



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0082594
 (43) 공개일자 2017년07월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/22 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7015610
- (22) 출원일자(국제) 2015년11월06일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년06월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2015/075876
- (87) 국제공개번호 WO 2016/075035
 국제공개일자 2016년05월19일
- (30) 우선권주장
 14192524.8 2014년11월10일
 유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
 에프. 호프만-라 로슈 아게
 스위스 체하-4070 바젤 그랜짜체스트라쎄 124
- (72) 발명자
 맹글 스태판
 독일 80333 뮌헨 슐라이스사이퍼 스트라쎄 44아
 게오르게스 가이
 독일 82392 하바흐 암 베르크그라벤 11
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 제일특허법인

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 항-ANG2 항체 및 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 보고된 항-ANG2 항체에 관한 것이다. 특정 항-ANG2 항체는 (a) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.

(52) CPC특허분류

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

(72) 발명자

쥘스만 페터 미하엘

독일 82392 하바흐 임 존넨탈 20

케텐베르거 후베르트

독일 81369 뮌헨 파싸우어 스트라쎄 30

쾰레켄 외르크

독일 80686 뮌헨 오씨츠키스트라쎄 2

몰호즈 미하엘

독일 80686 뮌헨 파흐너스트라쎄 70a

레굴라 외르크 토마스

독일 81377 뮌헨 이너코플러스트라쎄 17 베

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및
(c) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는, 인간 ANG2에 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

(a) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
(c) 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체.

청구항 3

제1항에 있어서,

(a) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
(c) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 6 또는 서열번호 33의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체.

청구항 5

i) 서열번호 19와 70% 초과의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 6과 70% 초과의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하고,

ii) 카밧에 따라 넘버링된, 중쇄 가변 도메인 중에서 위치 28에 아미노산 잔기 아스파라긴(N), 위치 30에 아미노산 잔기 알라닌(A), 위치 100b에 아미노산 잔기 프롤린(P) 및 위치 100j에 아미노산 잔기 알라닌(A), 및 경쇄 가변 도메인 중에서 위치 51에 아미노산 잔기 트레오닌(T)을 갖고,

iii) 서열번호 19의 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 6 또는 서열번호 33의 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체와 비교하여, Tie2 인산화 ELISA를 사용하여 측정된, 인간 Tie2를 안정적으로 발현하는 HEK293 세포를 사용하는 세포-기반 어세이에서 수용체 Tie2로의 ANG2의 결합의 억제에 대해 낮은 EC₅₀ 값을 갖는

인간 ANG2에 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

이중특이성 항체인 항체.

청구항 7

제6항에 있어서,

이중특이성 항체가 CrossMab인, 항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

인간 서브클래스 IgG1의 항체 또는 인간 서브클래스 IgG4의 항체인 항체.

청구항 9

제1항 내지 제4항 및 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

인간 Tie2 수용체에 대한 인간 ANG2의 결합을 억제함으로써, 인간 ANG2의 생물학적 활성을 차단하는 항체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항체, 및 선택적으로 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 제형.

청구항 11

제10항에 있어서,

항-IL-1베타 항체 및 항-PDGF-B 항체로부터 선택되는 추가 치료제를 추가로 포함하는 약학 제형.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

약제로서 사용하기 위한 항체.

청구항 13

약제의 제조에 있어서, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항체의 용도.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서,

약제가 암과 혈관 질병의 치료용, 바람직하게는 황반 변성의 치료용 약제인, 용도.

청구항 15

제12항 또는 제13항에 있어서,

약제가 암의 치료용, 바람직하게는 신혈관형성암(neoangiogenic cancer)의 치료용 약제인, 용도.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

약제가 ANG2와 Tie2 수용체 사이의 상호작용을 억제하는 약제인, 용도.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

본 발명은 항-ANG2 항체 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

인간 안지오포이에틴-2(ANG2)(다르게는 ANGPT2 또는 ANG2로 약칭됨)(서열번호 106)는 문헌[Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60] 및 문헌[Cheung, A.H., et al., Genomics 48 (1998) 389-91]에 기재되어 있다. 안지오포이에틴-1 및 안지오포이에틴-2(ANG1(서열번호 107) 및 ANG2(서열번호 106))는 혈관 내피 내에서 선택적으로 발현되는 티로신 키나제(kinase)의 계열인 Tie에 대한 리간드로서 발견되었다(문헌[Yancopoulos, G.D., et al., Nature 407 (2000) 242-48]). 현재 안지오포이에틴 계열의 4개 확정적인 구성원들이 존재한다. 안지오포이에틴-3 및 안지오포이에틴-4(ANG3 및 ANG4)는 마우스 및 인간에서 동일한 유전자 좌위의 널리 분기된 대응물들을 대표할 수 있다(문헌[Kim, I., et al., FEBS Let, 443 (1999) 353-56]; 문헌[Kim, I., et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 26523-26528]). ANG1 및 ANG2는 처음에 조직 배양 실험에서 각각 작용제 및 길항제로서 발견되었다(ANG1에 대해서는 문헌[Davis, S., et al., Cell 87 (1996) 1161-69]을 참조하고; ANG2에 대해서는 문헌[Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60]을 참조한다). 모든

공지된 안지오포이에틴들이 일차적으로 Tie2에 결합하고, ANG1 및 ANG2 둘 다가 3 nM(Kd)의 친화도로 Tie2에 결합한다(문헌[Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60]). ANG1은 EC 생존을 뒷받침하고 내피 통합성을 촉진하는 것으로 밝혀진 반면(문헌[Davis, S., et al., Cell, 87 (1996) 1161-69]; 문헌[Kwak, H.J., et al., FEBS Lett 448 (1999) 249-53]; 문헌[Suri, C., et al., Science 282 (1998) 468-71]; 문헌[Thurston, G., et al., Science 286 (1999) 2511-2514]; 문헌[Thurston, G., et al., Nat. Med. 6 (2000) 460-63]), ANG2는 반대 효과를 나타내었고 생존 인자 VEGF 또는 염기성 섬유모세포 성장 인자의 부재 하에서 혈관 불안정화 및 퇴행을 촉진하였다(문헌[Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60]). 그러나, ANG2 기능의 많은 연구들이 보다 더 복잡한 상황을 암시하였다. ANG2는 혈관 발생 및 혈관 퇴행 둘 다에서 일정한 역할을 수행하는 혈관 리모델링의 복잡한 조절제일 수 있다. 발현 분석은 ANG2에 대한 이러한 역할을 뒷받침하면서 ANG2가 성인의 신혈관형성 발생 상황에서 VEGF와 함께 급속히 유도되는 반면, ANG2는 혈관 퇴행 상황에서 VEGF의 부재 하에서 유도된다는 것을 보여주었다(문헌[Holash, J., et al., Science 284 (1999) 1994-98]; 문헌[Holash, J., et al., Oncogene 18 (1999) 5356-62]). 상황 의존적 역할과 일치하여, ANG2는 ANG1에 의해 활성화되나 그의 활성화에 대한 상황 의존적 효과를 나타내는 동일한 내피 특이적 수용체인 Tie2에 특이적으로 결합한다(문헌[Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60]).

[0003] 각막 혈관형성 어세이는 ANG-1 및 ANG-2가 둘 다 VEGF와 상승작용하여 새로운 혈관의 성장을 촉진하는 유사한 효과를 가짐을 나타냈다(문헌[Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40]). 투여량-의존적 내피 반응이 존재할 가능성이 고 농도로 시험관 내에서 ANG-2가 또한 혈관형성촉진성(pro-angiogenic)일 수 있다는 관찰에 의해 증가하였다(문헌[Kim, I., et al., Oncogene 19 (2000) 4549-52]). 고 농도에서, ANG-2는 PI-3 키나제 및 Akt 경로를 통한 Tie2의 활성화를 통한 혈청 결핍 세포자멸 중에 내피 세포에 대한 세포자멸 생존 인자로서 작용한다(문헌[Kim, I., et al., Oncogene 19 (2000) 4549-52]).

[0004] 다른 시험관내 실험은, 지속된 노출 중에, ANG-2의 효과가 길항제의 효과로부터 Tie2의 작용제로 점진적으로 이동할 수 있고, 이후 시점에, 혈관형성 및 신생혈관 안정화에 직접적으로 공헌할 수 있음을 시사하였다(문헌[Teichert-Kuliszewska, K., et al., Cardiovas. Res. 49 (2001) 659-70]). 또한, EC가 피브린 겔 상에서 배양될 때, ANG-2에 의한 Tie2의 활성화가 또한 관찰되었고, 이는 아마도 ANG-2의 작용이 EC 분화 상태에 의존할 수 있음을 시사할 것이다(문헌[Teichert-Kuliszewska, K., et al., Cardiovas. Res. 49 (2001) 659-70]). 3-차원 콜라겐 겔에서 배양된 미세혈관 EC에서, ANG-2는 또한 Tie2 활성화를 유도하고 모세관-형 구조의 형성을 촉진할 수 있다(문헌[Mochizuki, Y., et al., J. Cell. Sci. 115 (2002) 175-83]). 혈관 성숙의 시험관내 모델로서 3-D 구형 공-배양물의 사용은 EC와 간접적 세포 사이의 직접적인 접촉이 VEGF에 대한 반응성을 없애는 반면, VEGF 및 ANG-2의 존재가 스프라우팅(sprouting)을 유도하였음을 증명하였다(문헌[Korff, T., et al., FASEB J. 15 (2001) 447-457]). 에토(Etoh, T.H.) 등은 Tie2를 구성적으로 발현하는 EC, MMP-1, -9 및 u-PA의 발현이 VEGF의 존재 하에 ANG-2에 의해 강하게 상향조절되었음을 증명하였다(문헌[Etoh, T., et al., Cancer Res. 61 (2001) 2145-53]). 생체내 동공 막 모델을 사용하여, 로보브(Lobov, I.B.) 등은 내인성 VEGF의 존재 하에 ANG-2가 모세관 직경의 신속한 증가, 기저판의 리모델링, 내피 세포의 증식 및 이동을 촉진하고, 새로운 혈관의 스프라우팅을 자극함을 증명하였다(문헌[Lobov, I.B., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 11205-10]). 그에 반해서, ANG-2는 내인성 VEGF 없이 세포 사멸 및 혈관 퇴행을 촉진한다(문헌[Lobov, I.B., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 11205-10]). 유사하게, 생체내 종양 모델을 사용하여, 바즈코크지(Vajkoczy, P.) 등은 다중세포 응집체가 속주 및 종양 내피에 의한 VEGFR-2 및 ANG-2의 동시 발현을 통해 혈관형성 스프라우팅함으로써 혈관 성장을 개시함을 증명하였다(문헌[Vajkoczy, P., et al., J. Clin. Invest. 109 (2002) 777-85]). 이러한 모델은 성장 종양의 확립된 미세혈관이 VEGF 및 ANG-2의 발현에 의해 추정적으로 매개되는 연속적인 리모델링에 의해 특징지어짐을 설명하였다(문헌[Vajkoczy, P., et al., J. Clin. Invest. 109 (2002) 777-85]).

[0005] Tie-2 및 안지오포이에틴-1의 녹-아웃(knock-out) 마우스 연구는 유사한 표현형을 나타내고, 안지오포이에틴-1 자극된 Tie-2 인산화가 혈관 발생의 리모델링 및 안정화, 혈관형성 중의 혈관 성숙의 촉진 및 내피 세포-지지 세포 접착의 유지를 매개함을 시사한다(문헌[Dumont, D.J., et al., Genes & Development, 8 (1994) 1897-1909]; 문헌[Sato, T.N., Nature, 376 (1995) 70-74]; 문헌[Thurston, G., et al., Nature Medicine 6 (2000) 460-463]). 안지오포이에틴-1의 역할은 성인에서 보존되는 것으로 여겨지고, 이때 광범위하고 구성적으로 발현된다(문헌[Hanahan, D., Science, 277 (1997) 48-50]; 문헌[Zagzag, D., et al., Exp. Neurol. 159 (1999) 391-400]). 대조적으로, 안지오포이에틴-2 발현은 주로 안지오포이에틴-1의 구성적인 안정화 또는 성숙 기능을 차단하는 것으로 여겨지는 혈관 리모델링의 부위로 제한되고, 혈관이 스프라우팅 신호에 더욱 반응성일 수 있는 플라스틱 상태로 돌아가 유지되는 것을 가능하게 한다(문헌[Hanahan, D., 1997]; 문헌[Holash, J., et al.,

Oncogene 18 (199) 5356-62]; 문헌[Maisonpierre, P.C., 1997]). 병리학적 혈관형성에서 안지오포이에틴-2 발현의 연구는 혈관 안지오포이에틴-2 발현을 나타내는 많은 종양 유형을 발견하였다(문헌[Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60]). 기능적인 연구는 안지오포이에틴-2가 종양 혈관형성에 관여하고 마우스 이종이식편 모델에서 증가된 종양 성장을 갖는 안지오포이에틴-2 과발현과 연관됨을 시사한다(문헌[Ahmad, S.A., et al., Cancer Res., 61 (2001) 1255-1259]). 다른 연구는 종양 과-맥관질(hyper-vascularity)을 갖는 안지오포이에틴-2 과발현과 연관되었다(문헌[Etoh, T., et al., Cancer Res. 61 (2001) 2145-53]; 문헌[Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-7129]).

[0006] 최근 수년간, 안지오포이에틴-1, 안지오포이에틴-2 및/또는 Tie-2는 가능성 있는 항암 치료 표적으로 제안되어 왔다. 예를 들어, US 6,166,185, US 5,650,490 및 US 5,814,464는 각각 항-Tie-2 리간드 및 수용체 항체를 개시한다. 가용성 Tie-2를 사용하는 연구는 설치류에서 종양의 수 및 크기를 감소시키는 것으로 보고되었다(문헌[Lin, 1997]; 문헌[Lin 1998]). 문헌[Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59:3 (1999) 3185-91]은 Tie-2의 세포외 도메인을 발현하는 인간 흑색종 세포주를 생성하였고, 이들의 누드 마우스 및 보고된 가용성 Tie-2에 주입하여 종양 성장 및 종양 혈관형성의 유의한 억제를 야기하였다. 안지오포이에틴-1 및 안지오포이에틴-2가 둘다 Tie-2에 결합하므로, 안지오포이에틴-1, 안지오포이에틴-2 또는 Tie-2가 항암 요법을 위한 매력적인 표적인지 여부가 이들 연구로부터는 불명확하다. 그러나, 효과적인 항-안지오포이에틴-2 요법은 암과 같은 질병의 치료에 유리한 것으로 여겨지고, 이때 진행은 과정의 차단이 질병 진행의 예방을 야기할 수 있는 비정상 혈관형성에 따라 변한다(문헌[Folkman, J., Nature Medicine. 1 (1995) 27-31]).

[0007] 또한, 일부 군은 안지오포이에틴-2에 결합하는 항체 및 웨티드의 용도를 보고하였다(예를 들어, US 6,166,185, US 2003/10124129, WO 03/030833, WO 2006/068953, WO 03/057134 또는 US 2006/0122370 참고).

[0008] 안지오포이에틴-2의 집중 발현의 효과의 연구는 안지오포이에틴-1/Tie-2 신호의 길항이 단단한 혈관 구조를 느슨하게 하고, 이에 의해 EC를 혈관형성 유도물질, 예컨대 VEGF로부터의 활성화 신호에 노출시켰다(문헌[Hanahan, D., Science, 277 (1997) 48-50]). 안지오포이에틴-1의 억제로부터 유발되는 이러한 혈관형성촉진 효과는 항-안지오포이에틴-1 요법이 효과적인 항암 치료법이 아님을 나타낸다.

[0009] ANG-2는 혈관 리모델링이 발생하는 부위에서의 성장 중에 발현된다(문헌[Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60]). 성인 개체에서, ANG-2 발현은 혈관 리모델링 부위, 및 혈관이 매우 발달된 종양, 예컨대 신경교종(문헌[Osada, H., et al., Int. J. Oncol. 18 (2001) 305-09]; 문헌[Koga, K., et al., Cancer Res. 61 (2001) 6248-54]), 간세포 암종(문헌[Tanaka, S., et al., J. Clin. Invest. 103 (1999) 341-45]), 위장 암종(문헌[Etoh, T., et al., Cancer Res. 61 (2001) 2145-53]; 문헌[Lee, J.H., et al., Int. J. Oncol. 18 (2001) 355-61]), 갑상선 종양(문헌[Bunone, G., et al., Am J Pathol 155 (1999) 1967-76]), 비소세포 폐암(문헌[Wong, M.P., et al., Lung Cancer 29 (2000) 11-22], 결장암(문헌[Ahmad, S.A., et al., Cancer 92 (2001) 1138-43], 및 전립선암(문헌[Wurmbach, J.H., et al., Anticancer Res. 20 (2000) 5217-20])으로 제한된다. 일부 종양 세포는 ANG-2를 발현하는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, 문헌[Tanaka, S., et al., J. Clin. Invest. 103 (1999) 341-45]은 인간 간세포 암종(HCC)의 12개의 견본 중 10에서 ANG-2 mRNA를 검출하였다. 엘리스(Ellis)의 그룹은 ANG-2가 종양 상피의 도처에서 발현됨을 보고하였다(문헌[Ahmad, S.A., et al., Cancer 92 (2001) 1138-43]). 다른 조사자는 유사한 발견을 보고하였다(문헌[Chen, L., et al., J. Tongji Med. Univ. 21 (2001) 228-35]). 보관된 인간 유방암 견본에서 ANG-2 mRNA 수준을 검출함으로써, 문헌[Sfiligoi, C., et al., Int. J. Cancer 103 (2003) 466-74]은 ANG-2 mRNA가 보조적인 텁프절 침입, 짧은 질병-부재 시간 및 불량한 전체 생존과 상당히 연관됨을 보고하였다. 문헌[Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-29]은 각각 병리학적 단계-I 내지 -IIIA를 갖는 비소세포 폐암(NSCLC)을 앓는 총 236명의 환자를 검토하였다. 면역조직화학을 사용하여, 16.9%의 NSCLC 환자가 ANG-2 양성임을 발견하였다. ANG-2 양성 종양에 대한 미세혈관 밀도는 ANG-2 음성의 밀도보다 상당히 높았다. ANG-2의 이러한 혈관형성 효과는 VEGF 발현이 높을 때에만 나타났다. 또한, ANG-2의 양성 발현은 불량한 수술 후 생존을 예측하는 유의한 인자이었다(문헌[Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-7129]). 그러나, Ang-1 발현과 미세혈관 밀도 사이에 어떠한 유의한 관계도 발견되지 않았다(문헌[Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-7129]). 이러한 결과는 ANG-2가 여려 유형의 암을 갖는 불량한 예후의 환자의 지시자임을 시사한다.

[0010] 최근에, ANG-2 녹-아웃 마우스 모델을 사용하여, 얀코풀로스(Yancopoulos)의 그룹은 ANG-2가 출생 후 혈관형성에 요구됨을 보고하였다(문헌[Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23]). 이들은 안구 중 유리체 맥관구조의 발전적으로 프로그래밍된 퇴행이 ANG-2 녹-아웃 마우스에서 발생하지 않고, 이들의 망막 혈관이 중심 망막 동맥으로부터 스파라우팅되지 않음을 증명하였다(문헌[Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-

423]). 이들은 또한 ANG-2의 결실이 림프 맥관구조의 패턴화 및 기능에서 심각한 결함을 야기함을 발견하였다(문헌[Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-423]). Ang-1의 유전적 구조는 림프의 결함을 정정하지만 혈관형성 결함은 정정하지 못한다(문헌[Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-423]).

[0011] 피터스(Peters)와 그의 동료들은, 가용성 Tie2가, 재조합 단백질로서 또는 바이러스 발현 벡터 중에서 전달될 때, 마우스 모델에서 뮤린 유방 암종 및 흑색종의 생체내 성장을 억제하였음을 보고하였다(문헌[Lin, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 8829-34]; 문헌[Lin, P., et al., J. Clin. Invest. 100 (1997) 2072-78]). 처리된 종양 조직의 혈관 밀도는 상당히 감소하였다. 또한, 가용성 Tie2는 종양 세포 컨디셔닝(conditioning)된 매질에 의해 자극된 래트 각막에서 혈관형성을 차단하였다(문헌[Lin, P., et al., J. Clin. Invest. 100 (1997) 2072-78]). 또한, 이스너(Isner) 및 그의 팀은 VEGF로의 ANG-2의 첨가가 VEGF 단독보다 길고 큰 더욱 원주의 신생맥관질을 유의하게 촉진함을 증명하였다(문헌[Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40]). 과량의 가용성 Tie2 수용체는 ANG-2에 의한 VEGF-유도 신생혈관형성의 조절을 배제하였다(문헌[Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40]). 문헌[Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59:3 (1999) 3185-91]은 누드 마우스 이종이식편을 사용하여 이종이식편 내의 Flt-1 또는 Tie2의 세포외 리간드-결합 도메인의 과발현이, 다른 것에 의해서는 보충될 수 없는 경로의 유의한 억제를 야기함을 나타냈고, 이는 VEGF 수용체 경로 및 Tie2 경로가 생체내 혈관형성의 과정에 필수적인 2개의 독립적인 매개자로서 간주되어야함을 시사한다(문헌[Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59:3 (1999) 3185-3191]). 이것은 더욱 최근의 문헌[White, R., R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 5028-33]에 의해 증명된다. 이러한 연구에서, 특이적으로 결합하고 ANG-2를 억제하는 뉴클레아제-내성 RNA 앱타머가 래트 각막 마이크로포켓 혈관형성 모델에서 bFGF에 의해 유도되는 신생혈관형성을 유의하게 억제하였음이 증명되었다.

[0012] 안구 혈관 질병, 예컨대, 연령-관련 황반 변성(AMD) 및 당뇨병성 망막병증(DR)은 각각 비정상적인 맥락막 또는 망막 신생혈관형성에 기인한다. 이 질환들은 산업화된 국가에서 시력 상실의 주된 원인이다. 망막은 신경, 아교세포 및 혈관 요소의 잘 한정된 층으로 구성되어 있기 때문에, 상대적으로 작은 장애, 예컨대, 혈관 증식 또는 부종에서 관찰된 장애가 시각 기능의 상당한 상실을 유발할 수 있다. 유전된 망막 변성, 예컨대, 색소성 망막염(RP)도 혈관 기형, 예컨대, 세동맥 협착 및 혈관 위축과 관련되어 있다. 이들은 3,500명 당 1명만큼 많은 개체에게 영향을 미치고, 진행성 야맹증, 시야 상실, 시신경 위축, 세동맥 약화, 및 종종 완전한 실명으로 진행하는 중심 시력 상실을 특징으로 한다.

[0013] 허혈성 망막병증은 혈류의 감소 및 저산소증을 초래하는 망막 혈관구조의 상실 또는 기능상실을 특징으로 한다. 망막은 새로운 혈관을 성장시키도록 신호를 발생시킴으로써 저산소증에 반응하지만, 이 새로운 혈관은 통상적으로 취약하고 해체된다. 이 혈관은 누출될 수 있거나, 출혈을 유발할 수 있거나, 망막 탈착으로 종결될 수 있는 흉터형성을 유발할 수 있기 때문에 시력에 대한 대부분의 위협을 생성하는 것은 이를 비정상적인 새로운 혈관의 성장이다. 허혈성 망막병증에 대한 현재 치료는 병리학적 혈관의 성장을 중단시키는 것을 추구하나, 이의 성장을 유발하는 근원적인 허혈을 해결하지 못한다. 더욱이, 수백만명에게 영향을 미치는 허혈성 망막병증인 당뇨병성 망막병증에 대한 표준 치료는 새로운 혈관 성장을 중단시키고 중심 시력을 보존하기 위한 시도로 레이저를 사용하여 망막의 일부를 파괴하는 단계를 포함한다. 혈관 성장의 주요 촉진제인 혈관 내피 성장인자(VEGF)의 기능을 차단하는 전략이 사용되고 있다. 단기간에서, 항-VEGF 요법은 시력을 개선할 수 있으나, 근원적인 허혈을 해결하지 못하고 사실상 유익한 결가지를 포함하는 모든 혈관 성장을 억제하기 때문에 이 상태를 악화시킬 수 있다. 새로운 혈관 성장이 허혈성 뇌, 심장 또는 사지에서 요구될 수 있는 노인 및/또는 당뇨병 환자에서 이 약물들의 전신 노출이라는 심각한 우려도 존재한다.

[0014] 전형적으로, 안구 질병의 경우 보다 더 작은 항체 단편, 예컨대, Fab 또는 Fab₂가 낮은 혈청 반감기를 갖고 전신 독성의 위험이 보다 더 낮기 때문에 유리체내 적용을 통해 종종 사용된다. 그러나, 이 보다 더 작은 단편도 전형적으로 (예를 들어, 혈청 내로의 보다 더 빠른 확산으로 인해) 보다 더 낮은 유리체내 반감기를 갖고 전형적으로 보다 더 자주 투약되어야 한다.

[0015] 하나의 결합 아암(arm)에서 도메인 대체/교환된 다중특이성 항체(CrossMab VH-VL)는 WO 2009/080252 및 문헌[Schaefer, W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108 (2011) 11187-11191](이들은 본원에 참고로 포함됨)에 상세히 기재되어 있다. 이들은 (이러한 도메인 교환을 수반하지 않는 접근법과 비교하여) 제1 항원에 대한 경쇄와 제2 항원에 대한 잘못된 중쇄의 부조화에 의해 야기된 부산물을 분명하게 감소시킨다. 그러나, 이들의 제조는 부산물로부터 완전히 자유롭지 못하다. 주요 부산물은 벤스-존스-유형(Bence-Jones-type) 상호작용을 기반으로 한다. 또한, 문헌[Schaefer, W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108 (2011) 11187-11191; in

Figure SII of the Supplement]을 참조한다.

[0016] WO 2010/040508에서, 이종특이성 항-VEGF/항-ANG-2 항체가 보고되었다. 인간 FcRn-결합 변형 항체 및 사용 방법이 WO 2014/177460에 보고되었다. 토마스(Thomas, M.) 등은 강력한 항-종양 및 항-혈관형성 효능, 및 안지오포이에틴-1/-2 억제제과 비교되는 우수한 부작용 프로파일을 갖는 신규한 안지오포이에틴-2 선택적인 완전 인간 항체를 보고하였다(문헌[PLOS One 8 (2013) E54923]). 파파도풀로스(Papadopoulos, K. P.) 등은 진행된 고형 종양 악성을 갖는 환자에서 REGN910(SAR307746), 완전 인간 및 선택적인 안지오포이에틴-2(Ang2) 단일클론 항체(MAb)의 상 I 선입 인체(first-in-human) 연구를 보고하였다(문헌[abstract 2517, ASCO Annual Meeting 2013]).

발명의 내용

[0017] 본 발명은 항-ANG2 항체 및 이의 사용 방법을 제공한다. 특정 양태에서, 항체는 친화성 성숙된 항체이다.

[0018] 본원에 보고된 한 양상은 (a) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는, 인간 ANG2에 특이적으로 결합하는 항체이다.

[0019] 본원에 보고된 모든 양상 중 한 양태에서, 항체는 (a) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함한다.

[0020] 본원에 보고된 한 양상은 (a) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는, 인간 ANG2에 특이적으로 결합하는 항체이다.

[0021] 본원에 보고된 모든 양상 중 한 양태에서, 항체는 (a) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함한다.

[0022] 본원에 보고된 한 양상은 (a) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는, 인간 ANG2에 특이적으로 결합하는 항체이다.

[0023] 본원에 보고된 모든 양상 중 한 양태에서, 항체는 (a) 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.

[0024] 한 양태에서, 항체는 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인, 및 서열번호 6 또는 서열번호 33의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0025] 본원에 보고된 한 양상은

[0026] i) 서열번호 19와 70% 초과, 85%, 90% 또는 95%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인, 및 서열번호 6과 70% 초과, 85%, 90% 또는 95%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하고,

[0027] ii) 중쇄 가변 도메인 중에서 위치 28에 아미노산 잔기 아스파라긴(N), 위치 30에 아미노산 잔기 알라닌(A), 위치 100b에 아미노산 잔기 프롤린(P) 및 위치 100j에 아미노산 잔기 알라닌(A)을 갖고, 경쇄 가변 도메인 중에서 위치 51에 아미노산 잔기 트레오닌(T)(카밧에 따른 넘버링)을 갖고,

[0028] iii) 서열번호 19의 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 6 또는 서열번호 33의 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체와 비교하여, Tie2 인산화 ELISA를 사용하여 측정된, 인간 Tie2를 안정적으로 발현하는 HEK293 세포를 사용하는 세포-기반 어세이에서 수용체 Tie2에 대한 ANG2의 결합의 억제에 대해 낮은 EC₅₀ 값을 갖는

[0029] 인간 ANG2에 특이적으로 결합하는 항체이다.

[0030] 본원에 보고된 모든 양상 중 한 양태에서, 항체는 인간 서브클래스 IgG1 또는 인간 서브클래스 IgG4의 항체이다.

- [0031] 본원에 보고된 모든 양상 중 한 양태에서, 항체는 카파 경쇄를 갖는 인간 서브클래스 IgG1의 항체이다.
- [0032] 본원에 보고된 모든 양상 중 한 양태에서, 항체는 람다 경쇄를 갖는 인간 서브클래스 IgG1의 항체이다.
- [0033] 본원에 보고된 모든 양상 중 한 양태에서, 항체는 단일클론성 항체이다.
- [0034] 본원에 보고된 한 양상은 서열번호 19의 VH 서열 및 서열번호 24의 VL 서열을 포함하는 항체이다.
- [0035] 본원에 보고된 한 양상은 서열번호 28의 VH 서열 및 서열번호 33의 VL 서열을 포함하는 항체이다.
- [0036] 본원에 보고된 한 양상은 서열번호 37의 VH 서열 및 서열번호 42의 VL 서열을 포함하는 항체이다.
- [0037] 한 양태에서, 항체는 이중특이성 항체이다.
- [0038] 모든 양상 중 한 양태에서, 인간화된 항체는 Tie2 수용체로의 인간 ANG2의 결합을 억제함으로써 인간 ANG2의 생물학적 활성을 차단한다.
- [0039] 본원에 보고된 한 양상은 인간 ANG2에 특이적으로 결합하는 항체 Fab 단편이고, 이때 항체 Fab 단편은 (a) 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.
- [0040] 본원에 보고된 모든 양상 중 한 양태에서, 항체 Fab 단편은 (a) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함한다.
- [0041] 본원에 보고된 한 양상은 인간 ANG2에 특이적으로 결합하는 항체 Fab 단편이고, 이때 항체 Fab 단편은 (a) 서열 번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.
- [0042] 본원에 보고된 모든 양상 중 한 양태에서, 항체 Fab 단편은 (a) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함한다.
- [0043] 본원에 보고된 한 양상은 인간 ANG2에 특이적으로 결합하는 항체 Fab 단편이고, 이때 항체 Fab 단편은 (a) 서열 번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.
- [0044] 본원에 보고된 모든 양상 중 한 양태에서, 항체 Fab 단편은 (a) 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함한다.
- [0045] 본원에 보고된 한 양상은 서열번호 19의 VH 서열 및 서열번호 24의 VL 서열을 포함하는 항체 Fab 단편이다.
- [0046] 본원에 보고된 한 양상은 서열번호 28의 VH 서열 및 서열번호 33의 VL 서열을 포함하는 항체 Fab 단편이다.
- [0047] 본원에 보고된 한 양상은 서열번호 37의 VH 서열 및 서열번호 42의 VL 서열을 포함하는 항체 Fab 단편이다.
- [0048] 본원에 보고된 한 양상은 인간 ANG2에 특이적으로 결합하는 scFv 항체 단편이고, 이때 scFv 항체 단편은 (a) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.
- [0049] 본원에 보고된 모든 양상 중 한 양태에서, scFv 항체 단편은 (a) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함한다.
- [0050] 본원에 보고된 한 양상은 인간 ANG2에 특이적으로 결합하는 scFv 항체 단편이고, 이때 scFv 항체 단편은 (a) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.
- [0051] 본원에 보고된 모든 양상 중 한 양태에서, scFv 항체 단편은 (a) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함한다.

