(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0036852
(43) 공개일자 2025년03월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/22 (2013.01)
A61P 27/02 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2025-7004070
(22) 출원일자(국제) 2023년07월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년02월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/069962
(87) 국제공개번호 WO 2024/015791
국제공개일자 2024년01월18일
(30) 우선권주장
63/388,538 2022년07월12일 미국(US)

(71) 출원인
레보프시스 테라퓨틱스, 인크.
미국 일리노이 62711 스프링필드 챈들러우드 로드 4109
(72) 발명자
반다리 라마나트
미국 일리노이 62711 스프링필드 챈들러우드 로드 4109
수 리
미국 일리노이 62711 스프링필드 챈들러우드 로드 4109
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

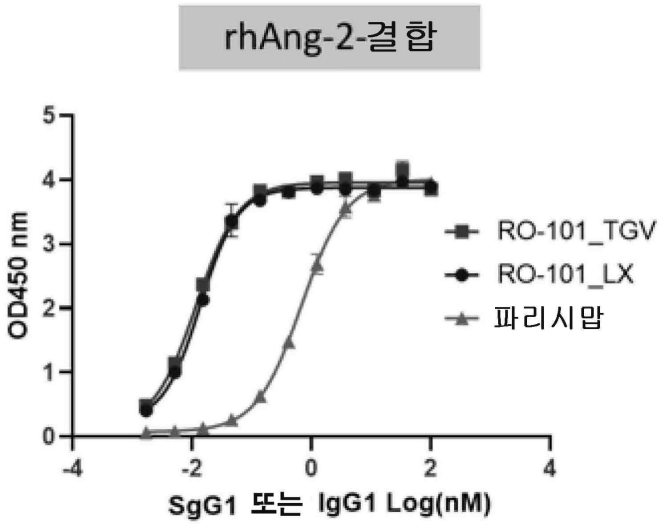
전체 청구항 수 : 총 117 항

(54) 발명의 명칭 **ANG-2/VEGF 항체 및 그의 용도**

(57) 요 약

VEGF_A 또는 ANG-2에 결합하는 항체, 또는 VEGF_A와 ANG-2에 결합하는 이중 특이적 항체가 본원에서 설명된다. 본 개시내용의 항체는 황반 변성을 포함한 눈 질환을 치료하는 데 유용하다.

대 표 도 - 도3a



(52) CPC특허분류
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/54 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
(72) 발명자
바트 라메쉬
미국 일리노이 62711 스프링필드 챈들러우드 로드 4109
팔란키 람 프라샨스
미국 일리노이 62711 스프링필드 챈들러우드 로드 4109

명 세 서

청구범위

청구항 1

혈관 내피 성장 인자 A(VEGF_A) 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서,

a. 서열번호 3(GYTFSIYT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1);

b. 서열번호 4(INPYNGNT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및

c. 서열번호 5(AKAPAVFWWTGLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고,

항체가 VEGF_A에 결합하는 것인 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF_A) 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 대리 경쇄를 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 5

제4항에 있어서, 대리 경쇄가

a. 서열번호 23(NDHDIGVYS)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1);

b. 서열번호 24(YFSQSDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(LCDR2); 및

c. 서열번호 25(AMGARSSVTH)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(LCDR3)

을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 VEGF_A의 혈소판 유래 성장 인자(PDGF) 도메인을 포함하는

펩타이드에 결합하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 9

제8항에 있어서, VEGF_A의 PDGF 도메인이 50번째 아미노산 내지 132번째 아미노산의 VEGF_A의 단편을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 VEGF_A의 VEGF-C 헤파린 도메인을 포함하는 펩타이드에 결합하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 11

제10항에 있어서, VEGF_A의 VEGF-C 헤파린 도메인이 143번째 아미노산 내지 191번째 아미노산 범위의 VEGF_A의 단편을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 VEGF_A 또는 그의 단편에 결합하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 13

제12항에 있어서, 항체가 약 60 피코몰 이하의 EC_{50}으로 VEGF_A 또는 그의 단편에 결합하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 억제하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 15

제14항에 있어서, 항체가 약 2000 피코몰 이하의 IC_{50}으로 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 억제하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 16

제14항에 있어서, 항체가 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 파리시맙이 상기 상호작용을 억제하는 것보다 적어도 3배 더 강하게 억제하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 17

제16항에 있어서, VEGF 수용체가 VEGF 수용체 2/키나제 삽입 도메인 수용체(KDR)인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 18

안지오포이에틴 2(ANG-2) 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서,

a. 서열번호 13(GFTFSSYG)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1);

b. 서열번호 14(ISADSGDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및

c. 서열번호 15(AKEFISWIYTFDYLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고,

항체가 ANG-2에 결합하는 것인 안지오포이에틴 2(ANG-2) 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 19

제18항에 있어서, 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 21

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 대리 경쇄를 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 22

제21항에 있어서, 대리 경쇄가

a. 서열번호 23(NDHDIGVYS)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1);

b. 서열번호 24(YFSQSDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(LCDR2); 및

c. 서열번호 25(AMGARSSVTH)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(LCDR3)

을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 23

제18항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 24

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 25

제18항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 ANG-2에 결합하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 26

제25항에 있어서, 항체가 약 55 피코몰 이하의 EC_{50}으로 ANG-2에 결합하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 27

제18항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 파리시맙이 ANG-2에 결합하는 것보다 적어도 50배 더 강하게 ANG-2에 결합하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 28

제18항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 억제하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 29

제28항에 있어서, 항체가 약 800 피코몰 이하의 IC_{50}으로 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 억제하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 30

제28항에 있어서, 항체가 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 파리시맙보다 적어도 15배 더 강하게 억제하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 31

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, ANG-2 수용체가 면역글로불린 유사 및 EGF 유사 도메인을 갖는 티로신 키나제 2 수용체(Tie-2 수용체)인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 IgG 항체인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 33

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 그의 항원 결합 단편이 Fab, $F(ab)_2$, 단일 도메인 항체 또는 단일 사슬 가변 단편(scFv)인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 34

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 대리 항체이고, 그의 항원 결합 단편이 대리 항체 항원 결합 단편(Sab) 또는 대리 항체의 단일 사슬 가변 단편(scSv)인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 항원 결합 단편이 인간, 키메라 또는 인간화 항체인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 36

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 인간화 항체인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 따른 항체 및 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, 정맥내 투여용으로 제제화되는 약학 조성물.

청구항 39

제37항에 있어서, 유리체내 투여용으로 제제화되는 약학 조성물.

청구항 40

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산.

청구항 41

제40항에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 42

제41항에 있어서, 발현 벡터가 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 연관 바이러스 벡터 또는 플라스미드 벡터인 발현 벡터.

청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서, 발현 벡터가 정맥내 투여용으로 제제화되는 것인 발현 벡터.

청구항 44

제41항 또는 제42항에 있어서, 발현 벡터가 유리체내 투여용으로 제제화되는 것인 발현 벡터.

청구항 45

제40항에 따른 핵산 또는 제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터를 포함하는 세포.

청구항 46

제45항에 있어서, 세포가 항체 생산에 적합한 진핵 세포이고, 선택적으로 세포는 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포인 세포.

청구항 47

혈관 내피 성장 인자 A(VEGF_A) 결합 모이어티 및 안지오포이에틴 2(ANG-2) 결합 모이어티를 포함하는 이중 특이적 항체로서,

VEGF_A 결합 모이어티는

a. 서열번호 3(GYTFSIYT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1);

b. 서열번호 4(INPYNGNT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및

c. 서열번호 5(AKAPAVFWWTGLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고;

ANG-2 결합 모이어티는

a. 서열번호 13(GFTFSSYG)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1);

b. 서열번호 14(ISADSGDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및

c. 서열번호 15(AKEFISWIYTFDYLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)

을 포함하고,

이중 특이적 항체가 VEGF_A 및 ANG-2에 결합하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 48

제47항에 있어서, VEGF_A 결합 모이어티가 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, VEGF_A 결합 모이어티가 중쇄 불변 영역을 추가로 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 50

제49항에 있어서, 중쇄 불변 영역이 VEGF_A 결합 모이어티의 동종이량체화가 억제되도록 조작된 돌출부 또는 조작된 공동을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 51

제50항에 있어서, 조작된 돌출부가 EU 넘버링에 따른 T366W 치환을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 52

제50항 또는 제51항에 있어서, 조작된 공동이 EU 넘버링에 따른 T366S/L368A/Y407V 치환을 포함하는 것인 이중

특이적 항체.

청구항 53

제49항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 불변 영역이 항체 이펙터 기능을 감소시키는 Fc 영역에 대한 하나 이상의 치환을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 54

제53항에 있어서, 항체 이펙터 기능을 감소시키는 Fc 영역에 대한 하나 이상의 치환이 EU 넘버링에 따른 L234A 및/또는 L235A를 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 55

제49항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 불변 영역이 시스테인 잔기의 하나 이상의 치환을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 56

제55항에 있어서, 시스테인 잔기의 하나 이상의 치환이 EU 넘버링에 따른 세린 354에서 이루어지는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 57

제47항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, VEGF_A 결합 모이어티가 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 58

제47항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 특이적 항체가 VEGF_A의 혈소판 유래 성장 인자(PDGF) 도메인을 포함하는 펩타이드에 결합하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 59

제58항에 있어서, VEGF_A의 PDGF 도메인이 50번째 아미노산 내지 132번째 아미노산 범위의 VEGF_A의 단편을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 60

제47항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 특이적 항체가 VEGF_A의 VEGF-C 헤파린 도메인을 포함하는 펩타이드에 결합하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 61

제60항에 있어서, VEGF_A의 VEGF-C 헤파린 도메인이 143번째 아미노산 내지 191번째 아미노산 범위의 VEGF_A의 단편을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 62

제47항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 특이적 항체가 VEGF_A 또는 그의 단편에 결합하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 63

제62항에 있어서, 이중 특이적 항체가 약 60 피코몰 이하의 EC_{50}으로 VEGF_A 또는 그의 단편에 결합하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 64

제47항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 특이적 항체가 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호

작용을 억제하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 65

제64항에 있어서, 이중 특이적 항체가 약 2000 피코몰 이하의 IC_{50}으로 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 억제하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 66

제64항에 있어서, 이중 특이적 항체가 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 파리시맙이 상기 상호작용을 억제하는 것보다 적어도 3배 더 강하게 억제하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 67

제66항에 있어서, VEGF 수용체가 VEGF 수용체 2/키나제 삽입 도메인 수용체(KDR)인 이중 특이적 항체.

청구항 68

제47항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, ANG-2 결합 모이어티가 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 69

제47항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, ANG-2 결합 모이어티가 중쇄 불변 영역을 추가로 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 70

제69항에 있어서, 중쇄 불변 영역이 ANG-2 결합 모이어티의 동종이량체화가 억제되도록 조작된 돌출부 또는 조작된 공동을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 71

제70항에 있어서, 조작된 돌출부가 EU 넘버링에 따른 T366W 치환을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 72

제70항 또는 제71항에 있어서, 조작된 공동이 EU 넘버링에 따른 T366S/L368A/Y407V 치환을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 73

제69항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 불변 영역이 항체 이펙터 기능을 감소시키는 Fc 영역에 대한 하나 이상의 치환을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 74

제73항에 있어서, 항체 이펙터 기능을 감소시키는 Fc 영역에 대한 하나 이상의 치환이 EU 넘버링에 따른 L234A 및/또는 L235A를 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 75

제69항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 불변 영역이 시스테인 잔기의 하나 이상의 치환을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 76

제75항에 있어서, 시스테인 잔기의 하나 이상의 치환이 EU 넘버링에 따른 세린 354에서 이루어지는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 77

제47항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, ANG-2 결합 모이어티가 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 78

제47항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 특이적 항체가 ANG-2에 결합하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 79

제78항에 있어서, 이중 특이적 항체가 약 55 피코몰 이하의 EC_{50}으로 ANG-2에 결합하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 80

제47항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 특이적 항체가 파리시맙이 ANG-2에 결합하는 것보다 적어도 50배 더 강하게 ANG-2에 결합하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 81

제47항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 특이적 항체가 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 억제하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 82

제81항에 있어서, 이중 특이적 항체가 약 800 피코몰 이하의 IC_{50}으로 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 억제하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 83

제81항에 있어서, 이중 특이적 항체가 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 파리시맙보다 적어도 15배 더 강하게 억제하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 84

제81항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, ANG-2 수용체가 면역글로불린 유사 및 EGF 유사 도메인을 갖는 티로신 키나제 2 수용체(Tie-2 수용체)인 이중 특이적 항체.

청구항 85

제47항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 공통 경쇄를 추가로 포함하는 이중 특이적 항체.

청구항 86

제85항에 있어서, 공통 경쇄가 대리 경쇄인 이중 특이적 항체.

청구항 87

제86항에 있어서, 대리 경쇄가

a. 서열번호 23(NDHDIGVYS)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1);

b. 서열번호 24(YFSQSDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(LCDR2); 및

c. 서열번호 25(AMGARSSVTH)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(LCDR3)

을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 88

제86항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 대리 경쇄가 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도

85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 89

제47항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 대리 경쇄가 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함하는 것인 이중 특이적 항체.

청구항 90

이중 특이적 항체 또는 항원 결합 펩타이드로서, (a) 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역; (b) 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역; 및 (c) 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 공통 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 이중 특이적 항체는 VEGF_A 및 ANG-2에 결합하는 것인 이중 특이적 항체 또는 항원 결합 펩타이드.

청구항 91

(a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄; (b) 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄; 및 (c) 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 공통 경쇄를 포함하고, VEGF_A 및 ANG-2에 결합하는 이중 특이적 항체.

청구항 92

(a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄; (b) 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄; 및 (c) 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 공통 경쇄를 포함하고, VEGF_A 및 ANG-2에 결합하는 이중 특이적 항체.

청구항 93

제47항 내지 제92항 중 어느 한 항에 따른 이중 특이적 항체 및 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 94

제93항에 있어서, 정맥내 투여용으로 제제화되는 약학 조성물.

청구항 95

제93항에 있어서, 유리체내 투여용으로 제제화되는 약학 조성물.

청구항 96

제47항 내지 제92항 중 어느 한 항에 따른 이중 특이적 항체를 코딩하는 핵산 또는 복수의 핵산.

청구항 97

제96항에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 98

제97항에 있어서, 발현 벡터가 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 연관 바이러스 벡터 또는 플라스미드 벡터인 발현 벡터.

청구항 99

제97항 또는 제98항에 있어서, 발현 벡터가 정맥내 투여용으로 제제화되는 것인 발현 벡터.

청구항 100

제97항 또는 제98항에 있어서, 발현 벡터가 유리체내 투여용으로 제제화되는 것인 발현 벡터.

청구항 101

제96항 내지 제100항 중 어느 한 항에 따른 이중 특이적 항체를 코딩하는 핵산 또는 복수의 핵산 및 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 102

제101항에 있어서, 정맥내 투여용으로 제제화되는 약학 조성물.

청구항 103

제101항에 있어서, 유리체내 투여용으로 제제화되는 약학 조성물.

청구항 104

개체의 눈 질환을 치료하는 방법으로서, 개체에게 제1항 내지 제103항 중 어느 한 항에 따른 항체, 이중 특이적 항체, 항체 또는 이중 특이적 항체를 코딩하는 핵산 또는 복수의 핵산, 또는 약학 조성물을 투여하여 눈 질환을 치료하는 것을 포함하는 치료 방법.

청구항 105

제104항에 있어서, 눈 질환이 황반 변성인 방법.

청구항 106

제105항에 있어서, 황반 변성이 연령과 관련이 있는 것인 방법.

청구항 107

제105항에 있어서, 황반 변성이 당뇨병과 관련이 있는 것인 방법.

청구항 108

제105항에 있어서, 황반 변성이 습성 황반 변성인 방법.

청구항 109

제104항에 있어서, 눈 질환이 분지 망막 정맥 폐쇄증인 방법.

청구항 110

제104항에 있어서, 눈 질환이 중심 망막 정맥 폐쇄증인 방법.

청구항 111

제1항 내지 제103항 중 어느 한 항에 따른 항체, 이중 특이적 항체 또는 약학 조성물의 눈 질환 치료 방법에서의 용도.

청구항 112

제111항에 있어서, 눈 질환이 황반 변성인 용도.

청구항 113

제112항에 있어서, 황반 변성이 연령과 관련이 있는 것인 용도.

청구항 114

제112항에 있어서, 황반 변성이 당뇨병과 관련이 있는 것인 용도.

청구항 115

제112항에 있어서, 황반 변성이 습성 황반 변성인 용도.

청구항 116

제111항에 있어서, 눈 질환이 분지 망막 정맥 폐쇄증인 용도.

청구항 117

제111항에 있어서, 눈 질환이 중심 망막 정맥 폐쇄증인 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 교차 참조

[0002] 본원은 2022년 7월 12일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 63/388,538의 이익을 주장하며, 이 출원은 본원에 참조로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 황반 변성 및 망막 정맥 폐쇄증을 포함한 눈 질환은 매년 수천 명의 개체에게 영향을 미치며, 영구적인 시력 감소 또는 실명을 초래할 수 있다. 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및 안지오포이에틴-2(ANG2) 단백질은 이러한 질병의 발병에서 역할을 수행하고, 따라서 잠재적인 치료 표적이 된다.

발명의 내용

[0004] 요약

[0005] 본원에는 VEGF 및/또는 ANG-2에 결합하는 항체 및 이중 특이적 항체가 설명되어 있다. 또한, 항체 및 이중 특이적 항체를 이를 필요로 하는 개체에게 투여함으로써 눈 질환을 치료하는 방법이 설명되어 있다. 이러한 질병에는 황반 변성, 망막 정맥 폐쇄증, 분지 정맥 폐쇄증 및 중심 정맥 폐쇄증이 포함된다. 본원에서 설명되는 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합하는 결합 모이어티 둘 모두가 각각의 항원에 높은 친화도로 결합한다는 점에서 이전에 설명된 이중 특이적 항체에 비해 이점이 있다. 또한, 공통 경쇄로 사용되는 대체(surrogate) 경쇄는 인간 생식 계열에서 기원하고, 따라서 다른 공통 경쇄보다 면역원성이 낮아 항치료 항체 반응을 겪을 가능성이 낮은 보다 안전한 분자를 제공한다. 낮은 항치료 항체 면역 반응은 치료 항체가 반복 투여 시 효능을 유지할 수 있도록 하기 때문에 바람직하다.

[0006] 본원의 한 측면에서 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 설명되고, 이는 (a) 서열번호(SEQ ID NO:) 3(GYTFSIYT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); (b) 서열번호 4(INPYNGNT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 (c) 서열번호 5(AKAPAVFWWTGLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고, 항체는 VEGF에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 대리(surrogate) 경쇄를 포함한다. 특정 실시양태에서, 대리 경쇄는 다음을 포함한다: (a) 서열번호 23(NDHDIGVYS)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1); (b) 서열번호 24(YFSQSDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(LCDR2); 및 (c) 서열번호 25(AMGARSSVTH)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(LCDR3). 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산

서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 VEGF_A의 혈소판 유래 성장 인자(PDGF) 도메인을 포함하는 펩타이드에 결합한다. 특정 실시양태에서, VEGF_A의 PDGF 도메인은 50번째 아미노산 내지 132번째 아미노산의 VEGF_A의 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 VEGF_A의 VEGF-C 헤파린 도메인을 포함하는 펩타이드에 결합한다. 특정 실시양태에서, VEGF_A의 VEGF-C 헤파린 도메인은 143번째 아미노산 내지 191번째 아미노산의 VEGF_A의 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 VEGF_A 또는 그의 단편에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 약 60 피코몰 이하의 EC_{50}으로 VEGF_A 또는 그의 단편에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 억제한다. 특정 실시양태에서, 항체는 약 2000 피코몰 이하의 IC_{50}으로 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 억제한다. 특정 실시양태에서, 항체는 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 파리시맙이 상기 상호작용을 억제하는 것보다 적어도 3배 더 강하게 억제한다. 특정 실시양태에서, VEGF 수용체는 VEGF 수용체 2/키나제 삽입 도메인 수용체(KDR)이다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 Fab, F(ab)2, 단일 도메인 항체 또는 단일 사슬 가변 단편(scFv)이다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 IgG 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 인간, 키메라 또는 인간화 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 인간화 항체이다. 또한, 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물이 설명되어 있다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 정맥내 투여용으로 제제화된다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 유리체내 투여용으로 제제화된다. 또한, 항체를 코딩하는 핵산이 본원에서 설명된다. 특정 실시양태에서, 핵산은 발현 벡터이다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 연관 바이러스 벡터 또는 플라스미드 벡터이다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 정맥내 투여용으로 제제화된다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 유리체내 투여용으로 제제화된다. 또한, 핵산 또는 발현 벡터를 포함하는 세포가 본원에서 설명된다. 특정 실시양태에서, 세포는 항체 생산에 적합한 진핵 세포이다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 개체의 눈 질환을 치료하는 방법에 사용되며, 이 방법은 개체에게 항체, 항체를 코딩하는 핵산 또는 복수의 핵산, 또는 항체를 포함하는 약학 조성물을 투여하여 눈 질환을 치료하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 황반 변성이다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 연령과 관련이 있다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 당뇨병과 관련이 있다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 습성 황반 변성이다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 분지 정맥 폐쇄증이다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 중심 정맥 폐쇄증이다.

