVDSDKRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAREGIDFWSGLNWFDPWGQGTLTVSS	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 scFv 의 아미노산 서열
14	GAGATCGTGTGACCCAGAGCCCCGGCACCTGAGCCCTGGCGAGAGA GCCACCCCTGAGCTGCCGGGAGCCAGTCCATCACCGCAGCTACCTGGCTTG TATCAGCAGAACGCCGGACAGGCCCGGAGACTGCTGATCACGGGCTCCAGC TGGGCCACCGGCATCCCGACAGATTCAAGCAGCGCAGCGGCTCCGGCACCGACTC ACCCTGACCACATCAGCAGACTGGAGCCGAGGACTTCGGCGTGTACTACTGCCAG CAGTACACCCAGCAGCCCCATCACCTTCGGA1gcGGCACCGAGCTGGAGATCAAG GCGGAGGGGCTCTGGGGAGGGGAGCGGGCGCCGGAGGATCTGGGGAGGG GGCAGCAGGTGCAAGCTGCTGAGCTGGCCGGAGTGGTGCAGCCGGCAGA AGCCTGAGACTGAGCTGAGCTGCGCCGGAGCGGCTTCACCTCACCAACTACGGCATG CACTGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGTGCCTGGAGTGCGCTGATCAGC CACCGACGGCAACAACAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCAGATTACCATC AGCAGGGACAACAGCAAGAACACCCGTACCTCCAGATGAACAGCTGAGAGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAGGGCATCGACTTTGGAGCCGC CTGAATTGGTTGACCCCTGGGGCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCCAGC	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 scFv 의 뉴클레오타이드 서열
15	GGGGSGGGSGGGGGGGGG	scFV 내의 링커의 아미노산 서열
16	GGGGSGGGGS	CH3 도메인과 scFv 사이의 링커의 아미노산 서열
17	WYEMY	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 1 결합 도메인의 HCDR1 아미노산 서열

[0065]

SEQ ID NO	서열	설명
18	SISPSGGWTMYADSVKG	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 1 결합 도메인의 HCDR2 아미노산 서열
19	PLYSSDGLSLAGDI	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 1 결합 도메인의 HCDR3 아미노산 서열
20	RASQSVHSSYLA	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 1 결합 도메인의 LCDR1 아미노산 서열
21	GASSRAT	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 1 결합 도메인의 LCDR2 아미노산 서열
22	QQSYRTPS	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 1 결합 도메인의 LCDR3 아미노산 서열
23	GFTFTNYGMH	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 2 결합 도메인의 HCDR1 아미노산 서열
24	VISHDGNNKYYVDSVKG	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 2 결합 도메인의 HCDR2 아미노산 서열
25	EGIDFWSGLNWFDP	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 2 결합 도메인의 HCDR3 아미노산 서열
26	RASQSITGSYLA	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 2 결합 도메인의 LCDR1 아미노산 서열
27	GASSWAT	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 2 결합 도메인의 LCDR2 아미노산 서열
28	QQYSSSPIT	BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 의 제 2 결합 도메인의 LCDR3 아미노산 서열

[0066]

**실시예**

[0067]

본원에 기재된 실험을 위해, MEDI3617(문헌[Int J Oncol. 2012 May;40(5):1321-30]), Avastin®(문헌[Ferrara, N et al. Biochem Biophys Res Comm, 333:328-335, 2005]), G6-31(문헌[Liang, WC et al. J Biol Chem, 281: 951-961, 2006]), B20-4.1(문헌[Liang, WC et al. J Biol Chem, 281: 951-961, 2006]), 및 R347로 지정된 아이소타입 대조군을 포함한 다양한 항체들을 필요에 따라 단일특이적 또는 이중특이적 항체로서 사용하였다. 마우스와 교차-반응성이지 않은 모든 VEGF 동종형들에 결합할 수 있는 항-VEGF IgG1 항체를 일부 결합 및 기능성 연구를 위한 양성 대조군으로서 사용할 수 있다. 마우스 VEGF에 대한 교차-반응성이 필요하다면, 항체 G6-31 및 B20-4.1을 양성 대조군으로서 사용할 수 있다.

[0068]

실시예 1 - BS3AB-VEGF H1RK-ANG2의 포맷 및 서열.

[0069]

VEGF-A 및 ANG-2의 수용체인 VEGFR 및 Tie2에 대한 결합을 각각 감소시킴으로써, 이를 VEGF-A 및 ANG-2의 하나 이상의 생물학적 활성을 동시에 감소시키도록 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2를 디자인하였다. 도 2는 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2의 개략적인 다이어그램이다. 이중특이적 2가 항체는 Dimasi 등(문헌[J Mol Biol. 2009])에 의해 이미 기재된 바와 같이 각각의 중쇄의 C-종결부에 연결된 scFv와 함께 전장 IgG 분자로 구성된다. Fab 영역의 결합 특이성은 항-VEGF-A(제1 결합 도메인)이고, scFv는 항-ANG-2(제2 결합 도메인)이다. 제1 결합 도메인의 경쇄를 인코딩하는 전체 뉴클레오타이드 서열이 도 3에 도시되어 있다. 변역된 아미노산 서열 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 또한, 도 3에 도시되어 있다. 항-VEGF 경쇄는 위치 107에서 트레오닌을 라이신으로 돌연변이화시킴으로써 교정된 생식선(germline)이었다. 생식선 교정된 항-VEGF 서열은 H1RK로 지칭된다. 중쇄의 완전한 뉴클레오타이드 서열은 도 4에 도시되어 있고, 상응하는 아미노산 서열은 도 5에 도시되어 있다. 중쇄 서열의 아미노산 서열은 제1 결합 도메인의 중쇄 가변 영역, CH1, CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 중쇄 불변 영역, 연결성 글리신 세린 링커, 제2 결합 도메인의 가변 경쇄, scFv 글리신 세린 링커, 및 제2 결합 도메인의 가변 중쇄 영역으로 더 나뉠 수 있다.

[0070]

실시예 2 - 일시적인 형질감염

[0071]

BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 및 부모 항체의 일시적인 형질감염을, 120 rpm, 37°C 및 8% CO<sub>2</sub>에서 FreeStyle™ 혈청

-무함유 배지(Invitrogen)에서 배양된 HEK 293F 혼탁 세포에서 수행하였다. 형질감염 하루 전에 세포를  $0.7 \times 10^6$ 로 나누었다. 300  $\mu\text{L}$ 의 293fectin™ 형질감염 시약(Invitrogen) 및 200  $\mu\text{g}$ 의 DNA를 5 mL의 Opti-MEM® I 리듀스드(Reduced) 혈청 배지(Invitrogen) 내로 개별적으로 희석시키고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. DNA 및 293fectin™ 혼합물을 조합하고, 추가의 30분 동안 인큐베이션한 다음, 300 mL의  $1\times 10^6$  HEK 293F 세포/mL에 첨가하였다. 형질감염된 배양물의 부피를, FreeStyle™ 혈청-무함유 배지를 이용하여 3일마다 2배로 만들었다. 11일째에 배양물을 1500 X g에서 10분 동안 원심분리에 의해 수합하고, 0.2 mM 여과하였다(Eppendorf).

[0073]

단백질 A 결합 방법을 사용하여 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2 및 부모 항체의 발현을 모니터링하였다. 배양된 배지의 분취물을 0.2  $\mu\text{m}$  필터(Eppendorf) 처리하고, HPLC 시스템(Agilent 1100 Capillary LC)을 사용하여 단백질 A 컬럼(POROS®A 20  $\mu\text{m}$  컬럼, 4.6 x 50 mm, 0.8 mL) 상으로 로딩하였다. 컬럼을 1X PBS pH 7.2로 세척하고, 항체를 0.1% 인산(pH 1.8)을 이용하여 용출시켰다. A280 nm에서 UV 신호를 적분함으로써 결정된, 용출된 피크 아래 면적을 측정하고, 이를 사용하여 공지된 IgG 표준과 비교하여 발현 수준을 계산하였다. 표 1은 부모 항체 및 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 발현 수준을 보여준다.

### 표 1

	항-VEGF mAb	항-ANG-2 mAb	BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2
일시적인 발현 (293 F에서 10일 후 (mg/L))	195	165	174

[0074]

#### 실시예 3 - 단백질 정제 및 농도 결정

[0075]

항체를 표준 단백질 A 친화성 크로마토그래피 방법에 의해 정제하였다. 1 리터의 조건화된 배지를 1500 x g에서 10분 동안 원심분리하고, 0.2  $\mu\text{M}$  진공 여과하였다(Nalgene). 여과된 상층액을 Akta Explorer(GE)를 사용하여 mAbSelect™ 단백질 A 컬럼(GE) 상으로 로딩하였다. 20 컬럼 부피의 1X PBS, pH 7.2를 이용하여 단백질 A 컬럼을 평형화시키고, 여과된 배양 배지를 5 mL/분의 유속을 사용하여 로딩하였다. 20 컬럼 부피의 1X PBS, pH 7.2를 사용함으로써, 비결합된 물질을 제거하였다. 10 컬럼 부피의 0.1 M 글리신, 150 mM 소듐 클로라이드 pH 3.2를 사용하여 항체 용출을 수행하였다. 280 nm의 흡광도를 사용하여, 용출을 모니터링하였다. 1 분획의 1 M Tris-HCl pH 7.0 당 1/10의 부피를 사용함으로써, 단백질 A 용출된 항체를 즉시 중화시켰다. 그 후에, 0.22  $\mu\text{M}$  주사기 필터(Nalgene)를 사용하여 항체를 여과하였다. NanoDrop(NanoDrop) 및  $1.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 의 소광 계수를 사용하여 280 nm에서 흡광도를 판독함으로써, 정제된 항체의 농도를 결정하였다.

[0076]

BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 발현 동안 발생된 응집물을 세라믹 하이드록시아파타이트 유형 II(GE) 정제에 의해 효율적으로 제거할 수 있다. CHT 컬럼을 5 컬럼 부피의 1 M 소듐 하이드록사이드를 이용하여 예비-조건화하고, 1X PBS pH 7.2를 5 mL/분에서 이용하여 pH 7.2까지 중화시켰다. 20 컬럼 부피의 완충제 A(멸균수 중 20% 1X PBS, pH 7.2)를 사용하여, 상기 컬럼을 사용 전에 평형화시켰다. BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2 단백질 A 용출제를 CHT 컬럼 상에 직접적으로 로딩하고, 20 컬럼 부피의 완충제 A를 이용하여 세척하였다. 단량체 분획을 15 컬럼 부피에 대해 15% 완충제 A 및 85% 완충제 B(5X PBS, pH 7.2)를 이용하여 용출하였다. 100% 완충제 B를 사용하여 응집물을 용출하였다. 대표적인 용출 프로파일을 도 6에 제시한다. 단량체 분획을 1X PBS, pH 7.2에서 밤새 투석시켰다.

[0077]

단백질 A 정제 후 응집물 수준을 결정하고 폴리싱(polishing) 단계가 필요하다면, BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2의 단량체 함량을 측정하였다. TSK GEL G3000SWXL 컬럼(Tosoh Bioscience)과 함께 Agilent 1100 HPLC(Agilent)를 사용하여 분석 크기-배체 크로마토그래피(SEC-HPLC)를 수행하였다. 250  $\mu\text{g}$ 의 이중특이적 항체를 분석에 사용하였다. 이동상은 0.1 M 소듐 술페이트, 0.1 M 소듐 포스페이트 pH 6.8이었고, 280 nm의 흡광도를 사용하여 항체를 모니터링하였다. Chemstation 소프트웨어(Agilent)를 분석에 사용하였고, Prism5 소프트웨어(GraphPad)를 사용하여 도면을 제작하였다. 단백질 정제 후 및 세라믹 하이드록시아파타이트 정제 후, 대표적인 단량체 함량을 도 7에 제시한다. 세라믹 하이드록시아파타이트 크로마토그래피를 사용함으로써 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 중 적어도 12%의 응집물을 효율적으로 제거할 수 있다.