- [0052] 본원에 보고된 한 양상은 인간 ANG2에 특이적으로 결합하는 scFv 항체 단편이고, 이때 scFv 항체 단편은 (a) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.
- [0053] 본원에 보고된 모든 양상 중 한 양태에서, scFv 항체 단편은 (a) 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함한다.
- [0054] 본원에 보고된 한 양상은 서열번호 19의 VH 서열 및 서열번호 24의 VL 서열을 포함하는 scFv 항체 단편이다.
- [0055] 본원에 보고된 한 양상은 서열번호 28의 VH 서열 및 서열번호 33의 VL 서열을 포함하는 scFv 항체 단편이다.
- [0056] 본원에 보고된 한 양상은 서열번호 37의 VH 서열 및 서열번호 42의 VL 서열을 포함하는 scFv 항체 단편이다.
- [0057] 본원에 보고된 한 양상은 X-선 결정학에 의해 측정될 때, 본원에 보고된 항체로서 ANG2의 잔기의 90% 이상과 상호작용하는 항-ANG2 항체이다.
- [0058] 본원에 보고된 한 양상은 X-선 결정학에 의해 측정될 때, 본원에 보고된 항체로서 적어도 동일한 ANG2의 잔기와 상호작용하는 항-ANG2 항체이다.
- [0059] 본원에 보고된 한 양상은 X-선 결정학에 의해 측정될 때, 본원에 보고된 항체로서 ANG2의 잔기의 90% 이상과 상호작용하고 수용체로의 ANG2의 결합을 억제하는 항-ANG2 항체이다.
- [0060] 본원에 보고된 한 양상은 X-선 결정학에 의해 측정될 때, 본원에 보고된 항체로서 적어도 동일한 ANG2의 잔기와 상호작용하고 수용체로의 ANG2의 결합을 억제하는 항-ANG2 항체이다.
- [0061] 본원에 보고된 한 양상은 본원에 보고된 항체를 코팅하는 (단리된) 핵산이다.
- [0062] 본원에 보고된 한 양상은 본원에 보고된 핵산을 포함하는 숙주 세포이다.
- [0063] 본원에 보고된 한 양상은 본원에 보고된 숙주 세포를 배양하여 항체를 생산하는 단계; 및 상기 항체를 상기 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 회수하는 단계를 포함하는, 본원에 보고된 항체의 제조 방법이다.
- [0064] 본원에 보고된 한 양상은 본원에 보고된 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 제형이다.
- [0065] 한 양태에서, 약학 제형은 추가적인 치료제를 추가로 포함한다. 한 양태에서, 추가적인 치료제는 항-VEGF 항체, 항-IL-1베타 항체 또는 항-PDGF-B 항체이다.
- [0066] 본원에 보고된 한 양상은 약제로서 사용하기 위한 본원에 보고된 항체이다.
- [0067] 본원에 보고된 한 양상은 혈관 질병의 치료를 위한 본원에 보고된 항체이다.
- [0068] 본원에 보고된 한 양상은 혈관 질병의 치료를 위한 약학 조성물이다.
- [0069] 본원에 보고된 한 양상은 혈관 질병의 치료용 약제의 제조를 위한 본원에 보고된 항체의 용도이다.
- [0070] 본원에 보고된 한 양상은 본원에 보고된 항체를 이러한 치료를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써, 혈관 질병을 앓는 환자를 치료하는 방법이다.
- [0071] 본원에 보고된 한 양상은 혈관 질병의 치료에 사용하기 위한, 바람직하게는 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 보고된 항체이다.
- [0072] 본 발명의 한 양태는 암의 치료를 위한 본원에 보고된 항체이다.
- [0073] 본원에 보고된 한 양상은 암의 치료용 약제로서 사용하기 위한 것이다.
- [0074] 본원에 보고된 한 양상은 암의 치료용 약제의 제조를 위한 본원에 보고된 항체의 용도이다.
- [0075] 본원에 보고된 한 양상은 본원에 보고된 항체를 이러한 치료를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써, 암을 앓는 환자를 치료하는 방법이다.
- [0076] 본원에 보고된 한 양상은 전이의 예방용 약제로서 사용하기 위한 것이다.
- [0077] 본원에 보고된 한 양상은 전이의 예방용 약제의 제조를 위한 본원에 보고된 항체의 용도이다.
- [0078] 본원에 보고된 한 양상은 본원에 보고된 항체를 이러한 예방적 처치를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써, 원

발성 암을 앓는 환자에서 전이를 예방하는 방법이다.

[0079] 본원에 보고된 한 양상은 안구 혈관 질병의 치료에 사용하기 위한, 바람직하게는 황반 변성의 치료에 사용하기 위한 본원에 보고된 항체이다.

[0080] 본원에 보고된 한 양상은 ANG2와 Tie2 수용체 사이의 상호작용을 억제하는데 사용하기 위한 본원에 보고된 항체이다.

[0081] 본원에 보고된 한 양상은 약제의 제조에 있어서 본원에 보고된 항체의 용도이다.

[0082] 한 양태에서, 약제는 안구 혈관 질병의 치료, 바람직하게는 황반 변성의 치료를 위한 것이다.

[0083] 한 양태에서, 약제는 ANG2와 Tie2 수용체 사이의 상호작용을 억제하기 위한 것이다.

[0084] 본원에 보고된 한 양상은 효과량의 본원에 보고된 항체를 개체에 투여함을 포함하는, 안구 혈관 질병, 바람직하게는 황반 변성을 갖는 개체의 치료 방법이다.

[0085] 본원에 보고된 한 양상은 효과량의 본원에 보고된 항체를 개체에게 투여하여 ANG2와 Tie2 수용체 사이의 상호작용을 억제함을 포함하는, 개체에서 ANG2와 Tie2 수용체 사이의 상호작용의 억제 방법이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 정의

[0087] 본원의 목적상 "수용자 인간 골격"은 하기 정의된 바와 같이 인간 면역글로불린 골격 또는 인간 컨센서스 골격으로부터 유래된 경쇄 가변 도메인(VL) 골격 또는 중쇄 가변 도메인(VH) 골격의 아미노산 서열을 포함하는 골격이다. 인간 면역글로불린 골격 또는 인간 컨센서스 골격으로부터 유래된 수용자 인간 골격은 이의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 양태에서, 아미노산 변화의 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하 또는 2개 이하이다. 일부 양태에서, VL 수용자 인간 골격은 VL 인간 면역글로불린 골격 서열 또는 인간 컨센서스 골격 서열과 서열 면에서 동일하다.

[0088] "친화도"는 분자의 단일 결합 부위(예를 들어, 항체)와 이의 결합 파트너(예를 들어, 항원) 사이의 비-공유 결합성 상호작용의 총 합의 강도를 나타낸다. 달리 지시되지 않는 한, 본원에 사용된 "결합 친화도"는 결합 쌍(예를 들어, 항체 및 항원)의 구성원 사이의 1:1 상호작용을 나타내는 고유 결합 친화도를 나타낸다. 분자 X의 이의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수(k_d)로 나타낼 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 것을 비롯한 당해 분야에 공지된 통상적 방법에 의해 측정될 수 있다. 결합 친화도를 측정하기 위한 구체적 예 및 예시적 양태가 하기에 기재된다.

[0089] "친화도 성숙된" 항체는 변경을 보유하지 않는 모 항체에 비해 하나 이상의 초가변 영역(HVR)에서 하나 이상의 변경을 갖는 항체를 지칭하고, 이러한 변경은 항원에 대한 항체의 친화도의 개선을 야기한다.

[0090] 용어 "항-ANG2 항체" 및 "ANG2에 결합하는 항체"는 충분한 친화도로 ANG2에 결합할 수 있는 항체를 나타내고, 이러한 항체는 ANG2를 표적화하는데 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하다. 한 양태에서, 관련되지 않은 비-ANG2 단백질에 대한 항-ANG2 항체의 결합의 정도는, 예를 들어 ELISA 또는 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 바와 같이 ANG2에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 양태에서, ANG2에 결합하는 항체는 1 μM 이하, 100 nM 이하 또는 10 nM 이하(예컨대, 10^{-8} M 이하)의 해리 상수(KD)를 갖는다. 특정 양태에서, 항-ANG2 항체는 상이한 종으로부터의 ANG2 중에 보존되는 ANG2의 에피토프에 결합한다.

[0091] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 목적하는 항원-결합 활성을 나타내는 한, 비제한적으로 단일클론 항체, 다중클론 항체, 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체) 및 항체 단편을 포함하는 다양한 항체 구조물을 포괄한다.

[0092] "항체 단편"은 온전한 항체가 결합한 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부를 포함하는 온전한 항체 이외의 분자를 나타낸다. 항체 단편의 예는 비제한적으로 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 다이아바디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자(예를 들어, scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체를 포함한다.

[0093] 기준 항체로서 "동일한 에피토프에 결합하는 항체"는 기준 항체로서 적어도 동일한 아미노산 모이어티와의 상호작용을 갖는 항체를 나타낸다. 이를 상호작용은, 예를 들어 대전된 아미노산 모이어티 사이의 이온성 상호작용

또는 소수성 아미노산 모이어티 사이의 소수성 상호작용이다.

[0094] 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 부분이 특정 공급원 또는 종으로부터 유래된 반면에, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지 부분이 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래된 항체를 지칭한다.

[0095] 본원에 사용된 용어 "암"은 증식성 질병, 예컨대 림프종, 림프구성 백혈병, 폐암, 비소세포폐암(NSCL), 세기관지폐포세포폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문암, 복부암, 위암, 결장암, 유방암, 자궁암, 난관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's Disease), 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신장세포암종, 신우암종, 중피종, 간세포암, 담낭암, 중추신경계(CNS)의 신생물, 척추 종양, 뇌간아교종, 다형성 아교모세포종, 성상세포종, 신경초종, 상의세포종, 수도세포종, 수막종, 편평세포암종, 뇌하수체선종, 및 유잉 육종(임의의 상기 암의 난치 버전을 포함함), 또는 하나 이상의 상기 암의 조합을 지칭한다.

[0096] 항체의 "클래스"는 이의 중쇄에 의해 보유된 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 항체의 5종의 주요 클래스, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 서브클래스(동종형), 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 더 나누어질 수 있다. 면역글로불린의 상이한 클래스들에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로서 지칭된다.

[0097] 용어 "면역접합체"는 항체와 비-항체 모이어티 사이의 공유 결합성 접합체를 의미한다. 이러한 비-항체 모이어티는 검출가능한 표지, 효과기 분자 또는 세포독성제일 수 있다.

[0098] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "세포독성제"는 세포 기능을 억제하거나 방지하고/하거나 세포 사멸 또는 세포 파괴를 야기하는 물질을 나타낸다. 세포독성제는 비제한적으로 방사성 동위원소(예를 들어, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² 및 Lu의 방사성 동위원소); 화학치료제 또는 약물(예를 들어, 메토트렉세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드(빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 삽입성 제제); 성장 억제제; 효소 및 이의 단편, 예컨대 핵산 분해 효소; 항생제; 독소, 예컨대 소분자 독소 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소(이의 단편 및/또는 변이체 포함); 및 하기에 기재되는 다양한 항종양제 또는 항암제를 포함한다.

[0099] "효과기 기능"은 항체 클래스에 따라 달라지는, 항체의 Fc-영역에 기인할 수 있는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 효과기 기능의 예에는 C1q 결합 및 보체 의존적 세포독성(CDC); Fc 수용체 결합; 항체 의존적 세포-매개된 세포독성(ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체)의 하향조절; 및 B 세포 활성화가 포함된다.

[0100] 제제, 예를 들어 약학 제형의 "효과량"은 필요한 시간 동안 필요한 용량으로 목적하는 치료 또는 예방 결과를 달성하기에 효과적인 양을 지칭한다.

[0101] 본원에서 용어 "Fc-영역"은 불변 영역의 적어도 일부분을 함유하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 사용된다. 용어는 원래 서열 Fc-영역 및 변이체 Fc-영역을 포함한다. 한 양태에서, 인간 IgG 중쇄 Fc-영역은 Cys226 또는 Pro230으로부터 중쇄의 카복실 말단으로 연장된다. 그러나, Fc-영역의 C-말단 리신(Lys447) 또는 C-말단 글리신-리신 다이펩티드(Gly446Lys447)는 존재하지 않거나 존재할 수 있다. 달리 본원에 명시되지 않는 한, Fc-영역 또는 불변 영역내 아미노산 잔기의 넘버링은 문헌[Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242]에 기재된 바와 같이, EU 지수로도 지칭되는 EU 넘버링 시스템에 따른다.

[0102] "골격" 또는 "FR"은 초가변 영역(HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인으로 구성된다: FR1, FR2, FR3 및 FR4. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH(또는 VL)에서 하기 순서로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[0103] 용어 "전장 항체", "온전한 항체" 및 "전체 항체"는 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖거나 본원에 정의된 Fc-영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 나타내는데 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0104] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"은 상호교환적으로 사용되고, 외래 핵산이 도입되어 있는 세포(이러한 세포의 자손을 포함함)를 지칭한다. 숙주 세포는 일차 형질전환된 세포, 및 계대배양의 수와

관계 없이 이로부터 유래된 자손을 포함하는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함한다. 자손은 핵산 함량 면에서 모 세포와 완전히 동일하지 않을 수 있으나 돌연변이를 함유할 수 있다. 최초로 형질전환된 세포에서 스크리닝되거나 선별된 기능 또는 생물학적 활성과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 여기에 포함된다.

- [0105] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생성된 항체, 또는 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체 암호화 서열을 사용하는 비-인간 공급원으로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하는 항체이다. 인간 항체의 이 정의는 비-인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화된 항체를 특히 배제한다.
- [0106] "인간 컨센서스 골격"은 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 골격 서열의 선택에서 가장 흔히 존재하는 아미노산 잔기를 나타내는 골격이다. 일반적으로, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터의 선택이다. 일반적으로, 서열의 하위군은 문헌[Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3]에 기재된 바와 같은 하위군이다. 한 양태에서, VL의 경우 하위군은 상기 문헌[Kabat et al.]에 기재된 바와 같은 하위군 카파 I이다. 한 양태에서, VH의 경우 하위군은 상기 문헌[Kabat et al.]에 기재된 바와 같은 하위군 III이다.
- [0107] "인간화된" 항체는 비-인간 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 특정 양태에서, 인간화된 항체는 하나 이상, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 이때 모든 또는 실질적으로 모든 HVR(예를 들어, CDR)은 비-인간 항체의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 항체의 것에 상응한다. 인간화된 항체는 선택적으로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체, 예를 들어 비-인간 항체의 "인간화된 형태"는 인간화를 겪은 항체를 지칭한다.
- [0108] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열 면에서 초가변성(상보성 결정 영역 또는 CDR)을 갖고/갖거나 구조적으로 정의된 루프(초가변 루프)를 형성하고/하거나 항원 접촉 잔기(항원 접촉부)를 함유하는 항체 가변 도메인의 영역 각각을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR을 포함한다: VH에서 3개(H1, H2 및 H3), 및 VL에서 3개(L1, L2 및 L3).
- [0109] 본원에서 HVR은 (a) 아미노산 잔기 26-32(L1), 50-52(L2), 91-96(L3), 26-32(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3)에 존재하는 초가변 루프(문헌[Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917]); (b) 아미노산 잔기 24-34(L1), 50-56(L2), 89-97(L3), 31-35b(H1), 50-65(H2) 및 95-102(H3)에 존재하는 CDR(문헌[Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242]); (c) 아미노산 잔기 27c-36(L1), 46-55(L2), 89-96(L3), 30-35b(H1), 47-58(H2) 및 93-101(H3)에 존재하는 항원 접촉부(문헌[MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)]); 및 (d) HVR 아미노산 잔기 46-56(L2), 47-56(L2), 48-56(L2), 49-56(L2), 26-35(H1), 26-35b(H1), 49-65(H2), 93-102(H3) 및 94-102(H3)를 포함하는, (a), (b) 및/또는 (c)의 조합을 포함한다.
- [0110] 달리 지시되지 않는 한, 가변 도메인내 HVR 잔기 및 다른 잔기(예를 들어, FR 잔기)는 상기 카밧 등의 문헌에 따라 넘버링된다.
- [0111] "면역접합체"는 하나 이상의 이종기원 분자에 접합된 항체이다.
- [0112] "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물은 비체한적으로 사육 동물(예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예를 들어, 인간 및 비-인간 영장류, 예컨대, 원숭이), 토끼 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함한다. 특정 양태에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.
- [0113] "단리된" 항체는 이의 천연 환경의 성분으로부터 분리되어 있는 항체이다. 일부 양태에서, 항체는, 예를 들어 전기영동(예를 들어, SDS-PAGE, 등전점 포커싱(IEF), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 측정될 때 95% 또는 99% 초과의 순도로 정제된다. 항체 순도의 평가 방법의 검토를 위해서는, 예를 들어 문헌[Flatman, S. et al., J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87]을 참조한다.
- [0114] "단리된" 핵산은 이의 천연 환경의 성분으로부터 분리되어 있는 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산은 통상적으로 핵산 분자를 함유하는 세포에 함유된 핵산 분자를 포함하지만, 상기 핵산 분자는 염색체 외부에 존재하거나 이의 천연 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재한다.
- [0115] "항-ANG2 항체를 암호화하는 단리된 핵산"은 항체 중쇄 및 경쇄(또는 이들의 단편)를 암호화하는 하나 이상의

핵산 분자(단일 벡터 또는 별개의 벡터 내의 이러한 핵산 분자 및 숙주 세포에서 하나 이상의 위치에 존재하는 이러한 핵산 분자를 포함함)를 지칭한다.

- [0116] 본 발명에 따른 용어 "전이"는 환자에서 원발성 종양으로부터 2차 종양이 발생하는 하나 이상의 다른 부위로의 암성 세포의 전염을 지칭한다. 암이 전이되었는지를 측정하는 수단은 당해 분야에 공지되어 있고, 뼈 스캔, 흉부 X-선, CAT 스캔, MRI 스캔 및 종양 마커 시험을 포함한다.
- [0117] 본원에 사용된 용어 "전이의 예방" 또는 "2차 종양의 예방"은 동일한 의미를 갖고, 환자에서 원발성 종양으로부터 하나 이상의 다른 부위로의 암성 세포의 추가 전염을 억제하거나 감소시키는 방식으로, 암을 앓는 환자에서의 전이에 대한 예방제를 지칭한다. 이는 원발성 종양 또는 암이 예방되거나 자연되거나 감소됨에 따라 2차 종양의 발생이 예방되거나 자연되거나 감소됨을 의미한다. 바람직하게는, 전이, 즉 폐의 2차 종양이 예방되거나 감소되고, 이는 원발성 종양으로부터 폐로의 암성 세포의 전이성 감염이 예방되거나 감소됨을 의미한다.
- [0118] 본원에 사용된 용어 "단일클론 항체"는 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭한다. 즉, 예를 들어, 천연 돌연변이를 함유하거나 단일클론 항체 제제의 제조 동안 발생되는 가능한 변이체 항체(이러한 변이체는 일반적으로 미미한 양으로 존재함)를 제외하고 상기 집단을 구성하는 개별 항체는 동일하고/하거나 동일한 에피토프에 결합한다. 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 유도된 상이한 항체를 포함하는 다중클론 항체 제제와 대조적으로, 단일클론 항체 제제의 각각의 단일클론 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 유도된다. 따라서, 수식어 "단일클론"은 항체의 특성을 항체들의 실질적으로 균질한 집단으로부터 수득되는 것으로서 표시하고, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 제조를 요구하는 것으로서 해석되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 단일클론 항체는 비제한적으로 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지-디스플레이 방법, 및 인간 면역글로불린 좌위의 전부 또는 일부를 함유하는 형질전환 동물을 사용하는 방법을 포함하는 다양한 기법들에 의해 제조될 수 있고, 이러한 방법 및 단일클론 항체의 다른 예시적인 제조 방법은 본원에 기재되어 있다.
- [0119] "네이키드 항체"는 이종기원 모이어티(예를 들어, 세포독성 모이어티) 또는 방사성 표지에 접합되지 않는 항체를 나타낸다. 네이키드 항체는 약학 제형에 존재할 수 있다.
- [0120] "천연 항체"는 상이한 구조를 갖는 천연 면역글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들어, 천연 IgG 항체는 다이설파이드-결합된 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 구성된 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. 각각의 중쇄는 N-말단부터 C-말단까지 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인으로서도 지칭되는 가변 영역(VH)에 이어서 3개의 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, 각각의 경쇄는 N-말단부터 C-말단까지 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로서도 지칭되는 가변 영역(VL)에 이어서 불변 경쇄(CL) 도메인을 갖는다. 항체의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열에 근거하여 카파(κ) 및 람다(λ)로서 지칭되는 두 유형 중 하나로 배정될 수 있다.
- [0121] 용어 "포장 삽입물"은 치료 제품의 상업적 포장물 내에 통상적으로 포함되는 설명서로서, 적응증, 용법, 용량, 투여, 병용 치료, 사용금지 사유 및/또는 이러한 치료 제품의 사용에 관한 경고에 대한 정보를 함유하는 설명서를 지칭하기 위해 사용된다.
- [0122] 기준 폴리펩티드 서열에 대한 "퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성"은 서열을 정렬하고 필요에 따라 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 캡을 도입하고 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로서 간주하지 않은 후 기준 폴리펩티드 서열의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 측정하기 위한 정렬은 당해 분야의 기술 내에 있는 다양한 방식, 예를 들어 공개적으로 입수 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대, BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 사용함으로써 달성될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 서열 정렬을 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적상 % 아미노산 서열 동일성 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2의 사용을 통해 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크 인코포레이티드(Genentech, Inc.)에 의해 만들어졌고, 소스 코드는 미국 저작권 협회(U.S. Copyright Office, 미국 워싱턴 디씨 20559 소재)에 사용자 문서로 출원되었고, 상기 코드는 상기 미국 저작권 협회에서 미국 저작권 등록 번호 TXU510087 하에 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제넨테크 인코포레이티드(미국 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 소재)로부터 공개적으로 입수될 수 있거나 상기 소스 코드로부터 편집될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함하는 UNIX 작동 시스템 상에서의 사용을 위해 편집되어야 한다. 모든 서열 비교 변수는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고 변형되지 않는다.

- [0123] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교를 위해 사용되는 경우, 주어진 아미노산 서열 B에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성(다르게는, 주어진 아미노산 서열 B에 대한 특정 % 아미노산 서열 동일성을 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로서 표현될 수 있음)은 다음과 같이 계산된다:
- [0124] $100 \times X/Y$
- [0125] 이때, X는 A 및 B의 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2 정렬에서 이 프로그램에 의해 동일한 일치(match)로서 기록되는 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B에 존재하는 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동등하지 않은 경우, B에 대한 A의 % 아미노산 서열 동일성은 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 동일성과 동등하지 않을 것임이 인식될 것이다. 달리 구체적으로 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 % 아미노산 서열 동일성 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램의 사용을 통해 바로 이전 단락에 기재된 바와 같이 수득된다.
- [0126] 용어 "약학 제형"은 그 내부에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이게 하는 형태로 존재하고 이 제형이 투여되는 대상체에게 허용되지 않는 독성을 나타내는 추가적 성분을 함유하지 않는 제형을 지칭한다.
- [0127] "약학적으로 허용되는 담체"는 대상체에게 독성을 나타내지 않는, 약학 제형 중의 활성 성분 이외의 성분을 지칭한다. 약학적으로 허용되는 담체는 비제한적으로 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 포함한다.
- [0128] 본원에 사용된 용어 "ANG2"는 인간 안지오포이에틴-2(ANG-2)(다르게는, ANGPT2 또는 ANG2로 약칭됨)(서열번호 54)를 지칭하고, 예를 들어, 문헌[Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60] 및 문헌[Cheung, A.H., et al., Genomics 48 (1998) 389-91]에 기술된다. 안지오포이에틴-1 및 -2는 혈관 내피 내에서 선택적으로 발현되는 티로신 키나제의 계열인 Tie에 대한 리간드로 발견되었다(문헌[Yancopoulos, G.D., et al., Nature 407 (2000) 242-248]). 현재, 안지오포이에틴 계열의 4개의 명확한 구성원이 존재한다. 안지오포이에틴-3 및 -4 (ANG3 및 ANG4)는 마우스 및 인간에서 동일한 유전자 자리의 널리 분기된 대응물을 나타낼 수 있다(예컨대, 문헌[Kim, I., et al., FEBS Lett., 443 (1999) 353-56]; 문헌[Kim, I., et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 26523-26528] 참고). ANG1 및 ANG2는 원래 조직 배양 실험에서 각각 작용제 및 길항제로서 동정되었다(ANG1의 경우: 문헌[Davis, S., et al., Cell 87 (1996) 1161-69]; ANG2의 경우: 문헌[Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60]), 모든 공지된 안지오포이에틴은 주로 Tie2에 결합하고, ANG1 및 ANG2는 둘 다 3 nM(Kd)의 친화도로 Tie2에 결합한다(문헌[Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60]).
- [0129] 본원에 사용된 "치료"(및 이의 문법적 어미변화, 예컨대, "치료하다" 또는 "치료하는")는 치료되는 개체의 자연 경과를 변형시키기 위한 시도에서의 임상 중재를 지칭하고, 예방을 위해 또는 임상 병리의 과정 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 비제한적으로 질환의 발생 또는 재발의 예방, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접적인 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이의 예방, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 호전 또는 경감, 및 관해 또는 개선된 예후를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명의 항체는 질환의 발달을 지연시키거나 질환의 진행을 늦추기 위해 사용된다.
- [0130] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체와 항원의 결합에 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄(각각 VH 및 VL)의 가변 도메인은 일반적으로 유사한 구조를 갖고, 이때 각각의 도메인은 4개의 보존된 골격 영역(FR) 및 3개의 초가변 영역(HVR)을 포함한다(예를 들어, 문헌[Kindt, T.J. et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), page 91] 참고). 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 나아가, 특정 항원에 결합하는 항체는 항원에 결합하는 항체로부터의 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 각각 상보적인 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 스크리닝함으로써 단리될 수 있다(예를 들어, 문헌[Portolano, S. et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887]; 및 문헌[Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628] 참고).
- [0131] 용어 "혈관 질병"은, 암, 염증성 질병, 동맥경화증, 허혈, 트라우마, 폐혈증, COPD, 천식, 당뇨병, AMD, 망막증, 뇌졸중, 비만, 급성 폐 순상, 출혈, 혈관 누출(예컨대, 사이토킨 유도된 혈관 누출), 알러지, 그레브스 병(Graves' Disease), 하시모토(Hashimoto) 자가면역 갑상선염, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 거대세포동맥염, 류마티스성 관절염, 전신 홍반 루푸스(SLE), 홍반성 신염, 크론병(Crohn's Disease), 다발성 경화증, 궤양성 대장염, 특히 고형 종양, 안구내 신생혈관 증후군, 예컨대, 증식성 망막증 또는 연령-관련 황반 변성(AMD), 류마티스성 관절염 및 건선을 포함한다(문헌[Folkman, J., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934]; 문헌[Klagsbrun, M., et al., Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239]; 및 문헌[Garner, A.,

Vascular diseases, In: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., and Klintworth, G.K., (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp 1625-1710]).

[0132] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 그 자신에 연결된 또 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 이 용어는 자가 복제 핵산 구조물로서의 벡터뿐만 아니라 그 자신이 도입되어 있는 숙주 세포의 게놈 내로 삽입된 벡터도 포함한다. 특정 벡터는 이들에 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로서 지칭된다.

II. 조성물 및 방법

[0134] 개선된 친화도를 갖는 항-ANG2 항체가 본원에 보고된다.

[0135] 본 발명의 항체는, 예를 들어 혈관 질병, 예컨대 안구 혈관 질병, 예컨대 황반 변성, 또는 암의 치료에 유용하다.

[0136] 본 발명에 따른 항체는 이러한 질병, 특히 암 또는 황반 변성을 앓는 환자에게 이익을 주는 매우 중요한 특성을 갖는다. 본원에 보고된 항체는 혈관형성 또는 혈관 질병의 억제에 매우 효과적이다.

[0137] 본 발명에 따른 항체는 a) 종양 성장 억제, 및/또는 b) 종양 혈관형성 또는 혈관 질병의 억제, 및/또는 c) 황반 변성의 억제에 효과적일 수 있다.

A. 본원에 보고된 예시적인 항-ANG2 항체

[0139] 개선된 결합 특성을 갖는 항-ANG2 항체 및 이의 단편이 본원에 보고된다.

[0140] 인간 ANG2 결합 동역학:

분자	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)*	t1/2 (s)
0009	1.92E+06	0.07565	39	9
0041	3.85E+06	3.17E-03	1	219
0075	2.22E+06	3.10E-02	14	22
0090	2.16E+06	2.53E-03	1	274
0098	1.56E+07	1.58E-04	10*	
0099	2.61E+07	1.10E-04	4*	
0100	2.06E+07	1.67E-04	8*	
0101	1.83E+07	1.20E-04	7*	

[0141]

*결합 활성.

[0143] 사이노몰거스 ANG2 결합 동역학:

분자	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)*	t1/2 (s)
0009	1.45E+06	8.81E-02	61	8
0041	2.14E+06	3.60E-03	2	193
0075	1.34E+06	3.25E-02	24	21
0090	2.02E+06	3.08E-03	2	225

[0144]

[0145] 본원에 보고된 항체의 실시예 6에 따른 어세이에 의해 측정된 상대적인 생물학적 활성이 하기 표에 제공된다.

분자	상대적인 생물학적 활성 [%]
0009	72
0041	838
0075	128
0090	706
0098	100

[0146]

[0147] 상이한 항체의 열적 안정성을 응집 개시 온도(Tagg) 및 융점(Tm)의 측정에 의해 평가하였다(하기 표 참조).