[0007] 본원의 한 측면에서, 안지오포이에틴 2(ANG-2) 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 설명되고, 이는 (a) 서열번호 13(GFTFSSYG)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); (b) 서열번호 14(ISADSGDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 (c) 서열번호 15(AKEFISWIYTFDYLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고, 항체는 ANG-2에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 대리 경쇄를 포함한다. 특정 실시양태에서, 대리 경쇄는 다음을 포함한다: (a) 서열번호 23(NDHDIGVYS)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1); (b) 서열번호 24(YFSQSDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(LCDR2); 및 (c) 서열번호 25(AMGARSSVTH)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(LCDR3). 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 ANG-2에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 약 55 피코몰 이하의 EC50으로 ANG-2에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 파리시맙이 ANG-2에 결합하는 것보다 적어도 50배 더 강하게 ANG-2에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 억제한다. 특정 실시양태에서, 항체는 약 800 피코몰 이하의 IC50으로 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 억제한다. 특정 실시양태에서, 항체는 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 파리시맙보다 적어도 15배 더 강하게 억제한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 수용체는 면역글로불린 유사 및 EGF 유사 도메인을 갖는 티

로신 키나제 2 수용체(Tie-2 수용체)이다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 Fab, F(ab)2, 단일 도메인 항체 또는 단일 사슬 가변 단편(scFv)이다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 IgG 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 인간, 키메라 또는 인간화 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 인간화 항체이다. 또한, 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물이 설명되어 있다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 정맥내 투여용으로 제제화된다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 유리체내 투여용으로 제제화된다. 또한, 항체를 코딩하는 핵산이 본원에서 설명된다. 특정 실시양태에서, 핵산은 발현 벡터이다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 연관 바이러스 벡터 또는 플라스미드 벡터이다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 정맥내 투여용으로 제제화된다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 유리체내 투여용으로 제제화된다. 또한, 핵산 또는 발현 벡터를 포함하는 세포가 본원에서 설명된다. 특정 실시양태에서, 세포는 항체 생산에 적합한 진핵 세포이다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 개체의 눈 질환을 치료하는 방법에 사용되며, 이 방법은 개체에게 항체, 항체를 코딩하는 핵산 또는 복수의 핵산, 또는 항체를 포함하는 약학 조성물을 투여하여 눈 질환을 치료하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 황반 변성이다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 연령과 관련이 있다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 당뇨병과 관련이 있다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 습성 황반 변성이다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 분지 정맥 폐쇄증이다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 중심 정맥 폐쇄증이다.

[0008] 또 다른 측면에서, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 결합 모이어티 및 안지오포이에틴 2(ANG-2) 결합 모이어티를 포함하는 이중 특이적 항체가 설명되고, 여기서 VEGF 결합 모이어티는 (a) 서열번호 3(GYTFSIYT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); (b) 서열번호 4(INPYNGNT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 (c) 서열번호 5(AKAPAVFWWTGLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고; ANG-2 결합 모이어티는 (a) 서열번호 13(GFTFSSYG)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); (b) 서열번호 14(ISADSGDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 (c) 서열번호 15(AKEFISWIYTFDYLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고, 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합한다. 특정 실시양태에서, VEGF 결합 모이어티는 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 결합 모이어티는 추가로 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 VEGF 결합 모이어티의 동종이량체화가 억제되도록 조작된 돌출부 또는 조작된 공동을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조작된 돌출부는 EU 넘버링에 따른 T366W 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조작된 공동은 EU 넘버링에 따른 T366S/L368A/Y407V 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 항체 이펙터 기능을 감소시키는 Fc 영역에 대한 하나 이상의 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 이펙터 기능을 감소시키는 Fc 영역에 대한 하나 이상의 치환은 EU 넘버링에 따른 L234A 및/또는 L235A를 포함한다. 특정 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 시스테인 잔기의 하나 이상의 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 시스테인 잔기의 하나 이상의 치환은 EU 넘버링에 따른 세린 354에서 이루어진다. 특정 실시양태에서, VEGF 결합 모이어티는 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 결합 모이어티는 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 결합 모이어티는 추가로 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 ANG-2 결합 모이어티의 동종이량체화가 억제되도록 조작된 돌출부 또는 조작된 공동을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조작된 돌출부는 EU 넘버링에 따른 T366W 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조작된 공동은 EU 넘버링에 따른 T366S/L368A/Y407V 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 항체 이펙터 기능을 감소시키는 Fc 영역에 대한 하나 이상의 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 이펙터 기능을 감소시키는 Fc 영역에 대한 하나 이상의 치환은 EU 넘버링에 따른 L234A 및/또는 L235A를 포함한다. 특정 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 시스테인 잔기의 하나 이상의 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 시스테인 잔기의 하나 이상의 치환은 EU 넘버링에 따른 세린 354에서 이루어진다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 VEGF_A의 혈소판 유래 성장 인자(PDGF) 도메인을 포함하는 펩타이드에 결합한다. 특정 실시양태에서, VEGF_A의 PDGF 도메인은 50번째 아미노산 내지 132번째 아미노산의 VEGF_A의 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 VEGF_A의 VEGF-C 헤파린 도메인을 포함하는 펩타이드에 결합한다. 특정 실시양태에서, VEGF_A의 VEGF-C 헤파린 도메인은 143번째 아미노산 내지 191번째 아미노산의 VEGF_A의 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 VEGF_A 또는 그의 단편에 결합한

다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 약 60 피코몰 이하의 EC50으로 VEGF_A 또는 그의 단편에 결합한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 억제한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 약 2000 피코몰 이하의 IC50으로 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 억제한다. 특정 실시양태에서, 항체는 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 파리시맙이 상기 상호작용을 억제하는 것보다 적어도 3배 더 강하게 억제한다. 특정 실시양태에서, VEGF 수용체는 VEGF 수용체 2/키나제 삽입 도메인 수용체(KDR)이다. 특정 실시양태에서, ANG-2 결합 모이어티는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 공통 경쇄를 포함한다. 특정 실시양태에서, 공통 경쇄는 대리 경쇄이다. 특정 실시양태에서, 대리 경쇄는 다음을 포함한다: (a) 서열번호 23(NDHDIGVYS)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1); (b) 서열번호 24(YFSQSDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(LCDR2); 및 (c) 서열번호 25(AMGARSSVTH)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(LCDR3). 특정 실시양태에서, 대리 경쇄는 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 대리 경쇄는 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 (a) 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역; (b) 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역; 및 (c) 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 공통 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 ANG-2에 결합한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 약 55 피코몰 이하의 EC50으로 ANG-2에 결합한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 파리시맙이 ANG-2에 결합하는 것보다 적어도 50배 더 강하게 ANG-2에 결합한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 억제한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 약 800 피코몰 이하의 IC50으로 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 억제한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 파리시맙보다 적어도 15배 더 강하게 억제한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 수용체는 면역글로불린 유사 및 EGF 유사 도메인을 갖는 티로신 키나제 2 수용체(Tie-2 수용체)이다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 인간, 키메라 또는 인간화 항체이다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 인간화 항체이다. 또한, 이중 특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물이 설명되어 있다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 정맥내 투여용으로 제제화된다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 유리체내 투여용으로 제제화된다. 또한, 이중 특이적 항체를 코딩하는 핵산이 본원에서 설명된다. 특정 실시양태에서, 핵산은 발현 벡터이다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 연관 바이러스 벡터 또는 플라스미드 벡터이다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 정맥내 투여용으로 제제화된다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 유리체내 투여용으로 제제화된다. 또한, 핵산 또는 발현 벡터를 포함하는 세포가 본원에서 설명된다. 특정 실시양태에서, 세포는 항체 생산에 적합한 진핵 세포이다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 개체의 눈 질환을 치료하는 방법에 사용되며, 이 방법은 개체에게 이중 특이적 항체, 이중 특이적 항체를 코딩하는 핵산 또는 복수의 핵산, 또는 이중 특이적 항체를 포함하는 약학 조성물을 투여하여 눈 질환을 치료하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 황반 변성이다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 연령과 관련이 있다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 당뇨병과 관련이 있다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 습성 황반 변성이다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 분지 정맥 폐쇄증이다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 중심 정맥 폐쇄증이다.

[0009] 또 다른 측면에서, (a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄; (b) 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄; 및 (c) 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 공통 경쇄를 포함하는 이중 특이적 항체가 설명되고, 여기서 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 약 60 피코몰 이하의 EC50으로 VEGF에 결합한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 약 2000 피코몰 이하

의 IC50으로 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 억제한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 파리시맙이 ANG-2에 결합하는 것보다 적어도 50배 더 강하게 ANG-2에 결합한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 억제한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 약 800 피코몰 이하의 IC50으로 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 억제한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 파리시맙보다 적어도 15배 더 강하게 억제한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 파리시맙이 상기 상호작용을 억제하는 것보다 적어도 3배 더 강하게 억제한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 약 55 피코몰 이하의 EC50으로 ANG-2에 결합한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 인간, 키메라 또는 인간화 항체이다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 인간화 항체이다. 또한, 이중 특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물이 설명되어 있다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 정맥내 투여용으로 제제화된다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 유리체내 투여용으로 제제화된다. 또한, 이중 특이적 항체를 코딩하는 핵산이 본원에서 설명된다. 특정 실시양태에서, 핵산은 발현 벡터이다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 연관 바이러스 벡터 또는 플라스미드 벡터이다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 정맥내 투여용으로 제제화된다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 유리체내 투여용으로 제제화된다. 또한, 핵산 또는 발현 벡터를 포함하는 세포가 본원에서 설명된다. 특정 실시양태에서, 세포는 항체 생산에 적합한 진핵 세포이다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 개체의 눈 질환을 치료하는 방법에 사용되며, 이 방법은 개체에게 이중 특이적 항체, 이중 특이적 항체를 코딩하는 핵산 또는 복수의 핵산, 또는 이중 특이적 항체를 포함하는 약학 조성물을 투여하여 눈 질환을 치료하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 황반 변성이다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 연령과 관련이 있다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 당뇨병과 관련이 있다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 습성 황반 변성이다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 분지 정맥 폐쇄증이다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 중심 정맥 폐쇄증이다.

[0010] 또 다른 측면에서, (a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄; (b) 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄; 및 (c) 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 공통 경쇄를 포함하는 이중 특이적 항체가 설명되고, 여기서 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 약 60 피코몰 이하의 EC50으로 VEGF에 결합한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 억제한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 약 2000 피코몰 이하의 IC50으로 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 억제한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 파리시맙이 상기 상호작용을 억제하는 것보다 적어도 3배 더 강하게 억제한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 약 55 피코몰 이하의 EC50으로 ANG-2에 결합한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 파리시맙이 ANG-2에 결합하는 것보다 적어도 50배 더 강하게 ANG-2에 결합한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 억제한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 약 800 피코몰 이하의 IC50으로 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 억제한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 파리시맙보다 적어도 15배 더 강하게 억제한다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 인간, 키메라 또는 인간화 항체이다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 인간화 항체이다. 또한, 이중 특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물이 설명되어 있다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 정맥내 투여용으로 제제화된다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 유리체내 투여용으로 제제화된다. 또한, 이중 특이적 항체를 코딩하는 핵산이 본원에서 설명된다. 특정 실시양태에서, 핵산은 발현 벡터이다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 연관 바이러스 벡터 또는 플라스미드 벡터이다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 정맥내 투여용으로 제제화된다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 유리체내 투여용으로 제제화된다. 또한, 핵산 또는 발현 벡터를 포함하는 세포가 본원에서 설명된다. 특정 실시양태에서, 세포는 항체 생산에 적합한 진핵 세포이다. 특정 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 개체의 눈 질환을 치료하는 방법에 사용되며, 이 방법은 개체에게 이중 특이적 항체, 이중 특이적 항체를 코딩하는 핵산 또는 복수의 핵산, 또는 이중 특이적 항체를 포함하는 약학 조성물을 투여하여 눈 질환을 치료하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 황반 변성이다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 연령과 관련이 있다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 당뇨병과 관련이 있다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 습성 황반 변성이다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 분지 정맥 폐쇄증이다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 중심 정맥 폐쇄증이다.

도면의 간단한 설명

[0011] 본원에서 설명되는 새로운 특징은 첨부되는 청구항에 구체적으로 명시되어 있다. 본원에서 설명되는 특징 및 특징의 이점은 본원에서 설명되는 특징의 원리가 활용되는 예시적 예를 제시하는 다음의 자세한 설명 및 첨부 도면을 참조하여 보다 잘 이해될 것이다.

도 1a-1b는 CHO 세포에서 생성된 서열번호 2, 서열번호 12 및 서열번호 22에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 이중 특이적 대리 항체(surrobody)의 SDS-PAGE 및 SE-HPLC 분석을 도시한 것이다. 도 1a는 환원 및 비환원 샘플에 대한 SDS-PAGE 결과를 도시한 것이다. 레인 1, MW 래더; 레인 2, IgG 대조군(비환원); 레인 3, 샘플 1(비환원); 레인 4, 샘플 2(비환원); 레인 5, 샘플 3(비환원); 레인 6, IgG 대조군(환원); 레인 7, 샘플 1(환원); 레인 8, 샘플 2(환원); 레인 5, 샘플 3(환원). 도 1b는 3개 샘플의 SE-HPLC 결과를 도시한 것이다.

도 2a-2f는 대리 항체 RO-101의 VEGF에 대한 결합 및 파리시맙과 비교한 VEGF와 그의 수용체 사이의 상호작용의 억제를 도시한 것이다. 도 2a는 $VEGF_{121}$과 $VEGF_{165}$ 사이의 서열 정렬을 도시한 것이다. 도 2b는 $VEGF_{121}$ 또는 $VEGF_{165}$에 대한 RO-101의 결합에 대한 ELISA 결합 결과를 도시한 것이다. 도 2c는 $VEGF_{121}$에 대한 RO-101 또는 파리시맙의 결합에 대한 ELISA 결합 결과를 도시한 것이다. 도 2d는 $VEGF_{165}$에 대한 RO-101 또는 파리시맙의 결합에 대한 ELISA 결합 결과를 도시한 것이다. 도 2e는 VEGF와 그의 수용체 사이의 상호작용을 억제하는 대리 항체의 능력을 시험하는 검정의 다이어그램을 도시한 것이다. 도 2f는 $VEGF_{165}$와 그의 수용체 사이의 상호작용에 대한 RO-101 또는 파리시맙의 억제에 대한 ELISA 결합 결과를 보여준다.

도 3a-3c는 대리 항체 RO-101의 ANG-2에 대한 결합, 및 파리시맙과 비교한 ANG-2와 그의 수용체 사이의 상호작용의 억제를 도시한 것이다. 도 3a는 ANG-2에 대한 RO-101 또는 파리시맙의 결합에 대한 ELISA 결합 결과를 도시한 것이다. 도 3b는 ANG-2와 그의 수용체 사이의 상호작용을 억제하는 대리 항체의 능력을 시험하는 검정의 다이어그램을 도시한 것이다. 도 3c는 ANG-2와 그의 수용체 사이의 상호작용의 RO-101 또는 파리시맙의 억제에 대한 ELISA 결합 결과를 도시한 것이다.

도 4a-4b는 VEGF 및 ANG-2에 대한 RO-101의 결합의 다양한 형태를 예시한 것이다. 도 4a는 RO-101로부터 유래된 RO-101 SgG, scSv 또는 Sab와 VEGF 사이의 결합에 대한 ELISA 결합 결과를 예시한 것이다. 도 4b는 RO-101로부터 유래된 RO-101 SgG, scSv 또는 Sab와 ANG-2 사이의 결합에 대한 ELISA 결합 결과를 예시한 것이다.

도 5a-5d는 RO-101이 다른 PDGF/VEGF 패밀리 구성원에 결합하는 것을 보여준다. 도 5a는 VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF-1 및 PIGF-3 사이의 서열 정렬을 보여준다. 도 5b는 $VEGF_{165}$와 비교한, 상이한 공급업체의 VEGF-B에 대한 RO-101의 결합에 대한 ELISA 결합 결과를 보여준다. 도 5c는 $VEGF_{165}$와 비교한, VEGF-C 또는 VEGF-D에 대한 RO-101의 결합을 보여준다. 도 5d는 $VEGF_{165}$와 비교한, PIGF-1 또는 PIGF-3에 대한 RO-101의 결합을 보여준다.

도 6a-6d는 VEGF 또는 ANG-2의 비인간 오르토로그(ortholog)에 대한 RO-101의 결합을 도시한 것이다. 도 6a는 인간, 토끼, 개 및 돼지의 VEGF 오르토로그 사이의 서열 정렬을 도시한 것이다. 도 6b는 인간, 토끼, 개 및 돼지의 VEGF 오르토로그에 대한 RO-101의 결합에 대한 ELISA 결합 결과를 보여준다. 도 6c는 인간, 토끼, 개 및 돼지의 ANG-2 오르토로그 사이의 서열 정렬을 보여준다. 도 6d는 인간, 토끼 및 개의 ANG-2 오르토로그에 대한 RO-101의 결합에 대한 ELISA 결합 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본원의 한 측면에서, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 설명되고, 이는 서열번호 3(GYTFSIYT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); 서열번호 4(INPYNGNT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 서열번호 5(AKAPAVFWWTGLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고, 항체는 VEGF에 결합한다.

[0013] 본원의 또 다른 측면에서, 안지오포이에틴 2(ANG-2) 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 설명되고, 이는 서열번호 13(GFTFSSYG)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); 서열번호 14(ISADSGDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 서열번호 15(AKEFISWIYTFDYLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고, 항체는 ANG-2에 결합한다.

[0014] 또 다른 측면에서, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 결합 모이어티 및 안지오포이에틴 2(ANG-2) 결합 모이어티를 포함하는 이중 특이적 항체가 설명되고, 여기서 VEGF 결합 모이어티는 서열번호 3(GYTFSIYT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); 서열번호 4(INPYNGNT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 서열번호 5(AKAPAVFWWTGLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고; ANG-2 결합 모이어티는 서열번호 13(GFTFSSYG)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); 서열번호 14(ISADSGDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 서열번호 15(AKEFISWIYTFDYLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고, 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합한다.

[0015] 본원의 또 다른 측면에서, (a) 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역; (b) 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역; 및 (c) 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 공통 경쇄 가변 영역을 포함하는 이중 특이적 항체가 설명되고, 여기서 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합한다.

[0016] 본원의 또 다른 측면에서, (a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄; (b) 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄; 및 (c) 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 공통 경쇄를 포함하는 이중 특이적 항체가 설명되고, 여기서 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합한다.

[0017] 본원의 또 다른 측면에서, (a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄; (b) 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄; 및 (c) 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 공통 경쇄를 포함하는 이중 특이적 항체가 설명되고, 여기서 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합한다.

[0018] 다음 설명에서, 다양한 실시양태에 대한 철저한 이해를 제공하기 위해 특정한 세부 사항이 제시된다. 그러나, 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 제공된 실시양태가 이러한 세부 사항 없이도 실행될 수 있음을 이해할 것이다. 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 명세서 및 이어지는 청구항 전체에서 "포함하다"라는 단어 및 "포함한다" 및 "포함하는"과 같은 그 변형어는 개방적이고 포괄적인 의미, 즉 "포함하지만 이에 국한되지 않음"으로 해석되어야 한다. 이 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용되는 바와 같이, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 내용이 명확히 달리 지시하지 않는 한, 복수의 지시 대상을 포함한다. 또한, "또는"이라는 용어는 내용이 명확히 달리 지시하지 않는 한, 일반적으로 "및/또는"을 포함하는 의미로 사용된다는 점에 유의해야 한다. 또한, 본원에서 제공되는 제목은 편의를 위한 것일 뿐이며, 특허 청구된 실시양태의 범위 또는 의미를 해석하는 것이 아니다.