[0079] 실시예 4 - BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2의 분석 특징화

[0080] BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2를 환원성(reducing) 및 비-환원성 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 15  $\mu$ L의 1X PBS pH 7.2 중 2  $\mu$ g의 단백질, 항-VEGF 또는 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2를 1X NuPAGE 환원제(Invitrogen)와 함께 및 없이 5  $\mu$ L의 LDS-PAGE 로딩 완충제와 혼합하였다. 10  $\mu$ L의 노베스 샤프 프리-스테인드 단백질 표준(Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard)(Invitrogen)을 단백질 래더(ladder)로서 사용하였다. 시료를 70°C에서 10분 동안 가열하고, 벤치탑 원심분리를 사용하여 13,500 rpm에서 회전 침전(spun down)시키고, 4 내지 12% NuPage 젤(Invitrogen) 상에 로딩하였다. 전기영동을 MOPS 완충제에서 200 볼트에서 1시간 동안 수행하였다. SDS-PAGE 젤을 SimplyBlue™ SafeStain(Invitrogen)을 이용하여 염색시키고, 수(water) 중에서 밤새 탈색시켰다. 대표적인 SDS-PAGE 젤을 도 8에 제시한다.

[0081] iCE2 분석기(ProteinSimple)를 사용하여 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2의 영상 모세관 등전점 전기영동(imaged capillary isoelectric focusing)을 수행하였다. 파말라이트(pharmalyte) pH 3 내지 10 및 8 내지 10.5를 Sigma사로부터 입수하였다. 애노드액(0.1% 메틸 셀룰로스 중 80 mM 인산), 캐소드액(0.1% 메틸 셀룰로스 중 100 mM 소듐 하이드록사이드), 0.5% 메틸 셀룰로스, 헤모글로빈 및 양쪽성 물질을 포함한 iCE3 분석기의 성능 평가용 FC 카트리지 화학 시험 키트, 및 0.35% 메틸 셀룰로스 중 pI 마커를 ProteinSimple사로부터 구매하였다. 5.85 및 9.46 pI 마커를 ProteinSimple사로부터 구매하였다. 사용된 FC 카트리지 분리를 ProteinSimple사로부터 구매하였다. BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2를 탈이온수 중 1 mg/mL에서 제조하였다. 50  $\mu$ l의 1 mg/ml BiS3Ab-VEGF-Ang2 용액, 2  $\mu$ l의 5.85 pI 마커, 2  $\mu$ l의 9.46 pI 마커, 140  $\mu$ l의 0.5% 메틸 셀룰로스, 2  $\mu$ l의 파말라이트 3 내지 10 및 6  $\mu$ l의 8 내지 10.5 파말라이트를 조합하였으며; 45초 동안 와동(vortex)시키고, 10,000 rpm에서 3분 동안 원심분리하였다. 오토샘플러(ProteinSimple)를 사용하여 시료를 모세관에 도입하였다. 1000 kV에서 1분/s 동안, 후속해서 3000 kV에서 7분/s 동안 프리-포커스(pre-focus)에 의해 시료 분리를 수행하였다. 중수소 램프 검출기를 이용하여 280 nm에서 검출을 수행하였다. 데이터를 분석하고, iCE280 분석기 소프트웨어를 사용하여 도면을 제작하였다. BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2의 대표적인 포커싱을 도 9에 도시하고; 단백질의 pI를 표시한다.

[0082] VP-DSC(Microcal)를 사용한 시차 주사 열량계 분석 전에, BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2를 25 mM 히스티딘 pH 6.0 내에서 밤새 3회 투석시켰다. 최종 투석 완충제를 참조 스캔에 사용하여, 참조 공제(subtraction)용의 안정한 기준선을 수득하였다. 시약을 최소 2분 동안 탈기시키고, 단백질을 참조 완충제 내에서 1 mg/mL까지 희석시키고, 20°C로부터 110°C까지 1°C/분에서 16초의 필터 기간을 사용하여 스캔하였다. BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2에 대한 대표적인 전이 온도를 도 10에 제시한다.

[0083] 실시예 5 - ANG-2에 대한 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2의 결합 친화성

[0084] ANG-2에 대한 BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2 결합 친화성을 결정하였다. 평형 결합 상수(KD)를 KinExA 3000 및 3200 장비(Sapidyne Instruments, 미국 아이다호주 보이시 소재) 상에서 수행된 측정으로부터 수득하였다. 인간 ANG-2(huAng2) 단백질을 코팅 완충제(50 mM 소듐 카르보네이트 완충제, pH9) 중 5 mg/mL 및 30 mg/mL의 농도에서 UltraLink® 바이오서포트(Biosupport) 비드(PIERCE, 미국 일리노이주 록퍼드 소재) 상으로 코팅시켰다. 그 후에, 코팅된 비드를 미반응된 huAng2 단백질 용액으로부터 분리하고(부드러운 펄스 회전(pulse spin)), 10 mg/mL에서 BSA를 함유하는 1 M Tris, pH 8을 이용하여 실온에서 대략 15분 동안 블로킹시켰다. 이후, 비드 슬리리를 회전시켜, 블로킹 용액을 제거하고, 그 후에, 신선한 블록 완충제를 사용하여 블록 단계를 대략 2시간 동안 반복하고, 사용할 때까지 4°C에 보관하였다. 사용 전에, huAng2-코팅된 비드를 비드 바이얼에 전이시키고, 대략 27 mL의 장비 완충제(HBS-P 완충제, pH7.4; 10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 0.005% P20+0.02% NaN3를 함유함)에 재현탁시키고, KinExA 장비에 부착시켰다. 간략하게는, BiS3Ab-VEGF H1RK-ANG-2의 용액을 장비 완충제(HBS-P 완충제) 내에서 4 pM, 40 pM 및 400 pM에서 제조하고, 그 후에, 13개 튜브의 3개의 개별 시리즈로 배분하였다. 수용체- 및 KD-조건화된 조건들 둘 다 하에 측정을 수행할 수 있도록 이중특이적 항체의 이들 농도를 선택하였으며, 이는 시약 활성 및 친화성의 보다 염격한 추정을 각각 허용할 것이다. 그 후에, huAng2 단백질의 2배 단계 희석물을, 이중특이적 용액을 함유하는 9개의 튜브에 걸쳐 적정하였으며, 후속해서 10배 희석물을 2개 이상의 튜브에 걸쳐 적정하였고, 하나의 튜브를 이중특이적-단독, "제로" 대조군으로서 남겨 두었다. 그렇게 하여, 이는 huAng2 단백질의 농도 시리즈를 39 fM 내지 2 nM(4 pM 이중특이적 실험), 156 pM 내지 8 nM(40 pM 및 400 pM 이중특이적 실험) 범위로 제공하였다. 판매 회사 소프트웨어(Sapidyne Instruments, 미국 아이다호주 보이시 소재)를 통해 입수 가능한 이론 곡선 시뮬레이션을 기초로, 혼합물을 실온에서 1 내지 3일 동안 인큐베이션하여, 결합이 평형에 도달하도록 하였다. 이 시간의 종결 시, 신호-시험 실험을 수행하여, 각각의 측정 세트에 적절한 진행 조건을 결정하였다. 1 mg/mL에서 BSA를 함유하는 장비 완충제 중 0.75 mg/mL 또는 1.0

mg/mL에서 이용된 종-특이적인, 2차 항체 시약(염소 항-인간 IgG (H+L)-DyLight649, 파트 #109-495-088, Jackson ImmunoResearch Laboratories)을 사용하여 유리 항체의 검출을 가능하게 하였다. 그 후에, 모든 측정 세트로부터 수득된 데이터를 소프트웨어의 n-곡선 분석 특징을 사용하여 1-부위 결합 모델에 동시에 적합화시켜, 표 2에 보고된 바와 같이 평형 결합 상수(KD)를 수득하였다.

## 표 2

	<u>리간드</u>	<u><math>K_D</math>, pM (95% CI)</u> (Std. Aff. 모델 - ref [리간드])	<u>적합도</u> <u>오차</u>	<u>결합 부위</u> <u>활성</u>	<u>*<math>K_D</math>, pM</u> (대안적인 모델 - ref [IgG])
BiSAb- VEGF H1RK- ANG-2	huVEGF	24.0 (17.3-34.2)	3.06%	80%	30.1
BiSAb- VEGF H1RK- ANG-2	huAng2	23.3 (11.2-41.7)	3.67%	536%	4.35

[0085]

VEGF에 대한 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2 결합 친화성을 결정하였다. 항-hu-Ang2 측정과 함께, 평형 결합 상수(KD) 측정을 KinExA 3000 및 3200 장비(Sapidyne Instruments, 미국 아이다호주 보이시 소재) 상에서 수행하였다. 인간 VEGF(huVEGF) 단백질을 코팅 완충제(50 mM 소듐 카르보네이트 완충제, pH9) 중 3 mg/mL, 30 mg/mL 및 50 mg/mL의 농도에서 UltraLink® 바이오서포트 비드(PIERCE, 미국 일리노이주 록퍼드 소재) 상으로 코팅시켰다. 그 후에, 코팅된 비드를 미반응된 huVEGF 단백질 용액으로부터 분리하고(부드러운 펠스 회전), 10 mg/mL에서 BSA를 함유하는 1 M Tris, pH 8을 이용하여 실온에서 대략 15분 동안 블로킹시켰다. 이후, 비드 슬러리를 회전시켜, 블로킹 용액을 제거하고, 그 후에, 신선한 블록 완충제를 사용하여 블록 단계를 대략 2시간 동안 반복하고, 사용할 때까지 4°C에 보관하였다. 사용 전에, huAng2-코팅된 비드를 비드 바이얼에 전이시키고, 대략 27 mL의 장비 완충제(10 mM HEPES + 300 mM NaCl + 5 mM CaCl2 + 0.05% P20 + 0.02% NaN3, pH 8)에 재현탁시키고, KinExA 장비에 부착시켰다. 간략하게는, BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 용액을 장비 완충제 내에서 10 pM, 100 pM 및 2.5 nM에서 제조하고, 13개 튜브의 3개의 개별 시리즈로 배분하였다. 수용체- 및 KD-조건화된 조건들 둘 다 하에 측정을 수행할 수 있도록 이중특이적의 이들 농도를 선택하였으며, 이는 시약 활성 및 친화성의 보다 엄격한 추정을 각각 허용할 것이다. 그 후에, huVEGF 단백질의 2배 단계 희석물을 이중특이적 용액을 함유하는 9개의 튜브에 걸쳐 적정하였으며, 후속해서 10배 희석물을 2개 이상의 튜브에 걸쳐 적정하였고, 하나의 튜브를 이중특이적-단독, "제로" 대조군으로서 남겨 두었다. 그렇게 하여, 이는 huVEGF 단백질의 농도 시리즈를 78 fM 내지 4 nM(10 pM 이중특이적 실험), 488 fM 내지 25 nM(100 pM 이중특이적 실험) 및 3.91 pM 내지 200 nM(2.5 nM 이중특이적 실험) 범위로 제공하였다. 판매 회사 소프트웨어(Sapidyne Instruments, 미국 아이다호주 보이시 소재)를 통해 입수 가능한 이론 곡선 시뮬레이션을 기초로, 혼합물을 실온에서 1 내지 4일 동안 인큐베이션하여, 결합이 평형에 도달하도록 하였다. 이 시간의 종결 시, 신호-시험 실험을 수행하여, 각각의 측정 세트에 적절한 진행 조건을 결정하였다. 1 mg/mL에서 BSA를 함유하는 장비 완충제 중 0.75 mg/mL, 1.0 mg/mL 또는 2 mg/mL에 이용된 종-특이적인, 2차 항체 시약(염소 항-인간 IgG (H+L)-DyLight649, 파트 #109-495-088, Jackson ImmunoResearch Laboratories)을 사용하여 유리 항체의 검출을 가능하게 하였다. 그 후에, 모든 측정 세트로부터 수득된 데이터를 소프트웨어의 n-곡선 분석 특징을 사용하여 1-부위 결합 모델에 동시에 적합화시켜, 상기 표 2에 보고된 바와 같이 평형 결합 상수(KD)를 수득하였다.