분자	Tagg [° C]	Tm [° C]
0009	62.2	65.9
0041	63.1	66.0
0075	63.6	67.0
0090	64.0	67.4

[0148]

[0149] 또한, 항체는 스트레스 시험에서 양호한 안정성을 나타낸다. 결합 활성을 보면 플라스몬 공명을 사용하여 결정하였다(하기 표 참조).

분자	상대적인 결합 활성	
	37 ° C, pH 7.4 에서 2주	40 ° C, pH 6.0 에서 2주
0009	99 %	91 %
0041	100 %	101 %
0075	101 %	105 %
0090	112 %	100 %

[0150]

100 % = -80 ° C에서 저장된 샘플

[0151]

동일한 안정성을 CE-SDS 분석에서 볼 수 있다(하기 표 참조).

분자	상대적인 면적%		
	출발	37 ° C, pH 7.4 에서 2주	40 ° C, pH 6.0 에서 2주
0009	98.9	98.5	98.8
0041	98.9	98.6	98.6
0090	99.2	98.5	98.2

[0152]

[0153]

하기 표는 본원에 보고된 항체의 특성을 요약한다.

분자	0009	0015	0016	0017	0021	0025	0026
포맷	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1
ANG2에 대한 원자가	1	1	1	1	1	1	1
차이	참조 분자	VH: S100dP VL: wt	VH: S100dP Y100fP VL: wt	VH: S54C D100bC VL: wt	VH: G100jA VL: wt	VH: T28N T30V VL: wt	VH: T28N T30A VL: wt
서열번호	HC: 46 LC: 49	HC: 57 LC: 49	HC: 58 LC: 49	HC: 59 LC: 49	HC: 60 LC: 49	HC: 61 LC: 49	HC: 62 LC: 49
ka [1/Ms]	2.15E+06	1.87E+06	2.28E+06	3.03E+06	3.35E+06	1.87E+06	2.03E+06
kd [1/s]	7.23E-02	1.49E-02	2.21E-01	3.57E-02	3.00E-02	7.02E-02	3.71E-02
KD [nM]	34	8	97	12	9	38	18
t _{1/2} (s)	10	46	3	19	23	10	19
제 1 정제 단계	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트
스케일 [1]	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
수율 [mg/1 상청액]	123	153	153	136	103	30	77
단량체 (SEC) [%]	78	76	72	72	74	82	87
단량체 (CE-SDS) [%]	80	66	64	92	77	82	89
추가 정제 단계	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC
수율 [mg/1 상청액]	80	77	75	60	60	22.8	54
단량체 (SEC) [%]	> 99	98	99	96	> 99	>99	>99

[0154]

분자	0009	0015	0016	0017	0021	0025	0026
단량체 (CE-SDS) [%]	> 99	99	99	99	99	98	98
결합 억제 ANG2 tie2 수용체 EC50 [nM]	69						
T_agg [° C]	62						
T_m [° C]	66						
pH 6.0에서 황온처리 2주 후 ANG2 결합의 손실	9						
pH 7.4 에서 황온처리 2주 후 ANG2 결합의 손실	1						

[0155]

분자	0027	0028	0029	0031	0032	0033	0039
포맷	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1
ANG2 예 대한 원자가	1	1	1	1	1	1	1
차이	VH: T28N T30K VL: wt	VH: T30K VL: wt	VH: S100dP G100jA VL: wt	VH: wt VL: Y48W	VH: wt VL: D49S	VH: T28N S100dP G100jA VL: wt	VH: D100bT VL: D50T
서열번호	HC: 63 LC: 49	HC: 64 LC: 49	HC: 65 LC: 49	HC: 46 LC: 66	HC: 46 LC: 67	HC: 68 LC: 49	HC: 69 LC: 50
ka [1/Ms]	2.40E+06	1.81E+06	2.41E+06	1.15E+06	8.90E+05	7.53E+05	1.14E+06
kd [1/s]	1.65E-01	2.59E-01	4.24E-03	4.48E-01	1.38E-01	2.25E-03	0.1848
KD [nM]	69	143	2	391	154	3	162
t _{1/2} (s)	4	3	164	2	5	308	4
제 1 정제 단계	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트
스케일 [1]	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
수율 [mg/1 상청액]	150	155	136	140	47.6		163.8
단량체 (SEC) [%]	80	84	80	93	89	48	86
단량체 (CE-SDS) [%]	80	85	76	92	92	16+41	92
추가 정제 단계	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC
수율 [mg/1 상청액]	109.6	116.5	89	118.5	38.5	54	115
단량체 (SEC) [%]	>99	>99	>99	>99	>99	>99	>95

[0156]

분자	0027	0028	0029	0031	0032	0033	0039
단량체 (CE-SDS) [%]	98	99	98	98	99	27+72	98
결합 억제 ANG2 tie2 수용체 EC50 [nM]							
T_agg [° C]							
T_m [° C]							
pH 6.0 에서 항온처리 2주 후 ANG2 결합의 손실							
pH 7.4 에서 항온처리 2주 후 ANG2 결합의 손실							

[0157]

분자	0040	0041	0042	0057	0058	0060	0061
포맷	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1
ANG2에 대한 원자가	1	1	1	1	1	1	1
차이	VH: S100dP G100jA T28N T30V VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30K VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bE VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bT VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bE VL: D50T	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bT VL: D50T
서열번호	HC: 70 LC: 49	HC: 47 LC: 49	HC: 71 LC: 49	HC: 72 LC: 49	HC: 73 LC: 49	HC: 72 LC: 50	HC: 73 LC: 50
ka [1/Ms]	2.59E+06	3.85E+06	3.22E+06	3.28E+06	1.80E+06	3.72E+06	1.80E+06
kd [1/s]	5.92E-03	3.17E-03	1.28E-02	0.09483	0.03832	0.0786	0.03145
KD [nM]	23	1	4	29	21	21	18
t _{1/2} (s)	117	219	54	7	18	9	22
제 1 정제 단계	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트
스케일 [1]	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
수율 [mg/1 상청액]				118.3	114.3	144.9	176.6
단량체 (SEC) [%]				67	77	70	75
단량체 (CE-SDS) [%]				72	77	76	82
추가 정제 단계	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC
수율 [mg/1 상청액]	28.5	34.8	30.2	56	54	76	116.6

[0158]

분자	0040	0041	0042	0057	0058	0060	0061
단량체 (SEC) [%]	99	98	99	>95	>95	>95	>95
단량체 (CE-SDS) [%]	99	99	99	98	98	98	96
결합 억제 ANG2 tie2 수용체 EC50 [nM]		5.4					
T_agg [° C]		63				64	64
T_m [° C]		67				67	67
pH 6.0 에서 항온처리 2주 후 ANG2 결합의 손실		0				0	3
pH 7.4 에서 항온처리 2주 후 ANG2 결합의 손실		0				1	3

[0159]

분자	0074	0075	0076	0077	0090	IgG	0098
포맷	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	MAb	CrossMab CL-CH1
ANG2 예 대한 원자가	1	1	1	1	1	2	2
차이	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bS VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bS VL: D50T	VH: D100bS VL: wt	VH: D100bS VL: D50T	VH: S100dP G100jA T28N T30A VL: wt	참조 분자	VH: wt VL: wt
서열번호	HC: 48 LC: 49	HC: 48 LC: 50	HC: 74 LC: 49	HC: 74 LC: 50	HC: 47 LC: 50	HC: 75 LC: 76	HC: 51 LC: 49
ka [1/Ms]	2.27E+ 06	2.22E+ 06	1.06E+ 06	1.05E+ 06	2.16E+ 06		1.56E+0 7
kd [1/s]	3.66E- 02	3.10E- 02	2.60E- 01	2.58E- 01	2.53E- 03		1.58E- 04
KD [nM]	16	14	247	247	1		0.01
t _{1/2} (s)	19	22	3	3	274		4381
제 1 정제 단계	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트	카파 실렉트		맙실렉 트슈어
스케일 [1]	0.3	0.3	0.3	0.3	0.5		1
수율 [mg/1 상청액]	164	157	153.4	172.5	92		302
단량체 (SEC) [%]	67	70	72	79	80		
단량체 (CE-SDS) [%]	68	77	76	83	95		
추가 정제 단계	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC		HIC+ SEC

분자	0074	0075	0076	0077	0090	IgG	0098
수율 [mg/1 상청액]	86.6	95	99	132	69		42
단량체 (SEC) [%]	>98	>98	>98	>98	>98		>98
단량체 (CE-SDS) [%]	>99	>99	>99	>99	99		99
결합 억제 ANG2 tie2 수용체 EC50 [nM]		39			7	3.9	3.1
T_agg [° C]		64			64		
T_m [° C]		67			67		
pH 6.0 에서 항온처리 2주 후 ANG2 결합의 손실		0			0		
pH 7.4 에서 항온처리 2주 후 ANG2 결합의 손실		0			0		

[0161]

분자	0099	0100	0101	0154	0155	0156	0157
포맷	CrossM ab CL- CH1	CrossM ab CL- CH1	CrossM ab CL- CH1	CrossF ab CL- CH1	CrossF ab CL- CH1	CrossFa b CL- CH1	CrossFa b CL- CH1
ANG2 예 대한 원자가	2	2	2	1	1	1	1
차이	VH: S100dP G100jA T28N T30A VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A VL: D50T	VH: S100dP G100jA T28N T30A VL: D100bE	VH: wt VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A VL: D50T	VH: S100dP G100jA T28N T30A VL: D100bS	VH: wt VL: D50T
서열번호	HC: 52 LC: 49	HC: 52 LC: 50	HC: 53 LC: 50	HC: 46 LC: 77	HC: 47 LC: 78	HC: 48 LC: 78	HC: 46 LC: 50
ka [1/Ms]	2.61E+ 07	2.06E+ 07	1.83E+ 07	8.48E+ 05	7.46E+ 05	6.75E+0 5	5.80E+0 5
kd [1/s]	1.10E- 04	1.67E- 04	1.20E- 04	3.77E- 02	3.19E- 02	3.10E- 03	2.32E- 02
KD [nM]	0.004	0.008	0.007	44	43	5	40
t _{1/2} (s)	6284	4156	5771	18	22	224	30
제 1 정제 단계	맙실렉 트슈어	맙실렉 트슈어	맙실렉 트슈어	캡쳐 실렉트 IgG- CH1	캡쳐 실렉트 IgG- CH1	캡쳐 실렉트 IgG-CH1	캡쳐 실렉트 IgG-CH1
스케일 [1]	1	1	1	0.3	0.3	0.3	0.3
수율 [mg/1 상청액]	270	221	153	73.3	77.3	56.6	55.5
단량체 (SEC) [%]	33	34		68	64	77	64
단량체 (CE-SDS) [%]			83	96	97	97	98
추가 정제 단계	HIC+ SEC	HIC+ SEC	HIC+ SEC	SEC	SEC	SEC	SEC

[0162]

분자	0099	0100	0101	0154	0155	0156	0157
수율 [mg/1 상청액]	52	78	74	33.8	36.1	28.2	31.7
단량체 (SEC) [%]	>98	>98	>99	96	95	96	96
단량체 (CE-SDS) [%]	99	99	95	96	99	99.7	>99
결합 억제 ANG2 tie2 수용체 EC50 [nM]	3.2	3.2	3				
T_agg [° C]				61	61	61	61
T_m [° C]				63	64	64	64
pH 6.0 에서 항온처리 2주 후 ANG2 결합의 손실							
pH 7.4 에서 항온처리 2주 후 ANG2 결합의 손실							

[0163]

분자	0162	0163	0164	0165	0166	0167
포맷	CrossMa b CL- CH1	CrossMa b CL- CH1	CrossMa b CL- CH1	CrossMa b CL- CH1	CrossMab CL-CH1	CrossMab CL-CH1
ANG2에 대한 원자가	1	1	1	1	1	1
차이	참조 분자 ANG2: wt1 VEGF: wt1	ANG2: VH: S100dP G100jA T30A T28N VL: D50T VEGF: VH: wt1 VL: wt1	ANG2: VH: S100dP G100jA T30A T28N VL: D50T VEGF: VH: wt2 VL: wt2	ANG2: VH: S100dP G100jA T30A T28N VL: D50T VEGF: VH: wt2 VL: wt2	ANG2: VH: S100dP G100jA T30A T28N VL: D50T VEGF: VH: wt2 VL: wt2	참조 분자 ANG2: wt2 VEGF: wt2
서열번호	ANG2: HC: 79 LC: 80 VEGF: LC: 81 HC: 82	ANG2: HC: 83 LC: 84 VEGF: LC: 81 HC: 82	ANG2: HC: 85 LC: 86 VEGF: LC: 81 HC: 82	ANG2: HC: 89 LC: 90 VEGF: HC: 87 LC: 88	ANG2: HC: 91 LC: 92 VEGF: HC: 87 LC: 88	ANG2: HC: 93 LC: 94 VEGF: HC: 87 LC: 88
ka [1/Ms]	3.65E+0 5	3.14E+0 5	2.76E+0 5	3.02E+0 5	2.75E+05	4.11E+05
kd [1/s]	1.56E- 02	1.11E- 03	1.08E- 02	1.12E- 03	1.35E-02	4.09E-02
KD [nM]	43	4	39	4	49	99
t _{1/2} (s)	44	623	64	619	51	17
제 1 정체 단계	캡처 실렉트 IgG-CH1	캡처 실렉트 IgG-CH1	캡처 실렉트 IgG-CH1	캡처 실렉트 IgG-CH1	캡처 실렉트 IgG-CH1	캡처 실렉트 IgG-CH1
스케일 [1]	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
수율 [mg/1 상청액]	59.4	31.3	28.1	25	31.3	25
단량체 (SEC) [%]	53	47	49	54	61	70

[0164]

분자	0162	0163	0164	0165	0166	0167
단량체 (CE-SDS) [%]	65	58	57	59	63	62
추가 정제 단계	SEC+HIC + CEX	HIC+ CEX	IEX	HIC+ CEX	IEX	IEX
수율 [mg/1 상청액]	15.6	9.1	4.65	2.8	4.1	3.5
단량체 (SEC) [%]	99	99	97	97	94	97
단량체 (CE-SDS) [%]	98	99	96	96	93	97
결합 억제 ANG2 tie2 수용체 EC50 [nM]						
T _{agg} [° C]	60	60	60	60	60	60
T _m [° C]	64	65	65	66	66	66
pH 6.0 에서 항온처리 2주 후 ANG2 결합의 손실						
pH 7.4 에서 항온처리 2주 후 ANG2 결합의 손실						

[0165]

[0166] 본원에 보고된 양상은 상기 표에 제공된 중쇄 및 경쇄의 모든 개별적인 조합이다.

[0167]

본원에 보고된 한 양상은 (a) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 인간화된 항-인간 ANG2 항이체다. 한 양태에서, 항체는 (d) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함한다.

[0168]

본원에 보고된 한 양상은 (a) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 인간화된 항-인간 ANG2 항체이다. 한 양태에서, 항체는 (d) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함한다.

[0169]

한 양상에서, 본 발명은 (a) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호 34의 아미노산 서열

을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택되는 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 항-ANG2 항체를 제공한다.

[0170] 한 양상에서, 본 발명은 (a) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택되는 1개 이상, 2개 이상 또는 3개의 모든 VH HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양태에서, 항체는 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다. 다른 양태에서, 항체는 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3 및 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 추가 양태에서, 항체는 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2를 포함한다. 추가 양태에서, 항체는 (a) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.

[0171] 다른 양상에서, 본 발명은 (a) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택되는 1개 이상, 2개 이상 또는 3개 모두의 VL HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양태에서, 항체는 (a) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.

[0172] 다른 양상에서, 본 발명의 항체는 (a) (i) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호 32로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택되는 1개 이상, 2개 이상 또는 3개 모두의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) (i) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택되는 1개 이상, 2개 이상 또는 3개 모두의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0173] 다른 양상에서, 본 발명은 (a) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열번호 36으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체를 제공한다.

[0174] 다른 양상에서, 항-ANG2 항체는 서열번호 28의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 기준 서열을 기준으로 치환(예컨대, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 갖지만, 이러한 서열을 포함하는 항-ANG2 항체는 ANG2에 결합하는 능력을 갖는다. 특정 양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열번호 28에서 치환되고/되거나, 삽입되고/되거나, 결실되었다. 특정 양태에서, 치환, 삽입 또는 결실이 HVR 밖의 영역(즉, FR)에서 발생한다. 선택적으로, 항-ANG2 항체는 서열번호 28에 VH 서열(예컨대, 이러한 서열의 번역후 개질)을 포함한다. 특정 양태에서, VH는 (a) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0175] 다른 양상에서, 서열번호 33의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하는 항-ANG2 항체가 제공된다. 특정 양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 기준 서열을 기준으로 치환(예컨대, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 갖지만, 이러한 서열을 포함하는 항-ANG2 항체는 ANG2에 결합하는 능력을 갖는다. 특정 양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열번호 33에서 치환되고/되거나, 삽입되고/되거나, 결실되었다. 특정 양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 밖의 영역(즉, FR)에서 발생한다. 선택적으로, 항-ANG2 항체는 서열번호 33에 VL 서열(예컨대, 이러한 서열의 번역후 개질)을 포함한다. 특정 양태에서, VL은 (a) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0176] 다른 양상에서, 상기 제공된 임의의 양태에서와 같은 VH 및 상기 제공된 임의의 양태에서와 같은 VL을 포함하는 항-ANG2 항체가 제공된다. 한 양태에서, 항체는 서열번호 28 및 서열번호 33에 각각 VH 및 VL 서열(예컨대, 이

러한 서열의 번역후 개질)을 포함한다.

[0177] 본 발명의 추가 양상에서, 상기 양태 중 어느 한 양태에 따른 항-ANG2 항체는 단일클론성 항체이다. 한 양태에서, 항-ANG2 항체는 항체 단편, 예컨대 Fv, Fab, Fab', scFv, 다이아바디 또는 F(ab')₂ 단편이다. 다른 양태에서, 항체는 전장 항체, 예컨대 온전한 IgG1 항체 또는 본원에 정의된 다른 항체 클래스 또는 이소타입이다.

[0178] 본원에 보고된 모든 양상 중 한 양태에서, 항-ANG2 항체는 효과기 침묵 항-ANG2 항체이다. 본원에 보고된 모든 양상 중 한 양태에서, 항-ANG2 항체는 효과기 침묵 항-ANG2 항체이고, 인간 FcRn에 결합하지 않는다. 본원에 보고된 모든 양상 중 한 양태에서, 항-ANG2 항체는 인간 서브클래스 IgG1의 항-ANG2 항체이고, 중쇄 둘 다에서 돌연변이 L234A, L235A, P329G, I253A, H310A 및 H434A를 갖는다(카밧 지수에 따른 넘버링).

[0179] 본원에 보고된 모든 양상 중 한 양태에서, 항-ANG2 항체는 이중특이성 항체이다.

[0180] 본원에 보고된 한 양상은

[0181] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄, 및

[0182] b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄(이때, 제2 경쇄 및 제2 중쇄의 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체됨)

[0183] 를 포함하는 2가 이중특이성 항체로서, 이때, 제1 항원 또는 제2 항원은 인간 ANG2이다.

[0184] a)의 항체는 b)에 보고된 변형을 함유하지 않고, a)의 중쇄 및 경쇄는 단리된 쇄이다.

[0185] b)의 항체에서, 경쇄 내에, 가변 경쇄 도메인 VL은 상기 항체의 가변 중쇄 도메인 VH로 대체되고; 중쇄 내에, 가변 중쇄 도메인 VH는 상기 항체의 가변 경쇄 도메인 VL로 대체된다.

[0186] 한 양태에서,

[0187] i) a)의 제1 경쇄의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산(카밧에 따른 넘버링)은 양전하의 아미노산으로 치환되고, a)의 제1 중쇄의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산(카밧 EU 지수에 따른 넘버링)은 음전하의 아미노산으로 치환되거나,

[0188] ii) b)의 제2 경쇄의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산(카밧에 따른 넘버링)은 양전하의 아미노산으로 치환되고, b)의 제2 중쇄의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산(카밧 EU 지수에 따른 넘버링)은 음전하의 아미노산으로 치환된다.

[0189] 한 바람직한 양태에서,

[0190] i) a)의 제1 경쇄의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산은 독립적으로 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)으로(카밧에 따른 넘버링)(한 바람직한 양태에서 독립적으로 리신(K) 또는 아르기닌(R)으로) 치환되고, a)의 제1 중쇄의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산은 독립적으로 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로(카밧 EU 지수에 따른 넘버링) 치환되거나,

[0191] ii) b)의 제2 경쇄의 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산은 독립적으로 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)으로(카밧에 따른 넘버링)(한 바람직한 양태에서 독립적으로 리신(K) 또는 아르기닌(R)으로) 치환되고, b)의 제2 중쇄의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산은 독립적으로 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로(카밧 EU 지수에 따른 넘버링) 치환된다.

[0192] 한 양태에서, 제2 중쇄의 불변 도메인 CL에서, 위치 124 및 123의 아미노산은 K로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).

[0193] 한 양태에서, 제2 경쇄의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147 및 213의 아미노산은 E로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).

[0194] 한 바람직한 양태에서, 제1 경쇄의 불변 도메인 CL에서, 위치 124 및 123의 아미노산은 K로 치환되고, 제1 중쇄의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147 및 213의 아미노산은 E로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).

[0195] 한 양태에서, 제2 중쇄의 불변 도메인 CL에서, 위치 124 및 123의 아미노산은 K로 치환되고, 제2 경쇄의 불변 도메인 CH1에서, 위치 147 및 213의 아미노산은 E로 치환되고, 제1 경쇄의 가변 도메인 VL에서, 위치 38의 아미노산은 K로 치환되고, 제1 중쇄의 가변 도메인 VH에서, 위치 39의 아미노산은 E로 치환되고, 제2 중쇄의 가변 도메인 VL에서, 위치 38의 아미노산은 K로 치환되고, 제2 경쇄의 가변 도메인 VH에서, 위치 39의 아미노산은 E

로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).

[0196] 본원에 보고된 한 양상은

a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄, 및

b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄(이때, 제2 경쇄 및 제2 중쇄의 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되고, 제2 경쇄 및 제2 중쇄의 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체됨)

를 포함하는 2가 이중특이성 항체로서, 이때, 제1 항원 또는 제2 항원은 인간 ANG2이다.

a)의 항체는 b)에 보고된 변형을 함유하지 않고, a)의 중쇄 및 경쇄는 단리된 쇄이다.

b)의 항체에서, 경쇄 내에, 가변 경쇄 도메인 VL은 상기 항체의 가변 중쇄 도메인 VH로 대체되고, 불변 경쇄 도메인 CL은 상기 항체의 불변 중쇄 도메인 CH1로 대체되고; 중쇄 내에, 가변 중쇄 도메인 VH는 상기 항체의 가변 경쇄 도메인 VL로 대체되고, 불변 중쇄 도메인 CH1은 상기 항체의 불변 경쇄 도메인 CL로 대체된다.

[0202] 본원에 보고된 한 양상은

a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄, 및

b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄(이때, 제2 경쇄 및 제2 중쇄의 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체됨)

를 포함하는 2가 이중특이성 항체로서, 이때 제1 항원 또는 제2 항원은 인간 ANG2이다.

a)의 항체는 b)에 보고된 변형을 함유하지 않고, a)의 중쇄 및 경쇄는 단리된 쇄이다.

b)의 항체에서, 경쇄 내에, 불변 경쇄 도메인 CL은 상기 항체의 불변 중쇄 도메인 CH1로 대체되고; 중쇄 내에, 불변 중쇄 도메인 CH1은 상기 항체의 불변 경쇄 도메인 CL로 대체된다.

[0208] 본원에 보고된 한 양상은

a) 제1 항원에 특이적으로 결합하고 2개의 항체 중쇄 및 2개의 항체 경쇄로 이루어진 전장 항체, 및

b) 1 내지 4개의 항원(즉, 제2 및/또는 제3 및/또는 제4 및/또는 제5 항원, 바람직하게는 하나의 추가적 항원, 즉, 제2 항원)에 특이적으로 결합하는 1, 2, 3 또는 4개의 단일쇄 Fab 단편

을 포함하는 다중특이성 항체로서, 이때 b)의 상기 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단에서 웨티드 연결기를 통해 a)의 상기 전장 항체에 융합되고, 제1 항원 또는 하나의 추가 항원은 인간 ANG2이다.

[0212] 한 양태에서, 제2 항원에 결합하는 1 또는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단에서 웨티드 연결기를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.

[0213] 한 양태에서, 제2 항원에 결합하는 1 또는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 중쇄의 C-말단에서 웨티드 연결기를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.

[0214] 한 양태에서, 제2 항원에 결합하는 1 또는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 경쇄의 C-말단에서 웨티드 연결기를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.

[0215] 한 양태에서, 제2 항원에 결합하는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 각각의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단에서 웨티드 연결기를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.

[0216] 한 양태에서, 제2 항원에 결합하는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 각각의 중쇄의 C-말단에서 웨티드 연결기를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.

[0217] 한 양태에서, 제2 항원에 결합하는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 각각의 경쇄의 C-말단에서 웨티드 연결기를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.

[0218] 본원에 보고된 한 양상은

a) 제1 항원에 특이적으로 결합하고 2개의 항체 중쇄 및 2개의 항체 경쇄로 이루어진 전장 항체;

b) ba) 항체 중쇄 가변 도메인(VH), 또는

- [0221] bb) 항체 중쇄 가변 도메인(VH) 및 항체 불변 도메인 1(CH1)
- [0222] 로 이루어진 제1 폴리펩티드(이때, 상기 제1 폴리펩티드는 이의 VH 도메인의 N-말단을 사용하여 펩티드 연결기를 통해 상기 전장 항체의 2개의 중쇄 중 하나의 중쇄의 C-말단에 융합됨); 및
- [0223] c) ca) 항체 경쇄 가변 도메인(VL), 또는
- [0224] cb) 항체 경쇄 가변 도메인(VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인(CL)
- [0225] 으로 이루어진 제2 폴리펩티드(이때, 상기 제2 폴리펩티드는 VL 도메인의 N-말단을 사용하여 펩티드 연결기를 통해 상기 전장 항체의 2개의 중쇄 중 나머지 하나의 중쇄의 C-말단에 융합됨)
- [0226] 를 포함하는 3가 이중특이성 항체로서, 이때 제1 폴리펩티드의 항체 중쇄 가변 도메인(VH) 및 제2 폴리펩티드의 항체 경쇄 가변 도메인(VL)은 함께 제2 항원에 특이적으로 결합하는 항원-결합 부위를 형성하고, 제1 항원 또는 제2 항원은 인간 ANG2이다.
- [0227] 한 양태에서, b)의 폴리펩티드의 항체 중쇄 가변 도메인(VH) 및 c)의 폴리펩티드의 항체 경쇄 가변 도메인(VL)은 하기 위치 사이의 다이설파이드 결합의 도입에 의해 쇄간 다이설파이드 가교를 통해 연결되고 안정화된다:
- [0228] i) 중쇄 가변 도메인 위치 44 내지 경쇄 가변 도메인 위치 100, 또는
 - [0229] ii) 중쇄 가변 도메인 위치 105 내지 경쇄 가변 도메인 위치 43, 또는
 - [0230] iii) 중쇄 가변 도메인 위치 101 내지 경쇄 가변 도메인 위치 100(항상 카밧 EU 지수에 따른 넘버링).
- [0231] 안정화를 위한 부자연스러운 다이설파이드 가교 도입의 기술은, 예를 들어 WO 94/029350, 문헌[Rajagopal, V., et al., Prot. Eng. (1997) 1453-59]; 문헌[Kobayashi, H., et al., Nuclear Medicine & Biology, Vol. 25, (1998) 387-393]; 또는 문헌[Schmidt, M., et al., Oncogene (1999) 18 1711-1721]에 기재되어 있다. 한 양태에서, b) 및 c)의 폴리펩티드의 가변 도메인 사이의 선택적인 다이설파이드 결합은 중쇄 가변 도메인 위치 44와 경쇄 가변 도메인 위치 100 사이에 존재한다. 한 양태에서, b) 및 c)의 폴리펩티드의 가변 도메인 사이의 선택적인 다이설파이드 결합은 중쇄 가변 도메인 위치 105와 경쇄 가변 도메인 위치 43 사이에 존재한다(항상 카밧 EU 지수에 따른 넘버링). 한 양태에서, 단일쇄 Fab 단편의 가변 도메인 VH와 VL 사이의 상기 선택적인 다이설파이드 안정화가 부재하는 3가 이중특이성 항체가 바람직하다.
- [0232] 본원에 보고된 한 양상은
- [0233] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄,
- [0234] b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체의 제2 (변형된) 경쇄 및 제2 (변형된) 중쇄(이때, 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되고/되거나 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체됨), 및
- [0235] c) 펩티드 연결기를 통해 a) 및/또는 b)의 경쇄 또는 중쇄의 C- 또는 N-말단에 융합되는, 1 또는 2개의 추가적 항원(즉, 제3 및/또는 제4 항원)에 특이적으로 결합하는 1 내지 4개의 항원 결합 펩티드
- [0236] 를 포함하는 삼중특이성 또는 사중특이성 항체로서, 이때, 제1 항원 또는 제2 항원은 인간 ANG2이다.
- [0237] a)의 항체는 b)에 보고된 변형을 함유하지 않고, a)의 중쇄 및 경쇄는 단리된 쇄이다.
- [0238] 한 양태에서, 삼중특이성 또는 사중특이성 항체는 c) 하에 1 또는 2개의 추가적 항원에 특이적으로 결합하는 1 또는 2개의 항원 결합 펩티드를 포함한다.
- [0239] 한 양태에서, 항원 결합 펩티드는 scFv 단편 및 scFab 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0240] 한 양태에서, 항원 결합 펩티드는 scFv 단편이다.
- [0241] 한 양태에서, 항원 결합 펩티드는 scFab 단편이다.
- [0242] 한 양태에서, 항원 결합 펩티드는 a) 및/또는 b)의 중쇄의 C-말단에 결합된다.
- [0243] 한 양태에서, 삼중특이성 또는 사중특이성 항체는 c) 하에 하나의 추가적 항원에 특이적으로 결합하는 1 또는 2개의 항원 결합 펩티드를 포함한다.
- [0244] 한 양태에서, 삼중특이성 또는 사중특이성 항체는 c) 하에 제3 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 동일한 항원 결합 펩티드를 포함한다. 한 바람직한 양태에서, 이러한 2개의 동일한 항원 결합 펩티드는 동일한 펩티드 연결

기를 통해 a) 및 b)의 중쇄의 C-말단에 융합된다. 한 바람직한 양태에서, 2개의 동일한 항원 결합 펩티드는 scFv 단편 또는 scFab 단편이다.

[0245] 한 양태에서, 삼중특이성 또는 사중특이성 항체는 c) 하에 제3 및 제4 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 항원 결합 펩티드를 포함한다. 한 양태에서, 상기 2개의 항원 결합 펩티드는 둘 다 동일한 펩티드 연결자를 통해 a) 및 b)의 중쇄의 C-말단에 융합된다. 한 바람직한 양태에서, 상기 2개의 항원 결합 펩티드는 scFv 단편 또는 scFab 단편이다.