[0019] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약"은 명시된 양에 10% 이하만큼 근접한 양을 의미한다.

[0020] 본원에서 사용되는 바와 같이, "혈관 내피 성장 인자" 또는 "VEGF"는 *VEGFA* 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩타이드를 의미하며, 이의 아미노산 서열은 www.uniprot.org/uniprot/P15692에서 이용 가능하다. 이러한 서열에는 본원에서 설명되는 항체 및 이중 특이적 항체의 결합에 영향을 미치지 않는 번역 후 변형, 자연 발생 아미노산 변이체, 및 자연 발생 스플라이스 변이체가 포함된다.

[0021] 본원에서 사용되는 "안지오포이에틴 2" 또는 "ANG-2"는 *ANGPT2* 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩타이드를 의미하며, 이의 아미노산 서열은 www.uniprot.org/uniprot/P15123에서 이용 가능하다. 이러한 서열에는 본원에서 설명되는 항체 및 이중 특이적 항체의 결합에 영향을 미치지 않는 번역 후 변형, 자연 발생 아미노산 변이체, 및 자연 발생 스플라이스 변이체가 포함된다.

[0022] 본원에서 사용되는 바와 같이, "대리 경쇄"는 VpreB 폴리펩타이드와 λ5 폴리펩타이드의 융합에 의해 형성된 경쇄를 말하며, 두 개 이상의 구조적으로 구별되는 중쇄와 무차별적으로 결합될 수 있다. 이러한 대리 경쇄는 각각 그 전체가 본원에 참조로 포함된 US 8,114,967; US 10,214,580; 및 8,969,082에 기술되어 있다.

[0023] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "개체", "환자" 또는 "대상체"는 설명된 조성물 및 방법이 치료에 유용한 적어도 하나의 질병으로 진단받거나, 이에 걸린 것으로 의심되거나, 발병 위험이 있는 개체를 지칭한다. 특정

실시양태에서, 개체는 포유동물이다. 특정 실시양태에서, 포유동물은 마우스, 래트, 토끼, 개, 고양이, 말, 소, 양, 돼지, 염소, 라마, 알파카 또는 야크이다. 특정 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0024] 제공된 항체 중에는 모노클로날 항체, 다중 특이적 항체(예를 들어, 이중 특이적 항체 및 다중 반응성 항체) 및 항체 단편이 있다. 항체에는 항체 접합체 및 키메라 분자와 같은 항체를 구성하는 분자가 포함된다. 따라서, 항체에는 전장 및 천연 항체, 및 그의 결합 특이성을 유지하는 단편 및 부분, 예를 들어 임의의 수의 면역글로불린 클래스 및/또는 이소형(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD, IgE 및 IgM)을 갖는 것을 포함하는 임의의 특이적 결합 부분; 및 생물학적으로 관련되는(항원 결합) 단편 또는 그의 특이적 결합 부분, 비제한적인 예를 들어 Fab, $F(ab')_2$, Fv 및 scFv(단일 사슬 또는 관련 엔티티)가 포함되지만, 이에 국한되지 않는다. 모노클로날 항체는 일반적으로 실질적으로 균질한 항체의 조성물 내의 항체이고, 따라서, 모노클로날 항체 조성물 내에 포함된 모든 개별 항체는 미량으로 존재할 수 있는 자연적으로 발생하는 가능한 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 인간 IgG1 불변 영역을 포함할 수 있다. 모노클로날 항체는 인간 IgG4 불변 영역을 포함할 수 있다.

[0025] 본원에서 "항체"라는 용어는 가장 넓은 의미로 사용되며, 모노클로날 항체, 이중 특이적 항체를 포함하고, 온전한 항체 및 그의 기능적(항원 결합) 항체 단편, 예를 들어 단편 항원 결합(Fab) 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fab' 단편, Fv 단편, 재조합 IgG(rIgG) 단편, 단일 사슬 항체 단편, 예를 들어 단일 사슬 가변 단편(sFv 또는 scFv) 및 단일 도메인 항체(예를 들어, sdAb, sdFv, 나노바디) 단편을 포함한다. 이 용어는 유전자 조작 및/또는 기타 변형된 형태의 면역글로불린, 예를 들어 인트라바디, 펩티바디, 키메라 항체, 완전 인간 항체, 인간화 항체 및 이종 접합 항체, 다중 특이적, 예를 들어 이중 특이적 항체, 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디, 탠덤 디-scFv, 탠덤 트리-scFv를 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 용어 "항체"는 그의 기능적 항체 단편을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 이 용어는 또한 IgG 및 그의 하위 클래스, 즉 IgM, IgE, IgA 및 IgD를 포함하는 임의의 클래스 또는 하위 클래스의 항체를 포함하는 온전한 또는 전체 길이의 항체를 포함한다. 항체는 인간 IgG1 불변 영역을 포함할 수 있다. 항체는 인간 IgG4 불변 영역을 포함할 수 있다.

[0026] 본원에서 분자, 펩타이드, 폴리펩타이드, 항체 또는 항체 단편은 문법적 동등어를 포함하여 "이중 특이적" 또는 "이중-특이적"이라고 지칭될 수 있다. 이중 특이적 분자는 적어도 두 개의 구조적으로 구별되는 표적에 특이적으로 결합하는 능력을 가지고 있다. 특이적 결합은 분자 수준에서 구조적으로 구별되는 두 개의 별개의 결합 모이어티(여기에는 별개의 동일하지 않은 아미노산 서열을 포함하되 이에 국한되지 않음) 또는 또는 높은 친화도(예를 들어, 약 $1x10^{-6}$ 미만의 KD)로 두 개의 구조적으로 구별되는 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 단일 결합 모이어티에 따른 결과일 수 있다. "다중 특이적"이라고 지칭되는 분자, 펩타이드, 폴리펩타이드, 항체 또는 항체 단편은 적어도 세 개의 구조적으로 구별되는 표적에 특이적으로 결합하는 능력을 가지고 있는 분자를 말한다. 문법적 동등어를 포함한 "이중 특이적 항체"는 항체 분자의 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄, 또는 하나 이상의 상보성 결정 영역과 같이 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 적어도 하나의 단편을 보존하는 이중 특이적 분자를 말한다. 문법적 동등어를 포함한 "다중 특이적 항체"는 항체 분자의 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄, 또는 상보성 결정 영역과 같이 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 적어도 하나의 단편을 보존하는 다중 특이적 분자를 말한다.

[0027] "상보성 결정 영역" 및 "CDR"이라는 용어는 "초가변 영역" 또는 "HVR"과 동의어로서, 항원 특이성 및/또는 결합 친화도를 부여하는 항체 가변 영역 내의 비인접 아미노산 서열을 지칭하는 것으로 관련 기술 분야에 알려져 있다. 일반적으로, 각각의 중쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3)이 있고, 각각의 경쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3)이 있다. "프레임워크 영역" 및 "FR"은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 비-CDR 부분을 지칭하는 것으로 관련 기술 분야에 알려져 있다. 일반적으로, 각각의 전장 중쇄 가변 영역에는 4개의 FR(FR-H1, FR-H2, FR-H3 및 FR-H4)이 있고, 각각의 전장 경쇄 가변 영역에는 4개의 FR(FR-L1, FR-L2, FR-L3 및 FR-L4)이 있다. 주어진 CDR 또는 FR의 정확한 아미노산 서열 경계는 문헌 [Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD ("Kabat" numbering scheme), Al-Lazikani et al., (1997) *JMB* 273,927-948 ("Chothia" numbering scheme); MacCallum et al., J. *Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," *J. Mol. Biol.* 262, 732-745." ("Contact" numbering scheme); Lefranc MP et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev Comp *Immunol*, 2003 Jan;27(1):55-77 ("IMGT" numbering scheme); Honegger A and Plueckthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin

variable domains: an automatic modeling and analysis tool," *J Mol Biol*, 2001 Jun 8;309(3):657-70, ("Aho" numbering scheme); 및 Whitelegg NR and Rees AR, "WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB," *Protein Eng.* 2000 Dec;13(12):819-24 ("AbM" numbering scheme)]에 기재된 것을 포함하는 많은 잘 알려진 임의의 방식을 사용하여 쉽게 결정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서 설명되는 항체의 CDR은 카바트(Kabat), 코티아(Chothia), IMGT, Aho, AbM 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 방법에 의해 정의될 수 있다.

[0028] 주어진 CDR 또는 FR의 경계는 확인에 사용된 방식에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 카바트 방식은 구조적 정렬을 기반으로 하는 반면, 코티아 방식은 구조적 정보를 기반으로 한다. 카바트 방식과 코티아 방식 둘 모두의 넘버링은 가장 일반적인 항체 영역 서열 길이를 기반으로 하며, 삽입은 예를 들어 "30a"와 같은 삽입 문자에 의해 수용되고, 일부 항체에서는 결손이 나타난다. 두 방식은 특정 삽입 및 결실("indel")을 다른 위치에 배치하여 상이한 넘버링이 생성된다. 컨택트(Contact) 방식은 복잡한 결정 구조의 분석을 기반으로 하며, 코티아 넘버링 방식과 여러 면에서 유사한다.

[0029] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체를 항원에 결합하는 데 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 말한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인(각각 V_H 및 V_L)은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역(FR) 및 3개의 CDR로 구성된다(예를 들어, 문헌 [Kindt et al. Kuby *Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91(2007)] 참조). 단일 V_H 또는 V_L 도메인은 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정 항원에 결합하는 항체는 항원에 결합하는 항체의 V_H 또는 V_L 도메인을 사용하여 단리함으로써 각각 상보성 V_L 또는 V_H 도메인 라이브러리를 스크리닝할 수 있다(예를 들어, 문헌 [Portolano et al., *J. Immunol*. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)] 참조).

[0030] 본원에서 설명되는 항체 분자의 특이적 결합 또는 결합은 항체의 하나 이상의 CDR 부분에 의해 매개되는 결합을 지칭한다. 모든 CDR이 특이적 결합에 필요한 것은 아니다. 특이적 결합은 예를 들어 이소형 대조군 항체와 비교하여 상당한 결합 증가를 보이는 언급된 특이적 표적 또는 항원에 대한 ELISA에 의해 입증될 수 있다.

[0031] 본원에서 설명되는 바와 같이, "에피토프"는 항체 또는 그의 단편이 표적 항원에 특이적으로 결합하기 위해 최소한으로 필요한 본원에서 설명되는 항체 또는 단편의 결합 결정인자를 지칭한다. 표적 항원이 폴리펩타이드인 경우, 에피토프는 연속적이거나 불연속적인 에피토프일 것이다. 연속적인 에피토프는 표적 항원의 한 영역에 의해 형성되는 반면, 불연속적인 에피토프는 두 개 이상의 별도 영역으로 형성될 수 있다. 예를 들어, 불연속적인 에피토프는 표적 항원이 두 개의 아미노산 서열을 함께 모으고 항체에 의해 결합되는 3차원 구조를 형성하는 3차 구조를 채택할 때 형성될 수 있다. 표적 항원이 폴리펩타이드인 경우, 에피토프는 일반적으로 폴리펩타이드 사슬로 연결된 복수의 아미노산일 것이다. 연속적인 에피토프는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 연속적인 아미노산을 포함할 수 있다. 에피토프는 아미노산의 연속적인 중합체를 포함할 수 있지만, 중합체의 모든 아미노산이 항체의 아미노산 잔기에 의해 접촉될 수 있는 것은 아니다. 이러한 비접촉 아미노산은 접촉된 아미노산의 구조 및 연결에 중요할 수 있으므로 여전히 에피토프의 일부를 구성할 것이다. 통상의 기술자는 예를 들어 참조 항체와의 교차 차단 실험을 통해 임의의 주어진 항체가 참조 항체의 에피토프에 결합하는지의 여부를 결정할 수 있다. 본원에서 설명되는 특정 실시양태에서, 설명되는 항체의 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제시된다. 본원에서 설명되는 특정 실시양태에서, 설명되는 항체에 의해 경쟁적으로 차단되는 항체가 제시된다. 본원에서 설명되는 특정 실시양태에서, 설명되는 항체와 결합을 위해 경쟁하는 항체가 제시된다.

[0032] 제공되는 항체 중에는 항체 단편이 있다. "항체 단편"은 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합하는, 온전한 항체의 일부를 포함하는 온전한 항체가 아닌 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예로는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; 디아바디; 선형 항체; 단일 사슬 항체 분자(예를 들어, scFv 또는 sFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중 특이적 항체가 포함되지만, 이에 국한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 항체는 가변 중쇄 영역 및/또는 가변 경쇄 영역, 예를 들어 scFv를 포함하는 단일 사슬 항체 단편이다.

[0033] 항체 단편은 온전한 항체의 단백질 분해 소화 및 재조합 숙주 세포에 의한 생산을 포함하지만 이에 국한되지 않는 다양한 기술에 의해 만들어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 재조합 방식으로 생산된 단편, 예를 들어 폴리펩타이드 링커와 같은 합성 링커에 의해 연결된 두 개 이상의 항체 영역 또는 사슬을 갖는 것 또는 자연적으로 발생하는 온전한 항체의 효소 소화에 의해 생성되지 않는 것과 같이 자연적으로 발생하지 않는 배열을 포함하는 단편이다. 일부 측면에서, 항체 단편은 scFv이다.

[0034] "인간화" 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 아미노산 잔기가 비인간 CDR에서 유래되고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 아미노산 잔기가 인간 FR에서 유래된 항체이다. 인간화 항체는 선택적으로 인간 항체에서 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 비인간 항체의 "인간화 형태"는 일반적으로 인간에 대한 면역원성을 감소시키면서도 모 비인간 항체의 특이성 및 친화도를 유지하기 위해 인간화를 거친 비인간 항체의 변이체를 말한다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체의 일부 FR 잔기는 예를 들어 항체 특이성 또는 친화도를 회복하거나 개선하기 위해 비인간 항체(예를 들어, CDR 잔기가 그로부터 유래되는 항체)의 상응하는 잔기로 대체된다.

[0035] 제공되는 항체 중에는 인간 항체가 있다. "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포, 또는 인간 항체 라이브러리를 포함하는 인간 항체 레퍼토리 또는 기타 인간 항체 코딩 서열을 활용하는 비인간 공급원에 의해 생성된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체이다. 이 용어는 비인간 항원 결합 영역을 포함하는 비인간 항체의 인간화 형태, 예를 들어 모든 또는 실질적으로 모든 CDR이 비인간인 항체를 제외한다.

[0036] 인간 항체는 항원 도전에 반응하여 온전한 인간 항체 또는 인간 가변 영역을 갖는 온전한 항체를 생성하도록 변형된 형질전환(transgenic) 동물에 면역원을 투여함으로써 제조할 수 있다. 이러한 동물은 일반적으로 내인성 면역글로불린 유전자좌를 대체하거나 염색체 외부에 존재하거나 동물의 염색체에 무작위로 통합된 인간 면역글로불린 유전자좌의 일부 또는 전부를 포함한다. 이러한 형질전환 동물에서, 내인성 면역글로불린 유전자좌는 일반적으로 불활성화되었다. 인간 항체는 또한 인간 레퍼토리에서 유래된 항체 코딩 서열을 포함하는 파지 디스플레이 및 무세포 라이브러리를 포함한 인간 항체 라이브러리에서 유래될 수 있다.

[0037] 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 교환 가능하게 사용되며, 최소 길이로 제한되지 않는다. 제공되는 항체 및 항체 사슬 및 기타 펩타이드, 예를 들어 링커 및 결합 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드는 천연 및/또는 비천연 아미노산 잔기를 포함하는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 이 용어에는 또한 폴리펩타이드의 발현 후 변형, 예를 들어 글리코실화, 시알릴화, 아세틸화, 인산화 등이 포함된다. 일부 측면에서, 폴리펩타이드는 단백질이 원하는 활성을 유지하는 한, 천연 또는 자연 서열에 대한 변형을 포함할 수 있다. 이러한 변형은 부위 지정 돌연변이를 통한 것과 같이 의도적일 수도 있거나, 단백질을 생성하는 숙주의 돌연변이 또는 PCR 증폭으로 인한 오류와 같이 우연적일 수도 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 변이체는 일반적으로 하나 이상의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입에서 본원에서 구체적으로 개시되는 폴리펩타이드와 다르다. 이러한 변이체는 자연적으로 발생하거나, 예를 들어 본 발명의 상기 폴리펩타이드 서열 중 하나 이상을 변형하고 폴리펩타이드의 하나 이상의 생물학적 활성을 본원에서 설명되는 바와 같이 및/또는 다수의 공지된 임의의 기술을 사용하여 평가함으로써 합성에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 적절한 변형을 도입하거나 펩타이드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형에는 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환이 포함된다. 최종 구축물이 원하는 특성, 예를 들어, 항원 결합을 보유하는 한, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 최종 구축물에 존재하도록 처리될 수 있다.

[0038] 참조 폴리펩타이드 서열에 대한 서열 동일성 퍼센트(%)는 서열을 정렬하고 필요한 경우 갭을 도입하여 최대 서열 동일성 퍼센트를 달성한 후에 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로서 고려하지 않으면서 후보 서열의 아미노산 잔기가 참조 폴리펩타이드 서열의 아미노산 잔기와 동일한 퍼센트이다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 사용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 알려진 다양한 방법으로 달성할 수 있다. 비교되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 알고리즘을 포함하여 서열을 정렬하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본 발명의 목적을 위해 아미노산 서열 동일성 % 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인크.(Genentech, Inc.)에서 만들었고, 소스 코드는 미국 저작권청(미국 20559 워싱턴 디.씨. 소재)에 사용자 문서와 함께 제출되었으며, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 소재의 제넨테크, 인크.에서 공개적으로 제공되거나 소스 코드에서 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함한 UNIX 운영 체제에서 사용하도록 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에서 설정하며, 변경되지 않는다.

[0039] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교에 사용되는 상황에서, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 주어진 아미노산 서열 B와 함께 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대비한 주어진 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성 %(대안적으로 주어진 아미노산 서열 B에 대해, 주어진 아미노산 서열 B와 함께 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대비해 특정 아미노산 서열 동일성 %를 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로 표현될 수 있음)는 100 x (X/Y)와 같이

계산되고, 여기서 X는 A와 B의 해당 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일한 매치로 평가된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 총 수이다). 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 같지 않은 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %는 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 같지 않음이 이해될 것이다. 달리 구체적으로 명시되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 아미노산 서열 동일성 % 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 바로 앞 단락에 개시된 바와 같이 얻는다.

[0040] 아미노산 서열 삽입 및 결실에는 길이가 1개 잔기에서 100개 이상의 잔기를 포함하는 폴리펩타이드에 이르는 아미노 및/또는 카르복실 말단 융합, 및 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입 및 결실이 포함된다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체에는 항체의 N- 또는 C-말단에 효소(예를 들어, ADEPT의 경우) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩타이드가 융합된 것이 포함된다. 항체 분자의 서열내 삽입 변이체의 예는 경쇄에 3개 아미노산을 삽입하는 것을 포함한다. 말단 결실의 예는 경쇄의 끝에 7개 이하의 아미노산이 결실된 항체를 포함한다.

[0041] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체는 항체 표적에 대해 약 1 μM, 100 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM, 1 nM, 0.5 nM, 0.1 nM, 0.05 nM, 0.01 nM 또는 그 미만(예를 들어, 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수(K_D)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체는 항체 표적에 대해 약 100 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM, 1 nM, 0.5 nM, 0.1 nM, 0.05 nM, 0.01 nM, 또는 0.001 nM 또는 그 초과(예를 들어, 10^{-8} M 이하, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수(K_D)를 갖는다. 항체 표적은 항-VEGF 또는 항-ANG-2 항체일 수 있다. K_D는 임의의 적합한 검정에 의해 측정할 수 있다. 특정 실시양태에서, K_D는 표면 플라스몬 공명 검정(예를 들어, BIACORE®-2000, BIACORE®-3000 또는 Octet 사용)을 사용하여 측정될 수 있다.