실시예 6 - ANG-2 및 VEGF165에 대한 BIS3AB-VEGF H1RK-ANG-2에 의한 동시 결합

10 mM 아세테이트, pH 5 중 10 nM의 VEGF165, 100 nM의 Ang2 및 10 nM의 Bs3Ab-VEGF-Ang2를 사용하여 동시에 결합 실험을 Biacore 3000(GE Healthcare) 상에서 25°C에서 수행하고, 제조업체(GE Healthcare)에 의해 제공된

표준 아민 커플링 프로토콜을 사용하여 CM5 센서칩 표면 상에 고정하였다. 용액 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2 고정된 칩을 사용하여, 100 nM의 VEGF, 및 100 nM의 VEGF와 500 nM의 ANG-2의 혼합물을 HBS 완충제(GE Healthcare)에서 제조하였다. VEGF 용액을 30 mL/분의 유속에서 500초 동안 주사하였다. 제1 주사 후, VEGF 또는 VEGF/ANG-2 혼합물의 추가 주사를 250초 동안 주사하였다. 우선 500 nM의 ANG-2를 주사하고, 후속해서 VEGF/ANG-2 혼합물의 또 다른 ANG-2 주사에 의해, 유사한 실험을 수행하였다. 동시 결합을 더 확인하기 위해, VEGF 및 ANG-2 코팅된 칩을 사용하였다. VEGF165 표면의 경우, 50 nM의 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2를 30 mL/분에서 600초 동안 유동시키고, 후속해서 50 nM BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2 및 500 nM ANG-2의 제2 주사를 수행하였다. ANG-2 표면을 유사한 실험에 사용하였다. 50 nM의 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2를 30 mL/분에서 500초 동안의 초기 주사에 사용하였다. 50 nM의 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2, 또는 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2와 100 nM의 VEGF165의 혼합물을 사용하여, 제2 주사를 수행하였다. BIA평가(GE healthcare)를 사용하여 데이터를 분석하고, Prism 5(Graph Pad)를 사용하여 도면을 제작하였으며, 대표적인 결과를 도 11에 제시한다.

[0089]

BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2 항체를 또한, 이중 결합 ELISA에서 VEGF 및 ANG-2에 대한 동시 결합에 대해 스크리닝하였다. Ca++ 또는 Mg++ 없이 PBS에 희석된 100  $\mu$ L의 1.0  $\mu$ g/mL 인간 또는 마우스 VEGF(Peprotech)를 이용하여 맥시소프(Maxisorp) 플레이트(Nunc, Cat #439454)를 코팅시키고, 밤새 냉장시켰다. 플레이트를 디캔팅(decant)시키고, 그 후에, 1X PBS 중 3% BSA(Sigma, Cat #A-3059) 및 0.1% Tween-20을 함유하는 200  $\mu$ L의 블로킹 완충제를 이용하여 플레이트 쉐이커 상에서 1.5시간 동안 블로킹시켰다. 0.1% Tween-20을 함유하는 1 X PBS로 플레이트를 3회 세척하였다. 블로킹 완충제 중 50  $\mu$ L의 60 nM 및 단계 희석의 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2 이중특이적 항체, Ang-2 항체, 또는 이중특이적 r347 아이소타입 대조군 암(arm)(BS3Ab-r347-Ang2)을 2벌 중복하여 첨가하고, 플레이트 쉐이커 상에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척 완충제로 3회 세척하고, 그 후에, 블로킹 완충제 중 50  $\mu$ L의 1  $\mu$ g/ml 인간 또는 마우스 Ang2-비오틴(R&D Systems)을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트 쉐이커 상에서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, 그 후에, 50  $\mu$ L의 1:15,000 스트렙타비딘 HRP(Pierce)를 플레이트 쉐이커 상에서 실온에서 1시간 동안 첨가하였다. 플레이트를 세척하고, 그 후에 50  $\mu$ L의 TMB 용액(KPL)을 각각의 웰에 첨가함으로써 발색시키고, 그 후에 50  $\mu$ L의 1 M 인산을 이용하여 반응을 중단시켰다. 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 플레이트를 450 nm에서 판독하였다. GraphPad Prism, 버전 5.01(미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)에서 비-선형 회귀 분석(로그 용량 반응, 4-매개변수 적합도 곡선)을 사용하여 EC50 값을 결정하였다. 대표적인 결과를 도 12a(인간) 및 도 12b(마우스)에 제시한다. 인간 및 마우스 VEGF 및 ANG-2에 대한 강한 동시 결합은, 이러한 검정에서 VEGF 및 ANG-2에 대한 동시 결합의 실패를 가리키는 약한 결합을 보여준 Ang2 항체(MEDI3617) 단독 및 BS3Ab-r347-Ang2와 비교하여 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2(각각 EC50 10.8 pM 및 103.8 pM)에 의해 나타났다.

[0090]

실시예 7 - 감소된 VEGF121 결합에 대한 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 스크리닝

[0091]

항체를 ELISA 포맷에서 VEGF121 결합에 대해 스크리닝하였다. Ca++ 또는 Mg++ 없이 PBS에 희석된 25  $\mu$ L의 2  $\mu$ g/mL 인간 VEGF(Peprotech)를 이용하여 96-웰 하프 웰 맥시소프 플레이트를 코팅시키고, 밤새 냉장시켰다. 플레이트를 디캔팅시키고, 그 후에, 1X PBS 중 3% BSA(Sigma, Cat #A-3059) 및 0.1% Tween-20을 함유하는 180  $\mu$ L의 블로킹 완충제를 이용하여 37°C에서 1.5시간 동안 블로킹시켰다. 0.1% Tween-20을 함유하는 1 X PBS로 플레이트를 3회 세척하였다. 블로킹 완충제 중 50  $\mu$ L의 단계 희석의 항-VEGF 항체, Avastin®(양성 대조군; 항-VEGF 항체) 및 r347(음성 대조군)을 2벌 중복하여 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척 완충제로 3회 세척하고, 그 후에, 50  $\mu$ L의 1:5000 염소 항-인간 HRP IgG H+L(Jackson Immunoresearch)을 각각의 웰에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 50  $\mu$ L의 TMB 용액(KPL)을 각각의 웰에 첨가하여 플레이트를 발색시키고, 그 후에 50  $\mu$ L의 1 M 인산을 이용하여 반응을 중단시켰다. 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 플레이트를 450 nm에서 판독하였다. 대표적인 결과를 도 13에 제시한다. BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2는 양성 대조군 B20-4.1과 대조적으로, VEGF121 결합이 결여되었다.

[0092]

실시예 8 - 감소된 VEGF189 결합에 대한 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 스크리닝

[0093]

ELISA 포맷에서 VEGF189에 대한 결합에 대해 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2를 스크리닝하였다. Ca++ 또는 Mg++ 없이 PBS에 희석된 25  $\mu$ L의 2  $\mu$ g/mL 인간 VEGF189(R&D Systems)를 이용하여 96-웰 하프 웰 맥시소프 플레이트를 코팅시키고, 밤새 냉장시켰다. 플레이트를 디캔팅시키고, 그 후에, 1X PBS 중 3% BSA(Sigma, Cat #A-3059) 및 0.1% Tween-20을 함유하는 180  $\mu$ L의 블로킹 완충제를 이용하여 37°C에서 1.5시간 동안 블로킹시켰다. 0.1% Tween-20을 함유하는 1 X PBS로 플레이트를 3회 세척하였다. 블로킹 완충제 중 50  $\mu$ L의 6.7 nM 및 단계 희석의 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2, G6-31(양성 대조군) 및 BS3Ab-r347-Ang2(음성 대조군)를 2벌 중복하여 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척 완충제로 3회 세척하고, 그 후에, 50  $\mu$ L의 1:5000 염소 항

-인간 HRP IgG H+L(Jackson Immunoresearch)을 각각의 웰에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 50  $\mu\text{l}$ 의 TMB 용액(KPL)을 각각의 웰에 첨가하여 플레이트를 발색시키고, 그 후에 50  $\mu\text{l}$ 의 1 M 인산을 이용하여 반응을 중단시켰다. 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 플레이트를 450 nm에서 판독하였다. 도 14는 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2에 대한 대표적인 결과를 보여준다. BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2는 양성 대조군 G6-31과 비교하여 VEGF189에 대해 5배 더 낮은 결합(EC50 0.057 nM vs 0.0096 nM)을 보여주었다.

#### [0094] 실시예 9 - VEGF-ANG2 이중특이적 항체의 약효를 결정하기 위한 기능적 검정

BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2를 기능적 바이오검정에서 스크리닝하여, 인간, 마우스 및 시노(cyno) 수용체를 갖는 세포주에서 pVEGFR2 및 pTie2를 감소시키는 능력을 결정하였다. Ad293-HuVEGFR2(C1. E2), Hek293-Tie2, Ad293-muVEGFR2-muAng2 세포(C1. D10), Ad293-cynoVEGFR2-cynoAng2 세포(C1. SB5) 및 Ad293-cynoTie2 세포(C1. D12)를 안정한 형질감염으로부터 발생시켰다. 세포를 100  $\mu\text{l}$  DMEM + 10% FBS(Life Technologies, 미국 캘리포니아주 칼즈베드 소재)와 함께 96-웰 폴리-D-라이신 조직 배양 플레이트(Costar, 미국 메사추세츠주 투크스베리 소재)에 서브컨플루언시(subconfluence)에서 접종하고, 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 밤새 인큐베이션하였다. 이튿날, 배지를 흡인하고, 50  $\mu\text{l}$  기아(starvation) 배지(DMEM + 0.2% FBS + 0.1% BSA)로 대체하고, 세포를 인큐베이터에 밤새 되돌렸다. 24시간째에, 배지를 흡인하고, 2660 nM(2X 농도) 항체, BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2 및 BS3Ab-HPV-r347 음성 대조군을 혼합 무함유 DMEM + 0.1% BSA에서 단계 희석시키고, 37°C에서 30분 동안 플레이트에 2별 중복 첨가하였다. 그 후에, 1:1로 혼합된 50  $\mu\text{l}$ 의 12  $\mu\text{g}/\text{ml}$  인간, 마우스(R&D Systems) 또는 시노(인-하우스 조제물) VEGF(4X)를 웰에 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후에, 플레이트를 37°C에서 추가의 7분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 디캔팅시키고, 프로테아제 및 포스파타제 억제제(Life Technologies, 미국 캘리포니아주 칼즈베드 소재)를 함유하는 55  $\mu\text{l}$  빙냉 RIPA 용해(lysis) 완충제(Boston BioProducts, 미국 메사추세츠주 보스턴 소재)를 이용하여 웰을 용해시켰다. pVEGFR2 전체 세포 용해물 키트(Meso Scale Diagnostics, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)를 사용하여 인간, 시노 및 뮤린 pVEGFR2를 검출하였다.

**[0096]** 메조 스케일 다이아그노스틱스(MSD; Meso Scale Diagnostics) 플랫폼을 사용하여 개발된 프로토콜을 사용하여 인간 및 시노 pTie2를 결정하였다. 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 Tie2 항체 클론 16(Abcam, 미국 메사추세츠주 캠브리지 소재)을 이용하여 MSD 고 결합(hight bind) 플레이트를 밤새 코팅시켰다. 이튿날, 플레이트를 트리스(tris) 완충 식염수(TBS)로만 세척하고, TBS 중 3% MSD 블라커 A + 0.05% Tween 20(Sigma, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)을 이용하여 실온에서 1시간 동안 회전 쉐이킹하면서 블로킹시켰다. TBS + 0.05% Tween 20으로 플레이트를 세척하고, 용해물을 플레이트에 첨가하고, 그 후에 실온에서 1시간 동안 회전 쉐이킹하면서 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항-인간 Tie2 항체(AF2720, R&D Systems, 미국 미네소타주 미네아폴리스 소재)를 실온에서 1시간 동안 회전 쉐이킹하면서 첨가하였다. 플레이트를 세척하고, 그 후에, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  술포-태그 염소 항-토끼 2차 항체(MSD, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)를 플레이트에 실온에서 1시간 동안 회전 쉐이킹하면서 첨가하였다. 플레이트를 세척하고, 판독 완충제 T(MSD, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)를 첨가하고, 그 후에, Sector Imager 6000(MSD, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)을 사용하여 플레이트를 즉시 판독하였다.

**[0097]** 메조 스케일 다이아그노스틱스(MSD) 플랫폼을 사용하여 개발된 프로토콜을 사용하여 뮤린 pTie2를 결정하였다. MSD 스트렙타비딘 플레이트를 TBS 중 3% MSD 블라커 A + 0.05% Tween 20(Sigma, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)을 이용하여 실온에서 1시간 동안 회전 쉐이킹하면서 블로킹시켰다. TBS + 0.05% Tween 20으로 플레이트를 세척하고, 그 후에, 블로킹 완충제 중 25  $\mu\text{l}/\text{웰}$ 의 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  비오틴 항-마우스 Tie2 항체(Biolegend# 124006)를 실온에서 1시간 동안 회전 쉐이킹하면서 인큐베이션하였다. 플레이트를 디캔팅시키고, 3회 세척하였다. 그 후에, 25  $\mu\text{l}/\text{웰}$ 의 용해물을 2별 중복하여 1개 웰 당 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 플레이트 쉐이커 상에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, 그 후에, 25  $\mu\text{l}$ 의 술포-태그 PY20(MSD)을 1개 웰 당 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 플레이트 쉐이커 상에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, 150  $\mu\text{l}$ 의 2X MSD 판독 완충제 T를 첨가하고, Sector Imager 6000(MSD, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)을 사용하여 플레이트를 즉시 판독하였다.

