



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I393571B1

(45)公告日：中華民國 102 (2013) 年 04 月 21 日

(21)申請案號：098134012

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 10 月 07 日

(51)Int. Cl.：

*A61K39/395 (2006.01)**C07K16/24 (2006.01)**C07K16/30 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2008/10/08

歐洲專利局

08017607.6

2008/12/16

歐洲專利局

08021834.0

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

瑞士

(72)發明人：貝納 蒙妮卡 BAEHNER, MONIKA (DE)；賓克曼 烏拉奇 BRINKMANN, ULRICH (DE)；喬治 蓋伊 GEORGES, GUY (BE)；蓋瑞普 瑞米可 艾伯特 GRIEP, REMKO ALBERT (NL)；因霍夫 俊 沙賓 IMHOF-JUNG, SABINE (DE)；卡夫立 安尼塔 KAVLIE, ANITA (NO)；凱騰伯格 胡伯特 KETTENBERGER, HUBERT (DE)；克萊 克里斯汀 KLEIN, CHRISTIAN (DE)；瑞古拉 喬傑 湯瑪斯 REGULA, JOERG THOMAS (DE)；雪弗 瓦夫崗 SCHAEFER, WOLFGANG (DE)；史甘哲 傑詹 麥可 SCHANZER, JUERGEN MICHAEL (DE)；舒爾 瓦納 SCHEUER, WERNER (DE)；席伯 史蒂芬 SEEGER, STEFAN (DE)；湯瑪斯 馬庫斯 THOMAS, MARKUS (DE)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 03/030833A2

WO 2006/031370A2

WO 2007/089445A2

Fischer et al., Bispecific Antibodies: Molecules That Enable Novel Therapeutic Strategies. Pathobiology 74:3-14, 2007.

Nina Jendreyko et al, Phenotypic knockout of VEGF-R2 and Tie-2 with an intradiabody reduces tumor growth and angiogenesis in vivo, PNAS, vol. 102, no. 23, p.8293-8298, 2005/06/07

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：13 項 圖式數：25 共 0 頁

(54)名稱

雙重專一性之抗-VEGF/抗-ANG-2 抗體

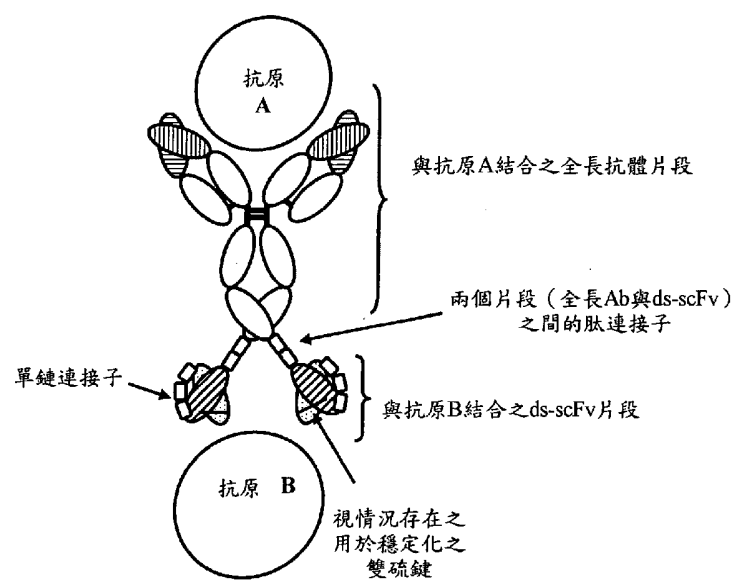
BISPECIFIC ANTI-VEGF/ANTI-ANG-2 ANTIBODIES

(57)摘要

本發明係關於針對人類 VEGF 及針對人類 ANG-2 之雙重專一性抗體、其製造方法、含有該等抗體之醫藥組合物，及其用途。

The present invention relates to bispecific antibodies against human VEGF and against human ANG-2, methods for their production, pharmaceutical compositions containing said antibodies, and uses thereof.

(無元件符號說明)



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於針對人類血管內皮生長因子(VEGF/VEGF-A)及針對人類血管生成素-2(ANG-2)之雙重專一性抗體、其製造方法、含有該等抗體之醫藥組合物，及其用途。

【先前技術】

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

VEGF及抗VEGF抗體

人類血管內皮生長因子(VEGF/VEGF-A)(SEQ ID No: 105)描述於例如以下之文獻中：Leung, D.W.等人，

Science 246 (1989) 1306-9 ; Keck, P.J. 等人 , Science 246 (1989) 1309-12 ; 及 Connolly, D.T. 等人 , J. Biol. Chem. 264 (1989) 20017-24 。 VEGF 涉及於調節與腫瘤及眼內病症相關之正常及異常血管生成及新血管生成 (Ferrara, N. 等人 , Endocr. Rev. 18 (1997) 4-25 ; Berkman, R.A. 等人 , J. Clin. Invest. 91 (1993) 153-159 ; Brown, L.F. 等人 , Human Pathol. 26 (1995) 86-91 ; Brown, L.F. 等人 , Cancer Res. 53 (1993) 4727-4735 ; Mattern, J. 等人 , Brit. J. Cancer. 73 (1996) 931-934 ; 及 Dvorak, H. 等人 , Am. J. Pathol. 146 (1995) 1029-1039) 。 VEGF 為自若干來源分離得到之同型二聚醣蛋白 。 VEGF 對內皮細胞顯示高度專一的促有絲分裂活性 。 VEGF 在胚胎血管發生期間之新血管形成中及成年期間之血管生成中具有重要調節功能 (Carmeliet, P. 等人 , Nature, 380 (1996) 435-439 ; Ferrara, N. 等人 , Nature, 380 (1996) 439-442 ; 綜述於 Ferrara 及 Davis-Smyth, Endocrine Rev., 18 (1997) 4-25 中) 。 已在顯示單個 VEGF 等位基因失活導致胚胎由於不能形成維管結構而死亡的研究中證明 VEGF 所起之作用的重要性 (Carmeliet, P. 等人 , Nature, 380 (1996) 435-439 ; Ferrara, N. 等人 , Nature, 380 (1996) 439-442) 。 此外 , VEGF 對單核細胞具有強趨化活性 , 可在內皮細胞中誘導出纖維蛋白溶酶原活化子及纖維蛋白溶酶原活化抑制子 , 且亦可誘導微血管滲透性 。 因為誘導微血管滲透性之活性 , 其有時稱為血管滲透因子 (VPF) 。 對 VEGF 之分離及特性已有綜述 ; 參見 Ferrara, N.

等人，J. Cellular Biochem., 47 (1991) 211-218及 Connolly, J. Cellular Biochem., 47 (1991) 219-223。單個 VEGF 基因之替代 mRNA 剪接產生 VEGF 之 5 種同功異型物。

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

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

ANG-2 及抗 ANG-2 抗體

人類血管生成素 -2 (ANG-2) (或者縮寫為 ANGPT2 或 ANG2) (SEQ ID No: 106) 已描述於 Maisonpierre, P.C. 等人，Science 277 (1997) 55-60 及 Cheung, A.H. 等人，Genomics

48 (1998) 389-91 中。已發現血管生成素-1及-2(ANG-1 (SEQ ID No: 107)及ANG-2(SEQ ID No: 106))為Tie之配位體，Tie為選擇性表現於血管內皮中之酪胺酸激酶家族。Yancopoulos, G.D.等人，Nature 407 (2000) 242-48。對於血管生成素家族目前存在四個確定的成員。血管生成素-3及-4(Ang-3及Ang-4)可為小鼠及人類中相同基因座上有很大大差異之對應物。Kim, I.等人，FEBS Lett, 443 (1999) 353-56；Kim, I.等人，J Biol Chem 274 (1999) 26523-28。ANG-1及ANG-2最初在組織培養實驗中分別被識別為促效劑及拮抗劑(關於ANG-1，參見：Davis, S.等人，Cell 87 (1996) 1161-69；且關於ANG-2，參見：Maisonpierre, P.C.等人，Science 277 (1997) 55-60)。所有已知血管生成素主要結合於Tie2，且Ang-1及-2皆以3 nM (Kd)親和力結合於Tie2。Maisonpierre, P.C.等人，Science 277 (1997) 55-60。已顯示Ang-1支持EC存活且促進內皮完整性，Davis, S.等人，Cell 87 (1996) 1161-69；Kwak, H.J.等人，FEBS Lett 448 (1999) 249-53；Suri, C.等人，Science 282 (1998) 468-71；Thurston, G.等人，Science 286 (1999) 251 1-14；Thurston, G.等人，Nat. Med. 6 (2000) 460-63，而ANG-2具有相反作用且在無存活因子VEGF或基本纖維母細胞生長因子時促使血管不穩定及退化。Maisonpierre, P.C.等人，Science 277 (1997) 55-60。然而，對於ANG-2功能之許多研究已表明更複雜之情形。ANG-2可能為複雜的血管重塑調節子，其在血管芽生(vessel sprouting)與血管退化方面

皆起一定作用。證實ANG-2之該等作用的表現分析揭示在成人芽生式血管生成背景下ANG-2與VEGF一起被迅速誘導，而在血管退化背景下ANG-2在無VEGF時被誘導。Holash, J.等人，*Science* 284 (1999) 1994-98；Holash, J.等人，*Oncogene* 18 (1999) 5356-62。與環境依賴性作用一致，ANG-2專一地結合於可由Ang-1活化之相同內皮專一性受體Tie-2，但對其活化具有環境依賴性效應。Maisonpierre, P.C.等人，*Science* 277 (1997) 55-60。

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

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

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

Tie-2及血管生成素-1之基因剔除小鼠研究顯示類似表型

且表明經血管生成素-1刺激之Tie-2磷酸化介導發育中的血管之重塑及穩定化，從而在血管生成期間促進血管成熟及維持內皮細胞支持細胞黏附(Dumont, J.等人，Genes & Development, 8 (1994) 1897-1909；Sato, T.N., Nature, 376 (1995) 70-74；Thurston, G.等人，Nature Medicine: 6 (2000) 460-463)。吾人認為血管生成素-1之作用在廣泛且組成性地表現血管生成素-1之成人體內被保留(Hanahan, D., Science, 277 (1997) 48-50；Zagzag, D.等人，Exp Neurology, 159:391-400 (1999))。相比之下，血管生成素-2表現主要限於血管重塑部位，吾人認為其於此處阻斷血管生成素-1之組成性穩定化或成熟功能，從而使血管恢復至並保持可能對芽生信號更具反應性之塑性狀態(Hanahan, D., 1997；Holash, J.等人，Orzcogerze 18 (199) 5356-62；Maisonpierre, P.C., 1997)。對病理性血管生成中血管生成素-2表現之研究已發現許多腫瘤類型顯示血管的血管生成素-2表現(Maisonpierre, P.C.等人，Science 277 (1997) 55-60)。在小鼠異種移植模型中，功能性研究表明血管生成素-2涉及於腫瘤血管生成中且將血管生成素-2過表現與增加之腫瘤生長相聯繫(Ahmad, S.A.等人，Cancer Res., 61 (2001) 1255-1259)。其他研究已將血管生成素-2過表現與腫瘤高血管性(hypervascularity)相聯繫(Etoh, T.等人，Cancer Res. 61 (2001) 2145-53；Tanaka, F.等人，Cancer Res. 62 (2002) 124-29)。

近年來，已提出血管生成素-1、血管生成素-2及/或Tie-

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

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

對局部表現血管生成素-2之作用的研究已顯示拮抗血管生成素-1/Tie-2信號使緻密血管結構變鬆，從而使EC暴露於來自血管生成誘導子(例如VEGF)之活化信號(Hanahan, D., Science, 277 (1997) 48-50)。此由抑制血管生成素-1產生之促血管生成效應表明抗血管生成素-1療法將不為有效的抗癌治療。