[0246] 본원에 보고된 한 양상은

[0247] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 항체(2개의 Fab 단편을 포함함)의 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄, 및

[0248] b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 2개의 추가적 Fab 단편(이때, 상기 추가적 Fab 단편은 둘 다 펩티드 연결기를 통해 a)의 중쇄의 C- 또는 N-말단에 융합됨)

[0249] 을 포함하는 4가 이중특이성 항체로서, 이때, Fab 단편에서 하기 변형이 수행되고, 제1 항원 또는 제2 항원은 인간 ANG2이다:

[0250] i) a)의 둘 다의 Fab 단편 또는 b)의 둘 다의 Fab 단편에서, 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되고/되거나 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체되거나,

[0251] ii) a)의 둘 다의 Fab 단편에서, 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되고, 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체되고, b)의 둘 다의 Fab 단편에서, 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되거나, 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체되거나,

[0252] iii) a)의 둘 다의 Fab 단편에서, 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되거나, 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체되고, b)의 둘 다의 Fab 단편에서, 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되고, 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체되거나,

[0253] iv) a)의 둘 다의 Fab 단편에서, 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되고, b)의 Fab 단편에서, 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체되거나,

[0254] v) a)의 둘 다의 Fab 단편에서, 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체되고, b)의 둘 다의 Fab 단편에서, 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체된다.

[0255] 한 양태에서, 상기 추가적 Fab 단편은 둘 다 펩티드 연결기를 통해 a)의 중쇄의 C-말단 또는 a)의 중쇄의 N-말단에 융합된다.

[0256] 한 양태에서, 상기 추가적 Fab 단편은 둘 다 펩티드 연결기를 통해 a)의 중쇄의 C-말단에 융합된다.

[0257] 한 양태에서, 상기 추가적 Fab 단편은 둘 다 펩티드 연결자를 통해 a)의 중쇄의 N-말단에 융합된다.

[0258] 한 양태에서, Fab 단편에서 하기 변형이 수행된다:

[0259] i) a)의 둘 다의 Fab 단편 또는 b)의 둘 다의 Fab 단편에서, 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되고/되거나 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체된다.

[0260] 한 양태에서, Fab 단편에서 하기 변형이 수행된다:

[0261] i) a)의 둘 다의 Fab 단편에서, 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되고/되거나 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체된다.

[0262] 한 양태에서, Fab 단편에서 하기 변형이 수행된다:

[0263] i) a)의 둘 다의 Fab 단편에서, 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체된다.

[0264] 한 양태에서, Fab 단편에서 하기 변형이 수행된다:

[0265] i) b)의 둘 다의 Fab 단편에서, 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되고/되거나 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체된다.

[0266] 한 양태에서, Fab 단편에서 하기 변형이 수행된다:

[0267] i) b)의 둘 다의 Fab 단편에서, 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체된다.

- [0268] 본원에 보고된 한 양상은
- [0269] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하고 제1 VH-CH1 도메인 쌍을 포함하는 제1 항체의 (변형된) 중쇄(이때, 상기 제1 항체의 제2 VH-CH1 도메인 쌍의 N-말단은 웨티드 연결기를 통해 상기 중쇄의 C-말단에 융합됨),
- [0270] b) a)의 상기 제1 항체의 2개의 경쇄,
- [0271] c) 제2 항원에 특이적으로 결합하고 제1 VH-CL 도메인 쌍을 포함하는 제2 항체의 (변형된) 중쇄(이때, 상기 제2 항체의 제2 VH-CL 도메인 쌍의 N-말단은 웨티드 연결기를 통해 상기 중쇄의 C-말단에 융합됨), 및
- [0272] d) 각각 CL-CH1 도메인 쌍을 포함하는 c)의 상기 제2 항체의 2개의 (변형된) 경쇄
- [0273] 를 포함하는 4가 이중특이성 항체로서, 이때, 제1 항원 또는 제2 항원은 인간 ANG2이다.
- [0274] 본원에 보고된 한 양상은
- [0275] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄, 및
- [0276] b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 전장 항체의 중쇄 및 경쇄(이때, 중쇄의 N-말단은 웨티드 연결기를 통해 경쇄의 C-말단에 연결됨)
- [0277] 를 포함하는 이중특이성 항체로서, 이때 제1 항원 또는 제2 항원은 인간 ANG2이다.
- [0278] a)의 항체는 b)에 보고된 변형을 함유하지 않고, 중쇄 및 경쇄는 단리된 쇄이다.
- [0279] 본원에 보고된 한 양상은
- [0280] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하고 2개의 항체 중쇄 및 2개의 항체 경쇄로 이루어진 전장 항체, 및
- [0281] b) VH^2 도메인 및 VL^2 도메인을 포함하는 제2 항원에 특이적으로 결합하는 Fv 단편(이때, 둘 다의 도메인은 다이설파이드 가교를 통해 서로 연결됨)
- [0282] 을 포함하는 이중특이성 항체로서, 이때, VH^2 도메인 또는 VL^2 도메인 중 하나 만이 웨티드 연결기를 통해 제1 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄에 융합되고, 제1 항원 또는 제2 항원은 인간 ANG2이다.
- [0283] 이중특이성 항체에서, a)의 중쇄 및 경쇄는 단리된 쇄이다.
- [0284] 한 양태에서, VH^2 도메인 또는 VL^2 도메인 중 나머지 하나는 제1 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄에 웨티드 연결기를 통해 융합되지 않는다.
- [0285] 본원에 보고된 모든 양상에서, 제1 경쇄는 VL 도메인 및 CL 도메인을 포함하고, 제1 중쇄는 VH 도메인, CH1 도메인, 힌지(hinge) 영역, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함한다.
- [0286] 모든 양상의 한 양태에서, 본원에 보고된 항체는 다중특이성 항체이되, 이는 2개 이상의 중쇄 폴리웨티드의 이종이량체화를 요구하고, 항체는 인간 ANG2 및 제2 비-인간 ANG2 항원에 특이적으로 결합한다.
- [0287] 이종이량체화를 지지하기 위한 CH3-변형에 대한 여러 접근법은, 예를 들어 본원에 참고로 포함된 WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 및 WO 2013/096291에 기재되어 있다. 전형적으로, 당해 분야에 공지된 접근법에서, 제1 중쇄의 CH3 도메인 및 제2 중쇄의 CH3 도메인은, 하나의 조작된 CH3 도메인을 포함하는 중쇄가 동일한 구조의 또 다른 구조와 더 이상 동종이량체화할 수 없도록(예를 들어, CH3-조작된 제1 중쇄는 또 다른 CH3-조작된 제1 중쇄와 더 이상 동종이량체화할 수 없고; CH3-조작된 제2 중쇄는 또 다른 CH3-조작된 제2 중쇄와 더 이상 동종이량체화할 수 없도록) 상보적 방법으로 둘 다 조작된다. 그렇게 함으로써, 하나의 조작된 CH3 도메인을 포함하는 중쇄는 CH3 도메인을 포함하는 또 다른 중쇄와 이종이량체화하도록 강요받고, 이는 상보적 방식으로 조작된다. 본 발명의 이러한 양태의 경우, 제1 중쇄의 CH3 도메인 및 제2 중쇄의 CH3 도메인은, 제1 중쇄 및 제2 중쇄가 이종이량체화를 강요받는 반면에, 제1 중쇄 및 제2 중쇄가 더 이상 동종이량체화할 수 없도록(예를 들어, 입체적 이유로) 아미노산 치환에 의해 상보적 방식으로 조작된다.
- [0288] 상기에 언급되고 포함된, 당해 분야에 공지된 중쇄 이종이량체화를 지지하기 위한 상이한 접근법은 본 발명에 따른 다중특이성 항체에 사용된 상이한 대안으로서 고려되고, 이는 본 발명에 대해 상기 기재된 특정 아미노산

치환과 조합되어, 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 항체로부터 유도된 "교차(crossing)되지 않은 Fab 영역", 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항체로부터 유도된 "교차된 Fab 영역"을 포함한다.

[0289] 본원에 보고된 다중특이성 항체의 CH3 도메인은, 예를 들어 WO 96/027011, 문헌[Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621]; 및 [Merchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681]에 여러 예로 상세히 기재되어 있는 "눕-인투-홀(knob-into-hole)" 기술에 의해 변경될 수 있다. 이 방법에서, 2개의 CH3 도메인의 상호작용 표면은 이 2개의 CH3 도메인을 함유하는 2개의 중쇄의 이종이량체화를 증가시키도록 변경된다. (2개의 중쇄의) 2개의 CH3 도메인 각각은 "눕"일 수 있는 반면에, 나머지 CH3 도메인은 "홀"이다. 다이설파이드 가교의 도입은 이종이량체를 보다 안정화시키고(문헌[Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681]; 문헌[Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35]) 수율을 증가시킨다.

[0290] 한 바람직한 양태에서, 본원에 보고된 다중특이성 항체는 "눕 쇄"의 CH3 도메인에 T366W 돌연변이 및 "홀 쇄"의 CH3 도메인에 T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함한다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링). 또한, CH3 도메인 사이의 추가적 쇄간 다이설파이드 가교가, 예를 들어 "눕 쇄"의 CH3 도메인 내로의 Y349C 돌연변이의 도입 및 "홀 쇄"의 CH3 도메인 내로의 E356C 돌연변이 또는 S354C 돌연변이의 도입에 의해 사용될 수 있다(문헌[Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681]). 따라서, 또 다른 바람직한 양태에서, 본원에 보고된 다중특이성 항체는 둘 중 하나의 CH3 도메인에 Y349C 및 T366W 돌연변이를, 둘 중 나머지 하나의 CH3 도메인에 E356C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 포함하거나, 본원에 보고된 다중특이성 항체는 둘 중 하나의 CH3 도메인에 Y349C 및 T366W 돌연변이를, 둘 중 나머지 하나의 CH3 도메인에 S354C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 포함한다(쇄간 다이설파이드 가교를 형성하기 위해 하나의 CH3 도메인에 추가적 Y349C 돌연변이 및 나머지 하나의 CH3 도메인에 E356C 또는 S354C 돌연변이)(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).

[0291] 그러나, EP 1 870 459 A1에 기재된 다른 낫-인투-홀 기술도 다르게는 또는 부가적으로 사용될 수 있다. 한 양태에서, 본원에 보고된 다중특이성 항체는 "눕 쇄"의 CH3 도메인에 R409D 및 K370E 돌연변이를, "홀 쇄"의 CH3 도메인에 D399K 및 E357K 돌연변이를 포함한다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).

[0292] 한 양태에서, 본원에 보고된 다중특이성 항체는 "눕 쇄"의 CH3 도메인에 T366W 돌연변이를, "홀 쇄"의 CH3 도메인에 T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 포함하고 부가적으로 "눕 쇄"의 CH3 도메인에 R409D 및 K370E 돌연변이를 포함하고 "홀 쇄"의 CH3 도메인에 D399K 및 E357K 돌연변이를 포함한다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).

[0293] 한 양태에서, 본원에 보고된 다중특이성 항체는 둘 중 하나의 CH3 도메인에 Y349C 및 T366W 돌연변이를, 둘 중 나머지 하나의 CH3 도메인에 S354C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 포함하거나, 본원에 보고된 다중특이성 항체는 둘 중 하나의 CH3 도메인에 Y349C 및 T366W 돌연변이를, 둘 중 나머지 하나의 CH3 도메인에 S354C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 포함하고 부가적으로 "눕 쇄"의 CH3 도메인에 R409D 및 K370E 돌연변이를, "홀 쇄"의 CH3 도메인에 D399K 및 E357K 돌연변이를 포함한다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).

[0294] "낫-인투-홀 기술"을 제외하고, 이종이량체화를 수행하기 위해 다중특이성 항체의 중쇄의 CH3 도메인을 변형하는 다른 기술이 당해 분야에 공지되어 있다. 이를 기술, 특히 WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 및 WO 2013/096291에 기재된 것은 본원에 보고된 다중특이성 항체와 조합되어 "낫-인투-홀 기술"에 대한 대안으로서 본원에서 고려된다.

[0295] 본원에 보고된 다중특이성 항체의 한 양태에서, EP 1870459에 기재된 접근법은 다중특이성 항체의 제1 중쇄 및 제2 중쇄의 이종이량체화를 지지하는데 사용된다. 이러한 접근법은 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 사이의 CH3/CH3-도메인-인터페이스에서 구체적 아미노산 위치에서 반대 전하를 갖는 대전된 아미노산의 도입을 기반으로 한다.

[0296] 따라서, 이러한 양태는 본원에 보고된 다중특이성 항체에 관한 것이고, 이때 항체의 삼차 구조에서 제1 중쇄의 CH3 도메인 및 제2 중쇄의 CH3 도메인이 각각의 항체 CH3 도메인 사이에 위치되는 인터페이스를 형성하되, 제1 중쇄의 CH3 도메인 및 제2 중쇄의 CH3 도메인의 각각의 아미노산 서열은 각각 항체의 삼차 구조 내의 상기 인터페이스 내에 위치되고, 하나의 중쇄의 CH3 도메인내 인터페이스에 위치된 아미노산의 세트로부터, 제1 아미노산은 양전하의 아미노산으로 치환되고, 나머지 중쇄의 CH3 도메인내 인터페이스에 위치된 아미노산의 세트로부터, 제2 아미노산은 음전하의 아미노산으로 치환된다. 본 양태에 따른 다중특이성 항체는 "CH3(+/-)-조작된 다중특이성 항체"로도 지칭된다(이때, 약어 "+/-"는 각각의 CH3 도메인에 도입된 반대로 대전된 아미노산을 의미한다).

- [0297] 본원에 보고된 상기 CH3(+/-)-조작된 다중특이성 항체의 한 양태에서, 양전하의 아미노산은 K, R 및 H로부터 선택되고, 음전하의 아미노산은 E 및 D로부터 선택된다.
- [0298] 본원에 보고된 상기 CH3(+/-)-조작된 다중특이성 항체의 한 양태에서, 양전하의 아미노산은 K 및 R로부터 선택되고, 음전하의 아미노산은 E 및 D로부터 선택된다.
- [0299] 본원에 보고된 상기 CH3(+/-)-조작된 다중특이성 항체의 한 양태에서, 양전하의 아미노산은 K이고, 음전하의 아미노산은 E이다.
- [0300] 본원에 보고된 상기 CH3(+/-)-조작된 다중특이성 항체의 한 양태에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 409의 아미노산 R은 D로 치환되고 위치의 아미노산 K는 E로 치환되고, 나머지 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 399의 아미노산 D는 K로 치환되고 위치 357의 아미노산 E는 K로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).
- [0301] 본원에 보고된 다중특이성 항체의 한 양태에서, WO 2013/157953에 기재된 접근법은 다중특이성 항체의 제1 중쇄 및 제2 중쇄의 이종이량체화를 지지하는데 사용된다. 본원에 보고된 상기 다중특이성 항체의 한 양태에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T는 K로 치환되고, 나머지 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 351의 아미노산 L은 D로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링). 본원에 보고된 상기 다중특이성 항체의 또 다른 양태에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T는 K로 치환되고 위치 351의 아미노산 L은 K로 치환되고, 나머지 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 351의 아미노산 L은 D로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).
- [0302] 본원에 보고된 상기 다중특이성 항체의 또 다른 양태에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T는 K로 치환되고 위치 351의 아미노산 L은 K로 치환되고, 나머지 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 351의 아미노산 L은 D로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링). 추가적으로 하기 치환 중 하나 이상이 나머지 하나의 중쇄의 CH3 도메인에 포함된다: 위치 349의 아미노산 Y는 E로 치환되고, 위치 349의 아미노산 Y는 D로 치환되고, 위치 368의 아미노산 L은 E로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링). 한 양태에서, 위치 368의 아미노산 L은 E로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).
- [0303] 본원에 보고된 다중특이성 항체의 한 양태에서, WO 2012/058768에 기재된 접근법은 다중특이성 항체의 제1 중쇄 및 제2 중쇄의 이종이량체화를 지지하는데 사용된다. 본원에 보고된 상기 다중특이성 항체의 한 양태에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 351의 아미노산 L은 Y로 치환되고 위치 407의 아미노산 Y는 A로 치환되고, 나머지 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T는 A로 치환되고 위치 409의 아미노산 K는 F로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링). 또 다른 양태에서, 전술된 치환에 더하여, 나머지 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 411(원래 T), 399(원래 D), 400(원래 S), 405(원래 F), 390(원래 N) 및 392(원래 K)의 아미노산 중 하나 이상이 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링). 하기 치환이 바람직하다:
- 위치 411의 아미노산 T를 N, R, Q, K, D, E 및 W로부터 선택된 아미노산으로 치환함(카밧 EU 지수에 따른 넘버링),
 - 위치 399의 아미노산 D를 R, W, Y 및 K로부터 선택된 아미노산으로 치환함(카밧 EU 지수에 따른 넘버링),
 - 위치 400의 아미노산 S를 E, D, R 및 K로부터 선택된 아미노산으로 치환함(카밧 EU 지수에 따른 넘버링),
 - 위치 405의 아미노산 F를 I, M, T, S, V 및 W로부터 선택된 아미노산으로 치환함(카밧 EU 지수에 따른 넘버링);
 - 위치 390의 아미노산 N을 R, K 및 D로부터 선택된 아미노산으로 치환함(카밧 EU 지수에 따른 넘버링); 및
 - 위치 392의 아미노산 K를 V, M, R, L, F 및 E로부터 선택된 아미노산으로 치환함(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).
- [0304] (WO 2012/058768에 따라 조작된) 본원에 보고된 상기 다중특이성 항체의 또 다른 양태에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 351의 아미노산 L은 Y로 치환되고 위치 407의 아미노산 Y는 A로 치환되고, 나머지 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T는 V로 치환되고 위치 409의 아미노산 K는 F로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링). 본원에 보고된 상기 다중특이성 항체의 또 다른 양태에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 407의 아미노산 Y는 A로 치환되고, 나머지 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T는 A로 치환되고 위치 409의 아미노산 K는 F로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링). 상기 마지막으로 전술된 양태에서, 상기 나머지 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 392의 아미노산 K는 E로 치환되고 위치 411의 아미노산 T는 E

로 치환되고 위치 399의 아미노산 D는 R로 치환되고 위치 400의 아미노산 S는 R로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).

[0311] 본원에 보고된 다중특이성 항체의 한 양태에서, WO 2011/143545에 기재된 접근법은 다중특이성 항체의 제1 중쇄 및 제2 중쇄의 이종이량체화를 지지하는데 사용된다. 본원에 보고된 상기 다중특이성 항체의 한 양태에서, 둘다의 중쇄의 CH3 도메인에서 아미노산 변형은 위치 368 및/또는 409에 도입된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).

[0312] 본원에 보고된 다중특이성 항체의 한 양태에서, WO 2011/090762에 기재된 접근법은 다중특이성 항체의 제1 중쇄 및 제2 중쇄의 이종이량체화를 지지하는데 사용된다. WO 2011/090762는 "펩-인투-홀" 기술에 따른 아미노산 변형에 관한 것이다. 본원에 보고된 상기 CH3(KiH)-조작된 다중특이성 항체의 한 양태에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T는 W로 치환되고, 나머지 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 407의 아미노산 Y는 A로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링). 본원에 보고된 상기 CH3(KiH)-조작된 다중특이성 항체의 또 다른 양태에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T는 Y로 치환되고, 나머지 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 407의 아미노산 Y는 T로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).

[0313] 본원에 보고된 IgG2 동종형의 것인 다중특이성 항체의 한 양태에서, WO 2011/090762에 기재된 접근법은 다중특이성 항체의 제1 중쇄 및 제2 중쇄의 이종이량체화를 지지하는데 사용된다.

[0314] 본원에 보고된 다중특이성 항체의 한 양태에서, WO 2009/089004에 기재된 접근법은 다중특이성 항체의 제1 중쇄 및 제2 중쇄의 이종이량체화를 지지하는데 사용된다. 본원에 보고된 상기 다중특이성 항체의 한 양태에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 392의 아미노산 K 또는 N은 음전하의 아미노산(한 바람직한 양태에서 E 또는 D, 한 바람직한 양태에서 D)으로 치환되고, 나머지 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 399의 아미노산 D, 위치 356의 아미노산 E 또는 D 또는 위치 357의 아미노산 E는 양전하의 아미노산(한 바람직한 양태에서 K 또는 R, 한 바람직한 양태에서 K)으로 치환된다(한 바람직한 양태에서, 위치 399 또는 356의 아미노산이 K로 치환됨)(카밧 EU 지수에 따른 넘버링). 하나의 추가적 양태에서, 전술된 치환에 부가적으로, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 409의 아미노산 K 또는 R은 음전하의 아미노산(한 바람직한 양태에서 E 또는 D, 한 바람직한 양태에서 D)으로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링). 하나의 추가적 양태에서, 전술된 치환에 부가적으로 또는 다르게는, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 439의 아미노산 K 및/또는 위치 370의 아미노산 K는 서로 독립적으로 음전하의 아미노산(한 바람직한 양태에서 E 또는 D, 한 바람직한 양태에서 D)으로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).

[0315] 본원에 보고된 다중특이성 항체의 한 양태에서, WO 2007/147901에 기재된 접근법은 다중특이성 항체의 제1 중쇄 및 제2 중쇄의 이종이량체화를 지지하는데 사용된다. 본원에 보고된 상기 다중특이성 항체의 한 양태에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 253의 아미노산 K는 E로 치환되고 위치 282의 아미노산 D는 K로 치환되고 위치 322의 아미노산 K는 D로 치환되고, 나머지 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 239의 아미노산 D는 K로 치환되고 위치 240의 아미노산 E는 K로 치환되고 위치 292의 아미노산 K는 D로 치환된다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).

[0316] 본원에 보고된 다중특이성 항체의 한 양태에서, WO 2007/110205에 기재된 접근법은 다중특이성 항체의 제1 중쇄 및 제2 중쇄의 이종이량체화를 지지하는데 사용된다.

[0317] 본원에 보고된 모든 양상의 양태에서, 다중특이성 항체는 이중특이성 항체 또는 삼중특이성 항체이다. 본 발명의 한 바람직한 양태에서, 다중특이성 항체는 이중특이성 항체이다.

[0318] 본원에 보고된 모든 양상의 한 양태에서, 항체는 2가 또는 3가 항체이다. 한 양태에서, 항체는 2가 항체이다.

[0319] 본원에 보고된 모든 양상의 한 양태에서, 다중특이성 항체는 IgG 유형 항체의 불변 도메인 구조를 갖는다. 본원에 보고된 모든 양상의 하나의 추가적 양태에서, 다중특이성 항체는 상기 다중특이성 항체가 인간 서브클래스 IgG1의 것, 또는 돌연변이 L234A 및 L235A를 갖는 인간 서브클래스 IgG1의 것임을 특징으로 한다. 본원에 보고된 모든 양상의 하나의 추가적 양태에서, 다중특이성 항체는 상기 다중특이성 항체가 인간 서브클래스 IgG2의 것임을 특징으로 한다. 본원에 보고된 모든 양상의 하나의 추가적 양태에서, 다중특이성 항체는 상기 다중특이성 항체가 인간 서브클래스 IgG3의 것임을 특징으로 한다. 본원에 보고된 모든 양상의 하나의 추가적 양태에서, 다중특이성 항체는 상기 다중특이성 항체가 인간 서브클래스 IgG4의 것, 또는 추가적 돌연변이 S228P를 갖는 인간 서브클래스 IgG4의 것임을 특징으로 한다. 본원에 보고된 모든 양상의 하나의 추가적 양태에서, 다중특이성 항체는 상기 다중특이성 항체가 인간 서브클래스 IgG1 또는 인간 서브클래스 IgG4의 것임을 특징으로 한다. 본원에 보고된 모든 양상의 하나의 추가적 양태에서, 다중특이성 항체는 상기 다중특이성 항체가 돌연변이 L234A 및 L235A를 갖는 인간 서브클래스 IgG1의 것임을 특징으로 한다.

연변이 L234A 및 L235A를 갖는 인간 서브클래스 IgG1의 것임을 특징으로 한다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링). 본원에 보고된 모든 양상의 하나의 추가적 양태에서, 다중특이성 항체는 상기 다중특이성 항체가 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G를 갖는 인간 서브클래스 IgG1의 것임을 특징으로 한다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링). 본원에 보고된 모든 양상의 하나의 추가적 양태에서, 다중특이성 항체는 상기 다중특이성 항체가 돌연변이 S228P 및 L235E를 갖는 인간 서브클래스 IgG4의 것임을 특징으로 한다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링). 본원에 보고된 모든 양상의 하나의 추가적 양태에서, 다중특이성 항체는 상기 다중특이성 항체가 돌연변이 S228P, L235E 및 P329G를 갖는 인간 서브클래스 IgG4의 것임을 특징으로 한다(카밧 EU 지수에 따른 넘버링).

[0320] 본원에 보고된 모든 양상의 한 양태에서, 본원에 명시된 CH3 도메인을 포함하는 중쇄를 포함하는 항체는 추가적 C-말단 글리신-리신 다이펩티드(G446 및 K447, 카밧 EU 지수에 따른 넘버링)를 포함한다. 본원에 보고된 모든 양상의 한 양태에서, 본원에 명시된 CH3 도메인을 포함하는 중쇄를 포함하는 항체는 추가적 C-말단 글리신 잔기 (G446, 카밧 EU 지수에 따른 넘버링)를 포함한다.

[0321] 추가적 양상에서, 임의의 상기 양태에 따른 항-ANG2 항체는 하기 섹션 1 내지 5에 기재된 바와 같은 임의의 특징을 단독으로 또는 조합으로 혼입할 수 있다.

1. 항체 친화성

[0323] 특정 양태에서, 본원에 제공된 항체는 1 μM 이하, 100 nM 이하 또는 10 nM 이하(예컨대, 10^{-8} M 이하)의 해리 상수(KD)를 갖는다.

[0324] KD 값을 측정하는 방법은 하기 실시예에 약술된다.

[0325] 다르게는, 바이아코어(BIACORE: 등록상표) 표면 플라즈몬 공명 어세이를 사용하여 KD 값을 다음과 같이 측정할 수 있다: 인간 ANG2-RBD-Fc-영역 융합으로의 항체 또는 항체 단편의 결합은 바이아코어 T200 기기(지이 헬스케어(GE Healthcare))를 사용하는 표면 플라즈몬 공명에 의해 조사될 수 있다. 약 4,000 RU의 항-인간 항체(10 $\mu\text{g/mL}$ 항-인간 IgG(Fc) 항체; 주문 코드 BR-1008-39; 지이 헬스케어)는 지이 헬스케어에 의해 제공된 아민 커플링 키트를 사용하여 pH 5.0의 시리즈 S CM5 칩(지이 헬스케어 BR-1005-30) 상에 커플링된다. HBS-N(10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7.4, 지이 헬스케어)은 부동화 과정 중에 러닝 완충액(running buffer)으로서 사용된다. 하기 동역학 특징규명을 위하여, 샘플 및 러닝 완충액은 HBS-P(10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7.4, 0.05% 계면활성제 P20; 지이 헬스케어)이다. 유동 셀은 25°C로 설정되고, 샘플 블록은 12°C로 설정되고, 동역학 특징규명 전에 러닝 완충액으로 2회 프라이밍된다.

[0326] ANG2-RBD-Fc-영역 융합은 1 $\mu\text{g/mL}$ 용액을 5 $\mu\text{L}/\text{분}$ 의 유량으로 30초 동안 주입함으로써 포획된다. 회합은 용액 중 다양한 농도의 Cross-Fab를 연속 1:3 회석액 중 300 nM로 시작하여 90 $\mu\text{L}/\text{분}$ 의 유량으로 90초 동안 주입함으로써 측정된다. 해리 상은 600초 동안 모니터링되고, 샘플 용액으로부터 러닝 완충액으로 전환함으로써 유발된다. 모든 표면은 60초까지 재생되고, 3 M MgCl₂ 용액에 의해 5 $\mu\text{L}/\text{분}$ 의 유량으로 세척된다. 벌크 굴절률 차이는 항-인간 IgG 항체(Fc) 표면으로부터 수득한 반응을 공제함으로써 정정된다. 블랭크 주입을 또한 공제한다(= 이중 레퍼런싱(double referencing)). KD 및 다른 동역학 변수의 계산을 위하여, 랭뮤어(Langmuir) 1:1 모델이 사용된다.

2. 항체 단편

[0328] 특정 양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체 단편이다. 항체 단편은, 비제한적으로, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv 및 scFv 단편, 및 하기 기술된 다른 단편을 포함한다. 특정 항체 단편의 검토를 위하여, 문헌 [Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134]을 참고한다. scFv 단편의 검토를 위하여, 예컨대 문헌 [Plueckthun, A., In; The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), pp. 269-315]을 참고하고; 또한 WO 93/16185호; US 5,571,894 및 US 5,587,458을 참고한다. 샐비지(salvage) 수용체 결합 에피토프 잔사를 포함하고 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 F(ab')₂ 단편의 논의를 위하여, US 5,869,046을 참고한다.

[0329] 다이아바디는 2가 또는 이중특이성일 수 있는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편이다. 예를 들어, EP 0 404 097; WO 1993/01161; 문헌[Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134]; 및 문헌[Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448]을 참고한다. 트라이아바디 및 테트라바디가 또한 문헌[Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134]에 기술되어 있다.