[0042] 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 VEGF_A에 결합한다. VEGF_A는 여러 개의 상이한 스플라이스 부위를 가질 수 있고, 따라서 스플라이스 부위에 따라 다양한 이소형을 가질 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 $VEGF_{165}$에 결합한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 $VEGF_{121}$에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체의 $VEGF_{121}$에 대한 결합 친화도는 눈 질환을 치료하는 데 있어서 항체의 효능을 예측하는 데 도움이 된다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 VEGF_A의 혈소판 유래 성장 인자(PDGF) 도메인을 포함하는 펩타이드에 결합한다. 일부 실시양태에서, VEGF_A의 PDGF 도메인은 약 40번째, 41번째, 42번째, 43번째, 44번째, 45번째, 46번째, 46번째, 47번째, 48번째, 49번째 또는 50번째 내지 약 130번째, 131번째, 132번째, 133번째, 134번째, 135번째, 136번째, 137번째, 138번째, 139번째 또는 140번째 아미노산의 VEGF_A의 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 VEGF_A의 VEGF-C 헤파린 도메인을 포함하는 펩타이드에 결합한다. 일부 실시양태에서, VEGF_A의 VEGF-C 헤파린 도메인은 약 140번째, 141번째, 142번째, 143번째, 144번째, 145번째, 146번째, 147번째, 148번째, 149번째 또는 150번째 내지 약 190번째, 191번째, 192번째, 193번째, 194번째, 195번째, 196번째, 197번째, 198번째, 199번째, 120번째 아미노산의 VEGF_A의 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 인간 또는 비인간 종(예를 들어, 토끼, 개 또는 돼지)의 VEGF_A에 결합한다.

[0043] 특정 실시양태에서, 항체는 인간 VEGF에 100, 75, 60, 50, 40, 30 또는 25 피코몰 이하의 K_D 또는 EC_{50}으로 결합하는 항-인간 VEGF 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 인간 VEGF에 100, 75, 60, 50, 40, 30 또는 25 피코몰 이하의 K_D 또는 EC_{50}으로 결합하는 항-인간 VEGF_A 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 인간 VEGF에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 피코몰 이상의 K_D 또는 EC_{50}으로 결합하는 항-인간 VEGF_A 항체이다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 파리시맙과 VEGF_A 또는 그의 단편 사이의 EC_{50}과 유사한 EC_{50}으로 VEGF_A 또는 그의 단편에 결합한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 파리시맙과 VEGF_A 또는 그의 단편 사이의 EC_{50}보다 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 pM 더 낮은 EC_{50}으로 VEGF_A 또는 그의 단편에 결합한다.

[0044] 특정 실시양태에서, 항체는 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 억제하는 항-인간 VEGF_A 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 600 pM 또는 그 미만의 IC_{50}으로 억제하는 항-인간 VEGF_A 항체이다. 특정

실시양태에서, 항체는 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 피코몰 또는 그 초과의 IC_{50}으로 억제하는 항-인간 VEGF_A 항체이다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 VEGF_A 또는 그의 단편과 VEGF 수용체의 상호작용을 파리시맙이 상기 상호작용을 억제하는 것보다 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배 더 강하게 억제한다. 특정 실시양태에서, VEGF 수용체는 VEGF 수용체 2/키나제 삽입 도메인 수용체(KDR)이다.

[0045] 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 VEGF_A에 결합하는 것보다 상당히 더 적은 정도로 VEGF-B에 결합한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 VEGF_A에 결합하는 것보다 상당히 더 적은 정도로 VEGF-C에 결합한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 VEGF_A에 결합하는 것보다 상당히 더 적은 정도로 VEGF-D에 결합한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 VEGF_A에 결합하는 것보다 상당히 더 적은 정도로 PIGF-1에 결합한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 VEGF_A에 결합하는 것보다 상당히 더 적은 정도로 PIGF-3에 결합한다.

[0046] 특정 실시양태에서, 항체는 인간 ANG-2에 100, 75, 60, 55, 50, 40, 30 또는 25 피코몰 이하의 K_D 또는 EC_{50}으로 결합하는 항-인간 ANG-2 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 인간 ANG-2에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 피코몰 이상의 K_D 또는 EC_{50}으로 결합하는 항-인간 ANG-2 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 파리시맙이 ANG-2에 결합하는 것보다 적어도 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배 또는 70배 더 강하게 ANG-2에 결합한다.

[0047] 특정 실시양태에서, 항체는 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 억제하는 항-인간 ANG-2 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 600 pM 이하의 IC_{50}으로 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 억제하는 항-인간 VEGF_A 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 피코몰 이상의 IC_{50}으로 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 억제하는 항-인간 VEGF_A 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 ANG-2와 ANG-2 수용체의 상호작용을 파리시맙이 상기 상호작용을 억제하는 것보다 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배 또는 15배 더 강하게 억제한다. 일부 실시양태에서, ANG-2 수용체는 면역글로불린 유사 및 EGF 유사 도메인을 갖는 티로신 키나제 2 수용체(Tie-2 수용체)이다.

[0048] 특정 실시양태에서, 항체는 인간 VEGF에 100, 75, 60, 50, 40, 30 또는 25 피코몰 이하의 K_D 또는 EC_{50}으로 결합하는 항-인간 VEGF/ANG-2 이중 특이적 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 인간 VEGF_A에 100, 75, 60, 50, 40, 30 또는 25 피코몰 이하의 K_D 또는 EC_{50}으로 결합하는 항-인간 VEGF/ANG-2 이중 특이적 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 인간 VEGF_A에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 피코몰 이상의 K_D 또는 EC_{50}으로 결합하는 항-인간 VEGF/ANG-2 이중 특이적 항체이다.

[0049] 특정 실시양태에서, 항체는 인간 ANG-2에 100, 75, 60, 50, 40, 30 또는 25 피코몰 이하의 K_D 또는 EC_{50}으로 결합하는 항-인간 VEGF/ANG-2 이중 특이적 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 인간 ANG-2에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 피코몰 이상의 K_D 또는 EC_{50}으로 결합하는 항-인간 VEGF/ANG-2 이중 특이적 항체이다.

[0050] 일부 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 IgG 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 IgE 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 IgM 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 IgA 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항체는 Fab, $F(ab)_2$, 단일 도메인 항체 또는 단일 사슬 가변 단편(scFv)이다.

[0051] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 대리 경쇄와 짝을 이루는, 본원에서 개시되는 항체는 대리 항체이다. 일부 실시양태에서, 그의 항원 결합 단편은 대리 항체 항원 결합 단편(Sab) 또는 대리 항체의 단일 사슬 가변 단편(scSv)이다.

[0052] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본원에서 제공되는 항체의 Fc 영역에 도입되어 Fc 영역 변이체를 생성할 수 있다. 본원에서 Fc 영역은 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역이다. Fc 영역에는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역이 포함된다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에 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.

[0053] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본원에서 제공되는 항체의 Fc 영역에 도입되어 Fc 영역 변이체를 생성할 수 있다. 본원에서 Fc 영역은 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역이다. Fc 영역에는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역이 포함된다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에 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.

[0054] 일부 경우에, 면역글로불린의 Fc 영역은 항원 의존성 세포 독성(ADCC), 보체 의존성 세포 독성(CDC) 및 항체 의존성 세포 매개 식세포 작용(ADCP)과 같은 많은 중요한 항체 기능(예를 들어, 이펙터 기능)에 중요하며, 이는 서로 다른 메커니즘을 통해 표적 세포를 죽인다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 항체는 항체의 의도된 용도에 대한 생물학적 활성을 기반으로 하여 선택되는 상이한 Fc 영역을 포함하는 불변 도메인과 조합된 본 발명의 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어, 특정 경우에, 인간 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 네 가지 하위 클래스로 분류될 수 있으며, 이들 각각은 하나 이상의 Fcɣ 수용체(활성화 수용체 FcɣRI(CD64), FcɣRIIA, FcɣRIIC(CD32); FcɣRIIIA 및 FcɣRIIIB(CD16) 및 억제 수용체 FcɣRIIB) 및 보체의 제1 성분(C1q)에 대한 결합을 위한 고유한 프로파일을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 인간 IgG1 및 IgG3은 모든 Fcɣ 수용체에 결합하고, IgG2는 $Fc\gamma RIIA_{H131}$에 결합하고 $Fc\gamma RIIA_{R131}$ $Fc\gamma RIIIA_{V158}$에 대한 친화도가 낮고, IgG4는 FcɣRI, FcɣRIIA, FcɣRIIB, FcɣRIIC 및 $Fc\gamma RIIIA_{V158}$에 결합하고 억제 수용체 FcɣRIIB는 다른 모든 Fcɣ 수용체보다 IgG1, IgG2 및 IgG3에 대한 친화도가 낮다. 연구에 따르면, FcɣRI는 IgG2에 결합하지 않고 FcɣRIIIB는 IgG2 또는 IgG4에 결합하지 않는다. 일반적으로, ADCC 활성과 관련하여 인간 IgG1≥IgG3>>IgG4≥IgG2이다.

[0055] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 감소된 이펙터 기능을 갖는 변이체로서, 이는 특정 이펙터 기능(예를 들어, 보체 고정 및 ADCC)이 불필요하거나 해로운 적용 분야에 바람직한 후보가 된다. 이러한 항체는 감소된 보체 의존성 세포 독성(CDC), 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 또는 항체 의존성 세포 매개 식세포 작용(ADCP)을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 증가된 면역원성이 유익한 적용 분야에서 증가된 이펙터 기능을 갖는 변이체이다. 이러한 항체는 증가된 CDC, ADCC 또는 ADCP 또는 이들의 조합을 가질 수 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 비제한적 예는 미국 특허 번호 5,500,362 및 5,821,337에 설명되어 있다. 대안적으로, 비방사성 검정 방법을 사용할 수 있다(예를 들어, ACTI™ 및 CytoTox 96® 비방사성 세포 독성 검정). 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초혈 단핵세포(PBMC), 단핵구, 대식세포 및 자연 살해(NK) 세포를 포함한다.

[0056] 항체는 증가된 반감기 및 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 개선된 결합을 가질 수 있다(예를 들어, US 2005/0014934 참조). 이러한 항체는 Fc 영역의 FcRn에 대한 결합을 개선하는 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함할 수 있으며, EU 넘버링 시스템에 따른 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 잔기에 치환이 있는 항체를 포함한다(예를 들어, US 특허 번호 7,371,826 참조). Fc 영역 변이체의 다른 예도 고려된다(예를 들어, 문헌 [Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260 및 5,624,821; 및 WO94/29351 참조).

[0057] 일부 실시양태에서, 항체의 하나 이상의 잔기가 시스테인 잔기로 치환된 시스테인 조작 항체, 예를 들어 "티오 MAb"를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 실시양태에서, 치환된 잔기는 항체의 접근 가능한 부위에서 발생한다. 반응성 티올 기는 약물 모이어티 또는 링커 약물 모이어티와 같은 다른 모이어티에 접합하기 위한 부위에 위치하여 면역 접합체를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다음 잔기 중 임의의 하나 이상을 시스테인으로 치환할 수 있다: 경쇄의 V205(카바트 넘버링); 중쇄의 A118(EU 넘버링); 중쇄 Fc 영역의 S400(EU 넘버링).

[0058] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체는 알려지고 이용 가능한 추가적인 비단백질성 모이어티를 포함하도록 추가로 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 모이어티에는 수용성 중합체가 포함되지만, 이에 국한되지 않는다. 수용성 중합체의 비제한적인 예에는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로오스, 덱스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(호모폴리머 또는 랜덤 공중합체), 및 덱스트란 또는 폴리(n 비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 호모폴리머, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올(예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알코올 및 이들의 혼합물이 포함되지만, 이에 국한되지 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 물에서의 안정성으로 인해 제조 상 이점이 있을 수 있다. 중합체는 분자량에 관계없이 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 다를 수 있으며, 두 개 이상의 중합체가 부착된 경우 중합체는 동일하거나 상이한 분자일 수 있다.

[0059] 본원에서 설명되는 항체는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 핵산은 두 개 이상의 뉴클레오타이드 염기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 한 유형이다. 특정 실시양태에서, 핵산은 폴리펩타이드 코딩 폴리뉴클레오타이드를 세포로 전달하는 데 사용될 수 있는 벡터의 성분이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "벡터"는 연결된 또 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 한 유형의 벡터는 게놈 통합 벡터 또는 "통합 벡터"이고, 이는 숙주 세포의 염색체 DNA에 통합될 수 있다. 또 다른 유형의 벡터는 "에피솜" 벡터, 예를 들어 염색체외 복제가 가능한 핵산이다. 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있는 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 지칭된다. 적합한 벡터는 플라스미드, 박테리아 인공 염색체, 효모 인공 염색체, 바이러스 벡터 등을 포함한다. 발현 벡터에서, 전사를 제어하는데 사용되는 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 신호와 같은 조절 요소는 포유동물, 미생물, 바이러스 또는 곤충 유전자에서 유래할 수 있다. 일반적으로 복제 기점에 의해 부여되는 숙주에서의 복제 능력 및 형질전환체 인식을 용이하게 하는 선택 유전자가 추가로 통합될 수 있다. 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스 등과 같은 바이러스에서 유래된 벡터가 사용될 수 있다. 플라스미드 벡터는 게놈 영역으로 통합하기 위해 선형화될 수 있다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 플라스미드이다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 렌티바이러스, 아데노바이러스 또는 아데노 연관 바이러스이다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 아데노바이러스이다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 아데노 연관 바이러스이다. 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 렌티바이러스이다. 특정 실시양태에서, 본원에서 설명된 발현 벡터는 유전자 요법에 사용된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 발현 벡터는 정맥내 투여를 위해 제제화된다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 발현 벡터는 유리체내 투여를 위해 제제화된다.

[0060] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "상동성의", "상동성" 또는 "상동성 백분율"은 참조 서열과 관련하여 아미노산 서열 또는 핵산 서열을 설명하기 위해 본원에서 사용될 때, 칼린(Karlin) 및 알츌(Altschul)에 의해 설명된 바와 같은 공식을 사용하여 결정될 수 있다(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, 1990 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993에서 수정됨). 이러한 공식은 찰츌 등의 기본 국소 정렬 검색 도구(BLAST) 프로그램(J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990)에 통합되어 있다. 서열의 상동성 백분율은 본 출원의 출원일 당시의 최신 버전의 BLAST를 사용하여 결정할 수 있다.

[0061] 본원에서 설명되는 항체를 코딩하는 핵산은 적합한 세포를 감염 또는 형질감염시키거나, 적합한 세포를 다른 방식으로 형질전환시키는 데 사용될 수 있고, 따라서 상업적 또는 치료적 용도를 위한 항체의 생산이 가능해진다. 대규모 세포 배양으로부터 항체를 생산하기 위한 표준 세포주 및 방법은 관련 기술 분야에 알려져 있다. 예를 들어, 문헌 [Li et al., "Cell culture processes for monoclonal antibody production." *Mabs*. 2010 Sep-Oct; 2(5): 466-477]을 참조한다. 특정 실시양태에서, 세포는 진핵 세포이다. 특정 실시양태에서, 진핵 세포는 포유동물 세포이다. 특정 실시양태에서, 포유동물 세포는 항체를 생산하는 데 유용한 세포주, 예를 들어 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, NSO 뮤린 골수종 세포 또는 PER.C6® 세포이다. 특정 실시양태에서, 항체를 코딩하는 핵산은 항체를 생산하는 데 유용한 세포의 게놈 유전자좌에 통합된다. 특정 실시양태에서, 본원에서는 항체를 만드는 방법을 설명하는데, 이 방법은 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 상기 항체의 생산 및 분비를 허용하기에 충분한 시험관내 조건 하에서 배양하는 단계를 포함한다.

[0062] 특정 실시양태에서, 다음을 포함하는 마스터 세포 은행(master cell bank)이 본원에서 설명된다: (a) 게놈 위치에 통합된 본원에서 설명되는 항체 또는 이중 특이적 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 포유동물 세포주; 및 (b) 동결 보호제. 특정 실시양태에서, 동결 보호제는 글리세롤 또는 DMSO를 포함한다. 특정 실시양태에서, 마스터 세포 은행은 다음을 포함한다: (a) 게놈 위치에 통합된 본원에서 설명되는 항체 또는 이중 특이적 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 CHO 세포주; 및 (b) 동결 보호제. 특정 실시양태에서, 동결 보호제는 글리세롤 또는 DMSO를 포함한다. 특정 실시양태에서, 마스터 세포 은행은 액체 질소에 의한 동결을 견딜 수 있는 적합한 바이알 또는 용기에 담겨 있다.

[0063] 또한, 본원에서 설명되는 항체를 만드는 방법이 본원에서 설명된다. 이러한 방법은 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포 또는 세포주를 항체의 발현 및 분비를 허용하기에 충분한 조건 하에 세포 배양 배지에서 인큐베이팅하고, 세포 배양 배지에서 항체를 추가로 수확하는 것을 포함한다. 수확은 살아있는 세포, 세포 파편, 비항체 단백질 또는 폴리펩타이드, 바람직하지 않은 염, 완충액 및 배지 성분을 제거하기 위한 하나 이상의 정제 단계를 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 추가의 정제 단계(들)는 원심분리, 초원심분리, 단백질 A, 단백질 G, 단백질 A/G 또는 단백질 L 정제 및/또는 이온 교환 크로마토그래피를 포함한다.

[0064] 본원에서 사용되는 바와 같이, "치료하다", "치료" 또는 "치료하는"은 예를 들어 질병 또는 병태의 중증도 감소를 초래하는 생리학적 질병 상태에 대한 의도적인 개입, 병태 과정의 지속 기간의 감소, 질병 또는 병태와 관련된 하나 이상의 증상의 개선 또는 제거, 또는 질병 또는 병태가 있는 대상체에 대한 유익한 효과의 제공을 의미

한다. 치료에는 기저 질병 또는 병태의 치료를 필요로 하지 않는다.

[0065] 약물 또는 치료제의 "치료 유효량", "유효 용량", "유효량" 또는 "치료 유효 투여량"은 단독으로 또는 다른 치료제와 병용하여 사용 시에 질병의 발병으로부터 대상체를 보호하거나 질병 증상의 중증도 감소, 질병 무증상 기간의 빈도 및 지속 기간 증가, 또는 질병으로 인한 손상 또는 장애 예방으로 입증되는 질병 퇴행을 촉진하는 약물의 임의의 양이다. 질병 퇴행을 촉진하는 치료제의 능력은 임상 시험 동안 인간 대상체에서, 인간에서의 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서, 또는 시험관내 검정에서 치료제의 활성을 검정하는 것과 같이 숙련된 실무자에게 알려진 다양한 방법을 사용하여 평가할 수 있다.

[0066] 본원에서 사용되는 바와 같이, "담체", "보조제" 또는 "희석제"와 관련하여 "약학적으로 허용되는"에는 생리학적으로 적합한 모든 용매, 분산매, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등이 포함된다. 일부 측면에서, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척추 또는 표피 투여(예를 들어, 주사 또는 주입에 의한)에 적합하다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물, 즉 항체는 화합물을 불활성화시킬 수 있는 산 및 기타 자연 조건의 작용으로부터 화합물을 보호하는 물질로 코팅될 수 있다.

[0067] 본원에서 설명되는 약학적 화합물은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 염을 포함할 수 있다. "약학적으로 허용되는 염"은 모 화합물의 원하는 생물학적 활성을 유지하고 바람직하지 않은 독성학적 효과를 부여하지 않는 염을 말한다(예를 들어, 문헌 [Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19] 참조). 이러한 염의 예로는 산 부가염 및 염기 부가염이 있다. 산 부가염에는 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 인산 등과 같은 무독성 무기산, 및 지방족 모노- 및 디카르복실산, 페닐-치환 알칸산, 하이드록시 알칸산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 설폰산 등과 같은 무독성 유기산에서 유래된 염이 포함된다. 염기 부가염에는 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등과 같은 알칼리 토금속에서 유래된 염, 및 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등과 같은 무독성 유기 아민에서 유래된 염이 포함된다.

[0068] **VEGF 항체**

[0069] VEGF 단백질에 결합하는 항체가 본원에서 설명된다. 일부 실시양태에서, VEGF 단백질은 인간 VEGF 단백질이다.

[0070] 특정 실시양태에서, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 본원에서 설명되고, 이는 서열번호 3(GYTFSIYT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); 서열번호 4(INPYNGNT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 서열번호 5(AKAPAVFWWTGLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고, 항체는 VEGF에 결합한다.

[0071] 특정 실시양태에서, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 본원에서 설명되고, 이는 서열번호 3(GYTFSIYT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); 서열번호 4(INPYNGNT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 서열번호 5(AKAPAVFWWTGLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3), 서열번호 23(NDHDIGVYS)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1); 서열번호 24(YFSQSDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(LCDR2); 및 서열번호 25(AMGARSSVTH)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(LCDR3)을 포함하고, 항체는 VEGF에 결합한다.