ANG-2在發育期間表現於發生血管重塑之部位處。Maisonpierre, P.C.等人, *Science* 277 (1997) 55-60。在成年個體中, ANG-2表現侷限於血管重塑部位以及高度血管化腫瘤內, 該等腫瘤包括神經膠質瘤(Osada, H.等人, *Int. J. Oncol.* 18 (2001) 305-09; Koga, K.等人, *Cancer Res.* 61 (2001) 6248-54)、肝細胞癌(Tanaka, S.等人, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 341-45)、胃癌(Etoh, T.等人, *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53; Lee, J.H.等人, *Int. J. Oncol.* 18 (2001) 355-61)、甲狀腺瘤(Bunone, G.等人, *Am J Pathol* 155 (1999) 1967-76)、非小細胞肺癌(Wong, M.P.等人, *Lung Cancer* 29 (2000) 11-22)以及結腸癌(Ahmad, S.A.等人, *Cancer* 92 (2001) 1138-43), 及前列腺癌(Wurmbach, J.H.等人, *Anticancer Res.* 20 (2000) 5217-20)。發現一些腫瘤細胞表現ANG-2。舉例而言, Tanaka, S.等人, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 341-45在12份人類肝細胞癌(HCC)試樣中之10份中偵測到ANG-2 mRNA。Ellis團體報導ANG-2普遍表現於腫瘤上皮中。Ahmad, S.A.等人, *Cancer* 92 (2001) 1138-43。其他研究者報導有類似發現。Chen, L.等人, *J. Tongji Med. Univ.* 21 (2001) 228-35。藉由偵測歸檔人類乳癌試樣中之ANG-2 mRNA含量, Sfiligoi, C.等人, *Int. J. Cancer* 103 (2003) 466-74報導ANG-2 mRNA與附屬淋巴結入侵、無疾病時間短及整體存活不良顯著相關。Tanaka, F.等人, *Cancer Res.* 62 (2002) 7124-29對總計236名分別處於病理階段I至IIIA之非小細胞肺癌(NSCLC)

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

最近，使用ANG-2基因剔除小鼠模型，Yancopoulos團體報導後天血管生成需要ANG-2。Gale, N.W.等人，Dev. Cell 3 (2002) 411-23。其顯示在ANG-2基因剔除小鼠中未出現眼睛中玻璃樣維管結構之發育漸進式退化，且其視網膜血管未能自視網膜中央動脈出芽。Gale, N.W.等人，Dev. Cell 3 (2002) 411-23。其亦發現缺失ANG-2導致在淋巴維管結構之模式化及功能方面產生重大缺陷。Gale, N.W.等人，Dev. Cell 3 (200) 411-23。Ang-1之遺傳拯救校正淋巴缺陷，但不能校正血管生成缺陷。Gale, N.W.等人，Dev. Cell 3 (2002) 411-23。

Peters及其同事報導可溶性Tie2當以重組蛋白或在病毒表現載體中之形式傳遞時抑制小鼠模型中鼠類乳腺癌及黑色素瘤之活體內生長。Lin, P.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 8829-34；Lin, P.等人，J. Clin. Invest. 100 (1997) 2072-78。經如此處理之腫瘤組織的血管密度大大

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

雙重專一性抗體

近期已開發出多種重組抗體形式，例如藉由融合例如IgG抗體形式與單鏈結構域產生之四價雙重專一性抗體(例如參見Coloma, M.J.等人，Nature Biotech 15 (1997) 159-163；WO 2001/077342；及Morrison, S.L., Nature Biotech 25 (2007) 1233-1234)。

亦已開發出不再保留抗體核心結構(IgA、IgD、IgE、

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

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

在WO 2007/024715中報導了作為經工程改造之多價及多重專一性結合蛋白之雙重可變域免疫球蛋白。在US 6,897,044中報導了一種製備生物活性抗體二聚體之方法。在US 7,129,330中報導了具有至少四個經肽連接子彼此連接之可變域的多價Fv抗體構築體。在US 2005/0079170中報導了二聚及多聚抗原結合結構。在US 6,511,663中報導了包含三個或四個藉由一連接結構彼此共價結合之Fab片段的三價或四價單專一性抗原結合蛋白，該蛋白不為天然免疫球蛋白。在WO 2006/020258中報導了四價雙重專一性抗體，其可有效地表現於原核及真核細胞中且適用於治療

及診斷方法。在US 2005/0163782中報導了一種自包含未經至少一個鏈間雙硫鍵連接之二聚體與經至少一個鏈間雙硫鍵連接之二聚體的混合物使該兩類多肽二聚體彼此分離或優先合成經至少一個鏈間雙硫鍵連接之二聚體的方法。

在US 5,959,083中報導了雙重專一性四價受體。在WO 2001/077342中報導了具有三個或三個以上功能抗原結合位點之經工程改造之抗體。

在WO 1997/001580中報導了多重專一性及多價抗原結合多肽。WO 1992/004053報導了通常由結合於相同抗原決定子的IgG類單株抗體製備之共軛對配合物(homoconjugate)，其係藉由合成交聯共價連接。在WO 1991/06305中報導了對抗原具有高親和力之寡聚單株抗體，其中分泌出通常為IgG類之寡聚物，其具有兩個或兩個以上締合在一起之免疫球蛋白單體以形成四價或六價IgG分子。在US 6,350,860中報導了綿羊源性抗體及經工程改造之抗體構築體，其可用於治療干擾素 γ 活性病原性疾病。在US 2005/0100543中報導了作為雙重專一性抗體之多價載體的可靶向之構築體，亦即可靶向之構築體之各分子可充當兩個或兩個以上雙重專一性抗體之載體。WO 1995/009917報導了經遺傳工程改造之雙重專一性四價抗體。WO 2007/109254報導了由穩定scFv組成或包含穩定scFv之穩定結合分子。

VEGF與ANG-2抑制劑之組合

WO 2007/068895涉及ANG-2拮抗劑與VEGF、KDR及/或

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

【發明內容】

本發明之第一態樣為一種雙重專一性抗體，其專一地結合於人類血管內皮生長因子(VEGF)及人類血管生成素-2(ANG-2)且包含專一地結合人類VEGF之第一抗原結合位點及專一地結合人類ANG-2之第二抗原結合位點。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- i) 該等抗原結合位點各為一對抗體重鏈可變域及抗體輕鏈可變域；
- ii) 該專一地結合VEGF之第一抗原結合位點在重鏈可變域中包含SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 94之CDR3區；SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 95之CDR2區；及SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 19或SEQ ID NO: 96之CDR1區，且在輕鏈可變域中包含SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 20或SEQ ID NO: 97之CDR3區；SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 21或SEQ ID NO: 98之CDR2區；及SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 22或SEQ ID NO: 99之CDR1區；
- iii) 該專一地結合ANG-2之第二抗原結合位點在重鏈可變域中包含SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 38、SEQ

ID NO: 46、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 78或SEQ ID NO: 86之CDR3區；SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 79或SEQ ID NO: 87之CDR2區；及SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 80或SEQ ID NO: 88之CDR1區，且在輕鏈可變域中包含SEQ ID NO: 28、具有突變T92L、H93Q及W94T之SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 81或SEQ ID NO: 89之CDR3區；SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 82或SEQ ID NO: 90之CDR2區；及SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 83或SEQ ID NO: 91之CDR1區。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- i) 該等抗原結合位點各為一對抗體重鏈可變域及抗體輕鏈可變域；
- ii) 該專一地結合VEGF之第一抗原結合位點在重鏈可變

域中包含SEQ ID NO: 1之CDR3區、SEQ ID NO: 2之CDR2區及SEQ ID NO:3之CDR1區，且在輕鏈可變域中包含SEQ ID NO: 4之CDR3區、SEQ ID NO:5之CDR2區及SEQ ID NO:6之CDR1區；

或該專一地結合VEGF之第一抗原結合位點在重鏈可變域中包含SEQ ID NO: 9之CDR3區、SEQ ID NO: 10之CDR2區及SEQ ID NO:11之CDR1區，且在輕鏈可變域中包含SEQ ID NO: 12之CDR3區、SEQ ID NO:13之CDR2區及SEQ ID NO:14之CDR1區；

或該專一地結合VEGF之第一抗原結合位點在重鏈可變域中包含SEQ ID NO: 17之CDR3區、SEQ ID NO: 18之CDR2區及SEQ ID NO:19之CDR1區，且在輕鏈可變域中包含SEQ ID NO: 20之CDR3區、SEQ ID NO:21之CDR2區及SEQ ID NO:22之CDR1區；及

- iii) 該專一地結合ANG-2之第二抗原結合位點在重鏈可變域中包含SEQ ID NO: 25之CDR3區、SEQ ID NO: 26之CDR2區及SEQ ID NO:27之CDR1區，且在輕鏈可變域中包含SEQ ID NO: 28或具有突變T92L、H93Q及W94T之SEQ ID NO: 28之CDR3區、SEQ ID NO:29之CDR2區及SEQ ID NO:30之CDR1區。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- i) 該等抗原結合位點各為一對抗體重鏈可變域及抗體輕鏈可變域；

ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 23 或 SEQ ID NO: 100 作為重鏈可變域，且包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 24 或 SEQ ID NO: 101 作為輕鏈可變域；及

iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 84 或 SEQ ID NO: 92 作為重鏈可變域，且包含 SEQ ID NO: 32、具有突變 T92L、H93Q 及 W94T 之 SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 85 或 SEQ ID NO: 93 作為輕鏈可變域。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 94 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 95 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 96 之 CDR1 區，且在輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 97 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 98 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 99 之 CDR1 區；

iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 46、SEQ

ID NO: 54、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 78或SEQ ID NO: 86之CDR3區；SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 79或SEQ ID NO: 87之CDR2區；及SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 80或SEQ ID NO: 88之CDR1區，且在輕鏈可變域中包含SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 81或SEQ ID NO: 89之CDR3區；SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 82或SEQ ID NO: 90之CDR2區；及SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 83或SEQ ID NO: 91之CDR1區。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合VEGF之第一抗原結合位點包含SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 100作為重鏈可變域，且包含SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 101作為輕鏈可變域；及
- iii) 該專一地結合ANG-2之第二抗原結合位點包含SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 84或SEQ

ID NO: 92作為重鏈可變域，且包含SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 85或SEQ ID NO: 93作為輕鏈可變域。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

iii) 該專一地結合ANG-2之第二抗原結合位點在重鏈可變域中包含SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 78或SEQ ID NO: 86之CDR3區；SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 79或SEQ ID NO: 87之CDR2區；及SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 80或SEQ ID NO: 88之CDR1區，且在輕鏈可變域中包含SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 81或SEQ ID NO: 89之CDR3區；SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 82或SEQ ID NO: 90之CDR2區；及SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 83或SEQ ID NO: 91之CDR1區。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的

特徵在於：

- iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 84 或 SEQ ID NO: 92 作為重鏈可變域，且包含 SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 85 或 SEQ ID NO: 93 作為輕鏈可變域。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 1 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 2 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 3 之 CDR1 區，且在輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 4 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 5 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 6 之 CDR1 區；及
- iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 46 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 47 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 48 之 CDR1 區，且在輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 49 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 50 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 51 之 CDR1 區。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 7 作為重鏈可變域，且包含 SEQ ID NO: 8 作