- [0330] 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 양태에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다(도만티스 인코포레이티드(Domantis, Inc., 미국 매사추세츠주 유탄 소재); 예컨대, US 6,248,516 참고).
- [0331] 항체 단편은, 본원에 기술된 바와 같이, 비제한적으로 온전한 항체의 단백질분해적 분해 및 재조합 숙주 세포(예컨대, 대장균 또는 파지)의 생산을 비롯한 다양한 기술에 의해 생성될 수 있다.
- [0332] 3. 키메라 및 인간화된 항체
- [0333] 특정 양태에서, 본원에 제공된 항체는 키메라 항체이다. 특정 키메라 항체는, 예를 들어 US 4,816,567 및 문헌[Morrison, S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855]에 기재되어 있다. 하나의 예에서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역(예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 또는 비-인간 영장류, 예컨대, 원숭이로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 추가적 예에서, 키메라 항체는 클래스 또는 서브클래스가 모 항체의 클래스 또는 서브클래스로부터 변형되어 있는 "클래스 전환된" 항체이다. 키메라 항체는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.
- [0334] 특정 양태에서, 키메라 항체는 인간화된 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 모 비-인간 항체의 특이성 및 친화성을 유지하면서 인간에 대한 면역원성을 감소시키도록 인간화된다. 일반적으로, 인간화된 항체는 HVR, 예를 들어 CDR(또는 이의 부분)이 비-인간 항체로부터 유래되고 FR(또는 이의 부분)이 인간 항체 서열로부터 유래된 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 또한, 인간화된 항체는 선택적으로 인간 불변 영역의 적어도 부분을 포함할 것이다. 일부 양태에서, 인간화된 항체의 일부 FR 잔기는, 예를 들어 항체 특이성 또는 친화성을 회복시키거나 개선하기 위해 비-인간 항체(예를 들어, HVR 잔기의 기원이 되는 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.
- [0335] 인간화된 항체 및 이의 제조 방법은, 예를 들어 문헌[Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633]에서 검토되어 있고, 예를 들어 하기 문헌에 추가로 기재되어 있다: 문헌[Riechmann, I., et al., Nature 332 (1988) 323-329]; 문헌[Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033]; US 5,821,337; US 7,527,791; US 6,982,321; US 7,087,409; 문헌[Kashmiri, S.V., et al., Methods 36 (2005) 25-34](특이성 결정 영역(SDR) 이식이 기재됨); 문헌[Padlan, E.A., Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498]("재표면화"가 기재됨); 문헌[Dall'Acqua, W.F., et al., Methods 36 (2005) 43-60]("FR 셔플링"이 기재됨); 문헌[Osbourne, J., et al., Methods 36 (2005) 61-68]; 및 문헌[Klimka, A., et al., Br. J. Cancer 83 (2000) 252-260](FR 셔플링에 대한 "유도된 선택" 방법이 기재됨).
- [0336] 인간화를 위해 사용될 수 있는 인간 골격 영역은 비제한적으로 "베스트-핏(best-fit)" 방법을 사용함으로써 선택된 골격 영역(예를 들어, 문헌[Sims, M.J., et al., J. Immunol. 151 (1993) 2296-2308] 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정 하위군의 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 골격 영역(예를 들어, 문헌[Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289] 및 문헌[Presta, L.G., et al., J. Immunol. 151 (1993) 2623-2632] 참조); 인간 성숙(체세포 돌연변이된) 골격 영역 또는 인간 생식세포주 골격 영역(예를 들어, 문헌[Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633] 참조); 및 스크리닝 FR 라이브리리로부터 유래된 골격 영역(예를 들어, 문헌[Baca, M. et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 10678-10684] 및 문헌[Rosok, M.J. et al., J. Biol. Chem. 271 (1996) 22611-22618]) 참조)을 포함한다.
- [0337] 4. 다중특이성 항체
- [0338] 특정 양태에서, 본원에 제공된 항체는 다중특이성 항체, 예를 들어 이중특이성 항체이다. 다중특이성 항체는 2개 이상의 상이한 부위에 대한 결합 특이성을 갖는 단일클론 항체이다. 특정 양태에서, 결합 특이성 중 하나는 ANG2에 대한 결합 특이성이고, 나머지 하나는 임의의 다른 항원에 대한 결합 특이성이다. 특정 양태에서, 이중 특이성 항체는 ANG2의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 또한, 이중특이성 항체는 세포독성제를, ANG2를 발현하는 세포에 위치시키는 데에 사용될 수 있다. 이중특이성 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조될 수 있다.
- [0339] 다중특이성 항체를 제조하는 기법은 비제한적으로 상이한 특이성을 갖는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 공-발현(문헌[Milstein, C. and Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540], WO 93/08829, 및 문헌[Traunecker, A., et al., EMBO J. 10 (1991) 3655-3659] 참조), 및 "눕-인-홀" 조작(예를 들어, US 5,731,168 참조)을 포함한다. 다중특이성 항체는 항체 Fc-이중이량체 분자를 제조하기 위한 정전기 조종 효과의 조작(WO 2009/089004); 2개 이상의 항체 또는 단편의 가교연결(예를 들어, US 4,676,980 및 문헌[Brennan, M. et al.,

Science 229 (1985) 81-83] 참조); 이중특이성 항체를 제조하기 위한 류신 지퍼의 사용(예를 들어, 문헌 [Kostelny, S.A., et al., J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553] 참조); 이중특이성 항체 단편을 제조하기 위한 "다이아바디" 기술의 사용(예를 들어, 문헌[Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448] 참조); 단일쇄 Fv(scFv) 이량체의 사용(예를 들어, 문헌[Gruber, M et al., J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374] 참조); 및 예를 들어 문헌[Tutt, A. et al., J. Immunol. 147 (1991) 60-69]에 기재된 바와 같은 삼중특이성 항체의 제조에 의해 제조될 수도 있다.

[0340] 3개 이상의 기능성 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체("옥토퍼스(Octopus) 항체"를 포함함)도 본원에 포함된다 (예를 들어, US 2006/0025576 참조).

[0341] 또한, 본원의 항체 또는 단편은 ANG2 및 또 다른 상이한 항원에 결합하는 결합 부위를 갖는 항원을 포함하는 "이중 작용 Fab" 또는 "DAF"도 포함한다(예를 들어, US 2008/0069820 참조).

[0342] 또한, 본원의 항체 또는 단편은 WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 및 WO 2010/145793에 기재된 다중특이성 항체를 포함한다.

5. 항체 변이체

[0344] 특정 양태에서, 본원에 제공된 항체의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/ 또는 다른 생물학적 성질을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 적절한 변형을, 항체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 내로 도입하거나 웨티드를 합성함으로써 제조될 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 항체의 아미노산 서열로부터의 잔기의 결실, 이러한 서열 내로의 잔기의 삽입 및/또는 이러한 서열 내의 잔기의 치환을 포함한다. 최종 구축물이 원하는 특성, 예를 들어 항원 결합을 보유하는 한, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합으로 최종 구축물에 도달할 수 있다.

a) 치환, 삽입 및 결실 변이체

[0346] 특정 양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 치환 돌연변이 유발을 위한 관심 있는 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 보존적 치환은 "바람직한 치환"이라는 표제 하에 하기 표에 제시되어 있다. 보다 더 실질적인 변형은 "예시적인 치환"이라는 표제 하에 하기 표 1에 제공되어 있고 아미노산 측쇄 클래스와 관련하여 하기에 추가로 기재되어 있다. 아미노산 치환은 관심 있는 항체 내로 도입될 수 있고, 생성 물은 원하는 활성, 예를 들어 보유된/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝될 수 있다.

원래 잔자	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0347]

[0348] 아미노산은 공통 측쇄 성질에 따라 분류될 수 있다:

[0349] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0350] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0351] (3) 산성: Asp, Glu;

[0352] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0353] (5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0354] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0355] 비-보존적 치환은 이 클래스 중 하나의 구성원을 또 다른 클래스의 구성원으로 대체하는 것을 수반할 것이다.

[0356] 치환 변이체의 하나의 유형은 모 항체(예를 들어, 인간화된 항체 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변 영역 잔기의 치환을 포함한다. 일반적으로, 추가적 연구를 위해 선택된 생성된 변이체는 모 항체에 비해 일부 생물학적 성질의 변형(예를 들어, 개선)(예를 들어, 증가된 친화도, 감소된 면역원성)을 가질 것이고/이거나, 모 항체의 실질적으로 보유된 일부 생물학적 성질을 가질 것이다. 예시적인 치환 변이체는, 예를 들어 파지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기법, 예컨대, 본원에 기재된 기법을 사용함으로써 편리하게 생성될 수 있는 친화도 성숙된 항체이다. 요약하건대, 하나 이상의 HVR 잔기가 돌연변이되고, 변이체 항체가 파지 상에서 디스플레이되고 특정 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다.

[0357] 변경(예를 들어, 치환)은, 예를 들어 항체 친화성을 개선하기 위해 HVR에서 만들어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스폿(hot spot)", 즉 체세포 성숙 과정 동안 높은 빈도로 돌연변이되는 코돈에 의해 암호화된 잔기(예를 들어, 문헌[Chowdhury, P.S., Methods Mol. Biol. 207 (2008) 179-196] 참조), 및/또는 항원과 접촉하는 잔기에서 만들어질 수 있고, 이때 생성된 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화도에 대해 시험된다. 2차 라이브러리를 구축하고 이 라이브러리로부터 재선택함으로써 달성되는 친화도 성숙은, 예를 들어 문헌[Hoogenboom, H.R. et al. in Methods in Molecular Biology 178 (2002) 1-37]에 기재되어 있다. 친화도 성숙의 일부 양태에서, 다양성

은 다양한 방법(예를 들어, 오류 유발 PCR, 쇄 셔플링 또는 올리고뉴클레오티드-지정된 돌연변이 유발) 중 임의의 방법에 의해 성숙을 위해 선택된 가변 유전자 내로 도입된다. 그 다음, 2차 라이브러리가 생성된다. 그 다음, 상기 라이브러리를 스크리닝하여 원하는 친화도를 갖는 임의의 항체 변이체를 확인한다. 다양성을 도입하는 또 다른 방법은 HVR-지정된 방법을 포함하고, 이때 여러 HVR 잔기(예를 들어, 한번에 4 내지 6개의 잔기)가 무작위화된다. 예를 들어, 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발 또는 모델링을 사용하여 항원 결합에 관여하는 HVR 잔기를 구체적으로 확인할 수 있다. CDR-H3 및 CDR-L3이 특히 자주 표적화된다.

[0358] 특정 양태에서, 하나 이상의 HVR 내에서 치환, 삽입 또는 결실이 일어날 수 있되, 이러한 변경은 항원에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않아야 한다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경(예를 들어, 본원에 제공된 보존적 치환)이 HVR에서 만들어질 수 있다. 이러한 변경은, 예를 들어 HVR 내의 항원 접촉 잔기의 외부에 존재할 수 있다. 상기 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 특정 양태에서, 각각의 HVR은 변경되지 않거나, 1, 2 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 함유한다.

[0359] 돌연변이 유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역을 확인하는 유용한 방법은 문헌[Cunningham, B.C. and Wells, J.A., Science 244 (1989) 1081-1085]에 기재된 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발"로서 지칭된다. 이 방법에서, 항체와 항원의 상호작용이 영향을 받는지를 확인하기 위해 잔기 또는 표적 잔기의 군(예를 들어, 대전된 잔기, 예컨대, arg, asp, his, lys 및 glu)을 확인하고 중성 또는 음으로 대전된 아미노산(예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체한다. 초기 치환에 대한 기능적 민감성을 나타내는 아미노산 위치에서 추가적 치환을 도입할 수 있다. 다르게는 또는 부가적으로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조를 사용할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 인접 잔기를 치환 후보로서 표적화 할 수 있거나 제거할 수 있다. 변이체가 원하는 성질을 함유하는지를 확인하기 위해 변이체를 스크리닝할 수 있다.

[0360] 아미노산 서열 삽입은 1개 잔기의 길이 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드 길이를 갖는 아미노-말단 및/또는 카복실-말단 융합뿐만 아니라, 단일 또는 다수의 아미노산 잔기의 서열내 삽입도 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 N-말단 또는 C-말단에서 효소(예를 들어, ADEPT) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드와 융합된 융합체를 포함한다.

b) 글리코실화 변이체

[0362] 특정 양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키도록 변경된다. 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 항체에의 글리코실화 부위의 추가 또는 항체로부터의 글리코실화 부위의 결실을 편리하게 달성할 수 있다.

[0363] 항체가 Fc-영역을 포함하는 경우, 그에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생성된 천연 항체는 전형적으로 N-연결에 의해 일반적으로 Fc-영역의 CH2 도메인의 Asn297에 부착되어 있는 분지된 바이안테나리(biantennary) 올리고사카라이드를 포함한다(예를 들어, 문헌[Wright, A. and Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32] 참조). 올리고사카라이드는 다양한 탄수화물, 예를 들어 만노스, N-아세틸 글루코사민(GlcNAc), 갈락토스 및 시알산뿐만 아니라 바이안테나리 올리고사카라이드 구조물의 "줄기"에서 GlcNAc에 부착된 푸코스도 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 특정 개선된 성질을 갖는 항체 변이체를 생성하기 위해 본원의 항체에서 올리고사카라이드를 변형시킬 수 있다.

[0364] 한 양태에서, Fc-영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 부착된 푸코스를 결여하는 탄수화물 구조물을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 예를 들어, 이러한 항체에서 푸코스의 양은 1 내지 80%, 1 내지 65%, 5 내지 65%, 또는 20 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은, 예를 들어 WO 2008/077546에 기재된 바와 같이 MALDI-TOF 질량 분광측정에 의해 측정될 때 Asn297에 부착된 모든 당구조물(예를 들어, 복합체, 하이브리드 및 고만노스 구조물)의 합계를 기준으로 Asn297에서 당쇄 내의 푸코스의 평균 양을 계산함으로써 측정된다. Asn297은 Fc-영역 내의 위치 약 297(Fc-영역 잔기의 EU 넘버링)에 위치하는 아스파라긴 잔기를 지칭하나; Asn297은 항체에서의 미미한 서열 변이로 인해 위치 297의 약 ± 3개 아미노산 업스트림 또는 다운스트림, 즉 위치 294와 300 사이에 위치할 수도 있다. 이러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, US 2003/0157108 및 US 2004/0093621을 참조한다. "탈푸코실화된" 또는 "푸코스 결핍" 항체와 관련된 공개문헌들의 예에는 하기 문헌이 포함된다: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; 문헌[Okazaki, A. et al.,

J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249]; 및 문헌[Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622]. 탈포코실화된 항체를 생성할 수 있는 세포주의 예에는 단백질 푸코실화 결핍 Lec13 CHO 세포(문헌[Ripka, J., et al., Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545]; US 2003/0157108; 및 WO 2004/056312, 특히 실시예 11), 및 녹-아웃 세포주, 예컨대, α -1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자인 FUT8 녹-아웃 CHO 세포(예를 들어, 문헌[Yamane-Ohnuki, N., et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622]; 문헌[Kanda, Y., et al., Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688]; 및 WO 2003/085107 참조)가 포함된다.

[0365] 예를 들어, 항체의 Fc-영역에 부착된 바이안테나리 올리고사카라이드가 GlcNAc에 의해 이등분되어 있는 이등분된 올리고사카라이드를 갖는 항체 변이체도 제공된다. 이러한 항체 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체의 예는, 예를 들어 WO 2003/011878; US 6,602,684; 및 US 2005/0123546에 기재되어 있다. Fc-영역에 부착된 올리고사카라이드에서 하나 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체 변이체도 제공된다. 이러한 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는, 예를 들어 WO 1997/30087; WO 1998/58964; 및 WO 1999/22764에 기재되어 있다.

c) Fc-영역 변이체

[0367] 특정 양태에서, 하나 이상의 아미노산 변형을 본원에 제공된 항체의 Fc-영역 내로 도입하여 Fc-영역 변이체를 생성할 수 있다. Fc-영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형(예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc-영역 서열(예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc-영역)을 포함할 수 있다.

[0368] 특정 양태에서, 본 발명은 일부 효과기 기능을 보유하되 모든 효과기 기능을 보유하지는 않아 생체내 항체의 반감기가 중요하지만 일부 효과기 기능(예컨대, 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 유해한 적용 분야를 위한 바람직한 후보가 되는 항체 변이체를 고려한다. 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 어세이를 수행하여 CDC 및/또는 ADCC 활성을 감소/고갈을 확인할 수 있다. 예를 들어, 항체가 Fc γ R 결합을 결여하되(따라서 ADCC 활성을 결여할 가능성이 있음) FcRn 결합 능력을 보유한다는 것을 보장하기 위해 Fc 수용체(FcR) 결합 어세이를 수행할 수 있다. ADCC를 매개하는 일차 세포인 NK 세포는 FcRIII만을 발현하는 반면에, 단핵세포는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈세포 상에서의 FcR 발현은 문헌[Ravetch, J.V., and Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492]의 제464면의 표 3에 요약되어 있다. 관심 있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 어세이의 비제한적인 예는 US 5,500,362(예를 들어, 문헌[Hellstrom, I., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063]; 및 문헌[Hellstrom, I., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502] 참조); 및 US 5,821,337(문헌[Bruggemann, M., et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361] 참조)에 기재되어 있다. 다르게는, 비-방사성 어세이 방법을 사용할 수 있다(예를 들어, 유동세포 측정을 위한 ACTI(상표) 비-방사성 세포독성 어세이(셀테크놀로지 인코포레이티드(CellTechnology, Inc., 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재)); 및 사이토톡스(CytoTox) 96(등록상표) 비-방사성 세포독성 어세이(프로메가(Promega, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)) 참조). 이러한 어세이에 유용한 효과기 세포는 말초 혈액 단핵세포(PBMC) 및 천연 살해(NK) 세포를 포함한다. 다르게는 또는 부가적으로, 관심 있는 분자의 ADCC 활성을 생체 내에서, 예를 들어 동물 모델, 예컨대, 문헌[Clynes, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656]에 개시된 동물 모델에서 평가할 수 있다. C1q 결합 어세이를 수행하여 항체가 C1q에 결합할 수 없으므로 CDC 활성을 결여한다는 것을 확인할 수도 있다(예를 들어, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402에 기재된 C1q 및 C3c 결합 ELISA 참조). 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 분석을 수행할 수 있다(예를 들어, 문헌[Gazzano-Santoro, H., et al., J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171]; 문헌[Cragg, M.S., et al., Blood 101 (2003) 1045-1052]; 및 문헌[Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743] 참조). 당해 분야에서 공지되어 있는 방법을 사용하여 FcRn 결합 및 생체내 제거/반감기 측정도 수행할 수 있다(예를 들어, 문헌[Petkova, S.B. et al., Int. Immunol. 18 (2006: 1759-1769)] 참조).

[0369] 감소된 효과기 기능을 갖는 항체는 Fc-영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 Fc-영역 잔기의 치환을 갖는 항체를 포함한다(US 6,737,056 참조). 이러한 Fc 돌연변이체는 잔기 265 및 297이 알라닌으로 치환되어 있는 소위 "DANA" Fc 돌연변이체를 포함하는, 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2 개 이상의 아미노산 위치에서 치환을 갖는 Fc 돌연변이체를 포함한다(US 7,332,581).

[0370] FcR과의 개선되거나 감소된 결합을 갖는 특정 항체 변이체가 기재되어 있다(예를 들어, US 6,737,056; WO 2004/056312; 및 문헌[Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604] 참조).

[0371] 특정 양태에서, 항체 변이체는 ADCC를 개선하는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc-영역의 위치 298, 333 및/또는 334(잔기의 EU 넘버링)에서의 치환을 갖는 Fc-영역을 포함한다.

- [0372] 일부 양태에서, 예를 들어 US 6,194,551, WO 99/51642 및 문헌[Idusogie, E.E. et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184]에 기재된 바와 같이 Clq 결합 및/또는 보체 의존적 세포독성(CDC)을 변경시키도록(즉, 개선하거나 감소시키도록) Fc-영역을 변경시킨다.
- [0373] 증가된 반감기를 갖고 태아로의 모체 IgG의 전달을 담당하는 신생아 Fc 수용체(FcRn)(문헌[Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593], 및 [Kim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434])와의 개선된 결합을 갖는 항체는 US 2005/0014934에 기재되어 있다. 이 항체는 Fc-영역과 FcRn의 결합을 개선하는 하나 이상의 치환을 그 내부에 갖는 Fc-영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 Fc-영역 잔기 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 및 434 중 하나 이상의 Fc-영역 잔기의 치환, 예를 들어 Fc-영역 잔기 434의 치환을 갖는 Fc-영역 변이체를 포함한다(US 7,371,826).
- [0374] 또한, Fc-영역 변이체의 다른 예에 대해서는 문헌[Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740]; US 5,648,260; US 5,624,821; 및 WO 94/29351을 참조한다.
- [0375] d) 시스테인 조작된 항체 변이체
- [0376] 특정 양태에서, 항체의 하나 이상의 잔기가 시스테인 잔기로 치환되어 있는 시스테인 조작된 항체, 예를 들어 "thioMAb"를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 구체적인 양태에서, 치환된 잔기는 항체의 접근가능한 부위에 존재한다. 이러한 잔기가 시스테인으로 치환됨으로써 반응성 티올 기는 항체의 접근가능한 부위에 위치하고, 본원에 추가로 기재된 바와 같이 항체를 다른 모이어티, 예컨대, 약물 모이어티 또는 연결기-약물 모이어티에 접합시켜 면역접합체를 생성하는데 사용될 수 있다. 특정 양태에서, 하기 잔기 중 임의의 하나 이상의 잔기가 시스테인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205(카밧 넘버링); 중쇄의 A118(EU 넘버링); 및 중쇄 Fc-영역의 S400(EU 넘버링). 시스테인 조작된 항체는, 예를 들어 US 7,521,541에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다.
- [0377] e) 항체 유도체
- [0378] 특정 양태에서, 본원에 제공된 항체는 당해 분야에서 공지되어 있고 용이하게 입수할 수 있는 추가적 비-단백질 성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 비제한적으로 수용성 중합체를 포함한다. 수용성 중합체의 비제한적인 예는 비제한적으로 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카복실메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-다이옥솔란, 폴리-1,3,6-트라이옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 프롤리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화된 폴리올(예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알코올, 및 이들의 혼합물을 포함한다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데하이드는 물에서의 이의 안정성으로 인해 제조에서 장점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 갖는 중합체일 수 있고, 분지되지 않거나 분지될 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 달라질 수 있고, 1개 초과의 중합체가 부착되는 경우 이들은 동일한 또는 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 비제한적으로 개선될 항체의 구체적인 성질 또는 기능, 항체 유도체가 한정된 조건 하에 치료에서 사용될 것인지 여부 등을 포함하는 고려사항에 근거하여 결정될 수 있다.
- [0379] 또 다른 양태에서, 방사선에의 노출에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 비-단백질성 모이어티와 항체의 접합체가 제공된다. 한 양태에서, 비-단백질성 모이어티는 탄소 나노튜브이다(문헌[Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605]). 방사선은 임의의 파장의 방사선일 수 있고, 비제한적으로 통상의 세포에게 유해하지 않으나 항체-비-단백질성 모이어티에 인접한 세포가 사멸되는 온도까지 비-단백질성 모이어티를 가열하는 파장을 포함한다.
- [0380] B. 재조합 방법 및 조성물
- [0381] 항체는, 예를 들어 US 4,816,567에 기재된 바와 같이 재조합 방법 및 조성물의 사용을 통해 제조될 수 있다. 한 양태에서, 본원에 기재된 항-ANG2 항체를 암호화하는 단리된 핵산이 제공된다. 이러한 핵산은 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열(예를 들어, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)을 암호화할 수 있다. 추가적 양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터(예를 들어, 발현 벡터)가 제공된다. 추가적 양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 이러한 한 양태에서, 숙주 세포는 (1) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터, 또는 (2) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함하는 제1 벡터 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함하는 제2 벡터를 포함한다(예를 들어, 상기 (1) 또는 (2)

의 벡터로 형질전환되어 있다). 한 양태에서, 숙주 세포는 진핵 세포, 예를 들어 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 림프 세포(예를 들어, YO, NS0, Sp20 세포)이다. 한 양태에서, 항-ANG2 항체를 제조하는 방법으로서, 상기 제공된 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 상기 항체의 발현에 적합한 조건 하에 배양하는 단계, 및 선택적으로 상기 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 상기 항체를 회수하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0382] 항-ANG2 항체의 재조합 제조를 위해, 예를 들어 전술된 항체를 암호화하는 핵산을 단리하고 추가적 클로닝 및/ 또는 숙주 세포에서의 발현을 위해 하나 이상의 벡터 내로 삽입한다. 통상적인 절차를 사용하여(예를 들어, 항체의 또는 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여) 이러한 핵산을 용이하게 단리할 수 있고 서열 결정할 수 있다.

[0383] 항체 암호화 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 원핵세포 또는 진핵세포를 포함한다. 예를 들어, 특히 글리코실화 및 Fc 효과기 기능이 필요하지 않은 경우 항체를 세균에서 제조할 수 있다. 세균에서의 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해서는, 예를 들어 US 5,648,237, US 5,789,199 및 US 5,840,523을 참조한다(또한, 대장균에서의 항체 단편의 발현이 기재되어 있는 문헌[Charlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254] 참조). 발현 후, 항체를 가용성 분획 중의 세균 세포 페이스트로부터 단리할 수 있고 추가로 정제할 수 있다.

[0384] 원핵세포 이외에, 글리코실화 경로가 "인간화"되어 있어 부분적으로 또는 전체적으로 인간 글리코실화 패턴을 갖는 항체를 생성하는 진균 및 효모 균주를 포함하는 진핵 미생물, 예컨대, 사상 진균 또는 효모가 항체 암호화 벡터를 위한 클로닝 또는 발현 숙주로서 적합하다. 문헌[Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414]; 및 문헌[Li, H., et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215]을 참조한다.

[0385] 글리코실화된 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체(무척추동물 및 척추동물)로부터도 유래된다. 무척추동물 세포의 예에는 식물 세포 및 곤충 세포가 포함된다. 곤충 세포와 함께 사용될 수 있는, 특히 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질감염을 위해 사용될 수 있는 다수의 바클로바이러스 균주가 확인되어 있다.

[0386] 식물 세포 배양물도 숙주로서 사용될 수 있다(예를 들어, US 5,959,177, US 6,040,498, US 6,420,548, US 7,125,978 및 US 6,417,429(형질전환 식물에서 항체를 제조하는 플란티바디스(PLANTIBODIES: 상표) 기술이 기재되어 있음)를 참조).

[0387] 척추동물 세포도 숙주로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 혼탁액에서 생장하도록 개조된 포유동물 세포주가 유용 할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7); 인간 배아 신장 세포주(예를 들어, 문헌[Graham, F.L., et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74]에 기재된 293 또는 293 세포); 새끼 햄스터 신장 세포(BHK); 마우스 세르톨리 세포(예를 들어, 문헌[Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252]에 기재된 TM4 세포); 원숭이 신장 세포(CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76); 인간 자궁경부암종 세포(HELA); 개 신장 세포(MDCK); 베팔로 래트 간 세포(BRL 3A); 인간 폐 세포(W138); 인간 간 세포(Hep G2); 마우스 유선 종양(MMT 060562); 예를 들어 문헌[Mather, J.P., et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68]에 기재된 TRI 세포; MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 DHFR⁻ CHO 세포(문헌[Urlaub, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220])를 포함하는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포; 및 골수종 세포주, 예컨대, YO, NS0 및 Sp2/0를 포함한다. 항체 제조에 적합한 일부 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해서는, 예를 들어 문헌[Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268]을 참조한다.

C. 어세이

[0389] 항-ANG2 항체는 당해 분야에 공지된 다양한 어세이에 의해 이의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성을 대하여 확인되거나 스크리닝되거나 특정규명될 수 있다. 예시적 어세이는 실시예에 보고되어 있다.

D. 면역접합체

[0391] 또한, 본 발명은 하나 이상의 세포독성제, 예컨대 화학치료제 또는 약물, 성장 억제제, 독소(예를 들어, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소 또는 이의 단편) 또는 방사성 동위원소와 접합된

본원에 보고된 항-ANG2 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다.

[0392]

한 양태에서, 면역접합체는 비제한적으로 하기를 포함하는 하나 이상의 약물과 접합된 항체인 항체-약물 접합체(ADC)이다: 마이탄시노이드(US 5,208,020, US 5,416,064 및 EP 0 425 235 B1 참조); 아우리스타틴, 예컨대 모노메틸 아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF(MMAE 및 MMAF)(US 5,635,483, US 5,780,588 및 US 7,498,298 참조); 둘라스타틴; 칼리케아미신 또는 이의 유도체(US 5,712,374, US 5,714,586, US 5,739,116, US 5,767,285, US 5,770,701, US 5,770,710, US 5,773,001 및 US 5,877,296; 문헌[Hinman, L.M. et al., Cancer Res. 53 (1993) 3336-3342]; 및 문헌[Lode, H.N. et al., Cancer Res. 58 (1998) 2925-2928] 참조); 안트라사이클린, 예컨대 다우노마이신 또는 독소루비신(문헌[Kratz, F. et al., Curr. Med. Chem. 13 (2006) 477-523]; 문헌[Jeffrey, S.C., et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 16 (2006) 358-362]; 문헌[Torgov, M.Y., et al., Bioconjug. Chem. 16 (2005) 717-721]; 문헌[Nagy, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 829-834]; 문헌[Dubowchik, G.M., et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12 (2002) 1529-1532]; 문헌[King, H.D., et al., J. Med. Chem. 45 (2002) 4336-4343]; 및 US 6,630,579 참조); 메토트렉세이트; 빈데신; 탁센, 예컨대 도세탁셀, 파클리탁셀, 라로탁셀, 테세탁셀 및 오르타탁셀; 트티코테센; 및 CC1065.

[0393]

또 다른 양태에서, 면역접합체는, 비제한적으로 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄(슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 기인), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우라이츠 포르디(*Aleurites fordii*) 단백질, 디아틴 단백질, 피톨라카 아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질(PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 큐르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(*Sapaponaria officinalis*) 억제제, 젤로닌, 미토젤린, 레스트릭토신, 폐노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함하는 효소 활성 독소 또는 이의 단편에 접합된 본원에 기재된 항체를 포함한다.

[0394]

또 다른 양태에서, 면역접합체는 방사접합체를 형성하는 방사성 원소에 접합된 본원에 기재된 항체를 포함한다. 다양한 방사성 동위원소가 방사접합체의 제조에 이용가능하다. 예는 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 방사접합체가 검출을 위해 사용되는 경우, 이는 신티그래프(scintigraphic) 연구용 방사성 원소, 예를 들어 TC^{99m} 또는 I¹²³, 또는 핵 자기 공명(NMR) 이미지(자기 공명 이미지(MRI)로도 공지됨)용 스핀 표지, 예컨대 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.

[0395]

항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 이작용성 단백질 커플링제, 예컨대 N-석신이미딜-3-(2-피리미딜다이티오) 프로페오네이트(SPDP), 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카복실레이트(SMCC), 이미노티올란(IT), 이미도에스터의 이작용성 유도체(예컨대, 디아메틸 아디프이미데이트 HC1), 활성 에스터(예컨대, 디아석신이미딜 수베레이트), 알데하이드(예컨대, 글루타르알데하이드), 비스-아지도 화합물(예컨대, 비스-(p-다이조벤조일)-헥산다이아민), 비스-다이아조늄 유도체(예컨대, 비스-(p-다이아조늄 벤조일)-에틸렌다이아민), 디아이소시아네이트(예컨대, 톨루엔 2,6-다이이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물(예컨대, 1,5-다이플루오로-2,4-다이니트로벤젠)을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌[Vitetta, E.S. et al., Science 238 (1987) 1098-1104]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸다이에틸렌 트라이아민 펜타아세트산(MX-DTPA)은 항체에 대한 방사성 뉴클레오티드의 접합을 위한 예시적 퀄레이트화제이다. WO 94/11026을 참조한다. 연결기는 세포독성 약물을 세포 내에 방출할 수 있는 "절단성 연결기"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정성 연결기, 웹타다제-민감성 연결기, 광-불안정성 연결기, 다이메틸 연결기 또는 다이설파이드-함유 연결기(문헌[Chari, R.V. et al., Cancer Res. 52 (1992) 127-131]; US 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0396]

본원의 면역접합체 또는 ADC가 명확이 고려되지만, 가교-연결기 시약(비제한적으로 (예를 들어, 피어스 바이오테크놀로지 인코포레이티드(Pierce Biotechnology, Inc., 미국 일리노이주 랙포드 소재)로부터) 상업적으로 입수가능한 BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 설포-EMCS, 설포-GMBS, 설포-KMUS, 설포-MBS, 설포-SIAB, 설포-SMCC, 설포-SMPB 및 SVSB(석신이미딜-(4-비닐설폰)벤조에이트)를 포함함)를 사용하여 제조된 접합체에 제한되지 않는다.