**[0098]** pTie2 및 pVEGFR2에 대한 퍼센트 인산화를 식: [평균 RLU(시험 시료)/평균 RLU (항체 없음)] \* 100에 의해 계산하였다. 대표적인 결과를 표 3에 제시한다. BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2는 인간, 마우스 및 시노 pVEGFR2 및 pTie2를 강력하게 감소시켰으며, 이는, 2개 암 모두가 이중특이적 포맷에서 기능적임을 보여준다. BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 항-ANG-2 활성은, BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 scFV 항-ANG-2의 제조에 사용된 ANG-2 항체(MEDI3617)와 비교하였을 때 두드러지게 더 큰 활성을 보여주었다.

표 3

분자	Ad293-HuVEGFR2 세포 (Cl. E2)	Hek293-Tie2 세포	MuVEGFR2-MuTie2 세포(Cl. D10)		Cyno VEGFR2-Cyno Tie2 세포(Cl. SB5)	Ad293-Cyno Tie2 세포(Cl. D12)
	Hu pVEGFR2 EC <sub>50</sub> (nM)	Hu pTie2 EC <sub>50</sub> (nM)	Mu pVEGFR2 EC <sub>50</sub> (nM)	Mu pTie2 EC <sub>50</sub> (nM)	Cyno pVEGFR2 EC <sub>50</sub> (nM)	Cyno pTie2 EC <sub>50</sub> (nM)
BS3Ab-VEGF H1RK-Ang2	0.087	2.29	5.95	12.16	0.131	3.47
H1RK	0.071	시험되지 않음	시험되지 않음	시험되지 않음	0.099	시험되지 않음
대조군						
B20-4.1	시험되지 않음	시험되지 않음	26.25	시험되지 않음	4.25	시험되지 않음
Ang2 항체	시험되지 않음	2.65	시험되지 않음	137	시험되지 않음	33.17
BS3Ab-HPV-r347 (-) 대조군	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

[0099]

## 실시예 10 - BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 생체내 활성

[0100]

BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2를, 종양 구획 내에서의 항-혈관신생을 예시하기 위해 BxPC3 종양의 캐스팅을 포함한 786-0 신세포암종 및 BxPC3 췌장암종 모델에서 효능에 대해 생체내에서 시험하였다. 또한, 망막 혈관형성 모델을 수행하여, BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2의 활성을 더 나타내었다. 보다 더, 혈소판감소증의 모델을 마우스에서 수행하여, VEGF의 모든 동종형에 결합하는 항-VEGF 양성 대조군 항체(G6-31)와 비교하여 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2에서 더 적은 독성이 발생하는지 결정하였다. 마지막으로, 신장 병상을 평가하였다.

[0101]

786-0 신세포암종 모델의 경우, 인간 신장암 세포주 786-0으로부터의 종양 단편을 누드 마우스의 우측 옆구리에 피하 이식하였다. 종양 부피가 대략 200 mm<sup>3</sup>에 도달한 후, 투약을 개시하였다. 마우스를 1주일에 2회 총 6회 투약 동안 치료하였다(축 상에서 삼각형). 분자량을 기초로, 용량을 정규화하였다. BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2는 종양 성장을 감소시키는 데 있어서 ANG-2 항체(MEDI3617) 또는 VEGF 항체(Avastin®) 단독과 비교하여 더 효과적이었다. 원-웨이 ANOVA 분석 Graphpad Prism 버전 5.01(미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)에 의해 결정된 바와 같이 P-값은 0.03이다. 대표적인 데이터를 도 15에 제시한다.

[0102]

BxPC3 췌장암종 모델의 경우, BxPC3 종양 단편을 암컷 SCID 마우스의 우측 옆구리에 피하 이식하였다. 종양 부피가 대략 200 mm<sup>3</sup>에 도달한 후, 투약을 개시하였다. 마우스를 1주일에 2회 총 6회 투약 동안 치료하였다(축 상에서 삼각형). 분자량을 기초로, 용량을 정규화하였다. BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2는 종양 성장을 감소시키는 데 있어서 ANG-2 항체(MEDI3617) 또는 VEGF 항체(Avastin®) 단독과 비교하여 더 효과적이었다. 원-웨이 ANOVA 분석 Graphpad Prism 버전 5.01(미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)에 의해 결정된 바와 같이 P-값은 0.02이다. 대표적인 데이터를 도 16에 제시한다.

[0103]

종양 부피 외에도, BxPC3 췌장암종 모델 연구로부터 종양을 사용하여 종양 맥관 구조를 평가하였다. 안락사 전 15분째에 마우스에게 헤파린을 투약하여, 혈액 응고를 예방하였다. 0.1 mM 소듐 니트로프루시드 용액을 대략 6 mL/분의 속도로 관류시켰다. 8 mL의 라텍스, 10 mL의 희석제 및 900 uL의 큐어(cure)를 혼합함으로써 Microfil MV-122를 제조하였다. 혼합물이 침강된 후(대략 1분), 17 mL의 총 부피가 투여될 때까지 상기 혼합물을 2 mL/분의 속도로 관류시켰다. 60 내지 90분 후, 종양을 절개하고, 10% NBF에 24시간 동안 침지시켰다. 그 후에, 시료를 에탄올 구배(25% ETOH/PBS, 50% ETOH/PBS, 75% ETOH/PBS, 95% ETOH, 및 그 후에 100% ETOH)를 통해 각각의 구배 수준에서 24시간 동안 전이시켰다. 최종 인큐베이션 후, 시료를 메틸 살리실레이트에 침지시켜, 탈수된 종양 시료를 투명화(clear)시킨 후, 광학 현미경에 의해 이미징하였다. 마우스에서 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2를 이용하여 종양 맥관 구조를 감소시켰다. 대표적인 데이터를 도 17에 제시한다.

[0104]

상기 기재된 모델 외에도, BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2를 망막 혈관신생 모델에서 평가하였다. 이 모델을 사용하여, CD1 마우스에게 출생 시, 1일째, 3일째 및 5일째에 복강내 투약하였다. 8일째 후, 마우스를 마취시키고, 플루오레세인-표지 텍스트란을 주입하였다. 눈을 제거하고, 10% 포르말린으로 고정한 후, 플랫 마운트(flat mount)를 제조하였다. 플랫 마운트를 형광 현미경에 의해 검사하였다.

[0105]

신생(neonatal) 망막 혈관신생은 2개의 과정, 즉, 시신경(도 18 도트-화살표)으로부터 망막 가장자리까지의 혈관 이동, 및 분지화로 구성된다. BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2는, 존재하는 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2가 없을 때의 이동 정도와 비교하여, 감소된 혈관 이동을 나타내었다. 대표적인 결과를 도 18에 제시한다. BiSAb-VEGF H1RK-ANG-

2는, 존재하는 BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2가 없을 때의 분지화 정도와 비교하여, 감소된 혈관 분지화를 나타내었다. 대표적인 결과를 도 19에 제시한다.

[0107] 혈소판감소증 모델의 경우, Meyer 등(문헌[J ThrombHaemost 7:171-81, 2009])으로부터 방법을 채택하였다. 간략하게는, 8 내지 16주령의 FC 감마 수용체 2A 유전자 이식 마우스에게, 예비혼합된 VEGF165, 0.6 단위 혜파린, 및 항체를 측면 꼬리 정맥 내로 주사하였다. 그 후에, 고통의 행동 정후에 대해 마우스를 관찰하고, 점수를 매겼다: (-) 멈추고, 모서리로부터 모서리까지 일정하게 이동하며, 정상적으로 숨을 쉼, (+) 무기력의 정후가 존재하고, 멈추고, 더 오랫동안 이동하며, 얇은 숨을 쉼, (++) 매우 무기력하고, 이동하는 것을 멈추고, 상자의 거의 한쪽 면에 머물러 있으며, 깊은 숨을 쉼, (+++) 심각한 혈전증성 사례-경련(twitching) 및 빙빙 돌기 (twirling), (++++) 사망. BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2는 항-VEGF 대조군(G6-31)과 비교하여 혈소판감소증을 감소시켰다. 대표적인 데이터를 표 4에 제시한다.

#### 표 4

	관찰	점수
항-VEGF* + VEGF165 + 0.6 단위 혜파린	호흡하기 고통스러워하며, 경련을 일으키고, 빙빙 돋다	+++
BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2 + 0.6 단위 혜파린	멈추고, 언뜻 느리게 움직이지만, 빠르게 회복하고, 정상적으로 호흡한다.	-/+

\* 항-VEGF는 VEGF의 모든 동종형에 결합함

[0109] 1개 그룹 당 4마리의 동물로부터의 신장을 과요오드산-쉬프(PAS; Periodic acid-Schiff)를 통한 염색에 의해 검사하였다. 14번의 치료 투약 후, PAS 염색을 사용하여 신장 병상을 검사하였다. BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2와 비교하여 항-VEGF(G6-31) 치료된 동물에서, 증가된 혈관사이 바탕질 및 굽어진 모세관 고리(화살표)가 존재하였다. 대표적인 것을 표 5 및 도 20a 내지 20c에 제시한다.

#### 표 5

병리학적 특성	비처리	항-VEGF	BiSAb-VEGF H1RK-ANG-2
증가된 혈관사이 바탕질	0	2.75	0
굽어진 모세관 고리	0	2	0
등급 0 = 부재, 등급 1 = 미미함, 등급 2 = 약함, 등급 3 = 중간 정도, 등급 4 = 심함, 등급 5 = 매우 심함			

[0110]

#### 원용에 의한 포함

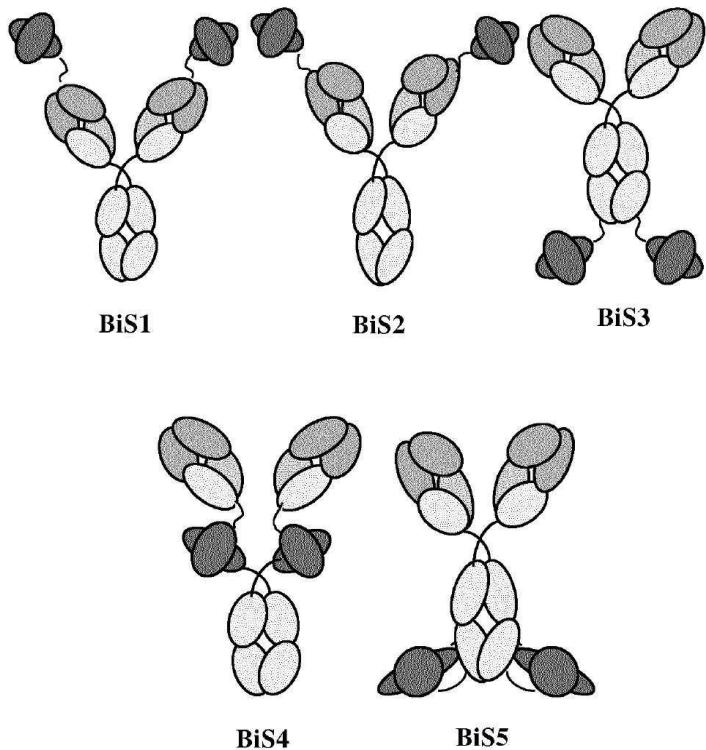
[0112] 특히, 특히 출원, 논문, 교재 등을 포함하여 본원에 인용된 모든 참조문헌들, 및 상기 참조문헌에서 인용된 참조문헌들은 이들이 이미 존재하지 않는 정도까지, 모든 목적을 위해 그 전체가 원용에 의해 본원에 포함된다.