為輕鏈可變域；及

- iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 52 作為重鏈可變域，且包含 SEQ ID NO: 53 作為輕鏈可變域。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 94 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 95 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 96 之 CDR1 區，且在輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 97 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 98 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 99 之 CDR1 區；
- iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 62 或 SEQ ID NO: 86 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 63 或 SEQ ID NO: 87 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 64 或 SEQ ID NO: 88 之 CDR1 區，且在輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 65 或 SEQ ID NO: 89 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 66 或 SEQ ID NO: 90 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 67 或 SEQ ID NO: 91 之 CDR1 區。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 100 作為重鏈可變域，且包

含 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 101 作為輕鏈可變域；及

- iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 68 或 SEQ ID NO: 92 作為重鏈可變域，且包含 SEQ ID NO: 69 或 SEQ ID NO: 93 作為輕鏈可變域。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 1 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 2 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 3 之 CDR1 區，且在輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 4 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 5 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 6 之 CDR1 區；
- iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 62 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 63 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 64 之 CDR1 區，且在輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 65 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 66 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 67 之 CDR1 區。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 7 作為重鏈可變域，且包含 SEQ ID NO: 8 作為輕鏈可變域；及
- iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點包含 SEQ

ID NO: 68作為重鏈可變域，且包含SEQ ID NO: 69作為輕鏈可變域。

該等雙重專一性抗體至少為二價且可為三價、四價或多價。本發明之雙重專一性抗體較佳為二價、三價或四價。

本發明之另一態樣為一種編碼該雙重專一性抗體之一條鏈的核酸分子。

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

本發明進一步包含一種原核或真核宿主細胞，該細胞包含本發明之載體。

本發明進一步包含一種產生本發明之雙重專一性抗體之方法，其特徵在於：在原核或真核宿主細胞中表現本發明之核酸，且自該細胞或細胞培養物上清液回收該雙重專一性抗體。本發明進一步包含藉由該類重組方法獲得之抗體。

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

對於需要VEGF及ANG-2靶向療法之人類患者，本發明之雙重專一性抗體顯示益處。本發明抗體具有對罹患該類疾病、尤其罹患癌症之患者產生益處的新穎及發明性特

性。令人驚奇的是，已發現本發明之雙重專一性抗體在腫瘤生長及/或腫瘤血管生成抑制方面比各別單專一性親本抗體之組合更有效。

【實施方式】

本發明之一項實施例為一種專一地結合於人類 VEGF 及人類 ANG-2 之雙重專一性抗體，其包含專一地結合人類 VEGF 之第一抗原結合位點及專一地結合人類 ANG-2 之第二抗原結合位點，該抗體特徵在於：

- i) 該等抗原結合位點各為一對抗體重鏈可變域及抗體輕鏈可變域；
- ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 17 或 SEQ ID NO: 94 之 CDR3 區；SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 18 或 SEQ ID NO: 95 之 CDR2 區；及 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 19 或 SEQ ID NO: 96 之 CDR1 區，且在輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 20 或 SEQ ID NO: 97 之 CDR3 區；SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 21 或 SEQ ID NO: 98 之 CDR2 區；及 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 22 或 SEQ ID NO: 99 之 CDR1 區；
- iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 62、SEQ

ID NO: 70、SEQ ID NO: 78或SEQ ID NO: 86之CDR3區；SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 79或SEQ ID NO: 87之CDR2區；及SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 80或SEQ ID NO: 88之CDR1區，且在輕鏈可變域中包含SEQ ID NO: 28、具有突變T92L、H93Q及W94T之SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 81或SEQ ID NO: 89之CDR3區；SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 82或SEQ ID NO: 90之CDR2區；及SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 83或SEQ ID NO: 91之CDR1區。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- i) 該等抗原結合位點各為一對抗體重鏈可變域及抗體輕鏈可變域；
- ii) 該專一地結合VEGF之第一抗原結合位點在重鏈可變域中包含SEQ ID NO: 1之CDR3區、SEQ ID NO: 2之

CDR2區及SEQ ID NO:3之CDR1區，且在輕鏈可變域中包含SEQ ID NO: 4之CDR3區、SEQ ID NO:5之CDR2區及SEQ ID NO:6之CDR1區；

或該專一地結合VEGF之第一抗原結合位點在重鏈可變域中包含SEQ ID NO: 9之CDR3區、SEQ ID NO: 10之CDR2區及SEQ ID NO:11之CDR1區，且在輕鏈可變域中包含SEQ ID NO: 12之CDR3區、SEQ ID NO:13之CDR2區及SEQ ID NO:14之CDR1區；

或該專一地結合VEGF之第一抗原結合位點在重鏈可變域中包含SEQ ID NO: 17之CDR3區、SEQ ID NO: 18之CDR2區及SEQ ID NO:19之CDR1區，且在輕鏈可變域中包含SEQ ID NO: 20之CDR3區、SEQ ID NO:21之CDR2區及SEQ ID NO:22之CDR1區；及

- iii) 該專一地結合ANG-2之第二抗原結合位點在重鏈可變域中包含SEQ ID NO: 25之CDR3區、SEQ ID NO: 26之CDR2區及SEQ ID NO:27之CDR1區，且在輕鏈可變域中包含SEQ ID NO: 28或具有突變T92L、H93Q及W94T之SEQ ID NO: 28之CDR3區、SEQ ID NO:29之CDR2區及SEQ ID NO:30之CDR1區。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- i) 該等抗原結合位點各為一對抗體重鏈可變域及抗體輕鏈可變域；
- ii) 該專一地結合VEGF之第一抗原結合位點包含SEQ

ID NO: 7、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 100作為重鏈可變域，且包含SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 24或SEQ ID NO: 101作為輕鏈可變域；及

- iii) 該專一地結合ANG-2之第二抗原結合位點包含SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 84或SEQ ID NO: 92作為重鏈可變域，且包含SEQ ID NO: 32、具有突變T92L、H93Q及W94T之SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 85或SEQ ID NO: 93作為輕鏈可變域。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合VEGF之第一抗原結合位點在重鏈可變域中包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 94之CDR3區、SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 95之CDR2區及SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 96之CDR1區，且在輕鏈可變域中包含SEQ ID NO: 4或SEQ ID NO: 97之CDR3區、SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 98之CDR2區及SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 99之CDR1區；
- iii) 該專一地結合ANG-2之第二抗原結合位點在重鏈可變域中包含SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 70、SEQ

ID NO: 78或SEQ ID NO: 86之CDR3區；SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 79或SEQ ID NO: 87之CDR2區；及SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 80或SEQ ID NO: 88之CDR1區，且在輕鏈可變域中包含SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 81或SEQ ID NO: 89之CDR3區；SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 82或SEQ ID NO: 90之CDR2區；及SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 83或SEQ ID NO: 91之CDR1區。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合VEGF之第一抗原結合位點包含SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 100作為重鏈可變域，且包含SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 101作為輕鏈可變域；及
- iii) 該專一地結合ANG-2之第二抗原結合位點包含SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 84或SEQ ID NO: 92作為重鏈可變域，且包含SEQ ID NO:

45、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 85或SEQ ID NO: 93作為輕鏈可變域。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

ii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 78 或 SEQ ID NO: 86 之 CDR3 區；SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 79 或 SEQ ID NO: 87 之 CDR2 區；及 SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 80 或 SEQ ID NO: 88 之 CDR1 區，且在輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 81 或 SEQ ID NO: 89 之 CDR3 區；SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 82 或 SEQ ID NO: 90 之 CDR2 區；及 SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 83 或 SEQ ID NO: 91 之 CDR1 區。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 84 或 SEQ ID NO: 92 作為重鏈可變域，且包含 SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 85 或 SEQ ID NO: 93 作為輕鏈可變域。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 1 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 2 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 3 之 CDR1 區，且在輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 4 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 5 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 6 之 CDR1 區；及
- iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 46 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 47 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 48 之 CDR1 區，且在輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 49 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 50 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 51 之 CDR1 區。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 7 作為重鏈可變域，且包含 SEQ ID NO: 8 作為輕鏈可變域；及

- iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 52 作為重鏈可變域，且包含 SEQ ID NO: 53 作為輕鏈可變域。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 94 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 95 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 96 之 CDR1 區，且在輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 97 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 98 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 99 之 CDR1 區；
- iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 62 或 SEQ ID NO: 86 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 63 或 SEQ ID NO: 87 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 64 或 SEQ ID NO: 88 之 CDR1 區，且在輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 65 或 SEQ ID NO: 89 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 66 或 SEQ ID NO: 90 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 67 或 SEQ ID NO: 91 之 CDR1 區。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 100 作為重鏈可變域，且包含 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 101 作為輕鏈可變

域；及

- iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 68 或 SEQ ID NO: 92 作為重鏈可變域，且包含 SEQ ID NO: 69 或 SEQ ID NO: 93 作為輕鏈可變域。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 1 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 2 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 3 之 CDR1 區，且在輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 4 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 5 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 6 之 CDR1 區；
- iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 62 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 63 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 64 之 CDR1 區，且在輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 65 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 66 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 67 之 CDR1 區。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 7 作為重鏈可變域，且包含 SEQ ID NO: 8 作為輕鏈可變域；及
- iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 68 作為重鏈可變域，且包含 SEQ ID NO: 69

作為輕鏈可變域。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 1 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 2 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 3 之 CDR1 區，且在輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 4 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 5 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 6 之 CDR1 區；及
- iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點在重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 78 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 79 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 80 之 CDR1 區，且在輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 81 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 82 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 83 之 CDR1 區。

在本發明之一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：

- ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 7 作為重鏈可變域，且包含 SEQ ID NO: 8 作為輕鏈可變域；及
- iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點包含 SEQ ID NO: 84 作為重鏈可變域，且包含 SEQ ID NO: 85 作為輕鏈可變域。

本發明之另一項實施例為一種專一地結合於人類血管內皮生長因子(VEGF)及人類血管生成素-2(ANG-2)之雙重專一性抗體，其特徵在於：親本抗 ANG-2 抗體並不專一地結

合於人類血管生成素1(Angiopoetin-1, ANG-1)。專一地結合於人類ANG-2但不專一地結合於人類ANG-1之典型親本抗體為例如Ang2s_R3_LC03、Ang2s_LC09、Ang2i_LC06、Ang2i_LC07，且較佳為Ang2i_LC10或結合與Ang2s_R3_LC03、Ang2s_LC09、Ang2i_LC06、Ang2i_LC07、Ang2i_LC10相同之抗原決定基之抗體，較佳為結合與Ang2i_LC06或Ang2i_LC10相同之抗原決定基之抗體。因此，在本發明之一項實施例中，專一地結合於人類血管內皮生長因子(VEGF)及人類血管生成素-2(ANG-2)但不專一地結合於人類ANG-1(或具如下特徵：親本抗ANG-2抗體並不專一地結合於人類血管生成素1(ANG-1))的雙重專一性抗體結合與Ang2s_R3_LC03、Ang2s_LC09、Ang2i_LC06、Ang2i_LC07、Ang2i_LC10相同之抗原決定基，較佳為結合與Ang2i_LC06或Ang2i_LC10相同之抗原決定基。該等專一地結合於人類血管內皮生長因子(VEGF)及人類血管生成素-2(ANG-2)但不專一地結合於人類ANG-1(或具如下特徵：親本抗ANG-2抗體並不專一地結合於人類血管生成素1(ANG-1))的雙重專一性抗體相較於專一地結合於人類血管內皮生長因子(VEGF)及人類血管生成素-2(ANG-2)以及人類ANG-1之雙重專一性抗體而言可具有改良之特性，諸如生物活性或藥理學活性、較低毒性或藥物動力學概況。