[0397]

E. 진단 및 검출을 위한 방법 및 조성물

[0398]

특정 양태에서, 본원에 제공된 임의의 항-ANG2 항체가 생물학적 샘플 내의 ANG2의 존재를 검출하는데 유용하다.

본원에 사용된 용어 "검출하는"은 정량적인 또는 정성적인 검출을 포함한다.

[0399] 한 양태에서, 진단 또는 검출 방법에 사용하기 위한 항-ANG2 항체가 제공된다. 추가 양상에서, 생물학적 샘플 내의 ANG2의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 특정 양태에서, 방법은 ANG2로의 항-ANG2 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 생물학적 샘플을 본원에 기술된 항-ANG2 항체와 접촉시키는 단계, 및 착물이 항-ANG2 항체와 ANG2 사이에 형성되는지 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 이러한 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 한 양태에서, 항-ANG2 항체는 항-ANG2 항체에 의한 요법을 사용할 수 있는 대상을 선택하는데 사용되고, 예컨대, 이때 ANG2는 환자의 선택을 위한 바이오마커이다.

[0400] 특정 양태에서, 표지된 항-ANG2 항체가 제공된다. 표지는, 비제한적으로, 직접 검출되는 표지 또는 모이어티(예컨대, 형광, 발색단, 전자-밀집, 화학발광 및 방사성 표지), 및 예컨대 효소적 반응 또는 분자 상호작용을 통해 간접적으로 검출되는 모이어티, 예컨대 효소 또는 리간드를 포함한다. 예시적인 표지는, 비제한적으로, 방사성 동위원소 ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H 및 ¹³¹I, 형광단, 예컨대 희토류 칼레이트 또는 플루오로세인 또는 이의 유도체, 로다민 및 이의 유도체, 단실, 염밸리페론, 루시퍼라제, 예컨대 개똥벌레 루시퍼라제 및 세균성 루시퍼라제(US 4,737,456), 루시페린, 2,3-다이하이드로프탈라진다이온, 고추냉이 과산화효소(HRP), 알칼리성 포스파타제, β-갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 산화효소, 예컨대 글루코스 산화효소, 갈락토스 산화효소 및 글루코스-6-포스페이트 탈수효소, 헤테로사이클릭 산화효소, 예컨대 유리카제 및 잔틴 산화효소를 포함하고, 이들은 과산화수소를 사용하여 염료 전구체, 예컨대 HRP, 락토포우시다제 또는 마이크로퍼옥시다제, 바이오틴/아비딘, 스펀 표지, 박테리오파지 표지, 안정한 유리 라디칼 등을 산화시키는 효소와 커플링된다.

F. 약학 제형

[0402] 본원에 기재된 항-ANG2 항체의 약학 제형은 원하는 순도를 갖는 이러한 항체를 선택적으로 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체와 혼합함으로써 동결건조된 제형 또는 수용액의 형태로 제조된다(문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)]). 약학적으로 허용되는 담체는 일반적으로 사용되는 용량 및 농도에서 수용자에게 독성을 나타내지 않고, 비제한적으로 완충제, 예컨대, 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예컨대, 옥타데실 다이메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 폐놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대, 폴리(비닐피롤리돈); 아미노산, 예컨대, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 모노아카라이드, 다이아카라이드 및 다른 탄수화물; 칼레이트화제, 예컨대, EDTA; 당, 예컨대, 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염형성 반대이온, 예컨대, 나트륨; 금속 착물(예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다. 본원에서 예시적인 약학적으로 허용되는 담체는 간질 약물 분산제, 예컨대, 가용성 중성-활성 하이알루로니다제 당단백질(sHASEGP), 예를 들어 인간 가용성 PH-20 하이알루로니다제 당단백질, 예컨대, rhuPH20(HYLENEX(등록상표, 박스터 인터내셔널 인코포레이티드(Baxter International, Inc.))을 추가로 포함한다. rhuPH20을 포함하는 일부 예시적인 sHASEGP 및 사용 방법은 US 2005/0260186 및 US 2006/0104968에 기재되어 있다. 한 양상에서, sHASEGP는 하나 이상의 추가적 글리코스아미노글리카나제, 예컨대, 콘드로이티나제와 병용된다.

[0403] 예시적인 동결건조된 항체 제형은 US 6,267,958에 기재되어 있다. 수성 항체 제제는 US 6,171,586 및 WO 2006/044908에 기재된 수성 항체 제형을 포함하고, 이때 후자 제형은 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다.

[0404] 본원의 제형은 치료되는 구체적인 적응증에 필요한 하나 초과의 활성 성분, 바람직하게는 서로 불리하게 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 활성 성분도 함유할 수 있다. 예를 들어, 항-IL-1베타 항체 또는 항-PDGF-B 항체를 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에 효과적인 양으로 함께 적절하게 존재한다.

[0405] 활성 성분은, 예를 들어 코아세르베이션(coacervation) 기법 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포좀, 알부민 마이크로스피어, 마이크로유화액, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 마크로유화액 중의 각각 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴 마이크로캡슐 및 폴리-(메틸 메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 포획될 수 있다. 이러한 기법은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)]에 개시되어 있다.

- [0406] 지속 방출 제제가 제조될 수 있다. 지속 방출 제제의 적합한 예에는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되고, 상기 매트릭스는 성형된 제품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태로 존재한다.
- [0407] 생체내 투여를 위해 사용되는 제형은 일반적으로 멸균 상태이다. 멸균성은, 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.
- [0408] **G. 치료 방법 및 조성물**
- [0409] 본원에 제공된 임의의 항-ANG2 항체가 치료 방법에서 사용될 수 있다.
- [0410] 한 양상에서, 약제로서 사용되는 항-ANG2 항체가 제공된다. 추가적 양상에서, 안구 혈관 질병, 바람직하게는 황반 변성의 치료에 사용되는 항-ANG2 항체가 제공된다. 특정 양태에서, 치료 방법에서 사용되는 항-ANG2 항체가 제공된다. 특정 양태에서, 효과량의 항-ANG2 항체를, 안구 혈관 질병, 바람직하게는 황반 변성을 갖는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 개체를 치료하는 방법에서 사용되는 항-ANG2 항체가 제공된다. 이러한 한 양태에서, 상기 방법은, 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 하나 이상의 추가적 치료제의 효과량을 상기 개체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 추가적 양태에서, 본 발명은 혈관신생을 억제하는데 사용되는 항-ANG2 항체를 제공한다. 특정 양태에서, 본 발명은 효과량의 항-ANG2 항체를 개체에게 투여하여 혈관신생을 억제하는 단계를 포함하는, 개체에서 혈관신생을 억제하는 방법에서 사용되는 항-ANG2 항체를 제공한다. 임의의 상기 양태에 따른 "개체"는 바람직하게는 인간이다.
- [0411] 추가적 양상에서, 본 발명은 약제의 제작 또는 제조에 있어서, 항-ANG2 항체의 용도를 제공한다. 한 양태에서, 약제는 안구 혈관 질병, 바람직하게는 황반 변성의 치료를 위한 약제이다. 추가적 양태에서, 약제는, 효과량의 약제를 안구 혈관 질병, 바람직하게는 황반 변성을 갖는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 안구 혈관 질병, 바람직하게는 황반 변성의 치료 방법에서 사용되는 약제이다. 이러한 한 양태에서, 상기 방법은, 예를 들어 하기 기재되는 바와 같은 하나 이상의 추가적 치료제의 효과량을 상기 개체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 추가적 양태에서, 약제는 혈관신생의 억제를 위한 약제이다. 추가적 양태에서, 약제는 효과량의 약제를 개체에게 투여하여 혈관신생을 억제하는 단계를 포함하는, 상기 개체에서 혈관신생을 억제하는 방법에서 사용되는 약제이다. 상기 양태 중 임의의 양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.
- [0412] 추가적 양상에서, 본 발명은 안구 혈관 질병, 바람직하게는 황반 변성을 치료하는 방법을 제공한다. 한 양태에서, 상기 방법은 효과량의 항-ANG2 항체를, 이러한 안구 혈관 질병, 바람직하게는 황반 변성을 갖는 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 이러한 한 양태에서, 상기 방법은 후술된 바와 같이 효과량의 하나 이상의 추가적 치료제를 상기 개체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 양태 중 임의의 양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.
- [0413] 추가적 양상에서, 본 발명은 개체의 혈관신생을 억제하는 방법을 제공한다. 한 양태에서, 상기 방법은 효과량의 항-ANG2 항체를 개체에게 투여하여 혈관신생을 억제하는 단계를 포함한다. 한 양태에서, "개체"는 인간이다.
- [0414] 추가적 양상에서, 본 발명은, 예를 들어 상기 치료 방법 중 임의의 치료 방법에서 사용되는, 본원에 제공된 임의의 항-ANG2 항체를 포함하는 약학 제형을 제공한다. 한 양태에서, 약학 제형은 본원에 제공된 임의의 항-ANG2 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 또 다른 양태에서, 약학 제형은 본원에 제공된 임의의 항-ANG2 항체, 및 예를 들어 하기 기재되는 바와 같은 하나 이상의 추가적 치료제를 포함한다.
- [0415] 본 발명의 항체는 치료에서 단독으로 사용될 수 있거나 다른 약제와 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 하나 이상의 추가적 치료제와 공동-투여될 수 있다. 특정 양태에서, 추가적 치료제는 항-IL-1베타 항체 또는 항-PDGF-B 항체이다.
- [0416] 상기 언급된 이러한 병용 요법은 병용 투여(2개 이상의 치료제가 동일하거나 별개의 제형에 포함되는 경우), 별개의 투여(이 경우, 본 발명의 항체의 투여가 추가적 치료제의 투여 전, 그와 동시에 및/또는 그 후에 발생할 수 있음)를 포함한다. 한 양태에서, 항-ANG2 항체의 투여 및 추가적 치료제의 투여는 약 1개월 이내에, 또는 약 1, 2 또는 3주 이내에, 또는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 이내에 발생한다.
- [0417] 본 발명의 항체(및 임의의 추가적 치료제)는 비경구 투여, 정맥내 투여, 유리체내 투여, 폐내 투여 및 비내 투여, 및 국소 치료가 요구되는 경우 병변내 투여를 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있다. 비경구 관주는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투약은 부분적으로 투여가 단기 투여

인지 아니면 장기 투여인지에 따라 임의의 적합한 경로, 예를 들어 주사, 예컨대, 정맥내 또는 피하 주사에 의해 달성될 수 있다. 비제한적으로 단회 투여 또는 다양한 시점에 걸친 다회 투여, 블루스 투여 및 펄스 관주를 포함하는 다양한 투약 스케줄이 본원에서 고려된다.

[0418] 본 발명의 항체는 우수한 의학적 관행에 일치하는 방식으로 제형화되고 조제되고 투여될 것이다. 이와 관련하여 고려될 인자는 치료될 구체적인 장애, 치료될 구체적인 포유동물, 개별 환자의 임상적 상태, 장애의 원인, 약제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄 및 의료인에게 공지된 다른 인자를 포함한다. 상기 항체는 해당 장애의 예방 또는 치료를 위해 현재 사용되는 하나 이상의 약제와 함께 제형화될 필요는 없지만 선택적으로 이러한 약제와 함께 제형화된다. 이러한 다른 약제의 효과량은 제형에 존재하는 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형 및 상기 논의된 다른 인자에 의해 좌우된다. 이들은 일반적으로 본원에 기재된 용량 및 투여 경로와 동일한 용량 및 투여 경로로 사용되거나, 본원에 기재된 용량의 약 1 내지 99%의 용량으로 사용되거나, 적절한 용량 및 경로인 것으로 실험적으로/임상적으로 확인된 임의의 용량 및 임의의 경로로 사용된다.

[0419] 질환의 예방 또는 치료를 위해, (단독으로 사용되거나 하나 이상의 다른 추가적 치료제와 함께 사용될 때) 본 발명의 항체의 적절한 용량은 치료되는 질환의 유형, 항체의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 항체가 예방 목적으로 투여되는지 아니면 치료 목적으로 투여되는지, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 의해 좌우될 것이다. 항체는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적절하게 투여된다. 질환의 유형 및 중증도에 따라, 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 50 mg/kg (예를 들어, 0.5 내지 30 mg/kg)의 항체가, 예를 들어 1회 이상의 분리 투여에 의해 또는 연속 관주에 의해 환자에게 투여될 초기 후보 용량일 수 있다. 한 전형적인 1일 용량은 상기 언급된 인자들에 따라 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 100 mg/kg 또는 그 이상일 것이다. 수일 또는 이보다 오랜 시간에 걸친 반복된 투여의 경우, 상태에 따라 치료는 일반적으로 질환 증상의 원하는 억제가 일어날 때까지 지속될 것이다. 항체의 하나의 예시적인 용량은 약 0.05 내지 약 10 mg/kg 의 범위 내에 있을 것이다. 따라서, 약 0.5, 2.0, 4.0, 10, 30 또는 50 mg/kg (또는 이들의 임의의 조합)의 용량이 환자에게 1회 이상 투여될 수 있다. 이러한 용량은 (예를 들어, 환자가 약 2 내지 약 20회, 또는 예를 들어 약 6회 용량의 항체를 제공받도록) 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 3주마다 투여될 수 있다. 보다 더 높은 초기 적재 용량에 이어서 보다 더 낮은 용량이 1회 이상 투여될 수 있다. 그러나, 다른 용량 양생법이 유용할 수 있다. 이 요법의 진행은 통상적인 기법 및 분석에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0420] 임의의 상기 제형 또는 치료 방법이, 항-ANG2 항체를 대신하거나 이에 부가하여 본 발명의 면역접합체를 사용하여 수행될 수 있음이 이해된다.

III. 제품

[0422] 본 발명의 또 다른 양상에서, 전술된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제품이 제공된다. 상기 제품은 용기; 및 용기 상에 존재하거나 용기와 연결되어 있는 표지 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는, 예를 들어 병, 바이알, 주사기, IV 용액 백 등을 포함한다. 상기 용기는 다양한 물질, 예컨대, 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 상기 용기는 그 자체로 존재하거나 질환의 치료, 예방 및/또는 진단에 효과적인 또 다른 조성물과 조합되어 있는 조성물을 보유하고, 멸균 출입구를 가질 수 있다(예를 들어, 상기 용기는 피하 주사 바늘에 의해 천공될 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 중의 하나 이상의 활성 성분은 본 발명의 항체이다. 상기 표지 또는 포장 삽입물은 상기 조성물이 선택된 질환의 치료에 사용된다는 것을 표시한다. 나아가, 제품은 (a) 본 발명의 항체를 포함하는 조성물을 그 내부에 함유하는 제1 용기; 및 (b) 추가적 세포독성제 또는 다른 치료제를 포함하는 조성물을 그 내부에 함유하는 제2 용기를 포함할 수 있다. 본 발명의 이 양태에서 제품은 상기 조성물이 특정 질환의 치료에 사용될 수 있다는 것을 표시하는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 다르게는 또는 추가로, 제품은 약학적으로 허용되는 완충액, 예컨대, 정균 주사용수(BWFI), 포스페이트 완충 식염수, 링거 용액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2(또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제품은 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 포함하는, 상업적 관점 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0423] 임의의 상기 제품이, 항-ANG2 항체 대신에 또는 이에 부가하여 본 발명의 면역접합체를 포함할 수 있음이 이해된다.

IV. 구체적인 양태

[0425] 1. (a) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는, 인간 ANG2에 특이적으로 결합하는 항

체.

- [0426] 2. (a) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는, 인간 ANG2에 특이적으로 결합하는 항체.
- [0427] 3. 제1 양태 또는 제2 양태에 있어서, (a) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체.
- [0428] 4. 제1 양태 또는 제2 양태에 있어서, (a) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체.
- [0429] 5. 제1 양태 내지 제4 양태 중 어느 한 양태에 있어서, (a) 서열번호 19의 아미노산 서열과 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 VH 서열, (b) 서열번호 6 또는 서열번호 33의 아미노산 서열과 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는 (c) (a)에서의 VH 서열 및 (b)에서의 VL 서열을 포함하는 항체.
- [0430] 6. (a) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는, 인간 ANG2에 특이적으로 결합하는 항체.
- [0431] 7. (a) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는, 인간 ANG2에 특이적으로 결합하는 항체.
- [0432] 8. 제6 양태 또는 제7 양태에 있어서, (a) 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체.
- [0433] 9. 제6 양태 내지 제8 양태 중 어느 한 양태에 있어서, (a) 서열번호 37의 아미노산 서열과 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 VH 서열, (b) 서열번호 42의 아미노산 서열과 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는 (c) (a)에서의 VH 서열 및 (b)에서의 VL 서열을 포함하는 항체.
- [0434] 10. i) 서열번호 19와 70% 초과의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인, 및 서열번호 6과 70% 초과의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, ii) 중쇄 가변 도메인 중에서 위치 28에 아미노산 잔기 아스파라긴(N), 위치 30에 아미노산 잔기 알라닌(A), 위치 100b에 아미노산 잔기 프롤린(P), 및 위치 100j에 아미노산 잔기 알라닌(A), 및 경쇄 가변 도메인 중에서 위치 51에 아미노산 잔기 트레오닌(T)(카밧에 따른 넘버링)을 갖고, iii) 서열번호 19과 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 6 또는 서열번호 33과 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체와 비교하여, Tie2 인산화 ELISA를 사용하여 측정된, 인간 Tie2를 안정적으로 발현하는 HEK293 세포를 사용하는 세포-기반 어세이에서 수용체 Tie2로의 ANG2의 결합의 억제에 대해 낮은 EC₅₀ 값을 갖는, 인간 ANG2에 특이적으로 결합하는 항체.
- [0435] 11. 제10 양태에 있어서, 서열 동일성이 80% 초과, 바람직하게는 90% 초과, 가장 바람직하게는 95% 이상인, 항체.
- [0436] 12. 제1 양태 내지 제11 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 인간 서브클래스 IgG1 또는 인간 서브클래스 IgG4의 항체인 항체.
- [0437] 13. 제1 양태 내지 제12 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 단일클론성 항체인 항체.
- [0438] 14. 서열번호 28의 VH 서열 및 서열번호 33의 VL 서열을 포함하는 항체.
- [0439] 15. 서열번호 19의 VH 서열 및 서열번호 24의 VL 서열을 포함하는 항체.
- [0440] 16. 서열번호 37의 VH 서열 및 서열번호 42의 VL 서열을 포함하는 항체.
- [0441] 17. 제1 양태 내지 제16 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 이중특이성 항체인 항체.
- [0442] 18. 제17 양태에 있어서, 이중특이성 항체가 CrossMab인, 항체.
- [0443] 19. 제1 양태 내지 제18 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 인간 Tie2 수용체로의 인간 ANG2의 결합을 억제함으

로써, 인간 ANG2의 생물학적 활성을 차단하는 항체.

[0444] 20. 제1 양태 내지 제19 양태 중 어느 한 양태에 있어서, a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄, 및 b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄(이때, 제2 경쇄 및 제2 중쇄의 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체됨)를 포함하는 2가 이중특이성 항체로서, 제1 항원 또는 제2 항원이 인간 ANG2인, 항체.

[0445] 21. 제20 양태에 있어서, i) a)의 제1 경쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124의 아미노산이 독립적으로 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)(카밧에 따른 넘버링)(한 바람직한 양태에서, 독립적으로 리신(K) 또는 아르기닌(R))으로 치환되고, a)의 제1 중쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산이 독립적으로 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)(카밧 EU 지수에 따른 넘버링)으로 치환되거나, ii) b)의 제2 경쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124의 아미노산이 독립적으로 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)(카밧에 따른 넘버링)(한 바람직한 양태에서, 독립적으로 리신(K) 또는 아르기닌(R))으로 치환되고, b)의 제2 중쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산이 독립적으로 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)(카밧 EU 지수에 따른 넘버링)으로 치환되는, 항체.

[0446] 22. 제20 양태 또는 제21 양태에 있어서, 제2 중쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124 및 123의 아미노산이 K로 치환되는(카밧 EU 지수에 따른 넘버링), 항체.

[0447] 23. 제20 양태 내지 제22 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 제2 경쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147 및 213의 아미노산이 E로 치환되는(카밧 EU 지수에 따른 넘버링), 항체.

[0448] 24. 제20 양태 내지 제23 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 제1 경쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124 및 123의 아미노산이 K로 치환되고, 제1 중쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147 및 213의 아미노산이 E로 치환되는(카밧 EU 지수에 따른 넘버링), 항체.

[0449] 25. 제20 양태 내지 제24 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 제2 중쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124 및 123의 아미노산이 K로 치환되고, 제2 경쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147 및 213의 아미노산이 E로 치환되고, 제1 경쇄의 가변 도메인 VL에서 위치 38의 아미노산이 K로 치환되고, 제1 중쇄의 가변 도메인 VH에서 위치 39의 아미노산이 E로 치환되고, 제2 중쇄의 가변 도메인 VL에서 위치 38의 아미노산이 K로 치환되고, 제2 경쇄의 가변 도메인 VH에서 위치 39의 아미노산이 E로 치환되는(카밧 EU 지수에 따른 넘버링), 항체.

[0450] 26. 제1 양태 내지 제19 양태 중 어느 한 양태에 있어서, a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄, 및 b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄(이때, 제2 경쇄 및 제2 중쇄의 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되고, 제2 경쇄 및 제2 중쇄의 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체됨)를 포함하는 2가 이중특이성 항체로서, 제1 항원 또는 제2 항원이 인간 ANG2인, 항체.

[0451] 27. 제1 양태 내지 제19 양태 중 어느 한 양태에 있어서, a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄, 및 b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄(이때, 제2 경쇄 및 제2 중쇄의 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체됨)를 포함하는 2가 이중특이성 항체로서, 제1 항원 또는 제2 항원이 인간 ANG2인, 항체.

[0452] 28. 제1 양태 내지 제19 양태 중 어느 한 양태에 있어서, a) 제1 항원에 특이적으로 결합하고 2개의 항체 중쇄 및 2개의 항체 경쇄로 이루어진 전장 항체, 및 b) 1 내지 4개의 항원(즉, 제2 및/또는 제3 및/또는 제4 및/또는 제5 항원, 바람직하게는 하나의 추가적 항원, 즉, 제2 항원)에 특이적으로 결합하는 1, 2, 3 또는 4개의 단일쇄 Fab 단편을 포함하는 다중특이성 항체로서, 이때 b)의 상기 단일쇄 Fab 단편이 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C- 또는 N-말단에서 웨პ티드 연결기를 통해 a)의 상기 전장 항체에 융합되고, 제1 항원 또는 제2 항원이 인간 ANG2인, 항체.

[0453] 29. 제1 양태 내지 제19 양태 중 어느 한 양태에 있어서, a) 제1 항원에 특이적으로 결합하고 2개의 항체 중쇄 및 2개의 항체 경쇄로 이루어진 전장 항체, b) ba) 항체 중쇄 가변 도메인(VH), 또는 bb) 항체 중쇄 가변 도메인(VH) 및 항체 불변 도메인 1(CH1)로 이루어진 제1 폴리웨პ티드(이때, 상기 제1 폴리웨პ티드는 이의 VH 도메인의 N-말단을 사용하여 웨პ티드 연결기를 통해 상기 전장 항체의 2개의 중쇄 중 하나의 중쇄의 C-말단에 융합됨), 및 c) ca) 항체 경쇄 가변 도메인(VL), 또는 cb) 항체 경쇄 가변 도메인(VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인(CL)으로 이루어진 제2 폴리웨პ티드(이때, 상기 제2 폴리웨პ티드는 VL 도메인의 N-말단을 사용하여 웨პ티드 연결기를 통해 상기 전장 항체의 2개의 중쇄 중 나머지 하나의 중쇄의 C-말단에 융합됨)를 포함하는 3가 이중특이성 항체로서, 이때, 제1 폴리웨პ티드의 항체 중쇄 가변 도메인(VH) 및 제2 폴리웨პ티드의 항체 경쇄 가변 도메인(VL)이 함께 제

2 항원에 특이적으로 결합하는 항원-결합 부위를 형성하고, 제1 항원 또는 제2 항원이 인간 ANG2인, 항체.

[0454] 30. 제29 양태에 있어서, b)의 폴리펩티드의 항체 중쇄 가변 도메인(VH) 및 c)의 폴리펩티드의 항체 경쇄 가변 도메인(VL)이 하기 위치 사이에 다이설파이드 결합의 도입에 의한 쇄간 다이설파이드 가교를 통해 연결되고 안정화되는, 항체: i) 중쇄 가변 도메인 위치 44 내지 경쇄 가변 도메인 위치 100, 또는 ii) 중쇄 가변 도메인 위치 105 내지 경쇄 가변 도메인 위치 43, 또는 iii) 중쇄 가변 도메인 위치 101 내지 경쇄 가변 도메인 위치 100(항상 카밧 EU 지수에 따른 넘버링).

[0455] 31. 제1 양태 내지 제19 양태 중 어느 한 양태에 있어서, a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄, 및 b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체의 제2 (변형된) 경쇄 및 제2 (변형된) 중쇄(이때, 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되고/되거나 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체됨), 및 c) 웨პ티드 연결기를 통해 a) 및/또는 b)의 경쇄 또는 중쇄의 C- 또는 N-말단에 융합되는, 1 또는 2개의 추가적 항원(즉, 제3 및/또는 제4 항원)에 특이적으로 결합하는 1 내지 4개의 항원 결합 웨პ티드를 포함하는 삼중특이성 또는 사중특이성 항체로서, 제1 항원 또는 제2 항원 또는 하나의 추가 항원이 인간 ANG2인, 항체.

[0456] 32. 제1 양태 내지 제19 양태 중 어느 한 양태에 있어서, a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 항체(2개의 Fab 단편을 포함함)의 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄, 및 b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 2개의 추가적 Fab 단편(이때, 상기 추가적 Fab 단편은 둘 다 웨პ티드 연결기를 통해 a)의 중쇄의 C- 또는 N-말단에 융합됨)을 포함하는 3가 이중특이성 항체로서, Fab 단편에서 하기 변형이 수행되고, 제1 항원 또는 제2 항원이 인간 ANG2인, 항체: i) a)의 둘 다의 Fab 단편 또는 b)의 둘 다의 Fab 단편에서, 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되고/되거나 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체되거나, ii) a)의 둘 다의 Fab 단편에서, 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되고 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체되고, b)의 둘 다의 Fab 단편에서, 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되거나 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체되거나, iii) a)의 둘 다의 Fab 단편에서, 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되거나 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체되고, b)의 둘 다의 Fab 단편에서 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체되거나, iv) a)의 둘 다의 Fab 단편에서, 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체되고 b)의 둘 다의 Fab 단편에서 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체된다.

[0457] 33. 제1 양태 내지 제19 양태 중 어느 한 양태에 있어서, a) 제1 항원에 특이적으로 결합하고 제1 VH-CH1 도메인 쌍을 포함하는 제1 항체의 (변형된) 중쇄(이때, 상기 제1 항체의 제2 VH-CH1 도메인 쌍의 N-말단은 웨პ티드 연결기를 통해 상기 중쇄의 C-말단에 융합됨), b) a)의 상기 제1 항체의 2개의 경쇄, c) 제2 항원에 특이적으로 결합하고 제1 VH-CL 도메인 쌍을 포함하는 제2 항체의 (변형된) 중쇄(이때, 상기 제2 항체의 제2 VH-CL 도메인 쌍의 N-말단은 웨პ티드 연결기를 통해 상기 중쇄의 C-말단에 융합됨), 및 d) 각각 CL-CH1 도메인 쌍을 포함하는 c)의 상기 제2 항체의 2개의 (변형된) 경쇄를 포함하는 4가 이중특이성 항체로서, 제1 항원 또는 제2 항원이 인간 ANG2인, 항체.

[0458] 34. 제1 양태 내지 제19 양태 중 어느 한 양태에 있어서, a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄, 및 b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 전장 항체의 중쇄 및 경쇄(이때, 중쇄의 N-말단은 웨პ티드 연결기를 통해 경쇄의 C-말단에 연결됨)를 포함하는 이중특이성 항체로서, 제1 항원 또는 제2 항원이 인간 ANG2인, 항체.

[0459] 35. 제1 양태 내지 제19 양태 중 어느 한 양태에 있어서, a) 제1 항원에 특이적으로 결합하고 2개의 항체 중쇄 및 2개의 항체 경쇄로 이루어진 전장 항체, 및 b) VH^2 도메인 및 VL^2 도메인을 포함하는 제2 항원에 특이적으로 결합하는 Fv 단편(이때, 둘 다의 도메인은 다이설파이드 가교를 통해 서로 연결됨)을 포함하는 이중특이성 항체로서, 이때, VH^2 도메인 또는 VL^2 도메인 중 하나 만이 웨პ티드 연결기를 통해 제1 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄에 융합되고, 제1 항원 또는 제2 항원이 인간 ANG2인, 항체.