[0072] 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 96%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 97%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 98%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 99%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0073] 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 중쇄는 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 중쇄는 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 중쇄는 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 중쇄는 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 96%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 중쇄는 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 97%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 중쇄는 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 98%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 중쇄는 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 99%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 중쇄는 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0074] 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 96%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 97%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 경쇄 가변 영역은 VEGF 항체는 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 98%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 99%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0075] 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 경쇄는 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 경쇄는 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 경쇄는 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 경쇄는 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 96%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 경쇄는 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 97%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 경쇄는 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 98%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 경쇄는 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 99%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체의 경쇄는 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0076] 특정 실시양태에서, VEGF 항체는 약 75피코몰 이하의 EC_{50}으로 VEGF에 결합한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체는 약 60 피코몰 이하의 EC_{50}으로 VEGF에 결합한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체는 약 50 피코몰 이하의 EC_{50}으로 VEGF에 결합한다. 특정 실시양태에서, VEGF 항체는 약 40 피코몰 이하의 EC_{50}으로 VEGF에 결합한다.

[0077] **ANG-2 항체**

[0078] ANG-2 단백질에 결합하는 항체가 본원에서 설명된다. 일부 실시양태에서, ANG-2 단백질은 인간 ANG-2 단백질이다.

[0079] 특정 실시양태에서, 안지오포이에틴 2(ANG-2) 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 본원에서 설명되고, 이는 서열번호 13(GFTFSSYG)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); 서열번호 14(ISADSGDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 서열번호 15(AKEFISWIYTFDYLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고, 항체는 ANG-2에 결합한다.

[0080] 특정 실시양태에서, 안지오포이에틴 2(ANG-2) 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 본원에서 설명되고, 이는 서열번호 13(GFTFSSYG)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); 서열번호 14(ISADSGDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 서열번호

15(AKEFISWIYTFDYLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3); 서열번호 23(NDHDIGVYS)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1); 서열번호 24(YFSQSDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(LCDR2); 및 서열번호 25(AMGARSSVTH)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(LCDR3)을 포함하고, 항체는 ANG-2에 결합한다.

[0081] 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 96%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 97%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 98%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 99%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0082] 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 중쇄는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 중쇄는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 중쇄는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 중쇄는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 96%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 중쇄는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 97%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 중쇄는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 98%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 중쇄는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 99%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 중쇄는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0083] 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 96%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 97%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 98%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 99%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 경쇄 가변 영역은 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0084] 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 경쇄는 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 경쇄는 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 경쇄는 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 경쇄는 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 96%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 경쇄는 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 97%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 경쇄는 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 98%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 경쇄는 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 99%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, ANG-2 항체의 경쇄는 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0085] **VEGF/ANG-2 이중 특이적 항체**

[0086] VEGF 및 ANG-2 단백질에 결합하는 이중 특이적 항체가 본원에서 설명된다. 일부 실시양태에서, VEGF 및/또는 ANG-2 단백질은 인간 VEGF 또는 ANG-2 단백질이다. 본 개시내용의 이중 특이적 항체는 공통 경쇄 형태이고, 여기서 VEGF 결합 모이어티의 중쇄는 ANG-2 결합 모이어티의 중쇄와 다르고, 두 중쇄와 연관될 수 있는 공통 경쇄가 사용된다. 이러한 형태는 원치 않는 중쇄 및 경쇄 페어링을 방지하여(경쇄는 한 가지 유형만 있기 때문에) 생산 동안 항체 형성을 보다 효율적으로 만든다. 생성된 항체는 고전적 항체로 배열된 두 개의 중쇄 및 두 개의 경쇄를 포함한다(단, 두 개의 중쇄는 이종이량체를 형성한다). 원치 않는 중쇄 동종이량체화(예를 들어, 두 개의 항-ANG-2 중쇄 또는 두 개의 항-VEGF 중쇄)를 방지하기 위해, 중쇄는 적절한 이종이량체 형성을 촉진하기 위해 중쇄 불변 영역에 돌연변이 또는 치환을 추가로 포함할 수 있다.

[0087] 공통 경쇄 이중 특이적 구조는 CH3 도메인 내에 돌연변이를 추가로 포함하는 제1 및 제2 중쇄 분자를 포함할 수 있으며, 이는 제1 및 제2 중쇄의 커플링을 촉진하고/하거나 제1 중쇄가 또 다른 제1 중쇄에 커플링되거나 제2 중쇄가 또 다른 제2 중쇄에 커플링되는 것을 방지한다. 돌연변이는 물리적으로(예를 들어, 입체 장애, "손잡이(knob)"가 "구멍(hole)"으로의) 또는 생화학적으로(예를 들어, 정전기적 상호작용) 두 개의 제1 중쇄 분자 또는 두 개의 제2 중쇄 분자의 커플링을 방지할 수 있다. 예시적인 손잡이가 구멍으로의 돌연변이는 한 중쇄에 T366W(EU 넘버링) 및 제2 중쇄에 T366S/L368A/Y407V(EU 넘버링)를 포함할 수 있다. 제1 및 제2 중쇄 분자의 커플링을 용이하게 하는 예시적인 돌연변이는 예를 들어 WO2009089004, 미국 특허 번호 8,642,745, US PG-PUB: US20140322756 및 문헌 ["The making of bispecific antibodies" MAbs. 2017 February-March; 9(2): 182-212]에 개시되어 있다.

[0088] 항-VEGF/ANG-2 이중 특이적 항체는 이펙터 기능을 감소시키기 위해 하나 이상의 치환을 포함할 수 있다. 이러한 치환은 변이체 Fc 분자를 생성한다. 일부 실시양태에서, 변이체 Fc 영역은 IgG1 Fc 영역을 포함하고, 여기서 하나 이상의 돌연변이는 EU 넘버링에 따른 다음을 포함한다: (a) 297A, 297Q, 297G, 또는 297D, (b) 279F, 279K, 또는 279L, (c) 228P, (d) 235A, 235E, 235G, 235Q, 235R, 또는 235S, (e) 237A, 237E, 237K, 237N, 또는 237R, (f) 234A, 234V, 또는 234F, (g) 233P, (h) 328A, (i) 327Q 또는 327T, (j) 329A, 329G, 329Y, 또는 329R (k) 331S, (l) 236F 또는 236R, (m) 238A, 238E, 238G, 238H, 238I, 238V, 238W, 또는 238Y, (n) 248A, (o) 254D, 254E, 254G, 254H, 254I, 254N, 254P, 254Q, 254T, 또는 254V, (p) 255N, (q) 256H, 256K, 256R, 또는 256V, (r) 264S, (s) 265H, 265K, 265S, 265Y, 또는 265A, (t) 267G, 267H, 267I, 또는 267K, (u) 268K, (v) 269N 또는 269Q, (w) 270A, 270G, 270M, 또는 270N, (x) 271T, (y) 272N, (z) 292E, 292F, 292G, 또는 292I, (aa) 293S, (bb) 301W, (cc) 304E, (dd) 311E, 311G, 또는 311S, (ee) 316F, (ff) 328V, (gg) 330R, (hh) 339E 또는 339L, (ii) 343I 또는 343V, (jj) 373A, 373G, 또는 373S, (kk) 376E, 376W, 또는 376Y, (ll) 380D, (mm) 382D 또는 382P, (nn) 385P, (oo) 424H, 424M, 또는 424V, (pp) 434I, (qq) 438G, (rr) 439E, 439H, 또는 439Q, (ss) 440A, 440D, 440E, 440F, 440M, 440T, 또는 440V, (tt) K322A, (uu) L235E, (vv) L234A 및 L235A, (ww) L234A, L235A, 및 G237A, (xx) L234A, L235A, 및 P329G, (yy) L234F, L235E, 및 P331S, (zz) L234A, L235E, 및 G237A, (aaa), L234A, L235E, G237A, 및 P331S (bbb) L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S, 및 P331S, (ccc) L234A, L235A, 및 P329A, (ddd) G236R 및 L328R, (eee) G237A, (fff) F241A, (ggg) V264A, (hhh) D265A, (iii) D265A 및 N297A, (jjj) D265A 및 N297G, (kkk) D270A, (lll) A330L, (mmm) P331A 또는 P331S, 또는 (nnn) E233P, (ooo) L234A, L235E, G237A, A330S, 및 P331S 또는 (ppp) (a) - (uu)의 임의의 조합.

[0089] 특정 실시양태에서, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 결합 모이어티 및 안지오포이에틴 2(ANG-2) 결합 모이어티를 포함하는 이중 특이적 항체가 본원에서 설명되고, 여기서 VEGF 결합 모이어티는 (a) 서열번호 3(GYTFSIYT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); (b) 서열번호 4(INPYNGNT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 (c) 서열번호 5(AKAPAVFWWTGLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고; ANG-2 결합 모이어티는 (a) 서열번호 13(GFTFSSYG)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); (b) 서열번호 14(ISADSGDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 (c) 서열번호 15(AKEFISWIYTFDYLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고, 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합한다.

[0090] 특정 실시양태에서, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 결합 모이어티 및 안지오포이에틴 2(ANG-2) 결합 모이어티를 포함하는 이중 특이적 항체가 본원에서 설명되고, 여기서 VEGF 결합 모이어티는 (a) 서열번호 3(GYTFSIYT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); (b) 서열번호 4(INPYNGNT)에 제시된 아미노산

서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 (c) 서열번호 5(AKAPAVFWWTGLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고; ANG-2 결합 모이어티는 (a) 서열번호 13(GFTFSSYG)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); (b) 서열번호 14(ISADSGDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 (c) 서열번호 15(AKEFISWIYTFDYLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고; 여기서 이중 특이적 항체는 (a) 서열번호 23(NDHDIGVYS)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1); (b) 서열번호 24(YFSQSDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(LCDR2); 및 (c) 서열번호 25(AMGARSSVTH)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(LCDR3)을 포함하고; VEGF 및 ANG-2에 결합한다.

[0091] 특정 실시양태에서, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 결합 모이어티 및 안지오포이에틴 2(ANG-2) 결합 모이어티를 포함하는 이중 특이적 항체가 본원에서 설명되고, 여기서 VEGF 결합 모이어티는 (a) 서열번호 3(GYTFSIYT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); (b) 서열번호 4(INPYNGNT)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 (c) 서열번호 5(AKAPAVFWWTGLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고; ANG-2 결합 모이어티는 (a) 서열번호 13(GFTFSSYG)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1); (b) 서열번호 14(ISADSGDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2); 및 (c) 서열번호 15(AKEFISWIYTFDYLDY)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함하고; 여기서 이중 특이적 항체는 (a) 서열번호 23(NDHDIGVYS)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 공통 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1); (b) 서열번호 24(YFSQSDK)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(LCDR2); 및 (c) 서열번호 25(AMGARSSVTH)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(LCDR3)을 포함하고; VEGF 및 ANG-2에 결합한다.

[0092] 또한, 특정 실시양태에서, (a) 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄 가변 영역; (b) 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄 가변 영역; 및 (c) 서열번호 21에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 공통 경쇄 가변 영역을 포함하는 이중 특이적 항체가 본원에서 설명되고, 여기서 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합한다.

[0093] 특정 실시양태에서, VEGF/ANG-2 이중 특이적 항체는 (a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄; (b) 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄; 및 (c) 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 공통 경쇄를 포함하고, 여기서 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합한다.

[0094] 특정 실시양태에서, VEGF/ANG-2 이중 특이적 항체는 (a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄; (b) 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄; 및 (c) 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 공통 경쇄를 포함하고, 여기서 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합한다.

[0095] 특정 실시양태에서, VEGF/ANG-2 이중 특이적 항체는 (a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄; (b) 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄; 및 (c) 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 공통 경쇄를 포함하고, 여기서 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합한다.

[0096] 특정 실시양태에서, VEGF/ANG-2 이중 특이적 항체는 (a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 97%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄; (b) 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 97%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄; 및 (c) 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 97%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 공통 경쇄를 포함하고, 여기서 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합한다.

[0097] 특정 실시양태에서, VEGF/ANG-2 이중 특이적 항체는 (a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 98%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄; (b) 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 98%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄; 및 (c) 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 98%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 공통 경쇄를 포함하고, 여기서 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합한다.

[0098] 특정 실시양태에서, VEGF/ANG-2 이중 특이적 항체는 (a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 99%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄; (b) 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 99%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄; 및 (c) 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 99%의 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 공통 경쇄를 포함하고, 여기서 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합한다.

[0099] 또한, 특정 실시양태에서, (a) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄; (b) 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄; 및 (c) 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 공통 경쇄를 포함하는 VEGF/ANG-2 이중 특이적 항체가 본원에서 설명되고, 여기서 이중 특이적 항체는 VEGF 및 ANG-2에 결합한다.

[0100] **치료 방법**

[0101] 특정 실시양태에서, 눈 질환을 치료하는 데 유용한 항체가 본원에서 개시된다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 연령 또는 당뇨병과 같은 또 다른 중복이환과 관련된다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 황반 변성이다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 연령과 관련이 있다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 당뇨병과 관련이 있다. 특정 실시양태에서, 황반 변성은 습성 황반 변성이다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 분지 정맥 폐쇄증이다. 특정 실시양태에서, 눈 질환은 중심 정맥 폐쇄증이다.

[0102] 특정 실시양태에서, 항체는 항체를 함유하는 약학 조성물의 투여에 적합한 임의의 경로, 예를 들어 국소, 피하, 정맥내 또는 유리체내 투여를 통해 이를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체를 포함하는 약학 조성물은 국소 투여된다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체를 포함하는 약학 조성물은 피하 투여된다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체를 포함하는 약학 조성물은 정맥 내로 투여된다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체를 포함하는 약학 조성물은 유리체 내로 투여된다.

[0103] 특정 실시양태에서, 항체는 예를 들어 매주, 매주 2회, 매월, 매월 2회, 2주에 1회, 3주에 1회, 또는 한 달에 1회, 2개월에 1회, 3개월에 1회, 4개월에 1회, 5개월에 1회, 또는 6개월에 1회 등과 같은 적절한 투여 일정에 따라 투여된다. 항체는 임의의 치료 유효량으로 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 치료상 허용되는 양은 약 0.1 mg/kg 내지 약 50 mg/kg이다. 특정 실시양태에서, 치료상 허용되는 양은 약 1 mg/kg 내지 약 40 mg/kg이다. 특정 실시양태에서, 치료상 허용되는 양은 약 1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg이다. 특정 실시양태에서, 치료상 허용되는 양은 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg이다. 특정 실시양태에서, 치료상 허용되는 양은 약 5 mg/kg 내지 약 30 mg/kg이다. 특정 실시양태에서, 치료상 허용되는 양은 약 5 mg/kg 내지 약 20 mg/kg이다. 유리체내 투여 농도는 유리체내 사용을 위해 50 mg/ml에서 150 mg/ml까지 다양할 수 있다. 치료 유효량에는 치료할 질환 또는 질병과 관련된 하나 이상의 증상을 개선하기에 충분한 양이 포함된다.

[0104] **약학적으로 허용되는 부형제, 담체 및 희석제**

[0105] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항-VEGF/ANG-2 단일 특이적 및 이중 특이적 항체는 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제, 담체 및 희석제를 포함하는 약학 조성물에 포함된다. 약학적으로 허용되는 부형제, 담체 및 희석제는 항체의 저장 수명, 안정성 또는 투여성을 증가시키기 위해 포함될 수 있다. 이러한 화합물에는 염, pH 완충액, 세제, 항응고제 및 방부제가 포함된다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 멸균 용액에 현탁되어 투여된다. 특정 실시양태에서, 용액은 약 0.9% NaCl을 포함한다. 특정 실시양태에서, 용액은 약 5.0% 덱스트로스를 포함한다. 특정 실시양태에서, 용액은 또한 다음 중 하나 이상을 포함한다: 완충액, 예를 들어, 아세테이트, 시트레이트, 히스티딘, 석시네이트, 포스페이트, 비카르보네이트 및 하이드록시메틸아미노메탄(트리스); 계면활성제, 예를 들어 폴리소르베이트 80(트윈 80), 폴리소르베이트 20(트윈 20) 및 폴록사머 188; 폴리올/디사카라이드/폴리사카라이드, 예를 들어, 포도당, 덱스트로스, 만노스, 만니톨, 소르비톨, 수크로스, 트레할로스 및 덱스트란 40; 아미노산, 예를 들어 글리신 또는 아르기닌; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산, 메티오닌; 또는 킬레이팅제, 예를 들어 EDTA 또는 EGTA.

[0106] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 동결건조되어 운송/보관되고, 투여 전에 재구성될 수 있다. 특정 실

시양태에서, 동결건조된 항체 제제는 만니톨, 소르비톨, 수크로스, 트레할로스, 덱스트란 40 또는 이들의 조합과 같은 증량제를 포함한다. 동결건조 제제는 유리 또는 다른 적합한 비반응성 재료로 구성된 바이알에 담을 수 있다. 항체는 재구성 여부와 관계없이 제제화될 때 일반적으로 7.0 미만의 특정 pH에서 완충될 수 있다. 특정 실시양태에서, pH는 4.5 내지 7.0, 4.5 내지 6.5, 4.5 내지 6.0, 4.5 내지 5.5, 4.5 내지 5.0, 또는 5.0 내지 6.0일 수 있다.

[0107] 또한, 적절한 용기에 본원에서 설명되는 하나 이상의 항체 및 사용 설명서, 희석제, 부형제, 담체 및 투여 장치 중에서 선택되는 하나 이상의 추가의 구성요소를 포함하는 키트가 본원에서 설명된다.

[0108] 특정 실시양태에서, 눈 질환에 대한 치료제를 제조하는 방법이 본원에서 설명되고, 상기 방법은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제와 본 개시내용의 항체를 혼합하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 보관 또는 운송을 위한 암 치료제를 제조하는 방법이 본원에서 설명되고, 상기 방법은 본 개시내용의 하나 이상의 항체를 동결건조하는 것을 포함한다.

[0109] **실시예**

[0110] 다음의 예시적인 실시예는 본원에서 설명되는 조성물 및 방법의 실시양태를 제시하는 것이며, 어떤 방식으로든 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0111] ***실시예 1 - VEGF/ANG-2 이중 특이적 대리 항체의 생산***

[0112] 서열번호 2, 서열번호 12 및 서열번호 22에 상응하는 서열을 코딩하는 핵산 서열을 플라스미드 벡터에 클로닝하여 진핵 세포 발현을 지시하였다. 세 가지 유형의 발현 플라스미드를 구축하였다. 제1 플라스미드는 각각의 대리 경쇄(SLC), VEGF 특이적 손잡이 중쇄 및 ANG-2 특이적 구멍 중쇄의 1개 카피를 포함하였다. 제2 플라스미드는 SLC:HC-손잡이:HC:구멍:SLC 배향으로 SLC의 2개 카피 및 각각의 중쇄의 1개 카피를 포함하였다. 제3 플라스미드는 SLC:SLC-:HC-손잡이:HC:구멍의 배향으로 SLC의 2개 카피 및 각각의 중쇄의 1개 카피를 포함하였다. 3개의 안정한 세포주에서 발현되고 정제된 생성물("RO-101")을 각각 샘플 1, 샘플 2 및 샘플 3으로 명명하였다.

[0113] CHO 세포는 6 mM L-글루타민(Life Technologies)이 보충된 CD-CHO 배지(Life Technologies)에서 배양되었다. 세포는 36.5℃, 5% CO_2, 140 rpm의 진탕 인큐베이터에서 인큐베이팅되었다.

[0114] 유전자 발현 플라스미드는 선형화한 후 에탄올 침전시키고, 최종 농도가 400 μg/ml가 되도록 EB 완충액 내에 재현탁하여 형질감염을 위해 제조되었다. 형질감염은 진 펄서 엑스셀(Gene Pulser XCell)을 사용하여 전기천공을 통해 수행되었다. 각각의 형질감염에 대해, 생존 가능 세포를 예열된 CD-CHO 배지에 1.43 x 10^7개 세포/ml로 재현탁하였다. 400 μg/ml 농도의 선형화된 DNA 100 μl를 0.4 cm 갭 전기천공 큐벳에 분주하고, 700 μl의 세포 현탁액을 첨가하였다. 세포 및 DNA의 3개의 큐벳을 300 V, 900 μF에서 전기천공하고, 10 ml/L SP4가 보충된 30 ml의 예열된 CD-CHO로 즉시 옮겨 안정한 풀을 생성하였다. 선택된 안정적인 형질감염체를 확장하고, 단백질 A 크로마토그래피를 통해 상청액에서 대리 항체를 단리하였다. 2차 연마 단계를 수행하여 원치 않는 분획, 즉 응집체를 제거하였다. 그런 다음, 정제된 단백질을 SE-HPLC 및 SDS-PAGE로 분석하였다.