因此，一項較佳實施例為一種專一地結合於人類VEGF及人類ANG-2之雙重專一性抗體，其包含專一地結合人類

VEGF之第一抗原結合位點及專一地結合人類ANG-2之第二抗原結合位點，該抗體特徵在於：該第二抗原結合位點並不專一地結合於人類血管生成素1(ANG-1)。

本發明之一項實施例為一種專一地結合於人類血管內皮生長因子(VEGF)及人類血管生成素-2(ANG-2)之雙重專一性抗體，其包含專一地結合人類VEGF之第一抗原結合位點及專一地結合人類ANG-2之第二抗原結合位點，該抗體特徵在於：結合親和力KD(對VEGF具專一性之抗原結合位點)/KD(對ANG-2具專一性之抗原結合位點)之比為1.0-10.0，較佳為1.5-8.0(在一項實施例中為5.0-8.0)，且絕對KD值較佳在 10^{-8} - 10^{-13} mol/l範圍內。KD值係以ANG-2/VEGF結合BIACORE測定(參見實例2及圖15A)。當兩種蛋白質人類VEGF及人類ANG-2皆以可溶性受體配位體形式以大致相同之濃度存在於人類血清中時，利用雙重專一性阻斷該兩種受體配位體之特徵在於：結合親和力KD(對VEGF具專一性之抗原結合位點)/KD(對ANG-2具專一性之抗原結合位點)之比為1.0-10.0，較佳為1.5-8.0，且在一項實施例中為5.0-8.0，可使得在以該類雙重專一性抗體治療癌症或血管疾病期間關於抗血管生成效應、腫瘤生長抑制或抗性機制之特性得到改良。較佳的是，該雙重專一性抗體之特徵在於：結合親和力KD(對VEGF具專一性之抗原結合位點)/KD(對ANG-2具專一性之抗原結合位點)之比為1.0-10.0，較佳為1.5-8.0(在一項實施例中為5.0-8.0)，且該雙重專一性抗體包含SEQ ID NO: 7之重鏈可變域及SEQ ID

NO: 8之輕鏈可變域作為專一地結合VEGF之第一抗原結合位點，且包含a)SEQ ID NO: 52之重鏈可變域及SEQ ID NO: 53之輕鏈可變域抑或b)SEQ ID NO: 84之重鏈可變域及SEQ ID NO: 85之輕鏈可變域作為該專一地結合ANG-2之第二抗原結合位點。

本文所用之「抗體」係指包含抗原結合位點之結合蛋白。本文所用之術語「結合位點」或「抗原結合位點」表示配位體實際上所結合於之抗體分子上的某一(些)區域。術語「抗原結合位點」包括抗體重鏈可變域(VH)及/或抗體輕鏈可變域(VL)，或VH/VL對，且可源自完整抗體或抗體片段，諸如單鏈Fv、VH域及/或VL域、Fab或(Fab)₂。在本發明之一項實施例中，抗原結合位點各包含抗體重鏈可變域(VH)及/或抗體輕鏈可變域(VL)，且較佳係由由抗體輕鏈可變域(VL)及抗體重鏈可變域(VH)組成之配對形成。

專一地結合於人類血管內皮生長因子(VEGF)之抗原結合位點及尤其重鏈可變域(VH)及/或抗體輕鏈可變域(VL)可源自：a)已知抗VEGF抗體(諸如Kim等人，Nature 362 (1993) 841-844；Warren, R.S.等人，J. Clin. Invest. 95 (1995) 1789-1797；Borgstrom, P.等人，Cancer Res. 56 (1996) 4032-4039；Melnik, O.等人，Cancer Res. 56 (1996) 921-924；WO 94/10202、WO 98/45332、WO 2005/00900、WO 00/35956及US 2007/0141065)；或b)藉由重新免疫法尤其使用人類VEGF蛋白或核酸或其片段或藉由噬菌體呈現獲得之新型抗VEGF抗體。

專一地結合於人類血管生成素-2(ANG-2)之抗原結合位點及尤其重鏈可變域(VH)及/或抗體輕鏈可變域(VL)可源自：a)已知抗ANG-2抗體(諸如WO 03/030833、WO 2006/068953、WO 2006/045049或US 6,166,185)；或b)例如藉由重新免疫法尤其使用人類ANG-2蛋白或核酸或其片段或藉由噬菌體呈現獲得之新型抗ANG-2抗體。

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

本發明之「雙重專一性抗體」為具有兩種不同抗原結合專一性之抗體。若抗體具有一種以上專一性，則所識別之抗原決定基可與單種抗原或一種以上抗原締合。本發明抗體對兩種不同抗原(亦即作為第一抗原之VEGF及作為第二抗原之ANG-2)具專一性。

本文所用之術語「單專一性」抗體表示具有一或多個結合位點之抗體，該等位點中之任一者與同一抗原之同一抗原決定基結合。

本申請案中所用之術語「價」表示抗體分子中存在規定數目之結合位點。因而，術語「二價」、「四價」及「六價」表示抗體分子中分別存在兩個結合位點，四個結合位點及六個結合位點。本發明之雙重專一性抗體至少為「二價」且可為「三價」或「多價」(例如「四價」或「六價」)。本發明之雙重專一性抗體較佳為二價、三價或四價。在一項實施例中，該雙重專一性抗體為二價抗體。在一項實施例中，該雙重專一性抗體為三價抗體。在一項實

施例中，該雙重專一性抗體為四價抗體。

本發明抗體具有兩個或兩個以上結合位點且為雙重專一性的。亦即，抗體可為雙重專一性抗體，即使在其中存在兩個以上結合位點之狀況(亦即抗體為三價抗體或多價抗體)下亦如此。本發明之雙重專一性抗體包括例如多價單鏈抗體、雙功能抗體及三功能抗體，以及經一或多個肽連接子連接有其他抗原結合位點(例如單鏈Fv、VH域及/或VL域、Fab或(Fab)₂)之具有全長抗體之恆定域結構的抗體。抗體可為來自單個物種之全長抗體，或為嵌合或人類化抗體。對於具有兩個以上抗原結合位點之抗體，一些結合位點可相同，只要蛋白質具有針對兩個不同抗原之結合位點即可。亦即，鑒於第一結合位點對VEGF具專一性，則第二結合位點對ANG-2具專一性，及鑒於第一結合位點對ANG-2具專一性，則第二結合位點對VEGF具專一性。

人類血管內皮生長因子(VEGF/VEGF-A)(SEQ ID No: 105)描述於例如 Leung, D.W. 等人, Science 246 (1989) 1306-9; Keck, P.J. 等人, Science 246 (1989) 1309-12 及 Connolly, D.T. 等人, J. Biol. Chem. 264 (1989) 20017-24 中。VEGF 涉及於腫瘤及眼內病症相關之正常及異常血管生成及新血管生成的調節中(Ferrara, N. 等人, Endocr. Rev. 18 (1997) 4-25; Berkman, R.A. 等人, J. Clin. Invest. 91 (1993) 153-159; Brown, L.F. 等人, Human Pathol. 26 (1995) 86-91; Brown, L.F. 等人, Cancer Res. 53 (1993) 4727-4735; Mattern, J. 等人, Brit. J. Cancer. 73 (1996)

931-934；及Dvorak, H.等人，Am. J. Pathol. 146 (1995) 1029-1039)。VEGF為已自若干來源分離之同型二聚糖蛋白。VEGF顯示針對內皮細胞之高度專一促有絲分裂活性。

人類血管生成素-2(ANG-2)(或者縮寫為ANGPT2或ANG2)(SEQ ID No: 106)描述於Maisonpierre, P.C.等人，Science 277 (1997) 55-60及Cheung, A.H.等人，Genomics 48 (1998) 389-91中。發現血管生成素-1及-2(ANG-1(SEQ ID No: 107)及ANG-2(SEQ ID No: 106))為Tie之配位體，Tie為選擇性表現於血管內皮中之酪胺酸激酶家族。Yancopoulos, G.D.等人，Nature 407 (2000) 242-48。血管生成素家族目前存在四個確定成員。血管生成素-3及-4(Ang-3及Ang-4)可表示小鼠及人類中相同基因座之廣泛發散對應物。Kim, I.等人，FEBS Let, 443 (1999) 353-56；Kim, I.等人，J Biol Chem 274 (1999) 26523-28。最初在組織培養實驗中分別以促效劑及拮抗劑形式識別出ANG-1及ANG-2(參見ANG-1: Davis, S.等人，Cell 87 (1996) 1161-69；及ANG-2: Maisonpierre, P.C.等人，Science 277 (1997) 55-60)。所有已知血管生成素主要結合Tie2，且Ang-1及-2皆以3 nM (Kd)親和力結合Tie2。Maisonpierre, P.C.等人，Science 277 (1997) 55-60。

本發明抗體之抗原結合位點可含有六個以不同程度幫助結合位點對抗原之結合親和力的互補決定區(CDR)。存在三個重鏈可變域CDR(CDRH1、CDRH2及CDRH3)及三個輕

鏈可變域CDR(CDRL1、CDRL2及CDRL3)。藉由與胺基酸序列之經彙編資料庫(其中CDR及FR已根據序列之間的可變性定義)比較來測定CDR及構架區(FR)之範圍。本發明範圍內亦包括由較少CDR組成之功能性抗原結合位點(亦即，其中結合專一性由三個、四個或五個CDR決定)。舉例而言，少於全套6個CDR對結合而言可為足夠的。在一些狀況下，VH或VL域將足夠。

在某些實施例中，本發明抗體進一步包含一或多個免疫球蛋白種類之免疫球蛋白恆定區。免疫球蛋白種類包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE同型，且在IgG及IgA狀況下，包括其亞型。在一項較佳實施例中，本發明抗體具有IgG型抗體之恆定域結構，但具有四個抗原結合位點。此例如藉由使兩個專一地結合VEGF之全抗原結合位點(例如單鏈Fv)與專一地結合ANG-2之完全抗體之N或C端重鏈或輕鏈中之任一者連接來完成。或者，此係藉由使兩個專一地結合ANG-2之全結合肽與專一地結合VEGF之完全抗體之C端重鏈之任一者融合來完成。四個抗原結合位點較佳包含針對兩種不同結合專一性之每一者的兩個抗原結合位點。

本文所用之術語「單株抗體」或「單株抗體組份」係指單胺基酸組份之抗體分子製劑。

術語「嵌合抗體」係指包含來自一種來源或物種之可變區(亦即結合區)及自不同來源或物種產生之至少一部分恆定區之抗體，該抗體一般藉由重組DNA技術製備。包含鼠類可變區及人類恆定區之嵌合抗體較佳。本發明涵蓋之

「嵌合抗體」的其他較佳形式為恆定區已自初始抗體恆定區修飾或改變以產生尤其關於C1q結合及/或Fc受體(FcR)結合的本發明特性之形式。該等嵌合抗體亦稱為「類別轉換抗體」。嵌合抗體為包含編碼免疫球蛋白可變區之DNA區段及編碼人類免疫球蛋白恆定區之DNA區段的經表現免疫球蛋白基因的產物。此項技術中熟知涉及習知重組DNA及基因轉染技術之製造嵌合抗體之方法。例如參見Morrison, S.L. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238及US 5,204,244。

術語「人類化抗體」係指構架或「互補決定區」(CDR)已經修飾以包含與親本免疫球蛋白相比具有不同專一性之免疫球蛋白之CDR的抗體。在一項較佳實施例中, 將鼠類CDR移植至人類抗體之構架區中以製備「人類化抗體」。例如參見Riechmann, L. 等人, Nature 332 (1988) 323-327; 及Neuberger, M.S. 等人, Nature 314 (1985) 268-270。尤其較佳之CDR對應於呈現識別上文對於嵌合抗體所述之抗原之序列的CDR。本發明涵蓋之「人類化抗體」的其他形式為恆定區已以其他方式自初始抗體恆定區作了修飾或改變以產生本發明之特性(尤其關於C1q結合及/或Fc受體(FcR)結合)的形式。