#### 등가사항

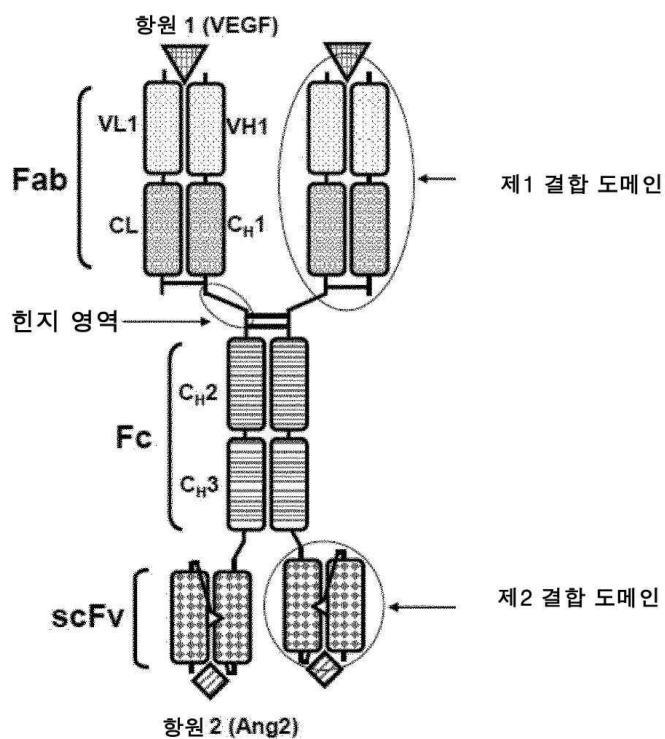
[0114] 상기 기재된 명세서는 당업자가 구현예를 실시할 수 있기에 충분한 것으로 여겨진다. 그러나, 상기 내용이 문맥에서 아무리 상세히 나타날 수 있더라도, 구현예는 많은 방식으로 실시될 수 있고, 청구항은 이의 임의의 등가사항을 포함하는 것으로 이해될 것이다.

도면

도면1



도면2



### 도면3

>DNA 서열: 도 1에 제시된 바와 같은 도메인 Fab 결합 단위 1(항-VEGF)의  
경쇄 가변 도메인 및 불변 카파

```
GAGATCGTGTGACCCAGTCTCCAGCCACCCCTCTTTGTCTCCAGGGAAAGGCCACCCCT
CTCCTGCAGGCCAGTCAGAGTGTTCACAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCGAGAAACCTG
GCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGCCACTGGCATCCCAGACAGG
TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGA
TTTGCAAGTTACTACTGTCAACAGAGTTACCGCACCCCTCCTCGGCCAAGGGACACGAC
TGGAGATTAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCCAGGATCTGATGAGCAG
TTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA
AGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGC
AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC
GAGAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTGCCGTACAAA
GAGCTTCAACAGGGAGAGTGT
```

>단백질 서열: 도메인 Fab 결합 단위 1(항-VEGF)의  
경쇄 가변 도메인 및 불변 카파

```
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVHSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSYRTPSFQGTRLEIKRTVAAPSFIGPPSDEQ
LKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADY
EKKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

>단백질 서열: 도메인 결합 단위 1(항-VEGF)의  
경쇄 가변(VL)