[0115] SDS-PAGE 분석을 위해, RO-101의 환원 및 비환원 샘플을 전기영동하였다. 도 1a는 생성물의 존재 및 양호한 수준의 순도가 관찰됨을 확인해준다. 비환원 조건에서, 생성물에 대해 100 내지 150 kDa의 다중 단백질 밴드가 관찰되었다(도 1a: 레인 3 내지 5). 환원 조건에서, 경쇄(~25 kDa) 및 중쇄(~50 kDa)의 분자량에 상응하는 밴드가 관찰되었으며, 이는 세 가지 생성물 모두에서 예상한 바와 같다(도 1a: 레인 7 내지 9). 정제된 RO-101 단백질도 SE-HPLC에서 분석하였다. 세 가지 샘플 단백질 모두 100% 단일 피크를 보였다(도 1b 참조).

[0116] ***실시예 2 - VEGF/ANG-2 이중 특이적 대리 항체의 결합***

[0117] 실시예 1에 따라 제조된 대리 항체 RO-101은 표적 항원에 대한 그의 결합 능력에 대해 시험되었다.

[0118] <u>VEGF ELISA</u> - 재조합 인간 $VEGF_{165}$(Peprotech, Cat #100-20)를 사용하여 1 μg/mL로 플레이트를 코팅하였다. 제품을 차단 완충액에 100 nM의 시작 농도로 희석한 다음, 1:3 희석액을 시험하였다. 결합은 HRP-접합 당나귀 항-인간 IgG Fcγ 항체(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cat #709-035-098)로 검출하였다. 허셉틴이 결합이 없는 비특이적 대조군으로 사용되었다. 파리시맙 및 아플리버셉트는 참조 물질로서 제품과 함께 시험되었다. 결과는 표 1에 나와 있다. 결과는 0.040 내지 0.056 nM의 EC_{50} 값으로 제품에 대해 높은 결합 친화도를 보여주었고, 이는 파리시맙 및 아플리버셉트 참조 물질과의 결합과 비슷하거나 약간 더 좋았다.

표 1 - VEGF 에 대한 EC50 (nM)

ELISA 표적	허셉틴	파리시맙	아플리버셉트	샘플 1	샘플 2	샘플 3
$VEGF_{165}$	비결합	0.04161	0.05135	0.04015	-	-
	비결합	0.05602	0.07402	-	0.05562	-
	비결합	0.05050	0.04025	-	-	0.04173

[0119]

[0120] ANG-2 ELISA - 재조합 인간 ANG-2(R&D Systems, Cat# 623-AN-025/CF)를 사용하여 1 μg/mL로 플레이트를 코팅하였다. 제품을 차단 완충액에 100 nM의 시작 농도로 희석한 다음, 1:3 희석액을 시험하였다. 결합은 HRP-접합 당나귀 항-인간 IgG Fcγ 항체(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cat #709-035-098)로 검출하였다. 허셉틴이 결합이 없는 비특이적 대조군으로 사용되었다. 결과는 표 2에 나와 있다. 결과는 0.045 내지 0.054 nM의 EC_{50} 값으로 제품에 대해 높은 결합 친화도를 보여준 반면, 파리시맙은 상당히 더 낮은 결합 친화도를 보였고, 아플리버셉트 대조군은 전혀 결합하지 않았다.

표 2 ANG-2 에 대한 EC50 (nM)

ELISA 표적	허셉틴	파리시맙	아플리버셉트	샘플 1	샘플 2	샘플 3
ANG-2	비결합	3.508	비결합	0.05358	-	-
	비결합	3.129	비결합	-	0.04984	-
	비결합	1.918	비결합	-	-	0.04494

[0121]

[0122] 따라서, 시험된 이중 특이적 RO-101 대리 항체는 인간 VEGFR1 및 VEGFR2의 세포외 도메인의 기존 VEGF 항체 또는 융합 단백질과 비교했을 때 $rhVEGF_{165}$에 대해 유사한 친화도를 나타냈으며, ANG-2에 대해 훨씬 우수한 친화도(예를 들어, 결합 친화도의 42 - 65배 증가)을 나타냈다.

[0123] ***실시예 3-VEGF 결합 ELISA 및 VEGF -수용체 결합 억제***

[0124] 대리 항체 제품 RO-101은 VEGF의 다양한 이소형에 대한 결합 및 VEGF-수용체 상호작용의 억제 측면에서 시험되었다. $VEGF_{165}$는 VEGF_A의 가장 풍부하고 강력한 이소형이고, $VEGF_{121}$은 눈에서 우세한 이소형이다. 따라서, 두 이소형 모두 결합 검정에서 시험되었다. 재조합 인간 $VEGF_{121}$("rh $VEGF_{121}$") 및 재조합 인간 $VEGF_{165}$("rh $VEGF_{165}$")는 페프로테크(Peprotech)에서 구입하였다(표 10 참조). 서열 정렬 및 분석은 도 2a에 도시되어 있다. $rhVEGF_{121}$은 헤파린 결합 도메인이 없는 혈소판 유래 성장 인자(PDGF) 도메인을 포함하고, 자유롭게 확산 가능하다.

[0125] 따라서, RO-101_샘플 1 결합 친화도는 각각 $VEGF_{121}$ 및 $VEGF_{165}$에 대해 시험되었다(도 2b 참조). rh $VEGF_{121}$(Peprotech, Cat #100-20A) 및 rh $VEGF_{165}$(Peprotech, Cat #100-20)는 코닝(Corning) 9017 배지 결합 플레이트를 웰당 1 μg/mL 및 100 μl로 코팅하는 데 사용되었다. 제품을 차단 완충액에 100 nM의 시작 농도로 희석한 다음, 1:3 희석액을 시험하였다. 당나귀 항-인간 IgG Fcγ-HRP(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cat #709-035-098)가 검출에 사용되었고, TMB 기질로 가시화되었다. OD450 nm 판독값은 빅터(Victor) 3(PerkinElmer 1420 Multilabel Counter)로 측정되었다.

표 3: $VEGF_{121}$ 및 $VEGF_{165}$를 향한 RO-101 의 결합에 대한 EC50

표적	EC50 (nM)	R^2
$rhVEGF_{121}$	0.0146	0.9966
$rhVEGF_{165}$	0.0135	0.9922

[0126]

[0127] 도 2b 및 표 3에 제시된 바와 같이, RO-101은 유사한 친화도로 rh $VEGF_{121}$ 및 rh $VEGF_{165}$에 결합한다.

[0128] 다음으로, SgG1 형식의 RO-101_샘플 1을 ELISA 결합 검정에서 rh $VEGF_{121}$을 향한 그의 결합 친화도 측면에서 파리시맙(IgG1)과 비교하였다. $rhVEGF_{121}$을 사용하여 코닝 9017 배지 결합 플레이트를 코팅하였다. RO-101을 차단 완충액에 10 nM의 시작 농도로 희석한 다음, 1:3 희석액을 시험하였다. 당나귀 항-인간 IgG Fcɣ-HRP(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cat #709-035-098)가 검출에 사용되었고, TMB 기질로 가시화되었다. OD450 nm 판독값은 빅터 3(PerkinElmer 1420 Multilabel Counter)로 측정되었다.

표 4: $VEGF_{121}$을 향한 RO-101 또는 파리시맙의 결합에 대한 EC50

SgG/IgG	EC50 nM	R^2
RO-101_샘플 1	0.0086	0.9984
파리시맙	0.0113	0.9980

[0129]

[0130] 도 2c 및 표 4에 제시된 바와 같이, RO-101 및 파리시맙은 ELISA에서 유사한 친화도로 $rhVEGF_{121}$에 결합한다.

[0131] 다음으로, RO-101 샘플 1을 ELISA 결합 검정에서 $rhVEGF_{165}$를 향한 그의 결합 친화도 측면에서 파리시맙과 비교하였다. $VEGF_{165}$를 사용하여 코닝 9017 배지 결합 플레이트를 코팅하였다. RO-101을 차단 완충액에 10 nM의 시작 농도로 희석한 다음, 1:3 희석액을 시험하였다. 당나귀 항-인간 IgG Fcɣ-HRP(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cat #709-035-098)가 검출에 사용되었고, TMB 기질로 가시화되었다. OD450 nm 판독값은 빅터 3(PerkinElmer 1420 Multilabel Counter)로 측정되었다.

표 5: $VEGF_{165}$를 향한 RO-101 또는 파리시맙의 결합에 대한 EC50

SgG/IgG	EC50 nM	R^2
RO-101_샘플 1	0.0231	0.9995
파리시맙	0.0228	0.9989

[0132]

[0133] 도 2d 및 표 5에 제시된 바와 같이, RO-101 및 파리시맙은 ELISA에서 유사한 친화도로 $rhVEGF_{165}$에 결합한다.

[0134] 다음으로, RO-101_샘플 1을 $VEGF_{165}$와 VEGF 수용체 2(VEGF R2) 사이의 상호작용의 억제 측면에서 파리시맙과 비교하였다. VEGF R2는 키나제 삽입 도메인 수용체(KDR)로도 알려져 있다. 도 2e에 도시된 바와 같이, 200 nM에서 시작하여 1:3 연속 희석된 RO-101 또는 파리시맙을 1:1 비율로 2 nM 비오티닐화된 rhVEGF R2/KDR 수용체(AcroBiosystems, Cat #KDR-H82E5)와 혼합하였다. 이 혼합물을 $rhVEGF_{165}$ 코팅이 포함된 ELISA 결합 플레이트에 첨가하였다. RO-101 또는 파리시맙이 없는 비오티닐화된 rhVEGF R2/KDR을 결합 대조군으로 사용하였다. 수용체 결합은 HRP-접합 스트렙타비딘(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cat #016-030-084)에 의해 검출되었고,

TMB 기질에 의해 가시화되었다. 결과는 도 2f에 제시되고, 상응하는 IC_{50} 값은 표 6에 제시된다.

표 6: $VEGF_{165}$-VEGF R2/KDR 수용체 결합의 RO-101 또는 파리시맙의 억제에 대한 IC50

SgG/IgG 억제	IC50 nM	R^2	Fold
RO-101_샘플 1	1.989	0.9863	3.25x
파리시맙	6.471	0.9919	

[0135]

[0136] 도 2f 및 표 6에 제시된 바와 같이, RO-101_샘플 1은 $rhVEGF_{165}$와 rhVEGF R2/KDR 수용체 사이의 상호작용을 억제하는 데 있어서 파리시맙보다 3배를 초과하는 수준으로 더 강력하였다.

[0137] ***실시예 4 - ANG-2-결합 ELISA 및 ANG-2-수용체 결합의 억제***

[0138] 대리 항체 제품 RO-101은 ANG-2에 대한 그의 결합 및 ANG-2와 그의 수용체 사이의 상호작용의 억제 측면에서 시험되었다.

[0139] RO-101_샘플 1 또는 농축 용액의 RO-101("RO-101 LX")은 ELISA 결합 검정에서 rhANG-2를 향한 그의 결합 친화도 측면에서 파리시맙과 비교되었다. rhANG-2(AcroBioSystems, Cat #AN2-H52H4)를 사용하여 코닝 9017 배지 결합 플레이트를 코팅하였다. RO-101을 차단 완충액에 100 nM의 시작 농도로 희석한 다음, 1:3 희석액을 시험하였다. 당나귀 항-인간 IgG Fcγ-HRP(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cat #709-035-098)가 검출에 사용되었고, TMB 기질로 가시화되었다. OD450 nm 판독값은 빅터 3(PerkinElmer 1420 Multilabel Counter)로 측정되었다.

표 7: ANG-2 를 향한 RO-101 또는 파리시맙의 결합에 대한 EC50

SgG/IgG 시작 농도	EC50 nM	R^2	RO-101/파리시맙 배수
RO-101_샘플 1	0.0118	0.9940	53 배
RO-101_LX	0.0138	0.9961	
파리시맙	0.6764	0.9989	

[0140]

[0141] 도 3a 및 표 7에 제시된 바와 같이, ELISA에서 RO-101의 rhANG-2에 대한 결합 친화도는 파리시맙보다 53배 더 강하다. 이것은 두 항원 중 하나에 대한 결합을 증가시킴으로써 파리시맙에 비해 상당히 개선된 것이었다.

[0142] 중요한 점은, 유사한 ELISA 결합 실험이 독립적인 팀에 의해 수행되었고, 유사한 결과가 얻어졌다는 것이다. RO-101에 대한 EC_{50} 값은 0.0526, 0.0498 및 0.0449 nM이었고, 평균값은 0.0491 nM이었다. 반면, 파리시맙에 대한 EC_{50} 값은 3.508, 3.129 및 1.918 nM이었고, 평균값은 2.8517 nM이었다. 따라서, rhANG-2에 대한 RO-101 결합은 다른 실험 설정에서 파리시맙보다 58배 더 좋았다. 이는 ANG-2에 대한 RO-101의 결합 친화도가 파리시맙보다 훨씬 더 우수하다는 것을 추가로 확인시켜 주었다.

[0143] 다음으로, RO-101_샘플 1은 면역글로불린 유사 및 EGF 유사 도메인을 갖는 티로신 키나제 2 수용체(Tie-2 수용체)(ANG-2 수용체)와 인간 ANG-2 사이의 상호작용의 억제 측면에서 파리시맙과 비교되었다. 200 nM에서 시작하여 1:3 연속 희석된 RO-101 또는 파리시맙은 1:1 비율로 2 nM His-태그 부착된 rhANG-2(AcroBiosystems, Cat #AN2-H52H4)와 혼합되었다. RO-101 또는 파리시맙이 없는 rhANG-2-His는 결합 대조군으로 사용되었다. 도 3b에 도시된 바와 같이, RO-101 또는 파리시맙은 재조합 인간 Tie-2-Fc 코팅(AcroBiosystems, Cat #TI2-H5255)이 있는 ELISA 결합 플레이트에 첨가되었다. rhANG-2와 rhTie-2-Fc의 결합은 HRP-접합된 토끼 항-His 항체(Bethyl Laboratories, Cat #A190-114P)에 의해 검출되었다. 결과는 도 3c에 도시되어 있으며, 상응하는 IC_{50} 값은 표 8에 제시되어 있다.

표 8: ANG-2 와 ANG-2 수용체 결합 사이의 RO-101 또는 파리시맙의 억제에 대한 IC50

SgG/IgG 억제	IC50 nM	R^2	배수
RO-101_샘플 1	0.7868	0.9989	17.2x
파리시맙	13.55	0.9956	

[0144]

[0145] 도 3c 및 표 8에 도시된 바와 같이, RO-101_샘플 1은 ANG-2와 Tie-2 수용체 사이의 상호작용을 억제하는 데 있어서 파리시맙보다 17배 초과의 수준으로 더 강력하였다.

[0146] 종합적으로 볼 때, RO-101은 파리시맙에 비해 rhANG-2에 대한 우수한 결합 특성을 나타냈다.

[0147] ***실시예 5 - RO-101의 상이한 형태의 결합 친화도***

[0148] RO-101에서 유래된 VEGF_A 특이적 대리 항체 항원 결합 단량체(Sab), Fab 동등물 및 단일 사슬 단편(scSv), scFv 동등물을 HEK293 세포에서 발현시켰다. 구체적으로, 대리 항체의 50 kDa 형태인 Sab는 VpreB 및 람다 5(대리 경쇄)와 결합된 VH-CH1 도메인을 포함하였다. scSV는 VpreB에 연결된 VH 도메인으로 구성된 단일 사슬 단편을 포함하였다.

[0149] 생성된 상청액은 His 태그 부착된 scSv 단백질에 대해 CaptureSelcet IgG-CH1 또는 Ni-NTA에 의해 정제되었다. RO-101 SgG와 함께, 세 가지 형태는 각각 $rhVEGF_{165}$ 및 rhANG-2를 향한 결합 친화도의 측면에서 시험되었다.

[0150] RO-101 SgG1, Sab 및 scSv는 중복해서 시험되었다. 이들은 10 nM의 시작 농도에서 차단 완충액에 희석한 다음, 1:3 희석액을 시험하였다. $rhVEGF_{165}$ 결합 ELISA는 비오티닐화된 항-인간 VpreB1 항체 및 HRP-접합 스트렙타비딘에 의해 검출되었다.

표 9.1: 비오티닐화된 항-VpreB 항체 및 HRP-접합 스트렙타비딘에 의해 검출된 $rhVEGF_{165}$를 향한 RO-101 SgG, Sab, 및 scSv 의 결합에 대한 EC50

시험 단백질	**EC50 (nM)**
RO-101_SgG	0.0057
RP-008_VEGF-A_**scSv**	0.009
RP-014_VEGF-A_**Sab**	0.0063

[0151]

[0152] 도 4a 및 표 9.1에 도시된 바와 같이, 단량체 항-VEGF_A Sab 및 scSv는 그의 SgG 형태와 비슷한 정도로 $rhVEG_{165}$에 잘 결합한다. 따라서, VEGF_A 특이적 대리 항체의 세 가지 형태 모두 $rhVEGF_{165}$를 향해 유사한 결합 친화도를 가졌다.

[0153] RO-101 SgG1, Sab 및 scSv는 중복해서 시험되었다. SgG1은 10 nM의 시작 농도로 차단 완충액에 희석되었다. Sab 및 scSv는 100 nM의 시작 농도로 차단 완충액에 희석되었다. 그런 다음, 1:3으로 연속 희석되었다. ANG-2 결합 ELISA는 비오티닐화된 항-인간 VpreB1 항체 및 HRP-접합 스트렙타비딘에 의해 검출되었다.

표 9.2: 비오티닐화된 항-VpreB 항체 및 HRP-접합 스트렙타비딘에 의해 검출된 ANG-2 를 향한 RO-101 SgG, Sab, 및 scSv 의 결합에 대한 EC50

시험 단백질	EC50 (nM)
RO-101_SgG	0.0257
RP-022_ANG-2_**scSv**	0.0442
RP-017_ANG-2_**Sab**	0.0485

[0154]

[0155] 도 4b 및 표 9.2에 제시된 바와 같이, 단량체 항-ANG-2 Sab 및 scSv는 rhANG-2에 대해 피코몰의 친화도로 ANG-2에 잘 결합한다.

[0156] ***실시예 6 - PDGF/VEGF 패밀리 구성원에 대한 RO-101의 결합***

[0157] PDGF/VEGF 패밀리 구성원은 페프로테크, 알&디 시스템즈(R&D Systems), 아크로바이오시스템즈(AcroBiosystems)의 세 가지 다른 공급업체에서 얻었다(표 10 참조). 서열 정렬 및 분석을 수행하였다(도 5a 참조). 구체적으로, 페프로테크 및 알&디의 rhVEGF-B는 동일한 서열을 가지고 있는 반면, 아크로바이오시스템즈의 rhVEGF-B 서열은 상이한 C 말단을 가지고 있었다. 세 공급업체 모두 동일한 rhVEGF-C 서열을 사용했지만, 아크로바이오시스템즈의 rhVEGF-C 서열은 N 말단에 추가의 9개 잔기가 있었다. 세 공급업체 모두 동일한 rhVEGF-D 서열을 사용했지만, 페프로테크의 rhVEGF-D 서열은 N 말단에 추가의 4개 잔기 및 C 말단에 추가의 4개 잔기가 있었다. 또한, 보존된 시스테인 매듭(knot) 도메인을 포함하는 태반 성장 인자-1(PlGF-1) 및 태반 성장 인자-3(PlGF-3)이라는 두 가지 추가의 인간 PDGF/VEGF 패밀리 구성원에 대한 RO-101의 교차 반응성도 조사하였다.

표 10 – 시험된 PDGF/VEGF 패밀리 구성원에 대한 기본 정보의 요약

표적	공급처_Cat. No.	공급원
$rhVEGF_{165}$	Peprotech_100-20	*이. 콜라이*(*E. coli*)
$rhVEGF_{121}$	Peprotech_100-20A	*이. 콜라이*
rhVEGF-B_Peprotech	Peprotech_100-20B	*이. 콜라이*
rhVEGF-B_AcroBio	AcroBio_VE6-H5225	His-태그 부착; HEK293
rhVEGF_C	AcroBio_VEC-H4225	His-태그 부착; HEK293
rhVEGF-D	AcroBio_VED-H5228	His-태그 부착; HEK293
rhPlGF-1	Peprotech_100-06	*이. 콜라이*
rhPlGF-3	Peprotech_100-57	*이. 콜라이*

[0158]

[0159] 먼저, rhVEGF-B에 대한 결합을 $rhVEGF_{165}$와 비교하여 시험하였다. rhVEGF-B 또는 $rhVEGF_{165}$를 사용하여 코닝 9017 배지 결합 플레이트를 웰당 1 μg/mL 및 100 μl로 코팅하였다. 제품 RO-101_샘플 1을 차단 완충액에 100 nM의 시작 농도로 희석한 다음, 1:3 희석액을 시험하였다. 당나귀 항-인간 IgG Fcɣ-HRP가 검출에 사용되었다. OD450 nm 판독값은 빅터 3에 의해 측정되었다.