[0460] 36. 제1 양태 내지 제35 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 제1 Fc-영역 폴리펩티드 및 제2 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하는 항체로서,

[0461] i) 제1 Fc-영역 폴리펩티드가

[0462] - 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,

[0463] - 인간 IgG2 Fc-영역 폴리펩티드,

- [0464] - 인간 IgG3 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0465] - 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0466] - 돌연변이 L234A, L235A를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0467] - 돌연변이 Y349C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0468] - 돌연변이 S354C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0469] - 돌연변이 L234A, L235A, Y349C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0470] - 돌연변이 L234A, L235A, S354C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0471] - 돌연변이 P329G를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0472] - 돌연변이 L234A, L235A, P329G를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0473] - 돌연변이 P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0474] - 돌연변이 P329G, S354C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0475] - 돌연변이 L234A, L235A, P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0476] - 돌연변이 L234A, L235A, P329G, S354C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0477] - 돌연변이 S228P, L235E를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0478] - 돌연변이 S228P, L235E, P329G를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0479] - 돌연변이 Y349C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0480] - 돌연변이 S354C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0481] - 돌연변이 S228P, L235E, Y349C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0482] - 돌연변이 S228P, L235E, S354C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0483] - 돌연변이 P329G를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0484] - 돌연변이 P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0485] - 돌연변이 P329G, S354C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0486] - 돌연변이 S228P, L235E, P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0487] - 돌연변이 S228P, L235E, P329G, S354C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0488] - 돌연변이 K392D를 갖는 인간 IgG1, IgG2 또는 IgG4,
- [0489] - 돌연변이 N392D를 갖는 인간 IgG3
으로 이루어진 군으로부터 선택되고,
- [0490] ii) 제2 Fc-영역 폴리펩티드가
 - 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
 - 인간 IgG2 Fc-영역 폴리펩티드,
 - 인간 IgG3 Fc-영역 폴리펩티드,
 - 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0491] - 돌연변이 L234A, L235A를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0492] - 돌연변이 S354C, T366W를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0493] - 돌연변이 Y349C, T366W를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0494] - 돌연변이 L234A, L235A, S354C, T366W를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0495] - 돌연변이 P329G, L235E, Y349C, T366W를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0496] - 돌연변이 L234A, L235A, S354C, T366W를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0497] - 돌연변이 Y349C, T366W를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0498] - 돌연변이 L234A, L235A, S354C, T366W를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0499] - 돌연변이 P329G, L235E, Y349C, T366W를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,

- [0500] - 돌연변이 L234A, L235A, Y349C, T366W를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0501] - 돌연변이 P329G를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0502] - 돌연변이 L234A, L235A, P329G를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0503] - 돌연변이 P329G, S354C, T366W를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0504] - 돌연변이 P329G, Y349C, T366W를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0505] - 돌연변이 L234A, L235A, P329G, S354C, T366W를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0506] - 돌연변이 L234A, L235A, P329G, Y349C, T366W를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0507] - 돌연변이 S228P, L235E를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0508] - 돌연변이 S228P, L235E, P329G를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0509] - 돌연변이 S354C, T366W를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0510] - 돌연변이 Y349C, T366W를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0511] - 돌연변이 S228P, L235E, S354C, T366W를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0512] - 돌연변이 S228P, L235E, Y349C, T366W를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0513] - 돌연변이 P329G를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0514] - 돌연변이 P329G, S354C, T366W를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0515] - 돌연변이 P329G, Y349C, T366W를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0516] - 돌연변이 S228P, L235E, P329G, S354C, T366W를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0517] - 돌연변이 S228P, L235E, P329G, Y349C, T366W를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드,
- [0518] - 돌연변이 D399K, D356K 및/또는 E357K를 갖는 인간 IgG1, 및
- [0519] - 돌연변이 D399K, E356K 및/또는 E357K를 갖는 인간 IgG2, IgG3 또는 IgG4
로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체.
- [0521] 37. 제1 양태 내지 제35 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 제1 Fc-영역 폴리펩티드 및 제2 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하는 항체로서,
 - i) 제1 Fc-영역 폴리펩티드가 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드이고 제2 Fc-영역 폴리펩티드가 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드이거나,
 - ii) 제1 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 L234A, L235A를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드이고 제2 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 L234A, L235A를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드이거나,
 - iii) 제1 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 L234A, L235A, P329G를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드이고 제2 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 L234A, L235A, P329G를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드이거나,
 - iv) 제1 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 L234A, L235A, S354C, T366W를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드이고 제2 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 L234A, L235A, Y349C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드이거나,
 - v) 제1 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 L234A, L235A, P329G, S354C, T366W를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드이고 제2 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 L234A, L235A, P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG1 Fc-영역 폴리펩티드이거나,
 - vi) 제1 Fc-영역 폴리펩티드가 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드이고 제2 Fc-영역 폴리펩티드가 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드이거나,
 - vii) 제1 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 S228P, L235E를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드이고 제2 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 S228P, L235E를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드이거나,

- [0529] viii) 제1 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 S228P, L235E, P329G를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드이고 제2 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 S228P, L235E, P329G를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드이거나,
- [0530] ix) 제1 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 S228P, L235E, S354C, T366W를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드이고 제2 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 S228P, L235E, Y349C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드이거나,
- [0531] x) 제1 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 S228P, L235E, P329G, S354C, T366W를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드이고 제2 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 S228P, L235E, P329G, Y349C, T366S, L368A, Y407V를 갖는 인간 IgG4 Fc-영역 폴리펩티드인,
- [0532] 항체.
- [0533] 38. 제1 양태 내지 제37 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 제1 Fc-영역 폴리펩티드 및 제2 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하는 항체로서, 제1 Fc-영역 폴리펩티드 및 제2 Fc-영역 폴리펩티드에 하기 돌연변이의 조합을 포함하는, 항체: i) I253A, H310A 및 H435A, 또는 ii) H310A, H433A 및 Y436A, 또는 iii) L251D, L314D 및 L432D, 또는 iv) i) 내지 iii)의 조합.
- [0534] 39. 제1 양태 내지 제37 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 제1 Fc-영역 폴리펩티드 및 제2 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하는 항체로서,
- [0535] a) 제1 및 제2 Fc-영역 폴리펩티드가 둘 다 인간 IgG1 또는 인간 IgG4 서브클래스(인간 기원으로부터 유래됨)의 것이고, i) 군 I253A, H310A 및 H435A, ii) 군 H310A, H433A 및 Y436A, 또는 iii) 군 L251D, L314D 및 L432D(카밧 EU 지수 넘버링 시스템에 따른 넘버링)로부터 선택된 1 또는 2개의 돌연변이를 제1 Fc-영역 폴리펩티드에 포함하고, 돌연변이 L251D, I253A, H310A, L314D, L432D, H433A, H435A 및 Y436A(카밧 EU 지수 넘버링 시스템에 따른 넘버링)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 또는 2개의 돌연변이를 제2 Fc-영역 폴리펩티드에 포함하여, 제1 및 제2 Fc-영역 폴리펩티드내 모든 돌연변이가 함께 취해질 때 돌연변이 i) I253A, H310A 및 H435A, ii) H310A, H433A 및 Y436A, 또는 iii) L251D, L314D 및 L432D가 변이체 (인간) IgG 클래스 Fc-영역에 포함됨을 야기하거나,
- [0536] b) 제1 및 제2 Fc-영역 폴리펩티드가 둘 다 인간 IgG1 또는 인간 IgG4 서브클래스(인간 기원으로부터 유래됨)의 것이고, 둘 다 돌연변이 I253A/H310A/H435A, H310A/H433A/Y436A, L251D/L314D/L432D 또는 이들의 조합을 Fc-영역(카밧 EU 지수 넘버링 시스템에 따른 넘버링)에 포함하여, 모든 돌연변이가 제1 또는 제2 Fc-영역 폴리펩티드에 존재하거나, 1 또는 2개의 돌연변이가 제1 Fc-영역 폴리펩티드에 존재하고 1 또는 2개의 돌연변이가 제2 Fc-영역 폴리펩티드에 존재하여, 제1 및 제2 Fc-영역 폴리펩티드내 모든 돌연변이가 함께 취해져 돌연변이 i) I253A, H310A 및 H435A, ii) H310A, H433A 및 Y436A, 또는 iii) L251D, L314D 및 L432D가 Fc-영역에 포함됨을 야기하거나,
- [0537] c) 제1 및 제2 Fc-영역 폴리펩티드가 둘 다 인간 IgG1 또는 인간 IgG4 서브클래스(즉, 인간 기원으로부터 유래됨)의 것이고, 돌연변이 I253A/H310A/H435A, H310A/H433A/Y436A 또는 L251D/L314D/L432D를 제1 및 제2 Fc-영역 폴리펩티드(카밧 EU 지수 넘버링 시스템에 따른 넘버링)에 포함하거나, 돌연변이 I253A/H310A/H435A의 조합을 제1 Fc-영역 폴리펩티드에 포함하고 돌연변이 H310A/H433A/Y436A의 조합을 제2 Fc-영역 폴리펩티드에 포함하는(카밧 EU 지수 넘버링 시스템에 따른 넘버링),
- [0538] 항체.
- [0539] 40. 제1 양태 내지 제37 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 제1 Fc-영역 폴리펩티드 및 제2 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하는 항체로서,
- [0540] a) 제1 변이체 Fc-영역 폴리펩티드가 제1 모 IgG 클래스 Fc-영역 폴리펩티드로부터 유래되고, 제2 변이체 Fc-영역 폴리펩티드가 제2 모 IgG 클래스 Fc-영역 폴리펩티드로부터 유래되어, 제1 모 IgG 클래스 Fc-영역 폴리펩티드가 제2 모 IgG 클래스 Fc-영역 폴리펩티드와 동일하거나 상이하고,
- [0541] b) 제1 변이체 Fc-영역 폴리펩티드가, 제1 모 IgG 클래스 Fc-영역 폴리펩티드가 제2 모 IgG 클래스 Fc-영역 폴리펩티드와 상이한 아미노산 잔기 이외의 하나 이상의 아미노산 잔기에서 제2 변이체 Fc-영역 폴리펩티드와 상이하고,
- [0542] c) 제1 변이체 Fc-영역 폴리펩티드 및 제2 변이체 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하는 IgG 클래스 Fc-영역이 a)의

제1 모 IgG 클래스 Fc-영역 폴리펩티드 및 a)의 제2 모 IgG 클래스 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하는 IgG 클래스 Fc-영역의 것과 상이한 인간 Fc-수용체에 대한 친화도를 갖고,

- [0543] 제1 Fc-영역 폴리펩티드 또는 제2 Fc-영역 폴리펩티드, 또는 둘 다의 Fc-영역 폴리펩티드가 하기 돌연변이 또는 돌연변이의 조합 중 하나 이상을 서로 독립적으로 포함하는, 항체:
 - T307H, 또는
 - Q311H, 또는
 - E430H, 또는
 - N434H, 또는
 - T307H 및 Q311H, 또는
 - T307H 및 E430H, 또는
 - T307H 및 N434A, 또는
 - T307H 및 N434H, 또는
 - T307Q 및 Q311H, 또는
 - T307Q 및 E430H, 또는
 - T307Q 및 N434H, 또는
 - T307H 및 Q311H 및 E430H 및 N434A, 또는
 - T307H 및 Q311H 및 E430H 및 N434H, 또는
 - T307H 및 Q311H 및 E430H 및 N434Y, 또는
 - T307Q 및 Q311H 및 E430H 및 N434A, 또는
 - T307Q 및 Q311H 및 E430H 및 N434H, 또는
 - T307Q 및 Q311H 및 E430H 및 N434Y, 또는
 - T307Q 및 V308P 및 N434Y 및 Y436H, 또는
 - T307H 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는
 - T307Q 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는
 - Q311H 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는
 - E430H 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는
 - N434H 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는
 - T307H 및 Q311H 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는
 - T307H 및 E430H 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는
 - T307H 및 N434A 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는
 - T307H 및 N434H 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는
 - T307Q 및 Q311H 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는
 - T307Q 및 E430H 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는
 - T307Q 및 N434H 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는
 - T307H 및 Q311H 및 E430H 및 N434A 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는
 - T307H 및 Q311H 및 E430H 및 N434H 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는

- [0576] - T307H 및 Q311H 및 E430H 및 N434Y 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는
- [0577] - T307Q 및 Q311H 및 E430H 및 N434A 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는
- [0578] - T307Q 및 Q311H 및 E430H 및 N434H 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는
- [0579] - T307Q 및 Q311H 및 E430H 및 N434Y 및 M252Y 및 S254T 및 T256E, 또는
- [0580] - T307Q 및 V308P 및 N434Y 및 Y436H 및 M252Y 및 S254T 및 T256E.
- [0581] 41. 제1 양태 내지 제37 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 제1 Fc-영역 폴리펩티드 및 제2 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하는 항체로서, 제1 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V(홀 쇄)를 포함하고, 제2 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 S354C 및 T366W(跛 쇄)를 포함하고, 제1 Fc-영역 폴리펩티드(홀 쇄)가 돌연변이 i) I253A 또는 I253G, 및 ii) L314A 또는 L314G 또는 L314D를 포함하고, 제1 Fc-영역 폴리펩티드 및 제2 Fc-영역 폴리펩티드가 하나 이상의 다이설파이드 가교로 연결되고, 제1 폴리펩티드의 CH3-도메인 및 제2 폴리펩티드의 CH3-도메인 둘 다가 단백질 A에 결합하거나 둘 다 결합하지 않는(카밧 EU 지수에 따른 넘버링), 항체.
- [0582] 42. 제41 양태에 있어서, 돌연변이 i) I253A 또는 I253G, 및 ii) L314A 또는 L314G 또는 L314D, 및 iii) T250Q, 및/또는 iv) T256E 또는 T256A를 포함하는 항체.
- [0583] 43. 제41 양태 또는 제42 양태에 있어서, 돌연변이 i) I253A 또는 I253G, 및 ii) L314A 또는 L314G 또는 L314D, 및 iii) 선택적으로 a) T250Q, 및/또는 T256E 또는 T256A, 및 iv) a) L251A 또는 L251G 또는 L251D, 및/또는 b) H310A 또는 H310G를 포함하는 항체.
- [0584] 44. 제41 양태 내지 제43 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 돌연변이 i) I253A 또는 I253G, 및 ii) L314A 또는 L314G 또는 L314D, 및 iii) a) T250Q, 및/또는 T256E 또는 T256A, 및 iv) a) L251A 또는 L251G 또는 L251D, 및/또는 b) H310A 또는 H310G, v) 선택적으로 a) T307A 또는 T307H 또는 T307Q 또는 T307P, 및/또는 b) Q311H, 및/또는 c) M252Y, 및/또는 d) S254T를 포함하는 항체.
- [0585] 45. 제41 양태 내지 제44 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 돌연변이 i) T250Q, 및/또는 ii) M252Y, 및/또는 iii) S254T, 및/또는 iv) T256E 또는 T256A, 및/또는 v) T307A 또는 T307H 또는 T307Q 또는 T307P, 및/또는 vi) Q311H를 포함하는 항체.
- [0586] 46. a) 서열번호 57의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0587] b) 서열번호 58의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0588] c) 서열번호 59의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0589] d) 서열번호 60의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0590] e) 서열번호 61의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0591] f) 서열번호 62의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0592] g) 서열번호 63의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0593] h) 서열번호 64의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0594] i) 서열번호 65의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0595] j) 서열번호 46의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 66의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0596] k) 서열번호 46의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0597] l) 서열번호 68의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0598] m) 서열번호 69의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 50의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0599] n) 서열번호 70의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0600] o) 서열번호 47의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0601] p) 서열번호 71의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;

- [0602] q) 서열번호 72의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0603] r) 서열번호 73의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0604] s) 서열번호 72의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 50의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0605] t) 서열번호 73의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 50의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0606] u) 서열번호 48의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0607] v) 서열번호 48의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 50의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0608] w) 서열번호 74의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0609] x) 서열번호 74의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 50의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0610] y) 서열번호 47의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 50의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0611] z) 서열번호 51의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0612] aa) 서열번호 52의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0613] ab) 서열번호 52의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 50의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0614] ac) 서열번호 53의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 50의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0615] ad) 서열번호 47의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 78의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0616] ae) 서열번호 48의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 78의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0617] af) 서열번호 46의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 50의 아미노산 서열을 갖는 경쇄;
- [0618] ag) 서열번호 83의 아미노산 서열을 갖는 제1 중쇄, 서열번호 81의 아미노산 서열을 갖는 제2 중쇄, 서열번호 84의 아미노산 서열을 갖는 제1 경쇄 및 서열번호 82의 아미노산 서열을 갖는 제2 경쇄;
- [0619] ah) 서열번호 85의 아미노산 서열을 갖는 제1 중쇄, 서열번호 81의 아미노산 서열을 갖는 제2 중쇄, 서열번호 86의 아미노산 서열을 갖는 제1 경쇄 및 서열번호 82의 아미노산 서열을 갖는 제2 경쇄;
- [0620] ai) 서열번호 89의 아미노산 서열을 갖는 제1 중쇄, 서열번호 87의 아미노산 서열을 갖는 제2 중쇄, 서열번호 90의 아미노산 서열을 갖는 제1 경쇄 및 서열번호 88의 아미노산 서열을 갖는 제2 경쇄;
- [0621] aj) 서열번호 81의 아미노산 서열을 갖는 제1 중쇄, 서열번호 87의 아미노산 서열을 갖는 제2 중쇄, 서열번호 92의 아미노산 서열을 갖는 제1 경쇄 및 서열번호 88의 아미노산 서열을 갖는 제2 경쇄
- [0622] 를 포함하는 단리된 항체 또는 단리된 항체 Fab 단편.
- [0623] 47. 제41 양태 내지 제46 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 약제로서 사용하기 위한 항체.
- [0624] 48. 제41 양태 내지 제46 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 안구 혈관 질병의 치료에 사용하기 위한 항체.
- [0625] 49. 안구 질병, 특히 안구 혈관 질병의 치료를 위한 제41 양태 내지 제46 양태 중 어느 한 양태에 따른 항체의 용도.
- [0626] 50. 제41 양태 내지 제46 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 안구 질병의 치료에 사용하기 위한 항체.
- [0627] 51. 제41 양태 내지 제46 양태 중 어느 한 양태에 있어서, 안구 질병, 특히 안구 혈관 질병의 치료에 사용하기 위한 항체.
- [0628] 52. 제41 양태 내지 제46 양태 중 어느 한 양태에 따른 항체의 효과량을 개체에게 투여함을 포함하는, 안구 혈관 질병을 갖는 개체의 치료 방법.
- [0629] 53. 제41 양태 내지 제46 양태 중 어느 한 양태에 따른 항체를 포함하는 약학 제형.
- [0630] 54. 제1 양태 내지 제46 양태 중 어느 한 양태에 따른 항체를 포함하는, 안구 혈관 질병의 치료에 사용하기 위한 약학 제형.
- [0631] 55. 안구 혈관 질병의 치료용 약제의 제조를 위한 제41 양태 내지 제46 양태 중 어느 한 양태에 따른 항체의

용도.

- [0632] 56. 제41 양태 내지 제46 양태 중 어느 한 양태에 따른 항체를 이러한 치료를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써, 안구 혈관 질병을 앓는 환자를 치료하는 방법.
- [0633] 57. 제53 양태 또는 제54 양태에 있어서, 항체가 유리체내 적용을 통해 투여되는, 약학 제형.
- [0634] 58. 투여가 유리체내 적용인, 제56 양태 또는 제57 양태에 기술된 투여.
- [0635] 59. 제41 양태 내지 제46 양태 중 어느 한 양태에 따른 항체를 암호화하는 핵산.
- [0636] 60. 제41 양태 내지 제46 양태 중 어느 한 양태에 따른 항체를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 세포.
- [0637] 61. a) 선택적으로 포유동물 세포를, 제41 양태 내지 제46 양태 중 어느 한 양태에 따른 항체를 암호화하는 하나 이상의 핵산으로 형질감염시키는 단계; b) 세포를 배양하여 항체를 발현시키는 단계; 및 c) 세포 또는 배양 배지로부터 항체를 회수하여 항체를 제조하는 단계를 포함하는, 제41 양태 내지 제46 양태 중 어느 한 양태에 따른 항체의 제조 방법.

V. 실시예

[0639] 하기는 본 발명의 방법 및 조성물의 실시예이다. 상기 제공된 일반적 기재를 고려하여 다양한 다른 양태가 실행될 수 있음이 이해된다.

재료 및 방법

클로닝:

[0642] 점 돌연변이를, 퀵체인지(QuikChange) II XL 부위-지향된 돌연변이유발 키트(아길런트 테크놀로지스(Agilent Technologies))를 사용하여 도입하였다. 몇개의 단일 콜로니를 집고, 4 mL의 LB-Amp 배지에 전달하고, 37°C에서 16 내지 18시간 동안 배양하였다. 원심분리함으로써, 이의 2 mL를 수확하고, 이어서 제조사의 지시에 따라 고순도 플라스미드 단리 키트(로슈 다이아그노스틱스 게엠베하(Roche Diagnostics GmbH), 독일 만하임 소재)에 의해 플라스미드를 제조하였다. 시퀀싱에 의해 확인한 후, 플라스미드를 대장균 세포(아길런트 테크놀로지스)에서 재형질전환시켰다. 단일 콜로니를 2 mL의 LB-Amp 배지에 전달하고, 37°C에서 6 내지 8시간 동안 배양하였다. 이어서, 200 μL의 상기 배양물을 사용하여 진탕 플라스크 중 150 mL LB-Amp 배지를 접종하였다. 배양물은 37°C에서 300 rpm으로 밤새 항온처리하고, 이어서 원심분리에 의해 세포를 수확하였다. 플라스미드 제조를 제조사의 지시에 따라 하이스피드 플라스미드 막시 키트(HiSpeed Plasmid Maxi Kit)(키아젠(Qiagen))로 수행하였다.

[0643] 돌연변이된 CrossFab를 CrossFab 및 CrossMab-콜격-플라스미드 내의 VH-영역 또는 VL-영역을 변화시킴으로써, 제한 측면을 통해 클로닝을 위한 주형으로서 사용하였다. 동일한 쌍의 제한 효소를 갖는 주형 및 골격-플라스미드의 분해 후에, 혼합물 1% 아가로스 겔에 첨가하여 공여자-DNA(VH- 또는 VL-영역) 및 수용자-DNA(플라스미드 콜격)를 단리하였다. 이어서, 아가로스-조각을 고순도 PCR 생성물 정제 키트(로슈 다이아그노스틱스 게엠베하, 독일 만하임 소재)로 정제하였다. 이어서, 수용자-DNA를 rAPid 알칼리성 포스파타제(로슈 다이아그노스틱스 게엠베하, 독일 만하임 소재)로 탈인산화시키고, 이어서 수용자-DNA 및 공여자-DNA를 신속 DNA 결찰 키트(로슈 다이아그노스틱스 게엠베하, 독일 만하임 소재)로 결찰시켰다. 결찰된 DNA를 대장균 세포(아길런트 테크놀로지스) 내로 형질전환시켰다.

일시적인 발현

[0645] HEK293F 세포(인비트로겐(Invitrogen))를 125 mL 진탕 플라스크(37°C에서 항온처리/진탕, 7% CO₂, 85% 습도, 135 rpm)에서 해동한 후 희석에 의해 적어도 4회(부피 30 mL) 계대배양시켰다.

[0646] 세포를 250 mL 부피에서 3×10^5 세포/mL까지 팽창시켰다. 3일 후, 세포를 분할하고, 1 L 진탕 플라스크에서 250 mL 부피에서 7×10^5 세포/mL의 밀도로 새롭게 시딩하였다. 형질감염을 약 1.4 내지 2.0×10^6 세포/mL의 세포 밀도로 24시간 후에 수행하였다.

[0647] 형질감염 전에, 250 μg 플라스미드-DNA(122 μg 경쇄 플라스미드 및 128 μg 중쇄 플라스미드)를 예열된(수육; 37°C) Opt i-MEM 배지(깁코(Gibco))로 10 mL의 최종 부피로 희석하였다. 용액을 천천히 혼합하고, 실온에서 5분 이하 동안 항온처리하였다. 이어서, 333.3 μL 293-자유 형질감염 시약을 DNA-Opt iMEM-용액에 첨가하였다. 용액

액을 천천히 혼합하고, 실온에서 15 내지 20분 동안 항온처리하였다. 혼합물의 전체 부피를 250 mL HEK-세포-배양물-부피를 갖는 1 L 진탕 플라스크에 첨가하였다. 플라스크를 37°C에서, 7% CO₂, 85% 습도, 135 rpm으로 6 또는 7일 동안 항온처리/진탕하였다. 상청액을 제1 원심분리 단계에 의해 2,000 rpm으로, 4°C에서 10분 동안 수화하였다. 상청액을, 4,000 rpm으로, 4°C에서 20분 동안의 제2 원심분리 단계를 위해 새로운 원심분리 플라스크로 옮겼다. 이어서, 세포-부재 상청액을 0.22 μm 바틀-탑-필터(bottle-top-filter)를 통해 여과하고 냉동기에 저장하였다(-20°C).

[0648] 정제

[0649] 항체 및 CrossMab^{CH1-CL}을, 맙실렉트슈어-세파로스(MabSelectSure-Sepharose: 상표)(지이 헬스케어, 스웨덴 소재)를 사용하는 친화성 크로마토그래피에 의해 세포 배양물 상청액으로부터 정제한 반면, AAA 돌연변이를 갖는 Fab, CrossFab 및 Ang2VEGF CrossMab를, 카파실렉트-아가로스(KappaSelect-Agarose)(비-Fc-영역-함유 결합 도메인의 경우)(지이 헬스케어, 스웨덴 소재), 및 이어서 부틸-세파로스(지이 헬스케어, 스웨덴 소재)를 사용하는 소수성 상호작용 크로마토그래피 및 슈퍼덱스(Superdex) 200 크기 배제(지이 헬스케어, 스웨덴 소재) 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다.

[0650] 간략하게, 항체 및 CrossMab를 PBS 완충액(10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl 및 2.7 mM KCl, pH 7.4)에 의해 평형이 유지된 맑실렉트슈어 수지 상에서 멸균 여과된 세포 배양물 상청액으로부터 포획하고, 평형 완충액으로 세척하고, 25 mM 나트륨 시트레이트로 pH 3.0에서 용리하였다. Fab를 25 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7.2로 평형이 유지된 카파실렉트 수지 상에서 포획하고, 평형 완충액으로 세척하고, 25 mM 나트륨 시트레이트 pH 2.9로 용리하였다. 용리된 항체 또는 Fab 함유 분획을 풀링하고, 2 M Tris, pH 9.0로 중화시켰다. 항체/Fab 풀을 1.6 M 암모늄 살레이트 용액을 0.8 M 암모늄 살레이트의 최종 농도까지 첨가함으로써 소수성 상호작용 크로마토그래피를 위해 제조하였다. 아세트산을 사용하여 pH를 pH 5.0까지 조정하였다. 35 mM 나트륨 아세테이트, 0.8 M 암모늄 살레이트, pH 5.0에 의한 부틸-세파로스의 평형 후, 항체를 수지에 적용하고, 평형 완충액으로 세척하고, 0 내지 35 mM의 나트륨 아세테이트(pH 5.0)의 선형 구배를 사용하여 용리하였다. 이중특이성 항체/항체 또는 Fab 함유 분획을 풀링하고, 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0으로 평형이 유지되는 슈퍼덱스 200 26/60 GL(지이 헬스케어, 스웨덴 소재) 컬럼을 사용하는 크기 배제 크로마토그래피로 더욱 정제하였다. 항체 또는 Fab를 각각 함유하는 분획을 풀링하고, 비바스핀(Vivaspin) 한외여과 장치(사르토리우스 스테דים 바이오텍 에스에이(Sartorius Stedim Biotech S.A.), 프랑스 소재)를 사용하여 요구되는 농도까지 농축하고, -80°C에서 저장하였다.

[0651] CE-SDS 분석학

[0652] 순도 및 항체 무결성을 각각의 정제 단계 후에, 미소유체 랩칩(Labchip) 기술(칼리퍼 라이프 사이언스(Caliper Life Science), 미국 소재)을 사용하는 CE-SDS에 의해 분석하였다. 따라서, 5 μL의 분석물 용액을, 제조사의 지시에 따라 HT 단백질 발현 시약 키트(Protein Express Reagent Kit)를 사용하여 제조하고, HT 단백질 발현 칩을 사용하여 랩칩 GXII 시스템 상에서 분석하였다. 랩칩 GX 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0653] 실시예 1

[0654] 안지오포이에틴-2(ANG2)에 결합하는 교차된 항체(CrossMab) 및 교차된 항체 Fab 단편(CrossFab)

[0655] 교차된 항체(CrossMab) 또는 교차된 단편 항원 결합(CrossFab)은 분자생물학 기술에 의해 방법 섹션에 기술된 클로닝에 의해 생성되었고, 상기 HEK293 세포에서 일시적으로 발현되었다.

[0656] CDR에서 특정 점 돌연변이를 갖는 생성된 항체 및 Fab의 일반적인 계획은 표 1에 제공된다. 교차된 항체 및 교차된 Fab는 표 1에 제시된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 함유하는 발현 플라스미드에 의해 발현된다.

[0657]

[표 1]

본원에 보고된 항-ANG2 CrossFab의 아미노산 서열

분자	돌연변이 VH	VH-X 서열 ID	돌연변이 VL	VL-X 서열 ID
XAng2-0009	wt	46	wt	49
XAng2-0015	S108P	57	wt	49
XAng2-0017	S-S 가교 S55C-D100BC	59	wt	49
XAng2-0021	G100JA	60	wt	49
XAng2-0026	T28N, T30A	62	wt	49
XAng2-0029	S108P, G100JA	65	wt	49
XAng2-0033	T28N, S108P, G100JA	68	wt	49
XAng2-0041	T30A, T28N, S108P, G100JA	47	wt	49
XAng2-0075	T30A, T28N, S108P, G100JA, D100BS	48	D50T	50
XAng2-0090	T30A, T28N, S108P, G100JA	47	D50T	50
XAng2-0098	wt	51	wt	49
XAng2-0099	G100JA, S108P, T28N, T30A	52	wt	49
XAng2-0100	G100JA, S108P, T28N, T30A	52	D50T	50
XAng2-0101	G100JA, S108P, T28N, T30A, D100BE	53	D50T	50
Xang2-0154	wt	46	wt	77

[0658]

분자	돌연변이 VH	VH-X 서열 ID	돌연변이 VL	VL-X 서열 ID
XAng2-0155	T30A, T28N, S108P, G100JA	47	D50T	78
XAng2-0156	T30A, T28N, S108P, G100JA, D100BS	48	D50T	78
XAng2-0157	wt (Ang2i-LC06)	46	D50T	50

[0659]

[0660]

실시예 2

[0661] ANG2 결합에서 CL-CH1 도메인 교환(CrossMab^{CH1/CL})에 의해, 안지오포이에틴-2(ANG2) 및 혈관 내피 성장 인자(VEGF)에 결합하는 교차된 2가 이중특이성 항체(CrossMab)

[0662] ANG2 Fab 아암에서 CH1-CL 크로스오버를 갖는 ANG2-VEGF CrossMab^{CH1-CL}은 분자생물학 기술을 사용하는 상기 클로닝에 의해 생성되었고, 상기한 바와 같이 HEK293 세포에서 일시적으로 발현된다

[0663] CDR에서 특정 점 돌연변이를 갖는 생성된 ANG2-VEGF CrossMabs^{CH1-CL}의 일반적인 계획은 표 2에 제공된다. ANG2-VEGF CrossMabs^{CH1-CL}은 표 2에 제시된 아미노산 서열을 코팅하는 핵산을 함유하는 벌현 플라스미드에 의해 발현된다.

[0664] [표 2]

본원에 보고된 항-ANG2/VEGF 이중특이성 2 가 CrossMab^{CH1-CL} 의 아미노산
서열

분자	ANG2 결합 부위				VEGF 결합 부위	
	돌연변이 VH	<VH-CL- CH2-CH3> 서열번호	돌연변이 VL	<VL-CH1> 서열번호	HC 서열번호	LC 서열번호
Xang2-0162	wt	79	wt	80	81	82
Xang2-0163	T30A, T28N, S108P, G100JA	83	D50T	84	81	82
Xang2-0164	T30A, T28N, S108P, G100JA, D100BS	85	D50T	86	81	82
Xang2-0165	T30A, T28N, S108P, G100JA	89	D50T	90	87	88
Xang2-0166	T30A, T28N, S108P, G100JA, D100BS	91	D50T	92	87	88
Xang2-0167	wt	93	wt	94	87	88

[0665]

[0666] 모든 구축물을 위해, 능-인투-홀 이종이량체화 기술을 제1 CH3 도메인 중 전형적인 능(T366W) 돌연변이 및 제2 CH3 도메인 중 상응하는 홀 돌연변이(T366S, L368A 및 Y407V)(및 2개의 추가적 도입된 시스테인 잔자 S354C/Y349C)(각각 상응하는 상기 도시된 중쇄(HC) 서열에 함유됨)와 함께 사용하였다.