本文所用之術語「人類抗體」意欲包括具有自人類生殖系免疫球蛋白序列產生之可變區及恆定區的抗體。人類抗體為此項技術中熟知(van Dijk, M.A.及van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374)。人類抗體亦可

產生於在無內源性免疫球蛋白產生之狀況下在免疫後能夠產生人類抗體之完全譜系或選擇之轉殖基因動物(例如小鼠)中。在該生殖系突變小鼠中轉移人類生殖系免疫球蛋白基因陣列將導致在抗原攻毒後產生人類抗體(例如參見 Jakobovits, A.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A.等人, Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M.等人, Year Immunol. 7 (1993) 33-40)。人類抗體亦可在噬菌體呈現庫中產生(Hoogenboom, H.R.及 Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D.等人, J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597)。Cole, A.等人及 Boerner, P.等人之技術亦適用於製備人類單株抗體(Cole, A.等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Liss, A.L., 第77頁 (1985); 及 Boerner, P.等人, J. Immunol. 147 (1991) 86-95)。如已針對本發明之嵌合及人類化抗體所提及, 本文所用之術語「人類抗體」亦包含在恆定區中例如藉由「類別轉換」(亦即Fc部分改變或突變(例如自IgG1至IgG4及/或IgG1/IgG4突變))修飾產生尤其關於C1q結合及/或FcR結合的本發明特性之抗體。

本文所用之術語「重組人類抗體」意欲包括藉由重組方式製備、表現、形成或分離之所有人類抗體, 諸如自例如 NS0或CHO細胞之宿主細胞或使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體表現之人類免疫球蛋白基因或抗體轉殖基因動物(例如小鼠)分離之抗體。該等重組人類抗體具有重排形式之可變區及恆定區。本發明之重組人類抗體已經受活體

內體細胞超突變。因此，重組抗體之VH及VL區之胺基酸序列為以下序列，其雖然自人類生殖系VH及VL序列產生且與其有關，但可能不天然存在於活體內人類抗體生殖系譜系中。

本文所用之「可變域」(輕鏈(VL)可變域、重鏈(VH)可變區)表示直接涉及於抗體與抗原結合中的各對輕鏈及重鏈。可變人類輕鏈及重鏈之結構域具有相同通用結構，且各結構域包含由3個「高變區」(或互補決定區，CDR)連接之4個構架(FR)區，其序列廣泛保守。構架區採用 β 折迭構形且CDR可形成連接 β 折迭結構之環。各鏈中之CDR藉由構架區保持其三維結構且連同來自其他鏈之CDR形成抗原結合位點。抗體重鏈及輕鏈CDR3區在本發明抗體之結合專一性/親和力中起尤其重要的作用，且因此提供本發明之另一目的。

當用於本文中時，術語「高變區」或「抗體之抗原結合部分」係指負責抗原結合之抗體之胺基酸殘基。高變區包含來自「互補決定區」或「CDR」之胺基酸殘基。「構架」或「FR」區為除如本文中所定義之高變區殘基之外的可變域區域。因此，抗體之輕鏈及重鏈自N端至C端包含結構域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。各鏈上之CDR係藉由該等構架胺基酸分離。重鏈之CDR3尤其為最有助於抗原結合之區域。根據Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health,

Bethesda, MD (1991)之標準定義判定CDR及FR區。

本發明之雙重專一性抗體另外包括具有「保守序列修飾」之該等抗體(其意謂雙重專一性抗體之「變異體」)。此意謂不影響或改變上述本發明抗體特徵之核苷酸及胺基酸序列修飾。可藉由此項技術中已知的諸如定點突變誘發及PCR介導之突變誘發之標準技術引入修飾。保守胺基酸取代包括胺基酸殘基經具有類似側鏈之胺基酸殘基置換之取代。此項技術中已定義具有類似側鏈之胺基酸殘基家族。此等家族包括具有鹼性側鏈之胺基酸(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、具有酸性側鏈之胺基酸(例如天冬胺酸、麩胺酸)、具有不帶電極性側鏈之胺基酸(例如甘胺酸、天冬醯胺、麩胺醯胺、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、具有非極性側鏈之胺基酸(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸)、具有 β -分支鏈側鏈之胺基酸(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及具有芳族側鏈之胺基酸(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。因此，在雙重專一性<VEGF-ANG-2>抗體中所預計之非必需胺基酸殘基較佳可以來自相同側鏈家族之另一胺基酸殘基置換。因此，「變異」雙重專一性<VEGF-ANG-2>抗體在本文中係指與「親本」雙重專一性<VEGF-ANG-2>抗體胺基酸序列相差親本抗體之一或多個可變區或恆定區中的至多10個、較佳約2至約5個添加、缺失及/或取代之分子。可藉由如Riechmann, L.等人，Nature 332 (1988) 323-327及Queen, C.等人，Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033所述之基於分子模擬之突變誘發進行胺基酸取代。本發明之「變異」雙重專一性<VEGF-ANG-2>抗體亦包括連接子(若存在)經另一連接子修飾或置換之雙重專一性抗體形式。

本文所用之術語「結合」或「專一地結合」係指在使用經純化野生型抗原之活體外檢定、較佳電漿共振檢定(BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Sweden)(實例2)中使抗體與抗原(人類VEGF或人類ANG-2)之抗原決定基結合。結合親和力由術語 k_a (締合來自抗體/抗原複合物之抗體的速率常數)、 k_D (解離常數)及 $K_D(k_D/k_a)$ 定義。結合或專一地結合意謂 10^{-8} mol/l或更低，較佳 10^{-9} M至 10^{-13} mol/l之結合親和力(K_D)。

可藉由BIAcore檢定(GE-Healthcare Uppsala, Sweden)來研究抗體與FcγRIII之結合。結合親和力由術語 k_a (締合來自抗體/抗原複合物之抗體的速率常數)、 k_D (解離常數)及 $K_D(k_D/k_a)$ 定義。

本文所用之術語「不結合ANG-1」或「不專一地結合ANG-1」表示抗體在活體外ANG-1結合ELISA檢定中具有高於8000 ng/ml之EC50值(根據實例9)。

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

在某些實施例中，當抗體在蛋白質及/或大分子之複雜混合物中優先識別其標靶抗原時，則稱該抗體專一地結合該抗原。

在本發明之一項實施例中，雙重專一性抗體包含全長親本抗體作為骨架。

術語「全長抗體」表示由兩個「全長抗體重鏈」及兩個「全長抗體輕鏈」組成之抗體。「全長抗體重鏈」為在N端至C端方向中由抗體重鏈可變域(VH)、抗體恆定重鏈域1(CH1)、抗體鉸鏈區(HR)、抗體重鏈恆定域2(CH2)及抗體重鏈恆定域3(CH3)(縮寫為 VH-CH1-HR-CH2-CH3)；及在子類IgE抗體狀況下視情況存在之抗體重鏈恆定域4(CH4)組成之多肽。「全長抗體重鏈」較佳為在N端至C端方向中由VH、CH1、HR、CH2及CH3組成之多肽。「全長抗體輕鏈」為在N端至C端方向中由抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域(CL)組成之多肽，縮寫為VL-CL。抗體輕鏈恆定域(CL)可為 κ 或 λ 。兩個全長抗體鏈在CL域與CH1域之間及全長抗體重鏈的鉸鏈區之間經多肽間雙硫鍵連接在一起。典型全長抗體之實例為天然抗體樣IgG(例如IgG 1及IgG2)、IgM、IgA、IgD及IgE。本發明之全長抗體可來自單獨物種(例如人類)，或其可為嵌合或人類化抗體。本發明之全長抗體包含各由一對VH及VL形成之兩個抗原結合位點，其皆專一地結合同一抗原。因此，包含第一抗原結合位點且由兩個抗體輕鏈及兩個抗體重鏈組成之單專一性二價(=全長)抗體為全長抗體。該全長抗體之重鏈或輕鏈

之C端表示該重鏈或輕鏈之C端的最後胺基酸。該全長抗體之重鏈或輕鏈之N端表示該重鏈或輕鏈之N端的最後胺基酸。

本發明之專一地結合人類血管內皮生長因子(VEGF)及人類血管生成素-2(ANG-2)之雙重專一性抗體的雙重專一性抗體形式之一項較佳實施例為具有兩種不同專一性之二價抗體，例如a)如WO 2009/080251、WO 2009/080252或WO 2009/080253中所述(結構域交換抗體-參見實例13)，或b)基於scFab-Fc融合抗體，其中一個單鏈Fab片段(最終經雙硫鍵穩定化)對VEGF具專一性且另一單鏈Fab片段(最終經雙硫鍵穩定化)對ANG-2具專一性(參見實例14)，或c)如Ridgway, J.B., Protein Eng. 9 (1996) 617-621；WO 96/027011；Merchant, A.M.等人，Nature Biotech 16 (1998) 677-681；Atwell, S.等人，J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35及EP 1 870 459A1中所述。

在一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：包含SEQ ID NO: 121、SEQ ID NO: 122、SEQ ID NO: 123及SEQ ID NO: 124或其變異體之胺基酸序列。

在一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：包含SEQ ID NO: 125、SEQ ID NO: 126、SEQ ID NO: 127及SEQ ID NO: 128或其變異體之胺基酸序列。

在一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：包含SEQ ID NO: 129、SEQ ID NO: 130、SEQ ID NO: 131及SEQ ID NO: 132或其變異體之胺基酸序列。

在一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：包含SEQ ID NO: 133及SEQ ID NO: 134或其變異體之胺基酸序列。

在一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：包含SEQ ID NO: 135及SEQ ID NO: 136或其變異體之胺基酸序列。

此等胺基酸序列係基於作為結合VEGF之第一抗原結合位點的SEQ ID NO: 7之重鏈可變域及SEQ ID NO: 8之輕鏈可變域(自貝伐單抗(Avastin)產生)，及作為結合ANG-2之第二抗原結合位點的SEQ ID NO: 52之重鏈可變域及SEQ ID NO: 53之輕鏈可變域(自Ang2i_LC06產生)。

在一項實施例中，該雙重專一性抗體為使用例如基於專一地結合兩個抗原VEGF或ANG-2中之一者的全長抗體之形式的三價抗體，該全長抗體僅在一重鏈之一C端融合scFab片段，該scFab片段專一地結合兩個抗原VEGF或ANG-2中之另一者，包括例如歐洲申請案第09004909.9號中所述之杵臼結構技術(knobs-into holes technology)(參見實例11)；或使用例如基於專一地結合兩個抗原VEGF或ANG-2中之一者的全長抗體之形式的三價抗體，該全長抗體在一重鏈之一C端融合VH或VH-CH1片段且在第二重鏈之另一C端融合VL或VL-CL片段，該等片段專一地結合兩個抗原VEGF或ANG-2之另一者，包括例如歐洲申請案第09005108.7號中所述之杵臼結構技術(參見實例12)。

在一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在

於：包含SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 116及SEQ ID NO: 117或其變異體之胺基酸序列。

在一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：包含SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119及SEQ ID NO: 120或其變異體之胺基酸序列。

此等胺基酸序列係基於作為結合VEGF之第一抗原結合位點的SEQ ID NO: 7之重鏈可變域及SEQ ID NO: 8之輕鏈可變域(自貝伐單抗(Avastin)產生)，及作為結合ANG-2之第二抗原結合位點的SEQ ID NO: 52之重鏈可變域及SEQ ID NO: 53之輕鏈可變域(自Ang2i_LC06產生)。