표 11: $rhVEGF_{165}$ 또는 rhVEGF-B 를 향한 RO-101_샘플 1 의 결합에 대한 EC50

표적	RO-101_샘플 1 (EC50 nM)
$rhVEGF_{165}$	0.0165
rhVEGF-B_Peprotech	>>> 100
rhVEGF-B_AcroBio	>>> 100

[0160]

[0161] 도 5b 및 표 11에 제시된 바와 같이, RO-101은 100 nM에서 rhVEGF-B에 거의 결합하지 않았다.

[0162] 두 번째로, RO-101_샘플 1의 rhVEGF-C 또는 rhVEGF-D에 대한 결합을 $rhVEGF_{165}$와 비교하여 시험하였다. rhVEGF-C 및 rhVEGF-D는 아크로바이오시스템즈에서 구입하였다. $rhVEGF_{165}$는 페프로테크에서 구입하여 양성 대조군으로 사용하였다. 상이한 표적 단백질을 사용하여 코닝 9017 배지 결합 플레이트를 웰당 1 μg/mL 및 100 μl로 코팅하였다. 당나귀 항-인간 IgG Fcɣ-HRP가 검출에 사용되었다. OD450 nm 판독값은 빅터 3에 의해 측정되었다.

표 12: $rhVEGF_{165}$, rhVEGF-C 또는 rhVEGF-D 를 향한 RO-101_샘플 1 의 결합에 대한 EC50

표적	RO-101_샘플 1 (EC50 nM)
$rhVEGF_{165}$	0.01223
rhVEGF-C	비결합
rhVEGF-D	비결합

[0163]

[0164] 도 5c 및 표 12에 제시된 바와 같이, RO-101은 PDGF 도메인만을 함유하는 시판 rhVEGF-C 또는 rhVEGF-D 단백질에 결합하지 않았다.

[0165] 세 번째로, rhPIGF-1 또는 rhPIGF-3에 대한 결합은 $rhVEGF_{165}$와 비교하여 시험되었다. 표적 단백질을 사용하여 코닝 9017 배지 결합 플레이트를 웰당 1 μg/mL 및 100 μl로 코팅하였다. 제품 RO-101_샘플 1을 차단 완충액에 100 nM의 시작 농도로 희석한 다음, 1:3 희석액을 시험하였다. 당나귀 항-인간 IgG Fcɣ-HRP가 검출에 사용되었다. OD450 nm 판독값은 빅터 3에 의해 측정되었다.

표 13: $rhVEGF_{165}$, rhPlGF-1 또는 rhPlGF-3 을 향한 RO-101_샘플 1 의 결합에 대한 EC50

표적	RO-101_샘플 1 (EC50 nM)
$rhVEGF_{165}$	0.0162
rhPlGF-1_Peprotech	비결합
rhPlGF-3_Peprotech	> 100

[0166]

[0167] 도 5d 및 표 13에 제시된 바와 같이, RO-101은 PIGF-1에 결합하지 않았고, >100 nM에서 PIGF-3에 약하게 결합하였다.

[0168] *실시예 7 - 상이한 종의 VEGF_A 및 ANG-2에 대한 RO-101의 결합*

[0169] RO-101은 상이한 종의 $VEGF_{165}$ 및 ANG-2 오르토로그에 대한 그의 친화도에 대해서 시험되었다(표 14 참조). 서열 정렬(VEGF의 경우 도 6a, ANG-2의 경우 도 6c 참조) 및 상동성 비교(VEGF의 경우 표 15.1, ANG-2의 경우 표 15.2 참조)가 수행되었다.

표 14 –상이한 종의 $VEGF_{165}$ 및 ANG-2 오르토로그에 대한 기본 정보의 요약

[0170]

표적	종	공급처_Cat No.	공급원
$rhVEGF_{165}$	인간	Peprotech_100-20	*이. 콜라이*
$rrVEGF_{165}$	토끼	Kingfisher Biotech_RP1025U-025	효모
$rdVEGF_{163}$	개과/개	R&D_1603-CV-010/CF	*이. 콜라이*
$rpVEGF_{164}$	돼지류/돼지	AssayGenie_KPRT0149	효모
rhANG-2	인간	AcroBio_AN2-H52H4	HEK293
rrANG-2	토끼	Speed Biosystems_YCP8015	HEK293
rdANG-2	개과/개	Producing @Creative Biolab_Vang-3062Lsx	포유동물 세포

[0171]

표 15.1 –상이한 종의 $VEGF_{165}$ 오르토로그에 대한 상동성 비율

[0172]

% 동일성	인간 VEGF-A	토끼 VEGF-A	개 VEGF-A	돼지 VEGF-A
인간 VEGF-A	100	92.72	95.12	96.36
토끼 VEGF-A	92.72	100	93.29	95.15
개 VEGF-A	95.12	93.29	100	96.95
돼지 VEGF-A	96.36	95.15	96.95	100

표 15.2 – 상이한 종의 ANG-2 오르토로그에 대한 상동성 비율

% 동일성	인간 ANG-2	토끼 ANG-2	개 ANG-2	돼지 ANG-2
인간 ANG-2	100	92.54	92.34	92.74
토끼 ANG-2	92.54	100	91.734	93.55
개 ANG-2	92.34	91.734	100	92.54
돼지 ANG-2	92.74	93.55	92.54	100

[0173]

[0174] 유사한 결합 검정을 이전 실시예에서 설명한 것과 같이 수행하였다. 도 6b 및 표 16은 RO-101이 인간 VEGF_A의 결합과 비교했을 때 비슷한 친화도로 토끼, 개 및 돼지 VEGF_A 표적에 결합한다는 것을 보여준다.

표 16 –상이한 종의 VEGF-A 를 향한 RO-101 의 결합에 대한 EC50

X-종 VEGF-A	EC50 (nM)	R^2
인간 VEGF-A	0.0171	0.9967
토끼 VEGF-A	0.0334	0.9967
개 VEGF-A	0.0237	0.9979
돼지 VEGF-A	0.0198	0.9899

[0175]

[0176] 이와 유사하게, 도 6d 및 표 17은 RO-101이 인간 ANG-2와 비슷한 친화도로 토끼 및 개 ANG-2 표적에 결합함을 보여준다.

표 17 - 상이한 종의 ANG-2 를 향한 RO-101 의 결합에 대한 EC50

X-종 ANG-2	EC50 (nM)	R^2
인간 ANG-2	0.007	0.9814
토끼 ANG-2	0.011	0.9868
개 ANG-2	0.0135	0.9376

[0177]

[0178] 종합적으로 볼 때, RO-101은 여러 종에 걸쳐 VEGF 및 ANG-2 오르토로그에 대해 유사하게 강한 결합 친화도를 나타냈다.

[0179] 본 발명의 바람직한 실시양태가 본원에서 제시되고 설명되었지만, 이러한 실시양태는 단지 예시로 제공된다는 것이 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 이제 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 본 발명에서 벗어나지 않으면서 많은 변형, 변경 및 대체를 생각해 낼 수 있을 것이다. 본원에서 설명되는 본 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안이 본 발명을 실시하는 데 사용될 수 있음을 이해하여야 한다.

[0180] 본원에서 언급되는 모든 간행물, 특허 출원, 등록된 특허 및 기타 문서는 마치 각각의 개별 간행물, 특허 출원, 등록된 특허 또는 기타 문서가 전체적으로 본원에 참조로 포함된다고 구체적이고 개별적으로 표시된 것처럼 본원에 참조로 포함된다. 참조로 포함된 텍스트에 포함된 정의는 본 개시내용의 정의와 모순되는 경우 제외된다.

[0181]

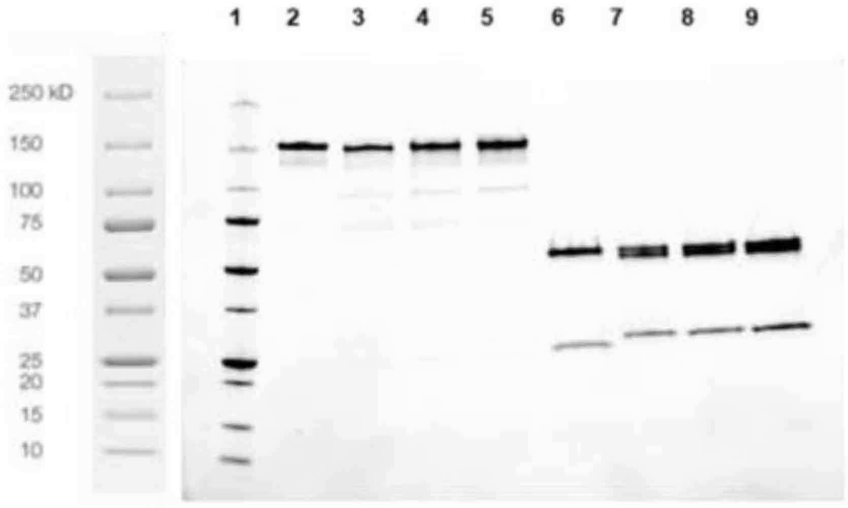
본원에서 설명되는 서열		
1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSIYTIHWVRQAP GQGLEWMGGINPYNGNTKYAQKFQGRVTMTRDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYYCAKAPAVFWWTGLDYWGQGTLVTV SS	VEGF VH
2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSIYTIHWVRQAP GQGLEWMGGINPYNGNTKYAQKFQGRVTMTRDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYYCAKAPAVFWWTGLDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	VEGF HC
3	GYTFSIYT	VEGF HCDR1
4	INPYNGNT	VEGF HCDR2
5	AKAPAVFWWTGLDY	VEGF HCDR3
11	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAGISADSGDKNYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKEFISWIYTFDYLDYWGQGTLVTV SS	Ang-2 VH
12	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAGISADSGDKNYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKEFISWIYTFDYLDYWGQGTLVTV	Ang-2 HC

	SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	
13	GFTFSSYG	Ang-2 HCDR1
14	ISADSGDK	Ang-2 HCDR2
15	AKEFISWIYTFDYLDY	Ang-2 HCDR3
21	QPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQQR PGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSI SELQPEDEAMYYCAMGARSSVTHVFGSGTQLTV	VL
22	QPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQQR PGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSI SELQPEDEAMYYCAMGARSSVTHVFGSGTQLTVLSQPKAT PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLMNDFYPGILTVTWKADGT PITQGVEMTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWRSRRSYSCQ VMHEGSTVEKTVAPAECS	LC
23	NDHDIGVYS	LCDR1
24	YFSQSDK	LCDR2
25	AMGARSSVTH	LCDR3

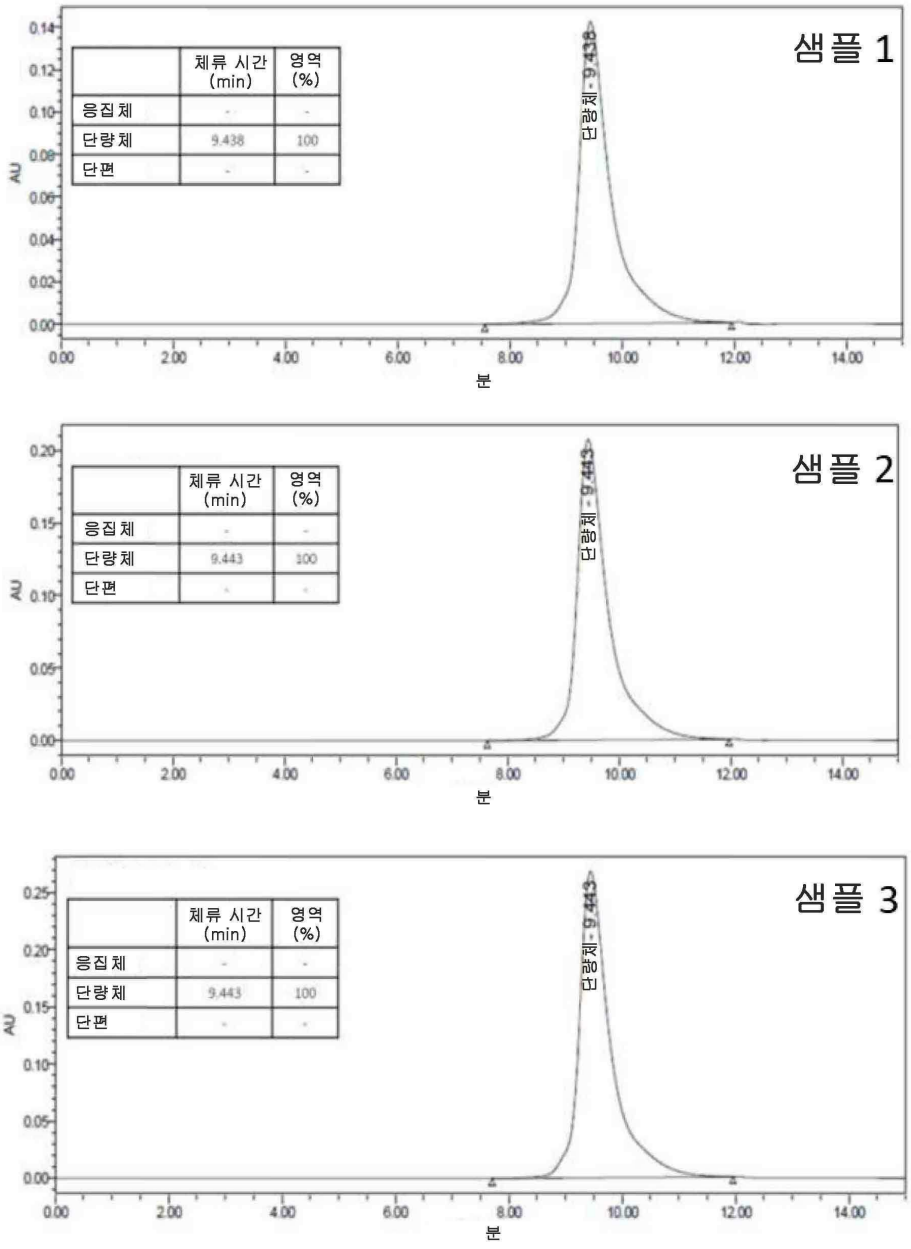
[0182]

도면

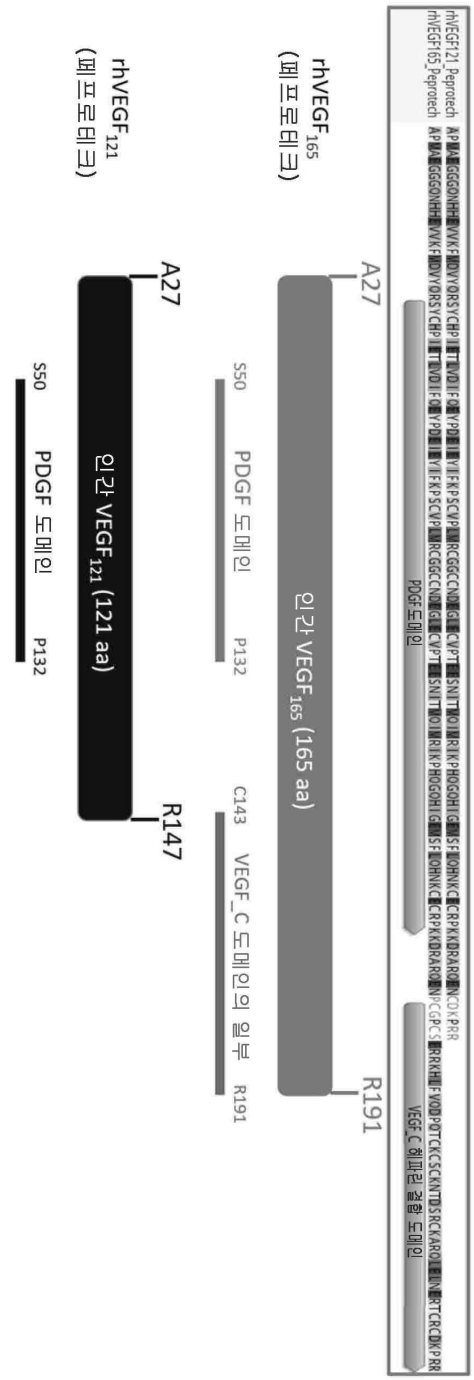
도면1a



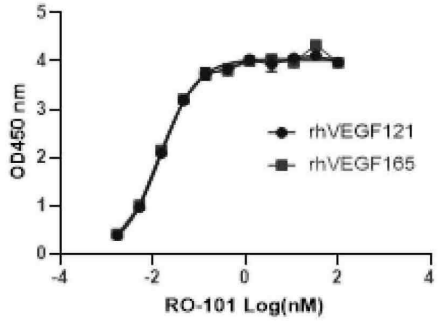
도면1b


샘플 1
체류 시간 (min)
영역 (%)
응집체
단량체
9.438
100
단편
단량체 - 9.438
AU
분
샘플 2
체류 시간 (min)
영역 (%)
응집체
단량체
9.443
100
단편
단량체 - 9.443
AU
분
샘플 3
체류 시간 (min)
영역 (%)
응집체
단량체
9.443
100
단편
단량체 - 9.443
AU
분

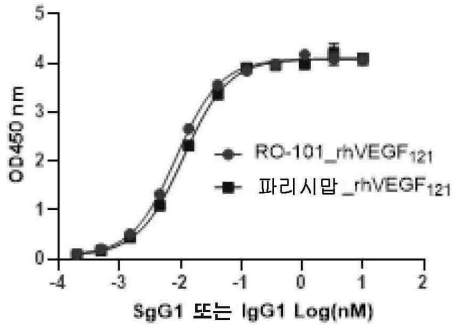
도면2a


rhVEGF165
(페프로테크)
A27
인간 VEGF165 (165 aa)
R191
S50
PDGF 도메인
P132
C143
VEGF_C 도메인의 일부
R191
rhVEGF121
(페프로테크)
A27
인간 VEGF121 (121 aa)
R147
S50
PDGF 도메인
P132