```
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVHSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSYRTPSFQGTRLEIK
```

## 도면4

>DNA 서열: 도 1에 제시된 바와 같은 Fab 결합 단위 1(VEGF)의 VH-CH1 도메인, FC 영역, 연결 링커, 및 결합 단위 2(항-Ang2)의 scFv

GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTTCTTACGTCTTCT  
 TCGCCTGCTCCGGATTCACTTTCTCTGGTACGAGATGTATTGGGTCGCCAAGCTCCTGGT  
 AAAGGTTGGAGTGGGTTCTTCTATCTCTCCTCTGGTGGCTGGACTATGTATGCTGACTCC  
 GTTAAAGGTGCTTCACTATCTTAGAGACAACCTTAAGAATACTCTACTTGAGATGAAC  
 AGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGACCCCCCTGTATAGCAGTGACGGG  
 CTTCGGCAGGGGATATCTGGGCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCAAGCGCGTCGACCAAG  
 GGCCCACATCCGTCTTCCCCCTGCCACCCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTG  
 GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGCCGGTACGGTGTCTGGAACTCAGCGCTCTG  
 ACCAGCGCGTGCACACCTTCCCAGTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
 GTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTGGGCAACCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG  
 CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGGCCAAATCTGTGACAAAACACACATGC  
 CCACCGTGCCTCAGCAGCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCCAAACCC  
 AAGGACACCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCAC  
 GAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCTAATGCCAAGACA  
 AAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGCTCTCACCCTGCAC  
 CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCC  
 ATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTCTACACCCCTGCC  
 CCATCCCAGGAGGAGTGAACCAAGAACAGGTACGGCTGACCTGCGCTGGTCAAAGGCTTCTAT  
 CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCACG  
 CCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC  
 AGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCTCATGCTCGTGTGAGGCTCTGCACAAACCAACTAC  
 ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAGGCGGAGGGGATCCGGCGGAGGGGCTCT  
 GAGATCGTGTGACCCAGAGCCCCGGCACCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGAGAGGCCACCC  
 AGCTGCCGGGCAGCCAGTCCATCACCGCAGCTACCTGGTGTGGTATCAGCAGAACGCCCGGA  
 CAGGCCAGACTGCTGATCACCGCCTCCAGCTGGGCCACCGCATCCCCGACAGATT  
 AGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCAGACTGGAGCCGAGGACTTC  
 GCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCACCCCATCACCTCGGAtgcGGCACCGAGCTG  
 GAGATCAAGGGCGGAGGGCTCTGGGGAGGGGAGCGCGGGAGGAGTCTGGGGAGGG  
 GGCAGCCAGGTGAGCTGGTGTGAGCTGGCGGGAGTGGTGCAGCCCGCAGAACGCTGAGA  
 CTGAGCTGCCGCCAGCGCTTCACTTACCAACTACGGCATGCACGGTCCGCCAGGCC  
 CCTGGCAAGtGCCTGGAGTGGGTGGCGTGATCAGCCACGGCAACAACAAGTACTACGTG  
 GACAGCGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCCCTGTACCTCCAG  
 ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAGGGCATCGACTTT  
 TGGAGCGGCCTGAATTGGTGCACCCCTGGGGCAGGGCACCTGGTGAACGTGTCCAGC

## 도면5

>단백질 서열: 도 1에 제시된 바와 같은 Fab 형성 결합 단위 1(VEGF)의 VH-CH1 도메인, FC 영역, 연결 링커, 및 결합 단위 2(항-Ang2)의 scFv

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYEMYWVRQAPGKGLEWVSSISP SGGWTMYADSVKGRT  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATPLYSSDGLSAGDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPS  
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSLGTQTYI  
CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPDTLMISRTPETCVVVDVS  
HEDPEVKFNWYVGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK  
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGS  
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSEIVLTQSPGTLSLS  
PGERATLSCRASQSITGSYLAQYQQKPGQAPRLLITGASSWATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE  
DFAVYYCQQYSSSPITFGCGTRLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLVESGGVVQPGRSRLSC  
AASGFTFTNYGMHWVRQAPGKCLEWVAVISHDGNNKYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED  
TAVYYCAREGIDFWGLNWFDPWGQGTIVTVSS

>단백질 서열: Fab 형성 결합 단위 1(항-VEGF)의 VH 도메인

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYEMYWVRQAPGKGLEWVSSISP SGGWTMYADSVKGRT  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATPLYSSDGLSAGDIWGQGTMVTVSS

>단백질 서열: 중쇄 불변 영역

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVV  
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPDTLM  
SRTPEVTCVVVDVSHDPEVKFNWYVGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC  
KVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCVKGFYPSDIAVEWE SNGQPEN  
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>단백질 서열: 글리신-세린 링커(G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>

GGGGSGGGGS

>단백질 서열: 결합 단위 2(항-Ang2)의 scFv

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSITGSYLAQYQQKPGQAPRLLITGASSWATGIPDRFSGSGS  
GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSSSPITFGCGTRLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLVESG  
GGVQPGRSRLSCAASGFTFTNYGMHWVRQAPGKCLEWVAVISHDGNNKYYVDSVKGRFTISRDN SK  
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIDFWGLNWFDPWGQGTIVTVSS

>단백질 서열: 결합 단위 2(항-Ang2)의 VL 도메인

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSITGSYLAQYQQKPGQAPRLLITGASSWATGIPDRFSGSGS  
GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSSSPITFGCGTRLEIK

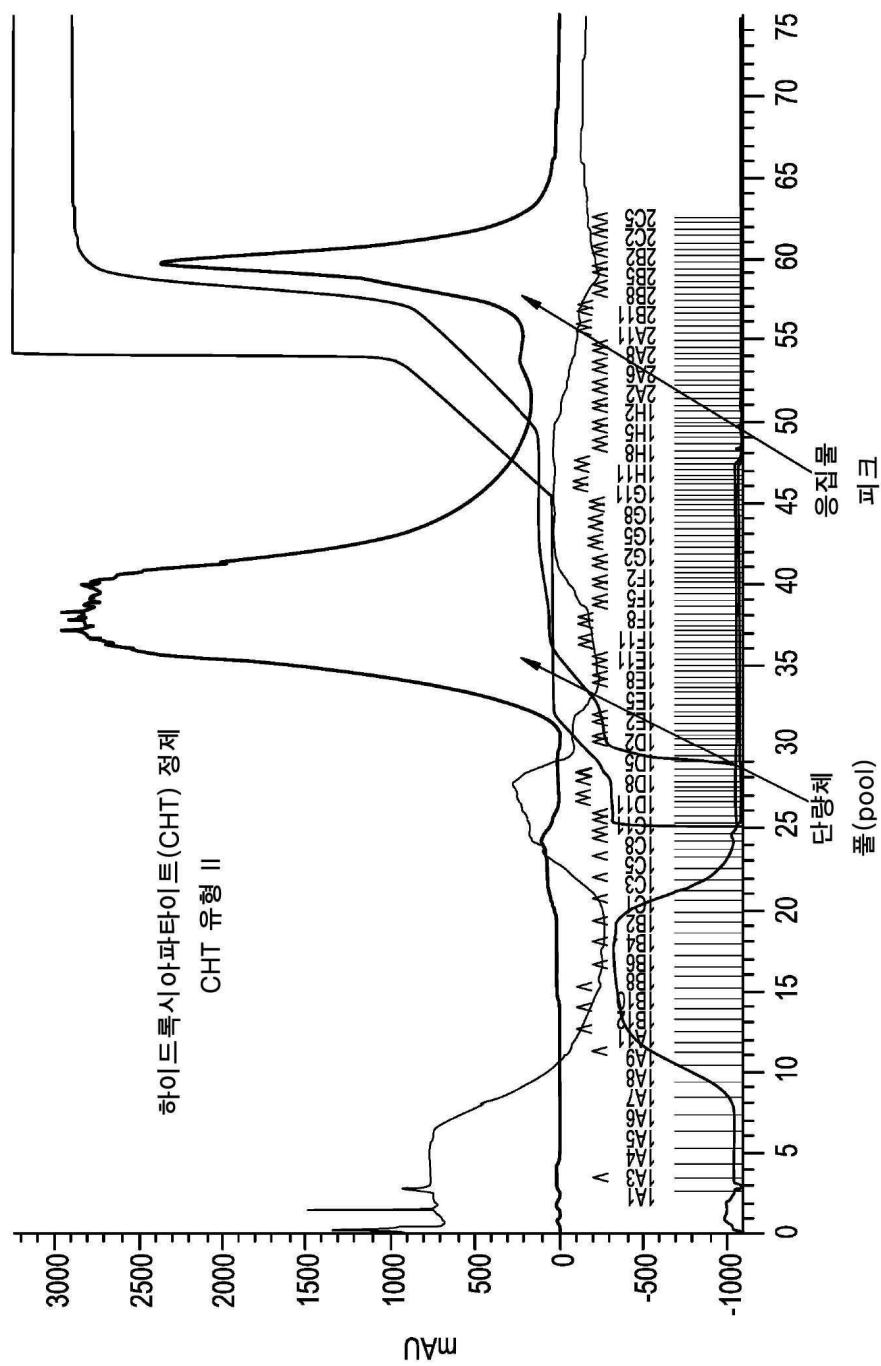
>단백질 서열: 글리신-세린 링커(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>

GGGGSGGGGSGGGSGGGS

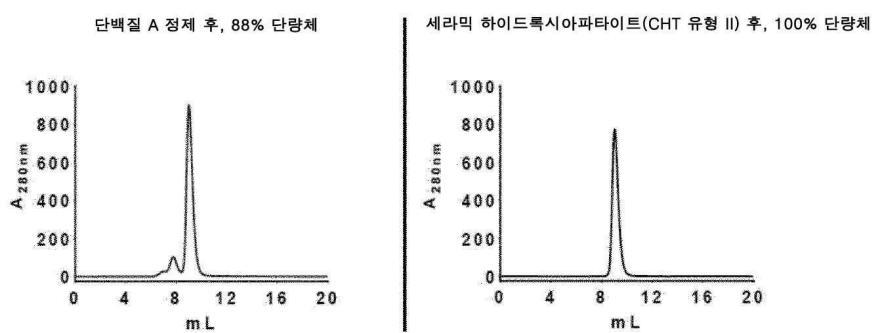
>단백질 서열: 결합 단위 2(항-Ang2)의 VH 도메인

QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFTNYGMHWVRQAPGKCLEWVAVISHDGNNKYYVDSVKGRF  
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIDFWGLNWFDPWGQGTIVTVSS

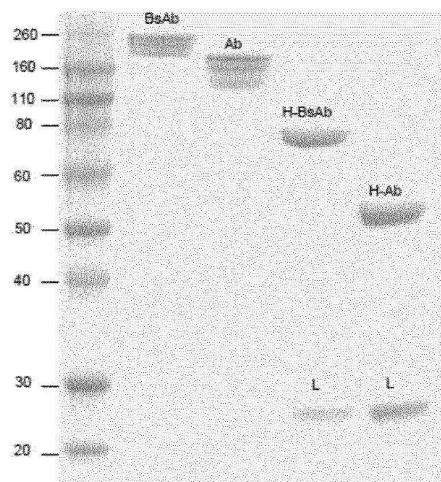
도면6



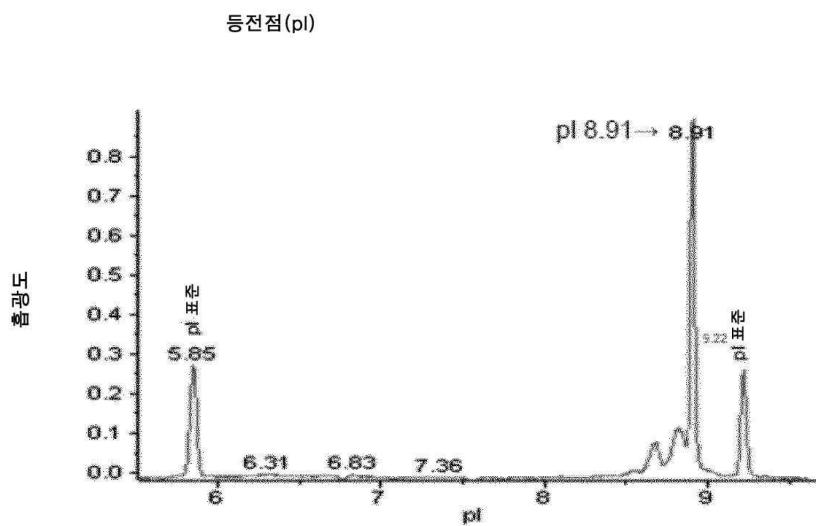
도면7



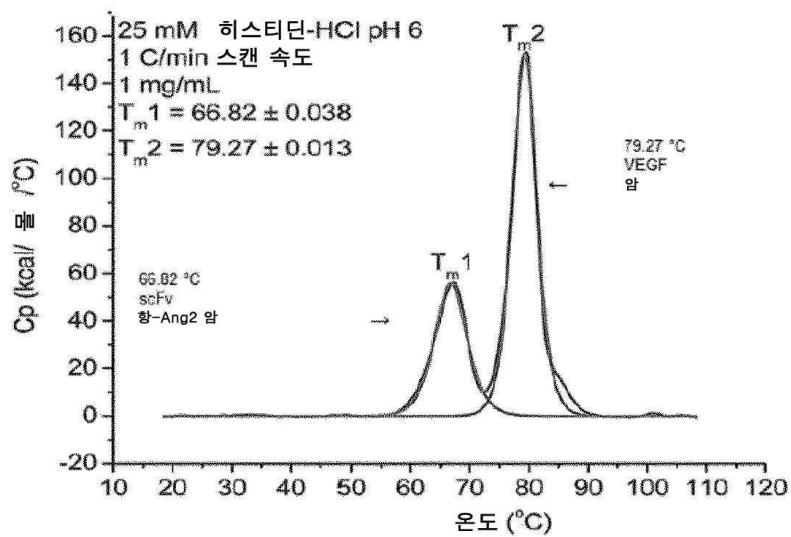
## 도면8



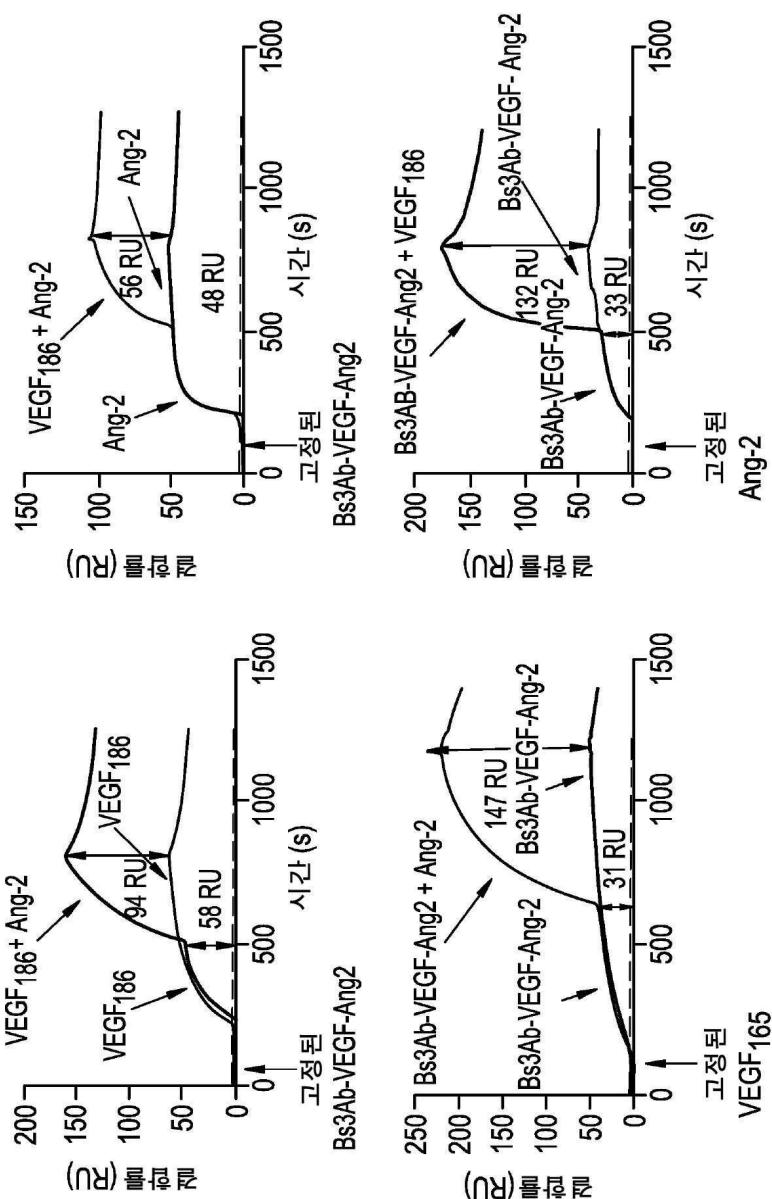
## 도면9



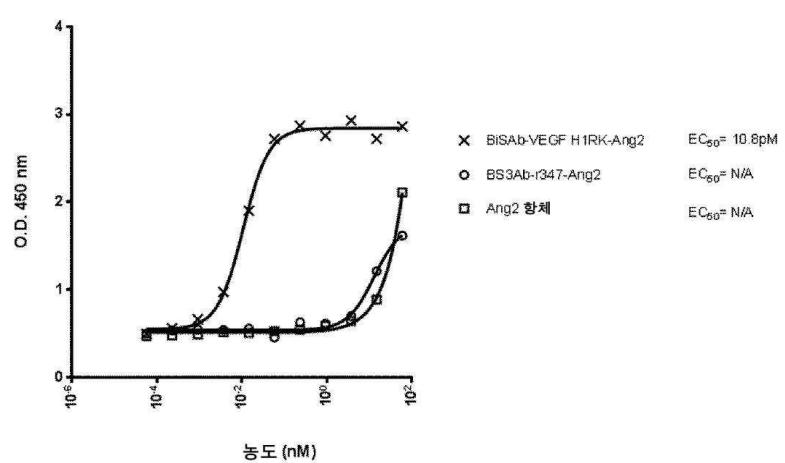
## 도면10



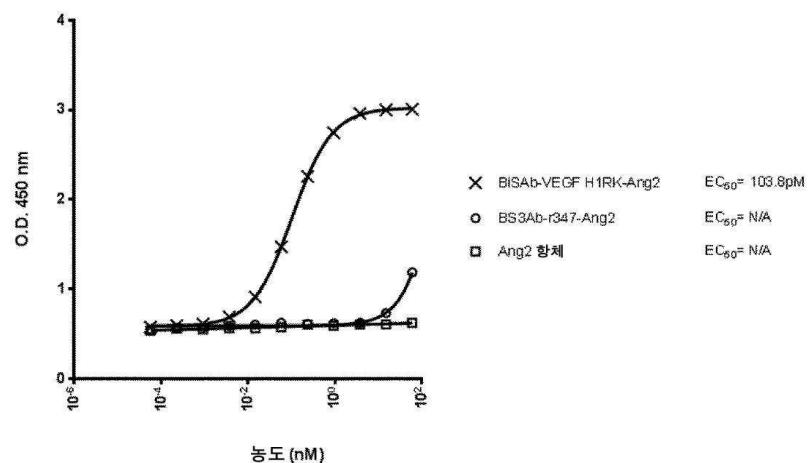
도면11



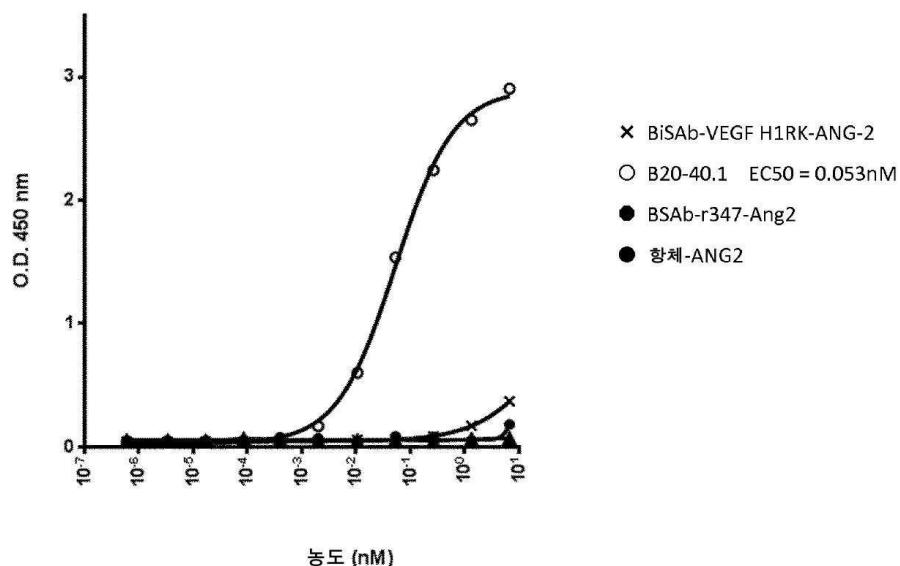
도면12a



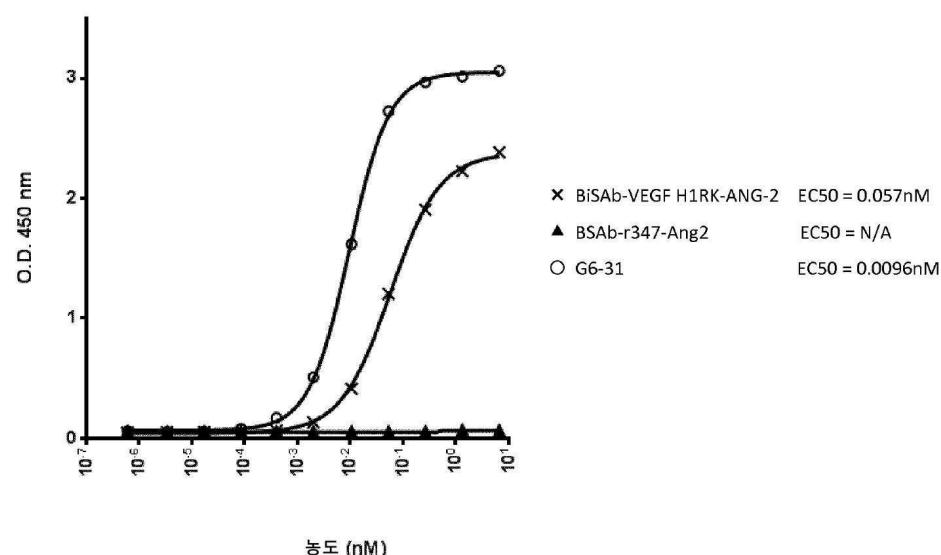
도면12b



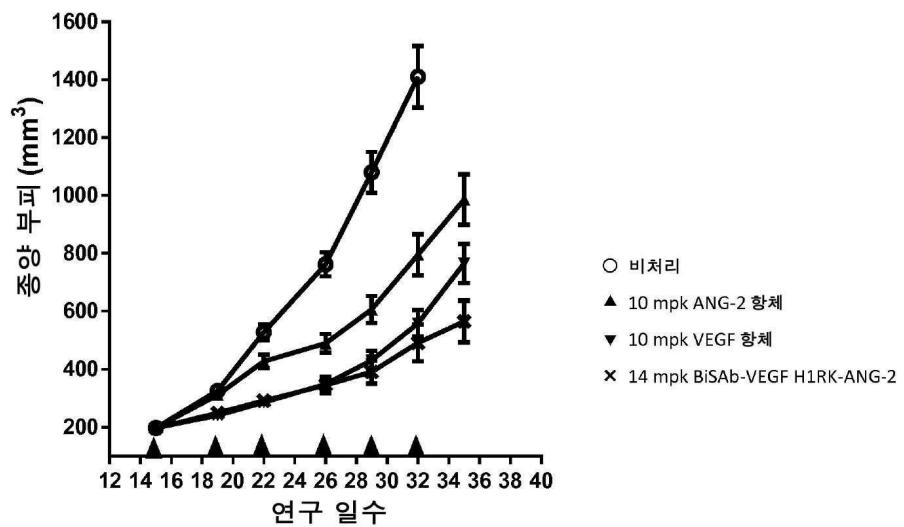
도면13



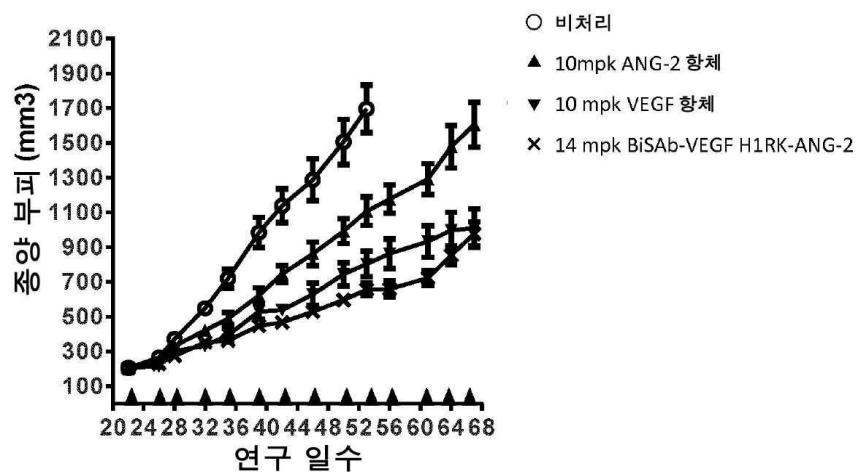
도면14



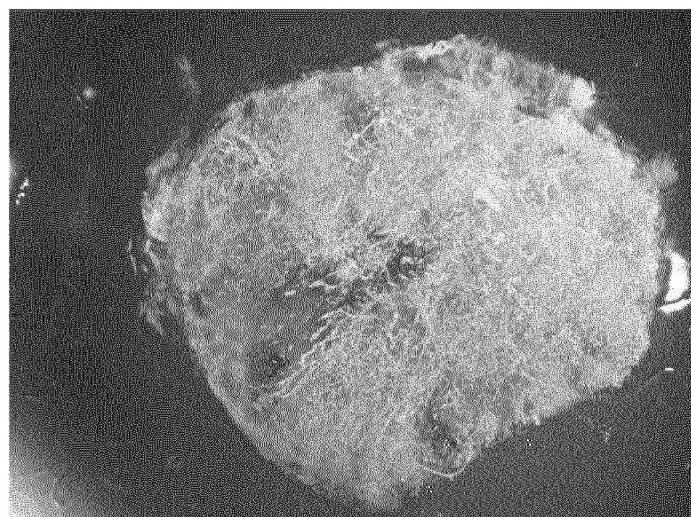
도면15



도면16



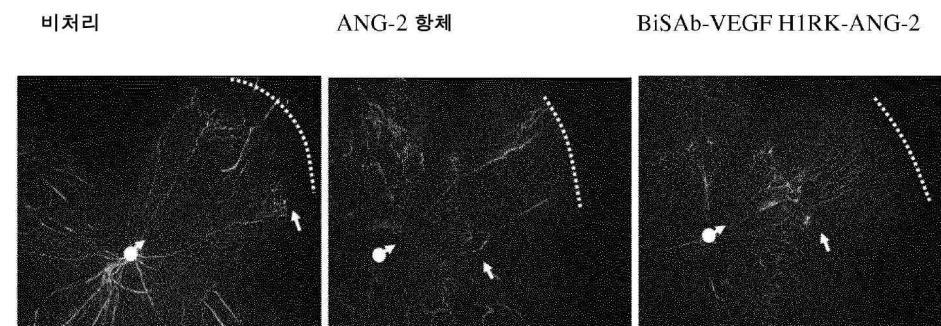
도면17a



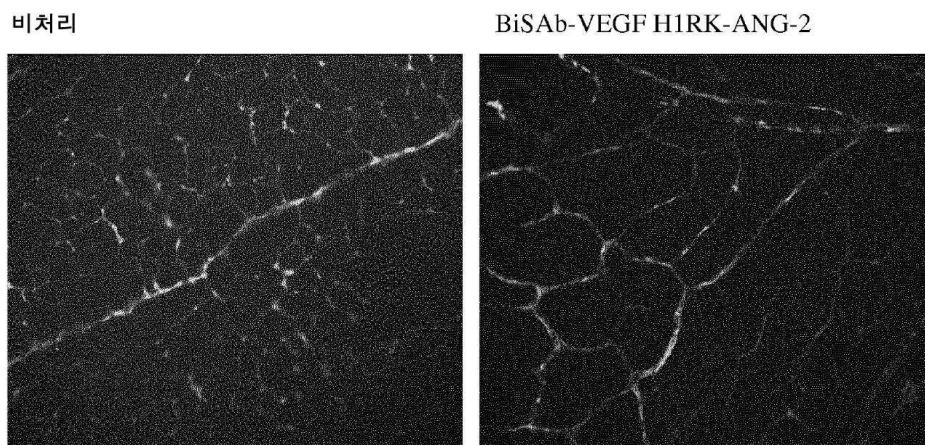
도면17b



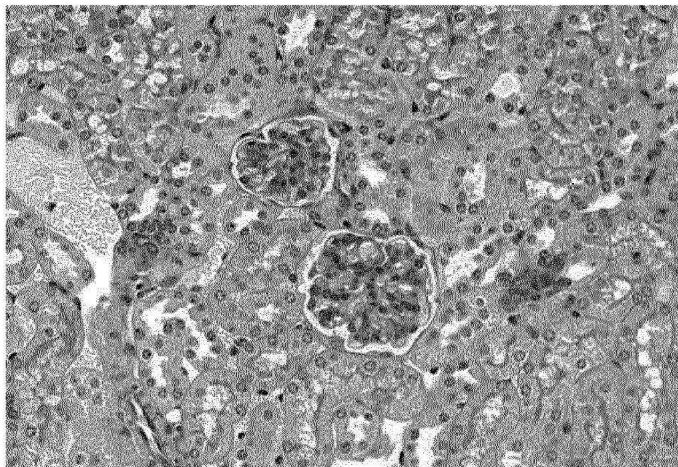
도면18



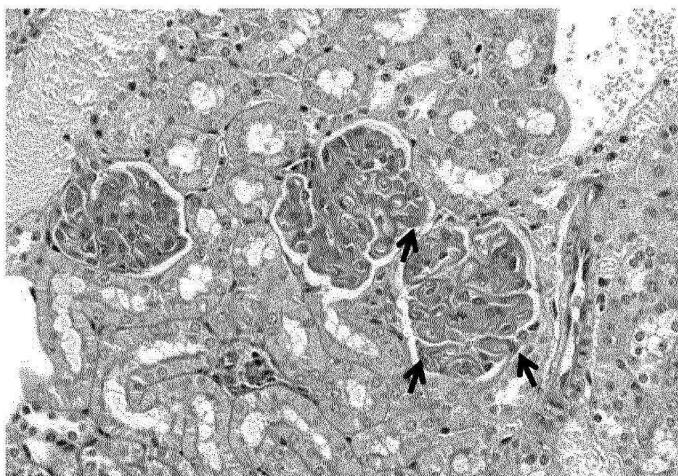
도면19



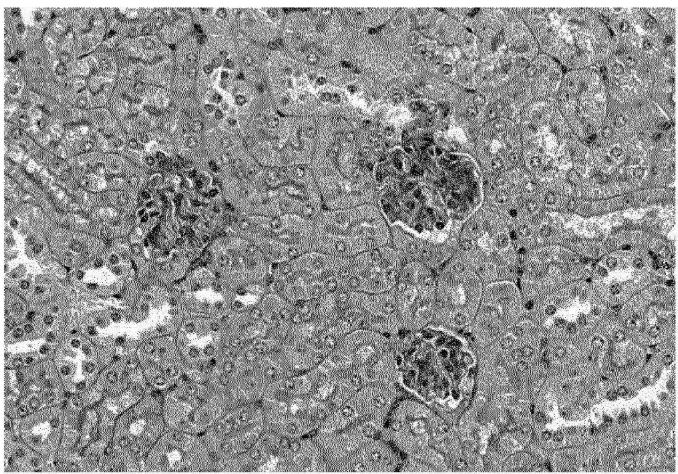
도면20a



도면20b



도면20c



### 서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MEDIMMUNE LIMITED

<120> ANTI-VEGF-A AND ANTI-ANG2 ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> ANGVE-105-WO-PCT

<140> PCT/EP2017/071104

<141> 2017-08-22

<150> 62/378,388

<151> 2016-08-23

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 713

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

<400> 1

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

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Trp Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

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

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

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

Ala Thr Pro Leu Tyr Ser Ser Asp Gly Leu Ser Ala Gly Asp Ile Trp

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

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

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

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370	375	380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Lys Thr Pro		
385	390	395
395		
400		
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
405	410	415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
420	425	430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
435	440	445
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ile		
450	455	460
Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg		
465	470	475
475		
480		
Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Thr Gly Ser Tyr Leu		
485	490	495
495		
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Thr		
500	505	510
510		
Gly Ala Ser Ser Trp Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser		
515	520	525
525		
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu		
530	535	540
540		
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Pro Ile Thr		
545	550	555
555		
560		
Phe Gly Cys Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly		
565	570	575
575		
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gln Val		
580	585	590
590		
Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu		
595	600	605
605		
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met		
610	615	620

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Val  
 625 630 635 640  