本發明專一地結合人類血管內皮生長因子(VEGF)及人類血管生成素-2(ANG-2)之雙重專一性抗體的較佳雙重專一性抗體形式為例如WO 2007/024715或WO 2007/109254或歐洲申請案第09004909.9號中所述的具有兩種不同專一性之四價抗體(TvAb)。因此，在一項實施例中，該雙重專一性抗體為使用例如WO 2007/024715或WO 2007/109254或歐洲申請案第09004909.9號中所述之形式的四價抗體(參見實例1或10)。

在本發明之一項實施例中，雙重專一性四價抗體TvAb-2441-貝伐單抗-LC06特徵在於：包含SEQ ID No: 102之肽及SEQ ID No: 62之輕鏈或其變異體。

在一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：包含SEQ ID NO: 109及SEQ ID NO: 110或其變異體之胺基酸序列。

在一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：包含SEQ ID NO: 111及SEQ ID NO: 112或其變異體之胺基酸序列。

在一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體的特徵在於：包含SEQ ID NO: 113及SEQ ID NO: 114或其變異體之胺基酸序列。

此等胺基酸序列係基於作為結合VEGF之第一抗原結合位點的SEQ ID NO: 7之重鏈可變域及SEQ ID NO: 8之輕鏈可變域(自貝伐單抗(Avastin)產生)，及作為結合ANG-2之第二抗原結合位點的SEQ ID NO: 52之重鏈可變域及SEQ ID NO: 53之輕鏈可變域(自Ang2i_LC06產生)。

在本發明之一項實施例中，雙重專一性四價抗體TvAb-2441-貝伐單抗-LC08特徵在於：包含SEQ ID No: 103之肽及SEQ ID No: 62之輕鏈或其變異體。

本發明抗體中之結合位點可各自由兩個可變域(亦即一重鏈可變域及一輕鏈可變域)之對形成。抗體中之最小結合位點決定子為重鏈CDR3區。

在一項實施例中，本發明之雙重專一性抗體為四價抗體。在另一項實施例中，該四價雙重專一性抗體具有以下特徵：

-其由以下組成：

- a)由兩個全長抗體重鏈及兩個全長抗體輕鏈組成之單專一性二價親本抗體，其中各鏈僅包含一可變域，
- b)兩個肽連接子，

c)各由抗體重鏈可變域、抗體輕鏈可變域及該抗體重鏈可變域與該抗體輕鏈可變域之間的單鏈連接子組成之兩個單專一性單價單鏈抗體；

且該單鏈抗體較佳與單專一性二價抗體重鏈之同一末端(C端及N端)連接，或與單專一性二價抗體輕鏈之同一末端(較佳C端)連接，且更佳與單專一性二價抗體重鏈之同一末端(C端及N端)連接。

在另一項實施例中，該雙重專一性抗體為四價且由以下組成

a)包含該抗原結合位點且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成之全長抗體；及

b)包含該第二抗原結合位點之兩個相同單鏈Fab片段，

其中該等在b)下之單鏈Fab片段與該在a)下之全長抗體經由該全長抗體之重鏈或輕鏈之C端或N端處的肽連接體融合。

在另一項實施例中，該雙重專一性抗體為四價且由以下組成

a)包含該第二抗原結合位點且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成之全長抗體；及

b)包含該第一抗原結合位點之兩個相同單鏈Fab片段，

其中該等在b)下之單鏈Fab片段與該在a)下之全長抗體經由該全長抗體之重鏈或輕鏈之C端或N端處的肽連接體融合。

該等在b)下之單鏈Fab片段與該在a)下之全長抗體較佳經

由該全長抗體之重鏈或輕鏈之C端處的肽連接體融合。

在一項實施例中，與第二抗原結合之兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體經由該全長抗體之各重鏈或輕鏈之C端處的肽連接體融合。

在一項實施例中，與第二抗原結合之兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體經由該全長抗體之各重鏈之C端處的肽連接體融合。

在一項實施例中，與第二抗原結合之兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體經由該全長抗體之各輕鏈之C端處的肽連接體融合。

該等包括單鏈Fab片段之實施例更詳細描述於例如歐洲申請案第09004909.9號中，其以引用的方式併入本文中。

本發明所用之術語「肽連接子」表示較佳合成來源的具有胺基酸序列之肽。使用本發明之此等肽連接子將不同抗原結合位點及/或最終包含不同抗原結合位點之抗體片段(例如單鏈Fv、全長抗體、VH域及/或VL域、Fab、(Fab)₂、Fc部分)連接在一起形成本發明之雙重專一性抗體。肽連接子可包含以下表1中所列之一或多個胺基酸序列以及其他任意選擇之胺基酸。該等肽連接子為具有長度至少為5個胺基酸，較佳至少10個胺基酸，更佳長度介於10與50個胺基酸之間的胺基酸序列之肽。該等在b)下之肽連接子較佳為具有長度至少為10個胺基酸之胺基酸序列的肽。在一項實施例中，該肽連接子為(GxS)_n，其中G=甘胺酸、S=絲胺酸(x=3且n=3、4、5或6)或(x=4且n=2、3、4或

5)，較佳 $x=4$ 且 $n=2$ 或 3，更佳 $x=4$ ， $n=2$ ($(G_4S)_2$)。向該 $(G_xS)_n$ 肽連接子亦可添加其他 G=甘胺酸，例如 GG 或 GGG。

本發明所用之術語「單鏈連接子」表示較佳合成來源的具有胺基酸序列之肽。使用此等本發明之單鏈連接子連接 VH 及 VL 域以形成單鏈 Fv。該 c) 下之單鏈連接子較佳為具有長度至少為 15 個胺基酸，更佳長度至少為 20 個胺基酸之胺基酸序列的肽。在一項實施例中，該單鏈連接子為 $(G_xS)_n$ ，其中 G=甘胺酸、S=絲胺酸 ($x=3$ 且 $n=4$ 、5 或 6) 或 ($x=4$ 且 $n=3$ 、4 或 5)，較佳 $x=4$ 、 $n=4$ 或 5，更佳 $x=4$ 、 $n=4$ 。

此外，該等單鏈(單鏈 Fv)抗體較佳經雙硫鍵穩定化。單鏈抗體之該進一步雙硫鍵穩定化係藉由在單鏈抗體之可變域之間引入雙硫鍵來實現，且描述於例如以下文獻中：WO 94/029350；Rajagopal, V. 等人，Prot. Engin. 10 (12) (1997) 1453-59；Kobayashi, H. 等人，Nuclear Medicine & Biology 25 (1998) 387-393；或 Schmidt, M. 等人，Oncogene 18 (1999) 1711-1721。

在雙硫鍵穩定之單鏈抗體之一項實施例中，本發明抗體中所包含之單鏈抗體之可變域之間的雙硫鍵對各單鏈抗體而言獨立選自：

- i) 重鏈可變域位置 44 至輕鏈可變域位置 100，
- ii) 重鏈可變域位置 105 至輕鏈可變域位置 43，或
- iii) 重鏈可變域位置 101 至輕鏈可變域位置 100。

在一項實施例中，本發明抗體中所包含之單鏈抗體之可

變域之間的雙硫鍵在重鏈可變域位置44與輕鏈可變域位置100之間。

在一項實施例中，本發明抗體中所包含之單鏈抗體之可變域之間的雙硫鍵在重鏈可變域位置105與輕鏈可變域位置43之間。

本發明之專一地結合 VEGF 及 ANG-2 之雙重專一性抗體的此四價實施例之結構，其中抗原 A 或 B 中之一者為 VEGF，而另一者為 ANG-2。該結構係基於專一地結合抗原 A 之全長抗體，其與專一地結合抗原 B 之兩個(視情況經雙硫鍵穩定化)單鏈 Fv 經肽連接子連接，如圖 1 及 2 之流程中所例示。

在一項實施例中，在單鏈抗體(單鏈 Fv)之可變域 VH 與 VL 之間不具有該視情況存在之雙硫鍵穩定化的該等單鏈(單鏈 Fv)抗體較佳。

在另一項實施例中，該四價雙重專一性抗體特徵在於：
a) 下之該單專一性二價抗體部分專一地結合 VEGF 且 c) 下之該兩個單價單專一性單鏈抗體結合 ANG-2。

在另一項實施例中，該四價雙重專一性抗體特徵在於：
a) 下之該單專一性二價抗體部分專一地結合 ANG-2 且 c) 下之該兩個單價單專一性單鏈抗體結合 VEGF。

「單鏈 Fab 片段」(參見圖 11)為由抗體重鏈可變域(VH)、抗體恆定域 1(CH1)、抗體輕鏈可變域(VL)、抗體輕鏈恆定域(CL)及連接子組成之多肽，其中該等抗體結構域及該連接子在 N 端至 C 端方向具有以下順序之一：a) VH-

CH1-連接子-VL-CL、b) VL-CL-連接子-VH-CH1、c) VH-CL-連接子-VL-CH1或d) VL-CH1-連接子-VH-CL；且其中該連接子為具有至少30個胺基酸，較佳32與50個胺基酸之間的多肽。該等單鏈Fab片段a) VH-CH1-連接子-VL-CL、b) VL-CL-連接子-VH-CH1、c) VH-CL-連接子-VL-CH1及d) VL-CH1-連接子-VH-CL經由CL域與CH1域之間的天然雙硫鍵而穩定化。術語「N端」表示N端之最後胺基酸。術語「C端」表示C端之最後胺基酸。

在一項較佳實施例中，該單鏈Fab片段中之該等抗體結構域及該連接子在N端至C端方向中具有以下順序中之一者：

a) VH-CH1-連接子-VL-CL，或b) VL-CL-連接子-VH-CH1，更佳VL-CL-連接子-VH-CH1。

在另一項較佳實施例中，該單鏈Fab片段中之該等抗體結構域及該連接子在N端至C端方向中具有以下順序中之一者：

a) VH-CL-連接子-VL-CH1或b) VL-CH1-連接子-VH-CL。

本發明中所用之術語「肽連接體」表示較佳來源於合成的具有胺基酸序列之肽。使用此等本發明之肽連接體使單鏈Fab片段與全長抗體之C或N端融合形成本發明之多重專一性抗體。b)下之該肽連接體較佳為具有長度至少為5個胺基酸，較佳長度為5至100個胺基酸，更佳10至50個胺基酸之胺基酸序列的肽。在一項實施例中，該肽連接體為 $(GxS)_n$ 或 $(GxS)_nG_m$ ，其中G=甘胺酸、S=絲胺酸，且 $(x=3, n=3、4、5或6, 且m=0、1、2或3)$ 或 $(x=4, n=2、$

3、4或5且 $m=0$ 、1、2或3)，較佳 $x=4$ 且 $n=2$ 或3，更佳 $x=4$ ， $n=2$ 。在一項實施例中，該肽連接體為 $(G_4S)_2$ 。

本發明中所用之術語「連接子」表示較佳合成來源的具有胺基酸序列之肽。使用此等本發明之肽連接 a) VH-CH1 至 VL-CL，b) VL-CL 至 VH-CH1，c) VH-CL 至 VL-CH1 或 d) VL-CH1 至 VH-CL 以形成以下本發明之單鏈 Fab 片段 a) VH-CH1-連接子-VL-CL，b) VL-CL-連接子-VH-CH1，c) VH-CL-連接子-VL-CH1 或 d) VL-CH1-連接子-VH-CL。單鏈 Fab 片段中之該連接子為具有長度至少為30個胺基酸，較佳長度為32至50個胺基酸之胺基酸序列的肽。在一項實施例中，該連接子為 $(G_xS)_n$ ，其中 G=甘胺酸，S=絲胺酸 ($x=3$ ， $n=8$ 、9或10且 $m=0$ 、1、2或3) 或 ($x=4$ 且 $n=6$ 、7或8且 $m=0$ 、1、2或3)，較佳 $x=4$ ， $n=6$ 或7且 $m=0$ 、1、2或3，更佳 $x=4$ ， $n=7$ 且 $m=2$ 。在一項實施例中，該連接子為 $(G_4S)_6G_2$ 。