[0667] 실시예 3

[0668] HEK 세포에서 ANG2 결합 CrossFab, 항체 및 Ang2-VEGF CrossMab^{CH1-CL}의 형질감염 및 일시적인 발현

[0669] 형질감염 시약 293-프리(노바젠(Novagen))를 사용한 혼탁액-적합화된 HEK293F(프리스타일(FreeStyle) 293-F 세포; 인비트로겐) 세포에서 항체의 일시적인 발현을 수행하였다.

[0670] 125 mL 진탕 플라스크(37°C, 7% CO₂, 85% 습도, 135 rpm에서 항온처리/진탕)에서 해동한 후에, 세포를 4회 이상(부피 30 mL) 연속 희석시켰다.

[0671] 세포를 250 mL 부피에서 3×10^5 세포/mL로 확장시켰다. 3일 후에, 세포를 분할하고 1 L 진탕 플라스크 중에서 250 mL 부피에서 7×10^5 세포/mL의 밀도로 새로이 시딩하였다. 형질감염을 24시간 후에 약 1.4 내지 2.0×10^6 세포/mL의 세포 밀도로 수행하였다.

[0672] 형질감염 전에, 250 μg 플라스미드-DNA(122 μg 경쇄 및 128 μg 중쇄)를 예열된(수육; 37°C) Opti-MEM(집코)을 사용하여 10 mL의 최종 부피로 희석하였다. 용액을 부드럽게 혼합하고 실온에서 5분 이하 동안 항온처리하였다. 이어서, 333.3 μL 293-프리 형질감염 시약을 DNA-OptiMEM-용액에 첨가하였다. 부드럽게 혼합하고 실온에서 15 내지 20분 동안 항온처리하였다. 전체 부피의 혼합물을 250 mL HEK-세포-배양-부피를 갖는 1 L 진탕 플라스크에 첨가하였다.

[0673] 37°C, 7% CO₂, 85% 습도, 135 rpm에서, 6 또는 7일 동안 항온처리/진탕하였다.

[0674] 2,000 rpm, 4°C에서, 10분 동안 제1 원심분리 단계에 의해 상청액을 채취하였다. 이어서, 상청액을 4,000 rpm, 4°C에서, 20분 동안의 제2 원심분리를 위한 새로운 원심분리 플라스크에 이동시켰다. 이후, 무세포 상청액을 0.22 μm 바틀-탑-필터를 통해 여과하고 냉동고(-20°C)에 저장하였다.

실시예 4

HEK 상청액으로부터의 Fab 정제

[0675] 항체-함유 세포 배양물 상청액을 여과하고, 2개의 크로마토그래피 단계에 의해 정제하였다. AAA 돌연변이를 갖는 CrossFab 및 CrossMAb를, 카파실렉트(지이 헬스케어)를 사용하는 친화성 크로마토그래피로 포획하고, 추가적인 HIC 및 SEC 크로마토그래피 단계에 의해 팔리싱(polishing)하였다. 상세한 내용은 상기 재료 및 방법 섹션을 참고한다.

실시예 5

HEK 상청액으로부터의 CrossMAb^{CH1-CL} 정제

[0676] 배양물 상청액을 여과하고 3개의 크로마토그래피 단계에 의해 정제하였다. 항체를, 하이트랩 맵실렉트슈어(지이 헬스케어)를 사용하는 친화성 크로마토그래피에 의해 포획하고, HIC 및 SEC 크로마토그래피 단계로 팔리싱하였다. 항체 함유 용액을, 바이오맥스(Biomax)-SK 막이 장착된 울트라프리(Ultrafree)-CL 원심분리 필터 장치(밀리포어(Millipore), 미국 매사추세츠주 빌러리카 소재)로 농축하고, -80°C에서 저장하였다.

실시예 6

CrossFab 및 CrossMAb^{CH1-CL} 제조의 분석법

[0677] 제제의 단백질 농도를 아미노산 서열을 기반으로 계산된 몰 흡광 계수를 사용하여 280 nm에서 광학 밀도(OD)를 측정함으로써 결정하였다.

[0678] 항체의 순도 및 일체성을 단백질 발현 칩 및 HT 단백질 발현 시약 키트를 갖는 랩칩(LabChip) GX II(퍼킨엘머(PerkinElmer))를 사용하여 CE-SDS에 의해 분석하였다.

[0679] 항체 제제의 응집 함량을 러닝 완충액으로서 2xPBS(pH 7.4)를 사용하는 TSK-GEL G3000SWXL을 사용하는 고성능 SEC에 의해, 또는 러닝 완충제로서 200 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 250 mM KCl(pH 7.0)을 사용하는 바이오스위트(BioSuite) 고해상도 SEC, 250 Å, 5 μm 분석적 크기 배재 컬럼(워터스 게임베하(Waters GmbH))을 사용하는 고성능 SEC에 의해 결정하였다.

실시예 7

항체로부터의 Fab 단편의 제조 및 분석법

[0680] 12 mg 항체(20 mM 히스티딘 중 1 mg/mL, 140 mM NaCl, pH 6.0)를 240 μL L-시스테인 용액(메르크 밀리포어; 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl 중 250 mM, pH 6.0) 및 327 μL 파파인(로슈 라이프 사이언스; 0.001 U/mg 항체)과 함께 120분 동안 37°C에서 항온처리하였다. 절단 후에, PBS(1 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl)(pH 7.4)와 평형을 이루는 하이트랩 맵실렉트슈어(지이 헬스케어)를 사용하는 친화성 크로마토그래피를 온전한 IgG 및 Fc 단편의 제거에 사용하였다. 이어서, 맵실렉트슈어 크로마토그래피의 통과액을 제2 정제

단계로서 슈퍼텍스 200(상표, 지이 헬스케어) 상에 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 추가로 정제하였다. 크기 배제 크로마토그래피를 20 mM 히스티딘 완충제, 0.14 M NaCl(pH 6.0) 중에서 수행하였다. Fab 단편 함유 용액을 바이오맥스-SK 막(밀리포어(미국 매사추세츠주 빌레리카 소재))을 갖춘 울트라프리-CL 원심분리 필터 유닛으로 농축하고 -80°C에서 저장하였다.

[0689] Fab 단편의 단백질 농도를 아미노산 서열을 기반으로 계산된 몰 흡광 계수를 사용하여 280 nm에서 광학 밀도 (OD)를 측정함으로써 결정하였다.

[0690] Fab 단편의 순도 및 무결성을 환원제(5 mM, 1,4-다이티오토레이톨) 및 심플리 블루 세이프 스테인(인비트로겐) 염색의 존재 및 부재 하에 SDS-PAGE(NuPAGE 4-12% 비스-트리스 겔, 인비트로겐)에 의해 분석하였다.

[0691] Fab 제제의 응집 함량을 러닝 완충액으로서 200 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 250 mM KC1(pH 7.0)을 사용하는 바이오스위트 고해상도 SEC, 250 Å, 5 μm 분석적 크기 배제 컬럼(워터스 게임베하)을 사용하는 고성능 SEC에 의해 결정하였다.

실시예 8

성숙한 CrossFab의 ANG2 결합 동역학 및 크로스-반응성

[0694] 인간 ANG2-RBD-Fc-영역 융합에 대한 성숙된 CrossFab의 결합을 바이아코어 T200 기구(지이 헬스케어)를 사용하여 표면 플라스몬 공명에 의해 조사하였다. 약 4000 RU의 항-인간 항체(10 μg/mL 항-인간 IgG(Fc) 항체; 주문 코드 BR-1008-39; 지이 헬스케어)를 시리즈 S CM5 칩(지이 헬스케어 BR-1005-30) 상에 pH 5.0에서 지이 헬스케어가 공급하는 아민 커플링 키트를 사용하여 커플링하였다. HBS-N(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4, 지이 헬스케어)을 고정 절차 동안 러닝 완충액으로서 사용하였다. 하기 동역학 특징규명을 위해, 샘플 및 러닝 완충액은 HBS-P(10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7.4, 0.05% 계면활성제 P20; 지이 헬스케어)였다. 유동 세포를 25°C로 설정하고, 샘플 블록을 12°C로 설정하고, 동역학 특징규명 전에 러닝 완충액으로 2회 프라이밍하였다.

[0695] 인간 또는 사이노몰구스 ANG2-RBD-Fc-영역 융합을 5 μL/분의 유속으로 1 μg/mL 용액을 30초 동안 주입함으로써 채취하였다. 결합율, 300 nM로 출발하여 연속 1:3 회석하면서 용액 중 다양한 농도로 90초 동안 90 μL/분의 유속으로 CrossFab의 주입에 의해 측정하였다. 해리 상을 600초 이하 동안 모니터링하고 샘플 용액에서 러닝 완충액으로 전환함으로써 촉발하였다. 모든 표면을, 60초 동안 5 μL/분의 유속으로 3 M MgCl₂ 용액으로 세척함으로써 재생하였다. 별크 굴절률 차이를 항-인간 IgG 항체(Fc) 표면으로부터 수득된 반응을 공제함으로써 정정하였다. 또한, 블랭크 주입을 공제하였다(= 이중 레퍼레싱). KD 및 다른 동역학 변수의 계산을 위해, 랭류어 1:1 모델을 사용하였다.

실시예 9

생물학적 활성

[0698] 본 방법은 ANG2의 이의 수용체 Tie2에 대한 결합을 억제하는 항체의 수용력을 결정한다. 세포 표면 상에서 Tie2 수용체 티로신 키나제의 발현을 위해, HEK293 세포주, 인간 배아 신장 세포주를 인간 Tie2의 발현 벡터로 안정하게 형질감염시켜 세포주 HEK293_Tie2를 생성하였다.

[0699] 세포를 Tie2 수용체에 결합하고 수용체의 자기 인산화를 유도하는 ANG2로 자극하였다. Tie2에 대한 결합은 본원에 보고된 항-ANG2 항체의 첨가에 의해 억제할 수 있다. 인산화의 등급을 ELISA에 의해 분석하였다. OD 값은 인산화된 Tie2의 양과 관련이 있고 항체 농도에 대해 플롯팅하였다. EC₅₀ 값을, 동일한 플레이트 상에 참조 표준과 비교하여 상대적 생물학적 활성(RBA)으로서 보고하였다.

[0700] 멀티-웰 플레이트를 인간 Tie2 수용체에 대한 항체로 코팅하였다(100 μL, 10 μg/mL; 알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 MAB3132; 96 웰 막시소르브(Maxisorb) 이뮤노 플레이트, 밤새 실온에서 항온처리됨; 코팅된 플레이트를 3회 세척함, 부피 250 μL; 이후, 200 μL 블록킹 1 내지 2시간 동안 실온에서 항온처리함).

[0701] 별개로 HEK293_Tie2 세포(40 μL; 5x10⁶ 세포/mL; DMEM/F12)를 해당 항체 및 ANG2(알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 623-CF)의 회석 시리즈의 미리 항온처리된 혼합물(80 μL)에 첨가하였다. 10분 후에, 세포를 용해시키고 (60 μL 용해 완충제를 첨가함; 15분 동안 항온처리함), 세포 용해물을 ELISA를 위해 코팅된 플레이트에 옮겼다.

[0702] 용해물의 Tie2 수용체는 결합하여 항-Tie2 항체를 채취한다(100 μL 용해물; 90분 동안 실온에서 항온처리함).

Tie2 수용체 상에 인산화된 티로신을 비오틴에 접합된 항-포스포티로신 항체에 의해 검출하였다(100 μL; 0.3 μg/mL 항-포스포티로신 항체, 클론 4G10(등록상표), 비오틴 접합체, 업스테이트(Upstate), 카탈로그 번호 16-103; 60분 동안 실온에서 항온처리함). 바이오틴 잔기는 스트렙타비딘-고추냉이 과산화효소 접합체(100 μL; 100 mU/mL; 로슈 다이아그노스틱스 게엠베하(독일 만하임 소재), 카탈로그 번호 11089153001; 30분 동안 실온에서 항온처리함)에 의해 결합되었다. 페옥시다제 기질 TMB(100 μL; 로슈 다이아그노스틱스 게엠베하(독일 만하임 소재), 카탈로그 번호 11835033001)를 첨가하고, 광학 밀도는 5 내지 10분 후에 450 nm에서 측정하였다.

[0703] 실시예 10

[0704] 화학적 분해 분석

[0705] 샘플을 3개의 분취액으로 분할하고, 20 mM His/His*HCl, 140 mM NaCl(pH 6.0) 또는 PBS 내에 각각 재완충시키고 40°C(His/NaCl) 또는 37°C(PBS)에서 저장하였다. 대조군 샘플을 -80°C에서 저장하였다.

[0706] 항온처리를 종료한 후에, 샘플을 상대 활성 농도(바이아코어), 응집(SEC) 및 단편화(모세관 전기이동 또는 SDS-PAGE)에 대하여 분석하고 미처리된 대조군과 비교하였다.

[0707] 실시예 11

[0708] 열적 안정성

[0709] 샘플을 20 mM 히스티딘/히스티딘 클로라이드, 140 mM NaCl(pH 6.0) 중에서 1 mg/mL의 농도로 제조하고, 0.4 μm 필터 플레이트를 통한 원심분리에 의해 광학 384-웰 플레이트 내로 이동시키고 파라핀 오일로 덮었다. 샘플을 0.05°C/분의 속도로 25°C에서 80°C로 가열하면서, 수력학적 반경을 동적 광산란에 의해 다이나프로(DynaPro) 플레이트 리더(와트(Wyatt)) 상에 반복적으로 측정하였다.

[0710] 다르게는, 샘플을 10 μL 마이크로-큐벳 어레이 내로 이동시키고, 이를 0.1°C/분의 속도로 25°C에서 90°C로 가열하면서 고정적 광산란 데이터 및 266 nm 레이저를 사용한 여기시 형광 데이터를 옵팀(Optim)1000 기구(아박타 인코포레이티드(Avacta Inc.))로 기록하였다.

[0711] 응집 개시 온도는 수력학적 반경(DLS) 또는 산란광 강도(옵팀1000)가 증가하기 시작하는 온도로서 정의된다.

[0712] 다르게는, 샘플을 9 μL 멀티-큐벳 어레이에 옮겼다. 멀티-큐벳 어레이를 옵팀1000 기기(아박타 어낼리티컬 인코포레이티드)에서 0.1 °C/분의 일정한 속도로 35°C로부터 90°C까지 가열하였다. 상기 기기는 266 nm 레이저의 산란된 빛의 강도를 대략적으로 0.5°C마다 기록한다. 빛의 산란 강도를 온도에 대한 도표로 그렸다. 응집 발생 온도(T_{agg})는 산란된 빛의 강도가 증가하기 시작하는 온도로서 정의된다.

[0713] 용융 온도는 형광 강도 대 광장 그래프에서 변곡점으로서 정의된다.

[0714] 전술한 본 발명은 이해의 명확성을 위해 예시 및 실시예로서 다소 상세하게 설명되었지만, 설명 및 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본원에 인용된 모든 특허 및 과학 문헌의 개시는 그 전체가 참조로 명확히 포함된다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> ANTI-ANG2 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

<130> P32413-WO

<140> PCT/EP2015/075876

<141> 2015-11-06

<150> EP14192524.8

<151> 2014-11-10

<160> 94

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 VH

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 HVR-H1

<400> 2

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

1 5

<210> 3

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 HVR-H2s

<400> 3

Asn Ser Gly

1

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 HVR-H2

<400> 4

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

1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 HVR-H3

<400> 5

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

1 5 10 15

Phe Asp

<210> 6

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 VL

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 HVR-L1

<400> 7

Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser

1 5

<210> 8

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 HVR-L2

<400> 8

Asp Asp Ser

1

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 HVR-L3

<400> 9

Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp

1 5

<210> 10

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC06 VH

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ser

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC06 HVR-H1

<400> 11

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

1 5

<210> 12

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC06 HVR-H2s

<400> 12

Asn Ser Gly

1

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC06 HVR-H2

<400> 13

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

1 5 10 15

Gly

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC06 HVR-H3

<400> 14

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

1 5 10 15

Phe Asp

<210> 15

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC06 VL

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC06 HVR-L1

<400> 16

Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser

1 5

<210> 17

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC06 HVR-L2

<400> 17

Asp Asp Ser

1

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC06 HVR-L3

<400> 18

Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr

1 5

<210> 19

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) VH

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115

120

125

Ser

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) HVR-H1

<400> 20

Gly Tyr Asn Phe Ala Gly Tyr

1 5

<210> 21

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) HVR-H2s

<400> 21

Asn Ser Gly

1

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) HVR-H2

<400> 22

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

1 5 10 15

Gly

<210> 23

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) HVR-H3

<400> 23

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

1 5 10 15

Phe Asp

<210> 24

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) VL

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) HVR-L1

<400> 25

Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser

1 5

<210> 26

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) HVR-L2

<400> 26

Asp Asp Ser

1

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) HVR-L3

<400> 27

Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp

1 5

<210> 28

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) VH

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Asp Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

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

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) HVR-H1

<400> 29

Gly Tyr Asn Phe Ala Gly Tyr

1 5

<210> 30

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) HVR-H2s

<400> 30

Asn Ser Gly

1

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) HVR-H2

<400> 31

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

1 5 10 15

Gly

<210> 32

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) HVR-H3

<400> 32

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

1 5 10 15

Phe Asp

<210> 33

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) VL

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) HVR-L1

<400> 34

Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser

1 5

<210> 35

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) HVR-L2

<400> 35

Asp Thr Ser

1

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) HVR-L3

<400> 36

Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp

1 5

<210> 37

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (in
LC) VH

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ser

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (in

LC) HVR-H1

<400>

38

Gly Tyr Asn Phe Ala Gly Tyr

1 5

<210> 39

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (in

LC) HVR-H2s

<400> 39

Asn Ser Gly

1

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (in
LC) HVR-H2

<400> 40

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

1 5 10 15

Gly

<210> 41

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (in
LC) HVR-H3

<400> 41

Pro Asn Pro Tyr Tyr Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr Pro Ala Ala

1 5 10 15

Phe Asp

<210> 42

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (in
LC) VL

<400> 42

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

1 5 10 15

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

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

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (in

LC) HVR-L1

<400> 43

Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser

1 5

<210> 44

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (in

LC) HVR-L2

<400> 44

Asp Thr Ser

1

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T (in
LC) HVR-L3

<400> 45

Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp

1 5

<210> 46

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2_wt VHVL cross LC kappa

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

210	215	220
-----	-----	-----

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

225	230	235
-----	-----	-----

<210> 47

<

211> 236

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2-wt mut4 + D50T VHVL cross kappa LC

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

115	120	125
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
130	135	140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
145	150	155
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
165	170	175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
180	185	190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
195	200	205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
210	215	220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	235
<210> 48		
<		
211> 236		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Ang2-mut4 + D50T + D106S VHVL cross kappa LC		
<400> 48		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Ala Gly Tyr		
20	25	30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		
50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		

85	90	95
Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr		
100	105	110
Pro Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser		
115	120	125
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
130	135	140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
145	150	155
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
165	170	175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
180	185	190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
195	200	205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
210	215	220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	235
<210> 49		
<		
211> 213		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Ang2_wt CHCk cross LC kappa		
<400> 49		
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln		
1	5	10
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val		
20	25	30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr		
35	40	45

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

50	55	60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly		
65	70	75
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His		
85	90	95
Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser		
100	105	110
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
115	120	125
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
130	135	140
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
145	150	155
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
180	185	190
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
195	200	205
Glu Pro Lys Ser Cys		
210		
<210> 50		
<211> 213		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Ang2-wt mut4 + D50T CHCk cross LC		
<400> 50		
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln		
1	5	10
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val		

20	25	30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr		
35	40	45
Asp Thr Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser		
50	55	60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly		
65	70	75
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His		
85	90	95
Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser		
100	105	110
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
115	120	125
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
130	135	140
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
145	150	155
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
180	185	190
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
195	200	205
Glu Pro Lys Ser Cys		
210		
<210		
> 51		
<211> 461		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Xang2-0098 Ang2 LC 10 VH wt IgG1		
<400> 51		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr			
20	25	30	
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe			
50	55	60	
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr			
100	105	110	
Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser			
115	120	125	
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp			
130	135	140	
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
145	150	155	160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
165	170	175	
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
180	185	190	
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			
195	200	205	
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser			
210	215	220	
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His			
225	230	235	240
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val			
245	250	255	

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

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

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

<210> 52

<211> 461

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Xang2-0099Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC)

<400> 52

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

<210>

53

<211> 461

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Xang2-0101

<400> 53

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Glu Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

<210> 54

<211> 496

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225	230	235	240
Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln His Asp Leu Met Glu Thr Val Asn			
245	250	255	
Asn Leu Leu Thr Met Met Ser Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asp Pro Thr			
260	265	270	
Val Ala Lys Glu Glu Gln Ile Ser Phe Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe			
275	280	285	
Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn			
290	295	300	
Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly			
305	310	315	320
Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln			
325	330	335	
Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu			
340	345	350	
Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg			
355	360	365	
Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr			
370	375	380	
Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg			
385	390	395	400
Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile			
405	410	415	
Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys			
420	425	430	
Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp			
435	440	445	
Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln			
450	455	460	
Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser			
465	470	475	480

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

485 490 495

<210> 55

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106E (HC) VH

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Glu Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr

100 105 110

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

115 120 125

Ser

<210> 56

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> ANg2 D106E HVR-H3

<400> 56

Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Glu Ser Pro Gly Tyr Tyr Pro Ala Ala

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

Phe Asp

<210> 57

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 0015 HC

<400> 57

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235
 <210> 58
 <
 211> 236
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> 0016 HC
 <400> 58
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Asp Ser Pro Gly Thr Tyr Tyr
 100 105 110
 Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235
 <210> 59
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> 0017 HC

<400> 59
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Cys Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Cys Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235

<210> 60

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 0021 HC

<400> 60

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr			
100	105	110	
Pro Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser			
115	120	125	
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp			
130	135	140	
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
145	150	155	160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
165	170	175	
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
180	185	190	
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			
195	200	205	
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser			
210	215	220	
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
225	230	235	
<210> 61			
<211> 236			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220><223> 0025 HC			
<400> 61			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Val Gly Tyr			
20	25	30	
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235

<210> 62

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 0026 HC

<400> 62

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

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Ala Gly Tyr			
20	25	30	
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe			
50	55	60	
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr			
100	105	110	
Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser			
115	120	125	
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp			
130	135	140	
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
145	150	155	160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
165	170	175	
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
180	185	190	
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			
195	200	205	
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser			
210	215	220	
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
225	230	235	
<210> 63			
<211> 236			

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 0027 HC

<400> 63

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210	215	220	
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
225	230	235	
<210> 64			
<211> 236			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220><223> 0028 HC			
<400> 64			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Gly Tyr			
20	25	30	
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe			
50	55	60	
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr			
100	105	110	
Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser			
115	120	125	
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp			
130	135	140	
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
145	150	155	160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
165	170	175	

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 65

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 0029 HC

<400> 65

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

1 5 10 15

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

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

35 40 45

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

50 55 60

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

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

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

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

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

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

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

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

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

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

<210> 66

<

211> 213

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 0031 HC

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

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

Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser
 100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys

210

<210> 67

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 0032 HC

<400> 67

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85	90	95	
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser			
100	105	110	
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr			
115	120	125	
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro			
130	135	140	
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val			
145	150	155	160
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser			
165	170	175	
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile			
180	185	190	
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val			
195	200	205	
Glu Pro Lys Ser Cys			
210			
<210			
> 68			
<211> 236			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220><223> 0033 HC			
<400> 68			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Gly Tyr			
20	25	30	
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe			
50	55	60	
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			

65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr			
100	105	110	
Pro Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser			
115	120	125	
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp			
130	135	140	
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
145	150	155	160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
165	170	175	
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
180	185	190	
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			
195	200	205	
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser			
210	215	220	
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
225	230	235	
<210> 69			
<211> 236			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220><223> 0039 HC			
<400> 69			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr			
20	25	30	
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			

35

40

45

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

50

55

60

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

65 70 75 80

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

85

90

95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Thr Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145 150 155 160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

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

225 230 235

<210> 70

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 0040 HC

<400> 70

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235

<210> 71

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 0042 HC

<400> 71

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235

<210> 72

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 0057 HC

<400> 72

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Glu Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235

<210> 73

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 0058 HC

<400> 73

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Thr Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

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

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

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

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

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

225 230 235

<210> 74

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 0076 HC

<400> 74

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100	105	110
Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser		
115	120	125
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
130	135	140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
145	150	155
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
165	170	175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
180	185	190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
195	200	205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
210	215	220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	235
<210> 75		
<211> 459		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> ANG2 ref HC		
<400> 75		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr		
20	25	30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		
50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		

65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr			
100	105	110	
Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser			
115	120	125	
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser			
130	135	140	
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp			
145	150	155	160
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr			
165	170	175	
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr			
180	185	190	
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln			
195	200	205	
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp			
210	215	220	
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro			
225	230	235	240
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro			
245	250	255	
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			
260	265	270	
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn			
275	280	285	
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg			
290	295	300	
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val			
305	310	315	320

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 76
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> ANG2 ref LC
 <400> 76

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

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

 20 25 30

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

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

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 77

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 0154 LC

<400> 77

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50	55	60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly		
65	70	75
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His		
85	90	95
Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser		
100	105	110
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
115	120	125
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
130	135	140
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
145	150	155
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
180	185	190
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
195	200	205
Glu Pro Lys Ser Cys		
210		
<210> 78		
<211> 213		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> 0155 LC		
<400> 78		
Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln		
1	5	10
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val		

20	25	30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr		
35	40	45
Asp Thr Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser		
50	55	60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly		
65	70	75
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His		
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His		
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His		
85	90	95
Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser		
100	105	110
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
115	120	125
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
130	135	140
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
145	150	155
160		
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
180	185	190
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
195	200	205
Glu Pro Lys Ser Cys		
Glu Pro Lys Ser Cys		
210		
<210		
> 79		
<211> 453		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> VEGF ref1 HC		
<400> 79		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr			
20	25	30	
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe			
50	55	60	
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val			
100	105	110	
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly			
115	120	125	
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly			
130	135	140	
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val			
145	150	155	160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe			
165	170	175	
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val			
180	185	190	
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val			
195	200	205	
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys			
210	215	220	
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu			
225	230	235	240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr			
245	250	255	

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 80
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VEGF ref1 LC
 <400> 80

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 81

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANG2 ref1 HC

<400> 81

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

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr			
20	25	30	
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe			
50	55	60	
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr			
100	105	110	
Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser			
115	120	125	
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp			
130	135	140	
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
145	150	155	160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
165	170	175	
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
180	185	190	
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			
195	200	205	
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser			
210	215	220	

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

225	230	235	240
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val			
245	250	255	
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
260	265	270	
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
275	280	285	
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
290	295	300	
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
305	310	315	320
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys			
325	330	335	
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile			
340	345	350	
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro			
355	360	365	
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala			
370	375	380	
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn			
385	390	395	400
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser			
405	410	415	
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg			
420	425	430	
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu			
435	440	445	
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
450	455	460	
<210> 82			
<211> 213			

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANG2 ref1 LC

<400> 82

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys

210

<210> 83

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 0163 ANG2 HC

<400> 83

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

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

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

210	215	220
-----	-----	-----

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

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

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

245	250	255
-----	-----	-----

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

260	265	270
-----	-----	-----

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

275	280	285
-----	-----	-----

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

290	295	300
-----	-----	-----

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

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

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

325	330	335
-----	-----	-----

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

340	345	350
-----	-----	-----

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

355	360	365
-----	-----	-----

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

370	375	380
-----	-----	-----

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

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

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

405	410	415
-----	-----	-----

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

420	425	430
-----	-----	-----

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

435	440	445
-----	-----	-----

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

450 455 460

<210> 84

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 0163 ANG2 LC

<400> 84

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 195 200 205
 Glu Pro Lys Ser Cys
 210
 <210> 85
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 0164 ANG2 HC
 <400> 85
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Ala Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Pro Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

165	170	175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
180	185	190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
195	200	205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
210	215	220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His		
225	230	235
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val		
245	250	255
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
260	265	270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
275	280	285
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
290	295	300
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
305	310	315
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
325	330	335
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
340	345	350
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro		
355	360	365
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala		
370	375	380
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
385	390	395
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
405	410	415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

<210> 86

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 0164 ANG2 LC

<400> 86

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 180 185 190

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 195 200 205
 Glu Pro Lys Ser Cys
 210

<210> 87
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VEGF ref2 HC
 <400> 87

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr
 20 25 30

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

Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys

450

<210> 88

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VEGF ref2 LC

<400> 88

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130	135	140													
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145					150			155					160		
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
								165		170			175		
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
								180		185			190		
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
								195		200			205		
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210														
<210>	89														
<211>	463														
<212>	PRT														
<213>	Artificial Sequence														
<220><223>	0165 ANG2 HC														
<400>	89														
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1					5			10			15				
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asn	Phe	Ala	Gly	Tyr
								20		25			30		
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
								35		40			45		
Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
50					55			60							
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65											70		75		80
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
											85		90		95
Ala	Arg	Ser	Pro	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Tyr
											100		105		110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355

360

365

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

370

375

380

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

385 390 395 400

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

405

410

415

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

420

425

430

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

435

440

445

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

450

455

460

<210> 90

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 0165 ANG2 LC

<400> 90

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

1 5 10 15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65 70 75 80

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

85

90

95

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

 145 150 155 160
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 180 185 190
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 195 200 205
 Glu Pro Lys Ser Cys
 210
 <210
 > 91
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 0166 ANG2 HC
 <400> 91
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Ala Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Pro Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His
 225 230 235 240
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 245 250 255
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr
 260 265 270
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320
 Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

325	330	335
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
340	345	350
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro		
355	360	365
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala		
370	375	380
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
385	390	395
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
405	410	415
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
420	425	430
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
435	440	445
His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
450	455	460
<210> 92		
<211> 213		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> 0166 ANG2 LC		
<400> 92		
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln		
1	5	10
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val		
20	25	30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr		
35	40	45
Asp Thr Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser		
50	55	60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly		

65	70	75	80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His			
85	90	95	
Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser			
100	105	110	
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr			
115	120	125	
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro			
130	135	140	
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val			
145	150	155	160
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser			
165	170	175	
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile			
180	185	190	
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val			
195	200	205	
Glu Pro Lys Ser Cys			
210			
<210> 93			
<211> 463			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
><223> ANG2 ref2 HC			
<400> 93			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr			
20	25	30	
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe			

50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr		
100	105	110
Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser		
115	120	125
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
130	135	140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
145	150	155
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
165	170	175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
180	185	190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
195	200	205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
210	215	220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His		
225	230	235
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val		
245	250	255
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr		
260	265	270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
275	280	285
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
290	295	300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 94

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ANG2 ref2 LC

<400> 94

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

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

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys

210