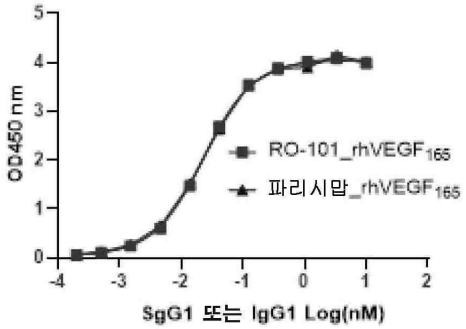
도면2b



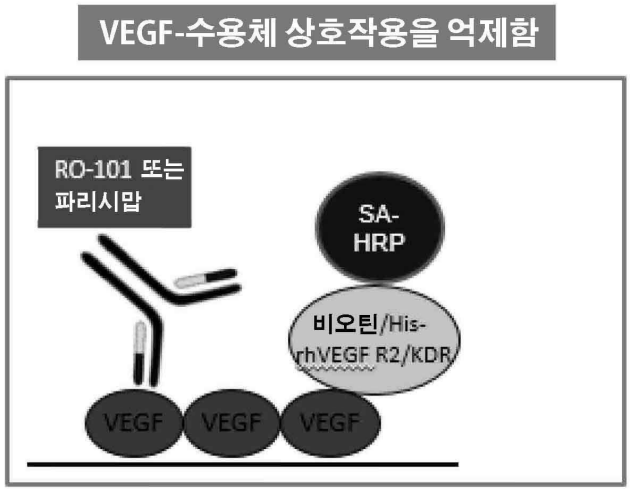
도면2c



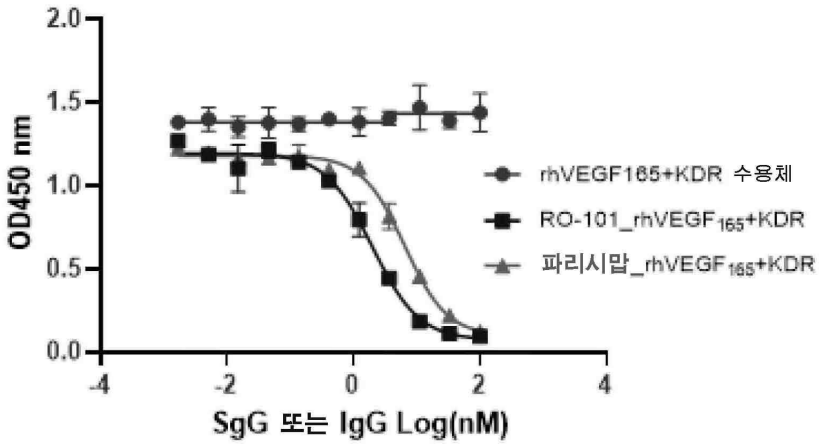
도면2d



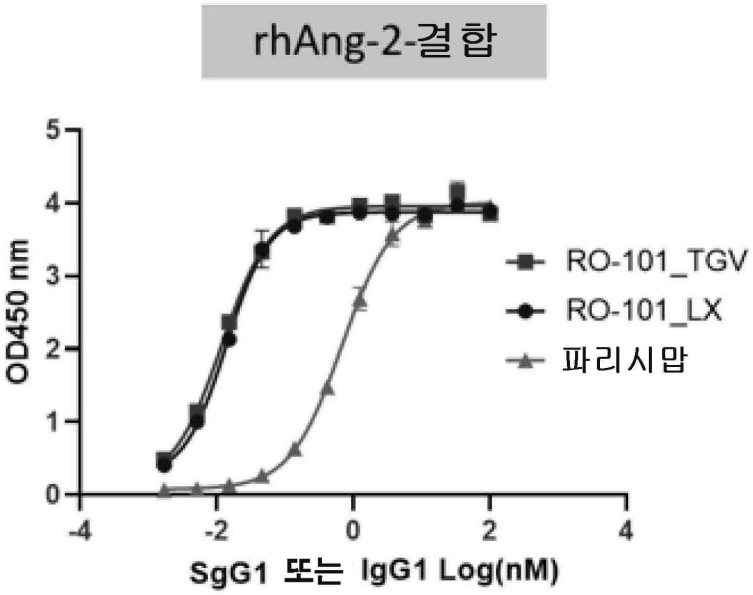
도면2e



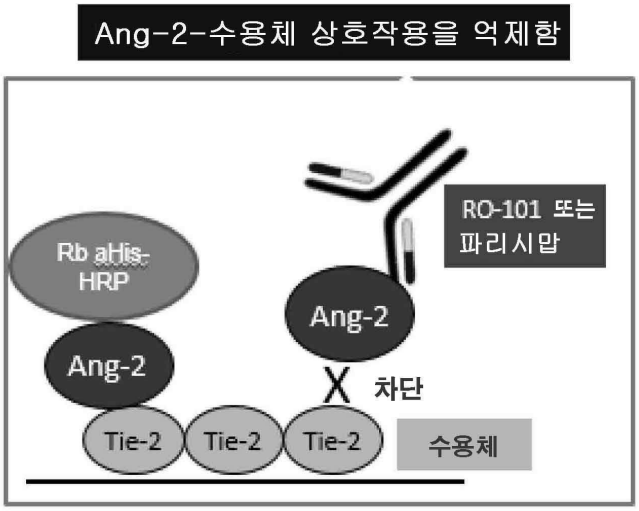
도면2f



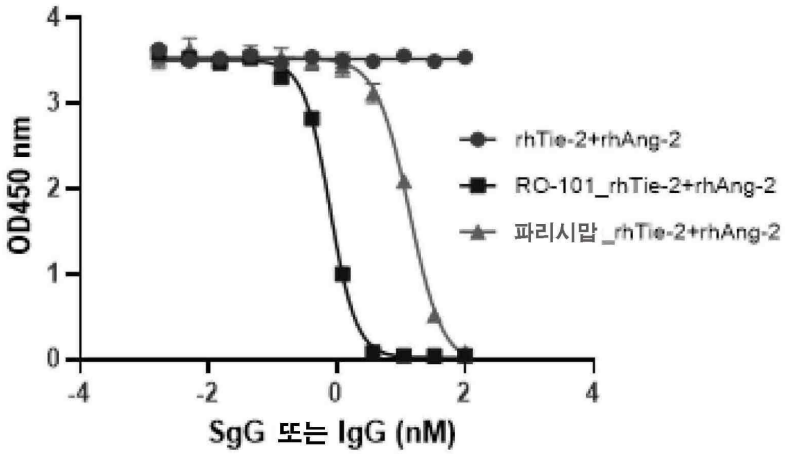
도면3a



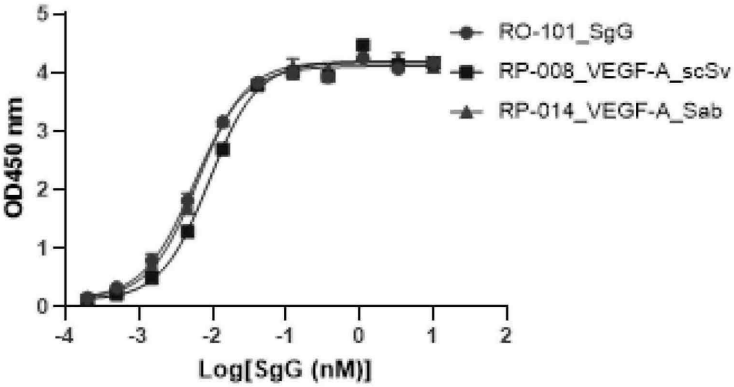
도면3b



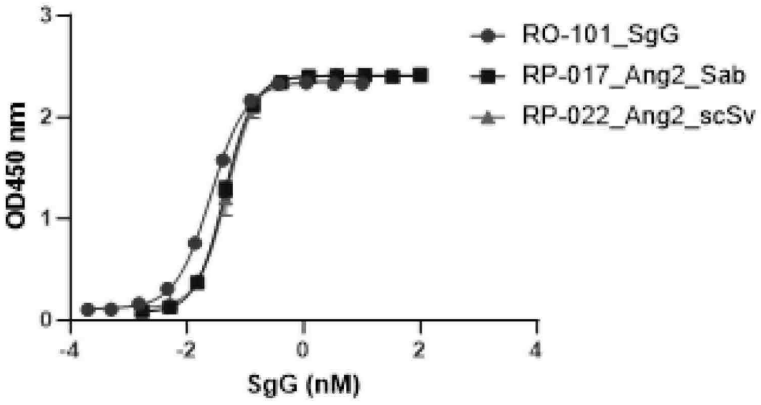
도면3c



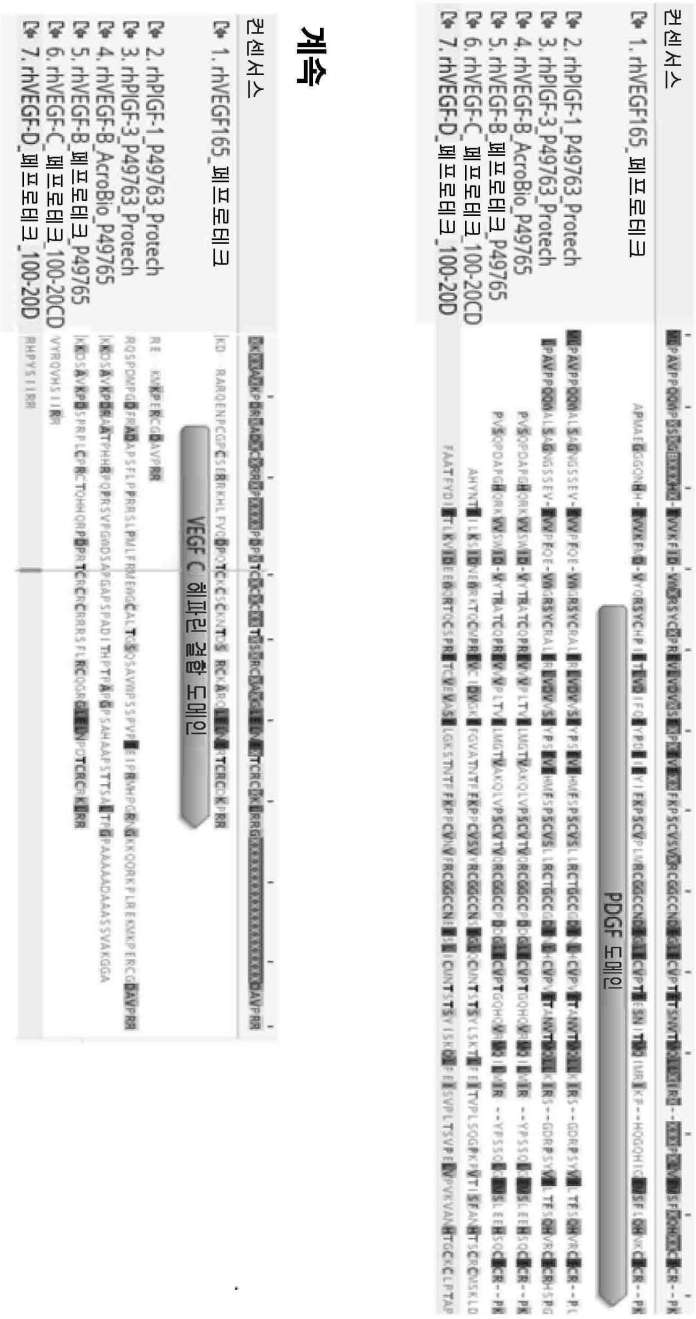
도면4a



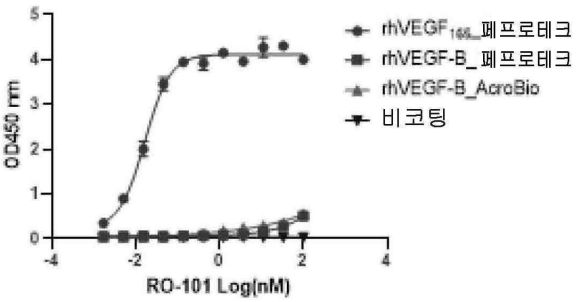
도면4b


RO-101_SgG
RP-017_Ang2_Sab
RP-022_Ang2_scSv
OD450 nm
SgG (nM)
3
2
1
0
-4
-2
0
2
4

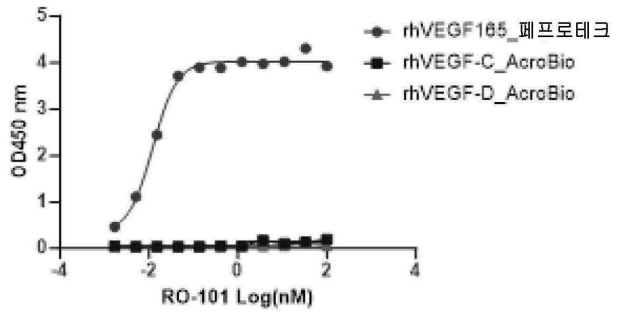
도면5a


계속
컨센서스
1. rhVEGF165_페프로테크
2. rhPlGF-1_P49763_Protech
3. rhPlGF-3_P49763_Protech
4. rhVEGF-B_AcroBio_P49765
5. rhVEGF-B_페프로테크_P49765
6. rhVEGF-C_페프로테크_100-20CD
7. rhVEGF-D_페프로테크_100-20D
VEGF C 헤파린 결합 도메인
PDGF 도메인

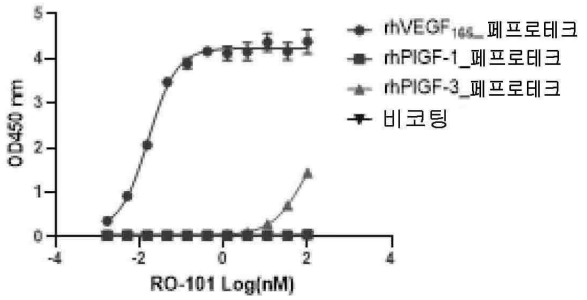
도면5b


rhVEGF165_페프로테크
rhVEGF-B_페프로테크
rhVEGF-B_AcroBio
비코팅
OD450 nm
RO-101 Log(nM)

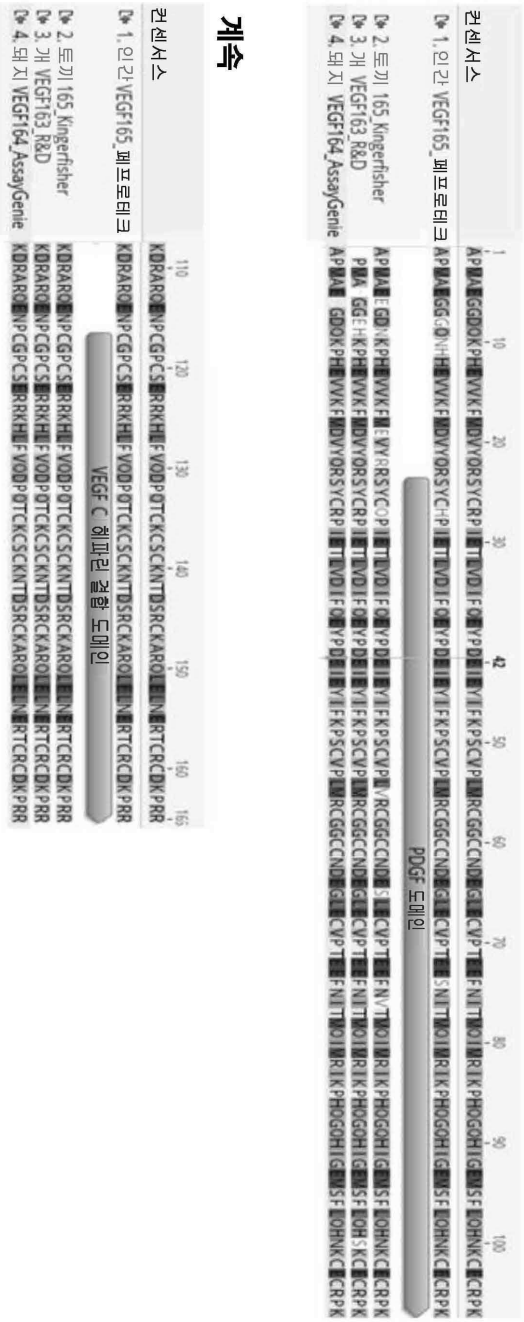
도면5c


rhVEGF165_페프로테크
rhVEGF-C_AcroBio
rhVEGF-D_AcroBio
OD450 nm
RO-101 Log(nM)

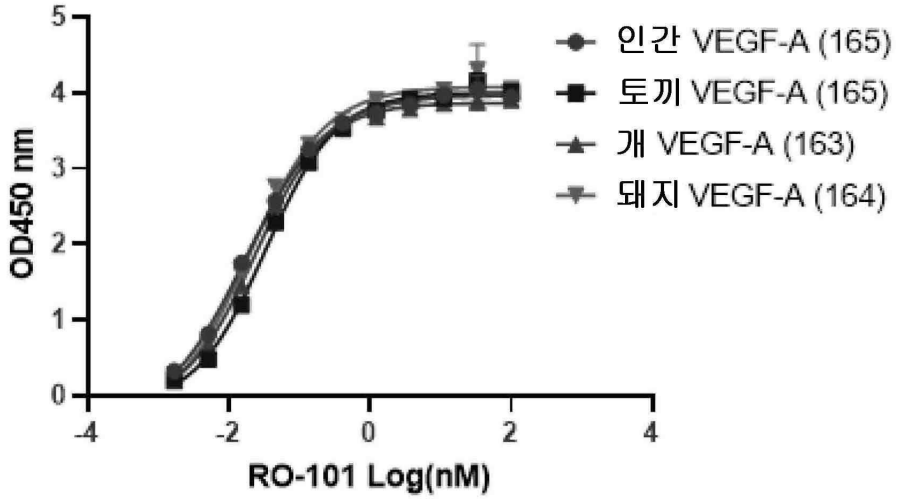
도면5d


rhVEGF165_페프로테크
rhPlGF-1_페프로테크
rhPlGF-3_페프로테크
비코팅
OD450 nm
RO-101 Log(nM)

도면6a


컨센서스
1. 인간 VEGF165_페프로테크
2. 토끼 165_Kingerfisher
3. 개 VEGF163_R&D
4. 돼지 VEGF164_AssayGenie
PDGF 도메인
계속
컨센서스
1. 인간VEGF165_페프로테크
2. 토끼 165_Kingerfisher
3. 개 VEGF163_R&D
4. 돼지 VEGF164_AssayGenie
VEGF C 헤파린 결합 도메인

도면6b


OD450 nm
5
4
3
2
1
0
-4
-2
0
2
4
RO-101 Log(nM)
인간 VEGF-A (165)
토끼 VEGF-A (165)
개 VEGF-A (163)
돼지 VEGF-A (164)

도면6c

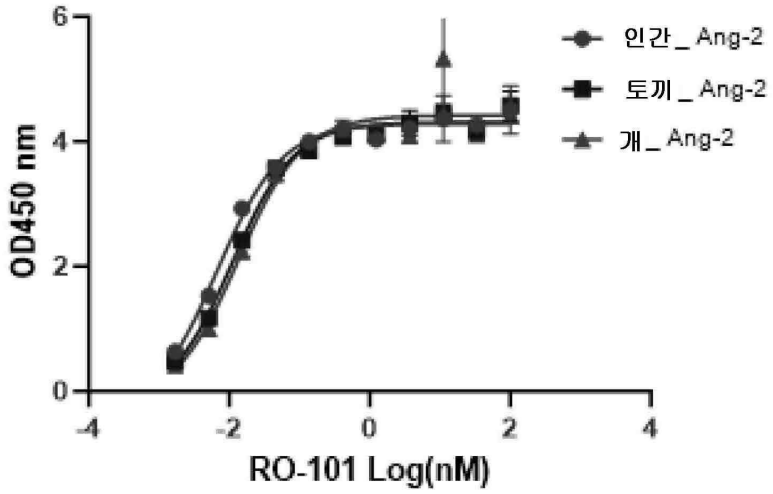
```
컨센서스                MWQIVFFTLSCDLVLAAAYNNFRKSMDSIGKKQYQVQHGSSCSYTFLPETDNCRSKSSPIVSNAVQRDAPLDYDDSVQRLQVLENIMENNTQWLMKLENYIQDNMKKEMVEIQQNAVQNQTAVM 124
인간 Ang-2_AcroBio     ...........................KK.....M.....S.....E.....................................................  124
토끼 Ang-2_SpeedBiosys.  ..R....S.....S.....V.RK.....S.....H.....S.....  124
개 Ang-2_CreativeBiolab  ..............R.....RR.....PG.-.P.....I.....M.....  123
돼지 Ang-2_CreativeBiolab  ...L...A.....T.KR.....P.....P..S.....R.....S.....  124

컨센서스                IEIGTNLLNQTAEQTRKLTDVEAQVLNQTTRLEIQLLEHSLSTNKLEKQILDQTSEINKLQDKNSFLEKKVLDMEDKHIVQLQSIKEEKDQLQVLVSKQNSIIEELEKQLVTATVNNSVLQKQQ 248
인간 Ang-2_AcroBio     ...............................................A.....I.....KI.....  248
토끼 Ang-2_SpeedBiosys.  .....................................................R.....A....  248
개 Ang-2_CreativeBiolab  ...............................................R.....  247
돼지 Ang-2_CreativeBiolab  ...............................................R.....  248

컨센서스                HDLMETVHXLLTMISTSNSAKDSFVAEEEQIIFRDCAEVFKSGLTTXGIYTLTFPNSTEEXKAYCDMETGGGGWTVLQRREDGSVDFQRTWKEYKVGFGNPSGEEHVLGNEFVSQXTNQQRYVLK 372
인간 Ang-2_AcroBio     .....NN...M.....PT.....S.....H.N.....I.....A.....I.....Y.....L.....  372
토끼 Ang-2_SpeedBiosys.  ...T...S....A..S...N..A.....T.....D..R.....S.....T.....L.....  372
개 Ang-2_CreativeBiolab  .....S.....P.K.P.T.....Y.....N.....T.....S.....F.V....P....  371
돼지 Ang-2_CreativeBiolab  .....N.....H.L.....A.....S.T.....T.....M...S.....V...K....  372

컨센서스                IHIXDWEGNEAYSLYEHFYLSSEEXNYRIHLKGLTGTAGKISSISQPGNDFSTKDADNDKCICKCSQMLTGGWWFDACGPSNLNGMYYPQRQNTNKFNGIKWYYWKGSGYSLKATTMMIRPADF 496
인간 Ang-2_AcroBio     ...K.....L.....F.....G.....  496
토끼 Ang-2_SpeedBiosys.  ...R.....F.....  496
개 Ang-2_CreativeBiolab  ...K.....G.L.....G.....  495
돼지 Ang-2_CreativeBiolab  ...R.....F.....  496
```

도면6d



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.