視情況而言，在該單鏈 Fab 片段中，除 CL 域與 CH1 域之間的天然雙硫鍵之外，抗體重鏈可變域 (VH) 及抗體輕鏈可變域 (VL) 亦藉由在以下位置之間引入雙硫鍵而雙硫鍵穩定化：

- i) 重鏈可變域位置44至輕鏈可變域位置100，
- ii) 重鏈可變域位置105至輕鏈可變域位置43，或
- iii) 重鏈可變域位置101至輕鏈可變域位置100(通常根據 Kabat 之 EU 指數編號)。

單鏈 Fab 片段之該進一步的雙硫鍵穩定化係藉由在單鏈

Fab片段之可變域VH與VL之間引入雙硫鍵實現。引入非天然雙硫橋以使單鏈Fv穩定化之技術描述於例如WO 94/029350、Rajagopal, V.等人, Prot. Engin. (1997) 1453-59; Kobayashi, H.等人; Nuclear Medicine & Biology, 第25卷, (1998) 387-393; 或 Schmidt, M.等人, Oncogene (1999) 18, 1711-1721中。在一項實施例中, 本發明抗體中所包含之單鏈Fab片段之可變域之間的視情況存在之雙硫鍵在重鏈可變域位置44與輕鏈可變域位置100之間。在一項實施例中, 本發明抗體中所包含之單鏈Fab片段之可變域之間的視情況存在之雙硫鍵在重鏈可變域位置105與輕鏈可變域位置43之間(通常根據Kabat之EU指數編號)。

在一項實施例中, 在單鏈Fab片段之可變域VH與VL之間不具有該視情況存在之雙硫鍵穩定化的單鏈Fab片段較佳。

本發明之四價雙重專一性抗體之該第二實施例較佳包含兩個相同單鏈Fab片段(較佳VL-CL-連接子-VH-CH1), 其皆與a)下之該全長抗體的兩個重鏈之兩個C端或兩個輕鏈之兩個C端融合。該融合產生與i)全長抗體之輕鏈或重鏈共表現之兩個相同融合肽(i)重鏈及單鏈Fab片段或ii)輕鏈及單鏈Fab片段), 獲得本發明之雙重專一性抗體。

在另一項實施例中, 該雙重專一性抗體特徵在於: 人類來源產生之恆定區。

在另一項實施例中, 該雙重專一性抗體特徵在於: 本發明雙重專一性抗體之恆定區為人類IgG1子類或具有突變

L234A及L235A之人類IgG1子類。

在另一項實施例中，該雙重專一性抗體特徵在於：根據本發明抗體之雙重專一性抗體之恆定區為人類IgG2子類。

在另一項實施例中，該雙重專一性抗體特徵在於：根據本發明抗體之雙重專一性抗體之恆定區為人類IgG3子類。

在另一項實施例中，該雙重專一性抗體特徵在於：本發明雙重專一性抗體之恆定區為人類IgG4子類或具有額外突變S228P之人類IgG4子類。

現已發現本發明之針對人類VEGF及人類ANG-2之雙重專一性抗體具有改良之特徵，諸如生物活性或藥理學活性、藥物動力學特性或毒性。其相較於針對VEGF及ANG-2之單專一性親本抗體顯示增加之活體內腫瘤生長抑制及/或腫瘤血管生成抑制(參見實例16、17及18：不同雙重專一性<VEGF-ANG-2>抗體貝伐單抗-ANG2i-LC06與單獨之單專一性抗體Avastin(貝伐單抗)、單獨之ANG2i-LC06或兩者之組合的比較)。

此外，相較於組合應用針對VEGF及ANG-2之兩種相應個別單專一性抗體之較低毒副作用(此由活體內應用期間測試動物之體重得到改良以及測試動物之死亡較少所反映)亦代表本發明之雙重專一性抗體之一項優勢。

此外，本發明之雙重專一性抗體可提供諸如降低投與劑量及/或頻率及伴隨之節約成本的益處。

本申請案中所用之術語「恆定區」表示除可變區之外的抗體結構域的總和。恆定區不直接涉及於抗原結合中，但

展現多種效應功能。視其重鏈恆定區之胺基酸序列而定，抗體分為以下類別：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且其中數種可進一步分為諸如IgG1、IgG2、IgG3及IgG4、IgA1及IgA2的子類。對應於不同類別之抗體的重鏈恆定區分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。所有5種抗體種類中可發現之輕鏈恆定區稱為 κ 及 λ 。

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

儘管IgG4子類抗體顯示降低之Fc受體(Fc γ RIIIa)結合，但其他IgG子類抗體顯示強結合。然而，Pro238、Asp265、Asp270、Asn297(失去Fc碳水化合物)、Pro329、Leu234、Leu235、Gly236、Gly237、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434及His435為若經改變亦提供降低之Fc受體結合的殘基(Shields, R.L.等人, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604; Lund, J.等人, *FASEB J.* 9 (1995) 115-119; Morgan, A.等人, *Immunology* 86 (1995) 319-324; EP 0 307 434)。

在一項實施例中，本發明抗體相較於IgG1抗體及單專一性二價(全長)親本抗體具有降低之FcR結合係對於在S228、L234、L235及/或D265具有突變，及/或含有

PVA236突變之IgG4子類或IgG1或IgG2子類的FcR結合而言。在一項實施例中，單專一性二價(全長)親本抗體之突變為S228P、L234A、L235A、L235E及/或PVA236。在另一項實施例中，單專一性二價(全長)親本抗體之突變在IgG4中為S228P且在IgG1中為L234A及L235A。恆定重鏈區顯示於SEQ ID NO: 35及36中。在一項實施例中，單專一性二價(全長)親本抗體之恆定重鏈區為具有突變L234A及L235A之SEQ ID NO: 35。在另一項實施例中，單專一性二價(全長)親本抗體之恆定重鏈區為具有突變S228P之SEQ ID NO: 36。在另一項實施例中，單專一性二價(全長)親本抗體之恆定輕鏈區為SEQ ID NO: 37的 κ 輕鏈區或SEQ ID NO: 34之 λ 輕鏈區。單專一性二價(全長)親本抗體之恆定重鏈區較佳為SEQ ID NO: 35或具有突變S228P之SEQ ID NO: 36。

抗體恆定區直接涉及於ADCC(抗體依賴性細胞介導之細胞毒性)及CDC(補體依賴性細胞毒性)中。藉由使補體因子C1q與多數IgG抗體子類之恆定區結合來起始補體活化(CDC)。藉由在所謂結合位點處之經界定蛋白質-蛋白質相互作用引起C1q與抗體的結合。該等恆定區結合位點為此項技術中已知且例如Lukas, T.J.等人, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560 ; Brunhouse, R. 及 Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917 ; Burton, D.R.等人, Nature 288 (1980) 338-344 ; Thommesen, J.E. 等人, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004 ; Idusogie, E.E. 等人, J.

Immunol. 164 (2000) 4178-4184 ; Hezareh, M. 等人 , J. Virol. 75 (2001) 12161-12168 ; Morgan, A. 等人 , Immunology 86 (1995) 319-324 ; 及 EP 0 307 434 所描述。該等恆定區結合位點特徵在於例如胺基酸 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331 及 P329 (根據 Kabat 之 EU 指數編號)。

術語「抗體依賴性細胞毒性 (ADCC)」係指在效應細胞存在下藉由本發明抗體溶解人類標靶細胞。較佳在效應細胞 (諸如自白血球層新鮮分離之 PBMC 或經純化效應細胞，如單核細胞或自然殺手 (NK) 細胞或永久生長 NK 細胞株) 存在下以本發明抗體處理表現 CCR5 之細胞製劑來量測 ADCC。

術語「補體依賴性細胞毒性 (CDC)」表示藉由使補體因子 C1q 與多數 IgG 抗體子類之 Fc 部分結合啟動之過程。藉由在所謂結合位點處之經界定蛋白質-蛋白質相互作用引起 C1q 與抗體的結合。此項技術中已知該等 Fc 部分結合位點 (參見上文)。該等 Fc 部分結合位點特徵在於例如胺基酸 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331 及 P329 (根據 Kabat 之 EU 指數編號)。子類 IgG1、IgG2 及 IgG3 之抗體一般顯示包括 C1q 及 C3 結合之補體活化，而 IgG4 不活化補體系統且不結合 C1q 及 / 或 C3。

藉由重組方式產生本發明抗體。因此，本發明之一態樣為編碼本發明抗體之核酸，且另一態樣為包含該編碼本發明抗體之核酸的細胞。重組製造法在此項技術中廣泛已知

且包含原核及真核細胞中之蛋白質表現，隨後分離抗體且一般純化至醫藥學上可接受之純度。為了在宿主細胞中表現上述抗體，藉由標準方法將編碼各別經修飾輕鏈及重鏈之核酸插入至表現載體中。在適當原核或真核宿主細胞(如 CHO細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、HEK293細胞、COS細胞、PER.C6細胞、酵母或大腸桿菌細胞)中進行表現且自細胞回收抗體(上清液或溶解後之細胞)。重組產生抗體之一般方法為此項技術中熟知且描述於例如 Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S.等人, Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880之評論文章。

雙重專一性抗體藉由習知免疫球蛋白純化程序(諸如蛋白質A瓊脂糖、氫氧磷灰石層析法、凝膠電泳法、透析或親和力層析法)合適地自培養基分離。編碼單株抗體之DNA及RNA使用習知程序容易地分離及定序。融合瘤細胞可用作該DNA及RNA之來源。分離後，DNA可插入至表現載體中，接著將其轉染至不另外產生免疫球蛋白之宿主細胞(諸如 HEK 293細胞、CHO細胞或骨髓瘤細胞)中以在宿主細胞中合成重組單株抗體。

藉由向抗體DNA中引入適當核苷酸變化或藉由核苷酸合成製備雙重專一性抗體之胺基酸序列變異體(或突變體)。然而，該等修飾僅可在例如上文所述之極有限範圍中進行。舉例而言，修飾不改變上述抗體特徵(諸如 IgG同型及

抗原結合)，但可改良重組製造之產量、蛋白質穩定性或促進純化。

本申請案中所用之術語「宿主細胞」表示可經工程改造而產生本發明抗體之任何種類之細胞株統。在一項實施例中，使用HEK293細胞及CHO細胞作為宿主細胞。本文所用之表述「細胞」、「細胞株」及「細胞培養物」可互換使用且所有該等名稱包括子代。因此，短語「轉型體」及「轉型細胞」包括初級個體細胞及自其產生之培養物，與轉移次數無關。亦應瞭解所有子代之DNA含量可能由於有意或無意突變而不能完全一致。針對原始轉型細胞篩選出的具有相同功能或生物活性之變異子代包括在內。

NS0細胞中之表現由例如Barnes, L.M.等人，Cytotechnology 32 (2000) 109-123；Barnes, L.M.等人，Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270描述。短暫表現由例如Durocher, Y.等人，Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9描述。可變域選殖由Orlandi, R.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837；Carter, P.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289；及Norderhaug, L.等人，J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87描述。較佳短暫表現系統(HEK 293)由Schlaeger, E.-J.及Christensen, K.在Cytotechnology 30 (1999) 71-83中及由Schlaeger, E.-J.在J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199中描述。