 Ile Ser His Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly  
 645 650 655

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 660 665 670  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 675 680 685  
 Glu Gly Ile Asp Phe Trp Ser Gly Leu Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly  
 690 695 700

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 705 710

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2139

&lt;212&gt; DNA

&lt;213

&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide"

&lt;400&gt; 2

gaaggtaat tggtagagtc tggtggcggt ctgtttcagc ctgggtggttc ttacgtttt	60
tcttgcgctg ctccggatt cactttctt tggtagcaga tgtattgggt tcgc当地	120
cctggtaaag gttggagtg ggttttttt atctctttt ctgggtggctg gactatgtat	180
gctgactccg ttaaaggatcg cttcaactatc tctagagaca actctaagaa tactcttac	240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gacccttg	300

tatacgatgc acgggttttgc ggccggggat atctggggcc aaggacaat ggtcaccgtc	360
tcaagcgctg cgaccaaggg cccatccgtc ttccccctgg caccctccctc caagagcacc	420
tctggggca cagcgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accgggtgacg	480
gtgtccctgga actcaggcgc tctgaccaggc ggcgtgcaca cttcccgcc tgtccctacag	540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cttccagcag cttggcacc	600
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagagatgtt	660

gagcccaaat ctgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactctg	720
gggggaccgt cagtcttcct cttccccca aaacccaagg acaccctcat gatctccgg	780
acccttgggg tcacatgcgt ggttgtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc	840
aactggtagc tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagcccg ggaggagcag	900
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	960
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc	1020
atctccaaag ccaaaggcga gccccgagaa ccacaggctt acaccctgcc cccatccgg	1080
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	1200
cccggtctgg actccgacgg ctcttcttc ctctatagca agtcaccgt ggacaagagc	1260
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtatgc atgaggctt gcacaaccac	1320
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggttaaggcg gagggggatc cggccggaggg	1380
ggctctgaga tctgtctgac ccagagcccc ggcaccctga gcctgagccc tggcgagaga	1440
gccaccctga gctgccggc cagccagtcc atcaccggca gtcacccgtt ttgttatcag	1500
cagaagcccg gacaggcccc cagactgctg atcaccggcg ctccagctg ggccaccggc	1560
atccccgaca gattcagcgg cagcggctcc ggcaccgact tcaccctgac catcagcaga	1620
ctggagcccg aggacttcgc cgtgtactac tgccagcagt acagcagcag ccccatcacc	1680
ttcggatgct gcaccaggct ggagatcaag ggcggaggg gctctgggg agggggcagc	1740
ggcggcggag gatctgggg agggggcagc caggtgcagc tggcgagtc tggcgccgaa	1800
gtggtgccgc cccgcagaag cctgagactg agctgcgcg ccagcggctt cacccatcacc	1860
aactacggca tgcactgggt ccggcaggcc cctggcaagt gcctggagtg ggtggccgtg	1920
atcagccacg acggcaacaa caagtactac gtggacagcg tgaagggcag attcaccatc	1980
agcagggaca acagcaagaa caccctgtac ctccagatga acagcctgag agccgaggac	2040
accggcggtt actactgcgc cagagaggc atcgacttt ggagcggctt gaattggttc	2100
gaccctggg gccaggccac cctggtgacc gtgtccagc	2139
<210> 3	
<211> 122	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic	

polypeptide"

<400> 3

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

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Trp Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

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

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

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

Ala Thr Pro Leu Tyr Ser Ser Asp Gly Leu Ser Ala Gly Asp Ile Trp

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

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115	120
-----	-----

<210> 4

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 4

gaaggtaat tggtagagtc tggggcggt ctgttcagc ctgggggtt tttacgttt	60
tcttgcgtg ctccggatt cactttctt tggtagcaga tgtattgggt tcgccaagct	120
cctggtaaag gttggagtg ggtttctt atcttcctt ctggggctg gactatgtat	180
gctgactccg ttaaaggctcg cttcaactatc tctagagaca actctaagaa tactctac	240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gacccttg	300
tatagcagtg acgggcttc ggccccggat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc	360

tcaagc

366

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 123

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

&lt;400&gt; 5

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser His Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Gly Ile Asp Phe Trp Ser Gly Leu Asn Trp Phe Asp Pro

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 369

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide"

&lt;400&gt; 6

caggtgcagc tggtcgagtc tggcgccgga gtggcagtc cccgcagaag cctgagactg	60
agctgcgcgg ccagcgctt caccttacc aactacggca tgcactgggt ccgcaggcc	120
cctggcaagt gcctggagtg ggtggccgtg atcagccacg acggcaacaa caagtactac	180
gtggacagcg tgaagggcag attcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac	240

ctccagatga acagcctgag agccgaggac accgcccgtgt actactgcgc cagagaggc	300
atcgactttt ggagcggcct gaattgggtc gaccctggg gccagggcac cctggtgacc	360
gtgtccagc	369

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

&lt;400&gt; 7

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val His Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu 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> 8

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 8

gagatcgtgc tgaccaggc tccagccacc ctctttgt ctccaggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggcaggta gagtgttac agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacttcactc tcaccatcg cagactggag	240

cctgaagatt ttgcagttt caactgtcaa cagagttacc gcacccttc cttcgccaa	300
gggacacgac tggagattaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttccggcca	360
tctgatgagc agttgaatac tggaaactgcc tctgttgtt gcctgctgaa taacttctat	420
cccaagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggtt taactcccg	480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcaggc	600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt	642

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

&lt;400&gt; 9

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val His Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide"

&lt;400&gt; 10

gagatcgtgc tgacccagtc tccagccacc ctctttgt ctccagggaa aagagccacc	60
ctctcctgca gggcagtca gagtgttcac agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca	180

gacaggttca gtggcagtgg gtcggaca gacttactc tcaccatcg cagactggag 240  
 cctgaagatt ttgcagttt ctactgtcaa cagagttacc gcacccttc cttcgccaa 300

gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide"

<400> 11

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Thr Gly Ala Ser Ser Trp Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Thr Phe Gly Cys Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 12

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polynucleotide"

&lt;400&gt; 12

gagatcgtc tgacccagag cccggcacc ctgaggctga gcctggcga gagagccacc	60
ctgagctgcc gggcagcca gtccatcacc ggcagctacc tggcttggta tcagcagaag	120
cccgacagg cccccagact gctgatcacc ggccgttcca gctggccac cgccatcccc	180
gacagattca gcggcagcgg ctccggcacc gacttaccc tgaccatcag cagactggag	240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagtacagca gcagccccat cacttcgga	300
tgcggcacca ggctggagat caag	324

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 251

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

&lt;400&gt; 13

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Thr Gly Ala Ser Ser Trp Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Thr Phe Gly Cys Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130	135	140
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr		
145	150	155
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val		
165	170	175
Ala Val Ile Ser His Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val		
180	185	190
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
195	200	205
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
210	215	220
Ala Arg Glu Gly Ile Asp Phe Trp Ser Gly Leu Asn Trp Phe Asp Pro		
225	230	235
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
245	250	
<210> 14		
<211> 753		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><221> source		
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"		
<400> 14		
gagatcgtgc tgaccaggag cccggcacc ctgagcctga gccctggcga gagagccacc		60
ctgagactgcc gggccagcca gtccatcacc ggcagctacc tggcttgta tcagcagaag		120
cccgacagg cccccagact gctgatcacc ggcgttcca gctggccac cggcatcccc		180
gacagattca gcccagcgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatcag cagactggag		240
cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagtacagca gcagccccat cacctcgga		300
tgcggcacca ggctggagat caagggcggg gggggctctg ggggaggggg cagccggcgc		360
ggaggatctg ggggaggggg cagccagggtg cagctggctg agtctggcgg cggagtggtg		420
cagccggca gaagcctgag actgagctgc gccggcagcg gttcacctt caccaactac		480

ggcatgcact gggccgcca ggcccctggc aagtgcctgg agtgggtggc cgtgatcagc 540  
 cacgacggca acaaacaagta ctacgtggac agcgtgaagg gcagattcac catcagcagg 600  
 gacaacagca agaacaccct gtacctccag atgaacagcc tgagagccga ggacaccgcc 660  
 gtgtactact gcgccagaga gggcatcgac ttttgagcg gcctgaatig gttcgacccc 720  
 tggggccagg gcaccctggt gaccgtgtcc agc 753

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

&lt;400&gt; 15

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

&lt;400&gt; 16

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 17

Trp Tyr Glu Met Tyr

1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 18

Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Trp Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 19

Pro Leu Tyr Ser Ser Asp Gly Leu Ser Ala Gly Asp Ile

1 5 10

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 20

Arg Ala Ser Gln Ser Val His Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 21

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 22

Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro Ser

1 5

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 23

Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met His

1 5 10

<210> 24

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

&lt;400&gt; 24

Val Ile Ser His Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

&lt;400&gt; 25

Glu Gly Ile Asp Phe Trp Ser Gly Leu Asn Trp Phe Asp Pro

1 5 10

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

&lt;400&gt; 26

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Thr Gly Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

&lt;400&gt; 27

Gly Ala Ser Ser Trp Ala Thr

1 5

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

&lt;400&gt; 28

Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Pro Ile Thr

1 5

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 642

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide"

&lt;400&gt; 29

gagatcgtgc tgaccaggc tccagccacc ctctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggcagtca gagtggtcac agcagctact tagcctggta ccagcagaaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattcca gcagggccac tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacttactc tcaccatcg cagactggag	240
cctgaagatt ttgcgttta ctactgtcaa cagagttacc gcacccttc cttcgccaa	300

gggacacgac tggagattaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttccggcca	360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaaatcggt taactcccag	480
gagagtgtaa cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcgc gcgaagtac ccattcaggc	600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac agggagagt gt	642
<210> 30	
<211> 2139	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide"

<400> 30	
gaagttcaat tggtagagtc tggtggcggt ctgttcagc ctgggtggtt tttacgttt	60
tcttcgcgtg ctccggatt cacttctct tggtacgaga tgtattgggt tcgccaagct	120
cctgttaaag gttggagtg ggtttctct atctctcctt ctgggtggcgt gactatgtat	180
gctgactccg ttaaaggctcg cttcaactatc tctagagaca actctaagaa tactcttac	240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaccccttg	300
tatagcagtg acggctttc ggccccggat atctggggcc aaggacaat gtcaccgtc	360

tcaagcgcgt cgaccaaggg cccatccgtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc	420
tctggggca cagccgcctt gggctgcgt gtcaaggact acttccccga accggtgacg	480
gtgtccttggaa actcaggcgc tctgaccgcg ggcgtgcaca cttcccgcc tgcctacag	540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cttccagcag cttggcacc	600
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagt	660
gagccaaat ctgtgacaa aactcacaca tgcccccgt gcccagcacc tgaactcctg	720
gggggaccgt cagtcttctt cttccccca aaacccaagg acaccctcat gatctccgg	780

acccctgagg tcacatgcgt ggtgggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag	900
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	960
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc	1020
atctccaaag ccaaaggca gccccgagaa ccacaggtct acaccctgcc cccatccgg	1080
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcgtg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200

cccggtctgg actccgacgg ctcccttctc ctctatagca agtcaccgt ggacaagagc 1260  
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtatgc atgaggctc gcacaaccac 1320  
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctcg ggtaaaggcg gagggggatc cggcggaggg 1380  
 ggctctgaga tcgtctgac ccagagcccc ggcaccctga gcctgagccc tggcagaga 1440  
 gccaccctga gctgccggc cagccagtcc atcaccggca gctacctggc ttggatcatc 1500  
 cagaagcccc gacaggcccc cagactgctg atcaccggcg cttccagctg ggccaccggc 1560  
 atccccgaca gattcagcgg cagcggctcc ggcaccgact tcaccctgac catcagcaga 1620

ctggagcccg aggacttcgc cgtgtactac tgccagcagt acagcagcag ccccatcacc 1680  
 ttcggatgct gcaccaggct ggagatcaag ggcggaggg gctctgggg agggggcagc 1740  
 ggcggcggag gatctgggg agggggcagc caggtgcagc tggcgagtc tggcggcgg 1800  
 gtggtgcagc cggcagaag cctgagactg agctgcgcg ccagcggctt cacccatcacc 1860  
 aactacggca tgcactgggt cggccaggcc cctggcaagt gcctggagtg ggtggccgt 1920  
 atcagccacg acggcaacaa caagtactac gtggacagcg tgaagggcag attcaccatc 1980  
 agcagggaca acagcaagaa caccctgtac ctccagatga acagcctgag agccgaggac 2040

accggcgtgt actactgcgc cagagaggc atcgacttt ggagcggcct gaattggttc 2100  
 gaccctggg gccagggcac cctggtgacc gtgtccagc 2139

<210> 31

<211> 713

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 31

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Trp Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Thr Pro Leu Tyr Ser Ser Asp Gly Leu Ser Ala Gly Asp Ile Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 115 120 125  
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
 130 135 140  
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175  
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 180 185 190  
 Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
 195 200 205  
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser  
 210 215 220  
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 245 250 255  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 260 265 270  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 275 280 285  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

290	295	300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
325	330	335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
340	345	350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
355	360	365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
370	375	380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
385	390	395
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		400
405	410	415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
420	425	430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
435	440	445
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Ile		
450	455	460
Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg		
465	470	475
Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Thr Gly Ser Tyr Leu		480
485	490	495
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Thr		
500	505	510
Gly Ala Ser Ser Trp Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser		
515	520	525
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu		
530	535	540

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Pro Ile Thr  
 545 550 555 560  
 Phe Gly Cys Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly  
 565 570 575  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val  
 580 585 590  
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu

595 600 605  
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met  
 610 615 620  
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Val  
 625 630 635 640  
 Ile Ser His Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly  
 645 650 655  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

660 665 670  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 675 680 685  
 Glu Gly Ile Asp Phe Trp Ser Gly Leu Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly  
 690 695 700  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

705 710

<210> 32

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 32

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  
 Arg 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 Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Met 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