適於原核生物之控制序列例如包括啟動子、視情況選用之操縱序列及核糖體結合位點。已知真核細胞利用啟動

子、強化子及聚腺苷酸化信號。

當使某一核酸與另一核酸序列功能相關時，該核酸被「可操作地連接」。舉例而言，前序列(pre-sequence)或分泌性前導序列之DNA若其被表現為參與多肽之分泌的前體蛋白質則被可操作地連接於多肽之DNA；啟動子或強化子若其影響編碼序列之轉錄則被可操作地連接於該編碼序列；或核糖體結合位點若其經定位以有助於轉譯則被可操作地連接於編碼序列。一般而言，「可操作連接」意謂所連接之DNA序列為鄰接的，且在分泌性前導序列之狀況下為鄰接且處於閱讀框架中。然而，強化子不必為鄰接的。連接係藉由在適宜的限制性位點處接合來達成。若該等位點不存在，則根據習知作法使用合成性寡核苷酸接合體或連接子。

藉由標準技術(包括鹼性/SDS處理、CsCl分帶技術(CsCl banding)、管柱層析法、瓊脂糖凝膠電泳及此項技術中熟知之其他技術)進行抗體之純化以去除細胞組分或其他污染物(例如其他細胞核酸或蛋白質)。參見Ausubel, F.等人編，Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。不同方法已經充分確立且廣泛用於蛋白質純化，諸如使用微生物蛋白之親和力層析(例如蛋白質A或蛋白質G親和力層析)、離子交換層析(例如陽離子交換(羧甲基樹脂)、陰離子交換(胺基乙基樹脂)及混合模式交換)、嗜疏性吸附(例如用 β 巰基乙醇及其他SH配位體)、疏水性相互作用或芳族

吸附層析(例如用苯基-瓊脂糖、氮雜-arenophilic樹脂或間胺基苯基酮酸)、金屬螯合物親和力層析(例如用Ni(II)及Cu(II)親和力材料)、尺寸排阻層析及電泳法(諸如凝膠電泳、毛細管電泳)(Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102)。

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

本發明之一項實施例為一種用於治療癌症之本發明雙重專一性抗體。

本發明之另一態樣為用於治療癌症之該醫藥組合物。

本發明之另一態樣為本發明抗體用於製造用以治療癌症之藥物的用途。

本發明之另一態樣為藉由向需要治療之患者投與本發明抗體來治療罹患癌症之患者的方法。

本文所用之「醫藥載劑」包括生理學相容之任何及所有溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等張及吸收延遲劑及其類似物。載劑較佳適於靜脈內、肌肉內、皮下、非經腸、脊椎或表皮投與(例如藉由注射或輸注)。

本發明組合物可藉由此項技術中已知的各種方法投與。如熟習此項技術者所瞭解，投與途徑及/或模式將視所要

結果而變化。為了藉由特定投與途徑來投與本發明化合物，可能需要將化合物以防止其失活之材料塗覆或將化合物與防止其失活之材料共同投與。舉例而言，化合物可在適當載劑(例如脂質體或稀釋劑)中向個體投與。醫藥學上可接受之稀釋劑包括生理食鹽水及水性緩衝溶液。醫藥載劑包括無菌水溶液或分散液及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末。此項技術中已知用於醫藥活性物質之該等介質及藥劑的用途。

本文所用之短語「非經腸投與」意謂除經腸及局部投與之外的一般藉由注射投與之模式，且包括(但不限於)靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、角質層下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊柱內、硬膜外及胸骨內注射及輸注。

本文所用之術語癌症係指增殖性疾病，諸如淋巴瘤、淋巴球性白血病、肺癌、非小細胞肺(NSCL)癌、支氣管細胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭部或頸部癌、皮膚或眼內黑素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門區癌、胃癌、胃癌、結腸癌、乳癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、陰門癌、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、膀胱癌、腎癌或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、間皮瘤、肝細胞癌、膽癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、脊柱軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、多形性膠質母細胞

瘤、星形細胞瘤、神經鞘瘤、室管膜瘤、成神經管細胞瘤、腦膜瘤、鱗狀細胞癌、垂體腺瘤及尤文氏肉瘤(Ewings sarcoma)，包括上述任何癌症之難治癒形式或上述一或多種癌症的組合。

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

本發明之一項實施例為用於治療血管疾病之本發明雙重專一性抗體。

本發明之另一態樣為用於治療血管疾病之該醫藥組合物。

本發明之另一態樣為本發明抗體用於製造用以治療血管疾病之藥物的用途。

本發明之另一態樣為藉由向需要治療之患者投與本發明抗體來治療罹患血管疾病之患者的方法。

術語「血管疾病」包括癌症、發炎疾病、動脈粥樣硬化、局部缺血、外傷、敗血症、COPD、哮喘、糖尿病、AMD、視網膜病變、中風、肥胖症、急性肺損傷、出血、血管滲漏(例如由細胞因子誘發)、過敏症、葛瑞夫茲氏病(Graves' Disease)、橋本氏自體免疫甲狀腺炎(Hashimoto's Autoimmune Thyroiditis)、特發性血小板減少性紫癜、巨細胞動脈炎、類風濕性關節炎、全身性紅斑性狼瘡症(SLE)、狼瘡腎炎、克羅恩氏病(Crohn's Disease)、多發性硬化症、潰瘍性結腸炎(尤其實體腫瘤)、眼內新生血管症

候群(諸如增殖性視網膜病變或年齡相關之黃斑部變性(AMD))、類風濕性關節炎及牛皮癬(Folkman, J.等人, J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M.等人, Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; 及 Garner, A., Vascular diseases, Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A.及 Klintworth, G.K., (編), 第2版, Marcel Dekker, New York (1994), 第1625-1710頁)。

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

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

可改變本發明醫藥組合物中之活性成份的實際劑量程度以便獲得在對患者無毒性之狀況下有效實現針對特定患者、組合物及投藥模式的所要治療反應的活性成份之量。所選劑量程度將視多種藥物動力學因素而定, 包括本發明所採用特定組合物之活性、投與途徑、投與時間、所採用之特定化合物的排出速率、治療持續時間、與所採用特定組合物組合使用之其他藥物、化合物及/或材料、待治療

患者之年齡、性別、體重、病況、一般健康狀況及先前病史及醫藥技術中熟知的類似因素。

組合物必須為無菌的且在一定程度上為流體以便可藉由注射器傳遞組合物。除水以外，載劑較佳為等張緩衝生理食鹽水溶液。

可(例如)藉由使用諸如卵磷脂之衣料，藉由在分散液狀況下維持所要粒徑且藉由使用界面活性劑來保持適當流動性。在許多情況下，較佳在組合物中包括等滲劑，例如糖、諸如甘露糖醇或山梨糖醇之多元醇及氯化鈉。

如本文所用，表述「細胞」、「細胞株」及「細胞培養物」可互換使用且所有該等名稱包括子代。因此，短語「轉型體」及「轉型細胞」包括初級個體細胞及自其產生之培養物，與轉移次數無關。亦應瞭解所有子代之DNA含量可能由於有意或無意突變而不能完全一致。針對原始轉型細胞篩選出的具有相同功能或生物活性之變異子代包括在內。當意欲使用不同名稱時，根據上下文此應為顯而易見的。

本文所用之術語「轉型」係指將載體/核酸轉移至宿主細胞中之過程。若使用不具有難以對付之細胞壁障壁之細胞作為宿主細胞，則例如藉由如Graham, F.L., van der Eb, A.J., Virology 52 (1978) 546及以下所述之磷酸鈣沈澱法進行轉染。然而，亦可使用諸如藉由細胞核注射或藉由原生質體融合將DNA引入至細胞中之其他方法。若使用原核細胞或含有實質細胞壁構造之細胞，則一種轉染方法例如為

如Cohen, S.N.等人，PNAS. 69 (1972) 2110-2114所述之使用氯化鈣的鈣處理。

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

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

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

胺基酸序列之說明

SEQ ID NO:	1	重鏈CDR3, <VEGF>貝伐單抗
SEQ ID NO:	2	重鏈CDR2, <VEGF>貝伐單抗
SEQ ID NO:	3	重鏈CDR1, <VEGF>貝伐單抗
SEQ ID NO:	4	輕鏈CDR3, <VEGF>貝伐單抗
SEQ ID NO:	5	輕鏈CDR2, <VEGF>貝伐單抗
SEQ ID NO:	6	輕鏈CDR1, <VEGF>貝伐單抗

SEQ ID NO:	7	重鏈可變域, <VEGF> 貝伐單抗
SEQ ID NO:	8	輕鏈可變域, <VEGF> 貝伐單抗
SEQ ID NO:	9	重鏈CDR3, <VEGF> 蘭尼單抗
SEQ ID NO:	10	重鏈CDR2, <VEGF> 蘭尼單抗
SEQ ID NO:	11	重鏈CDR1, <VEGF> 蘭尼單抗
SEQ ID NO:	12	輕鏈CDR3, <VEGF> 蘭尼單抗
SEQ ID NO:	13	輕鏈CDR2, <VEGF> 蘭尼單抗
SEQ ID NO:	14	輕鏈CDR1, <VEGF> 蘭尼單抗
SEQ ID NO:	15	重鏈可變域, <VEGF> 蘭尼單抗
SEQ ID NO:	16	輕鏈可變域, <VEGF> 蘭尼單抗
SEQ ID NO:	17	重鏈CDR3, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	18	重鏈CDR2, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	19	重鏈CDR1, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	20	輕鏈CDR3, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	21	輕鏈CDR2, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	22	輕鏈CDR1, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	23	重鏈可變域, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	24	輕鏈可變域, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	25	重鏈CDR3, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	26	重鏈CDR2, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	27	重鏈CDR1, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	28	輕鏈CDR3, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	29	輕鏈CDR2, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	30	輕鏈CDR1, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	31	重鏈可變域, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	32	輕鏈可變域, <ANG-2> Mab 536

SEQ ID NO:	33	(G4S)4連接子
SEQ ID NO:	34	λ輕鏈恆定區
SEQ ID NO:	35	自IgG1產生之人類重鏈恆定區
SEQ ID NO:	36	自IgG4產生之人類重鏈恆定區
SEQ ID NO:	37	κ輕鏈恆定區
SEQ ID NO:	38	重鏈CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	39	重鏈CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	40	重鏈CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	41	輕鏈CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	42	輕鏈CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	43	輕鏈CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	44	重鏈可變域, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	45	輕鏈可變域, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	46	重鏈CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	47	重鏈CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	48	重鏈CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	49	輕鏈CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	50	輕鏈CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	51	輕鏈CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	52	重鏈可變域, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	53	輕鏈可變域, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	54	重鏈CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	55	重鏈CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	56	重鏈CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	57	輕鏈CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	58	輕鏈CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC07

SEQ ID NO:	59	輕鏈CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	60	重鏈可變域, <ANG-2> Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	61	輕鏈可變域, <ANG-2> Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	62	重鏈CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	63	重鏈CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	64	重鏈CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	65	輕鏈CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	66	輕鏈CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	67	輕鏈CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	68	重鏈可變域, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	69	輕鏈可變域, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	70	重鏈CDR3, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	71	重鏈CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	72	重鏈CDR1, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	73	輕鏈CDR3, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	74	輕鏈CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	75	輕鏈CDR1, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	76	重鏈可變域, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	77	輕鏈可變域, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	78	重鏈CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	79	重鏈CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	80	重鏈CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	81	輕鏈CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	82	輕鏈CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	83	輕鏈CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	84	重鏈可變域, <ANG-2> Ang2i_LC10

SEQ ID NO:	85	輕鏈可變域, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	86	重鏈CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	87	重鏈CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	88	重鏈CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	89	輕鏈CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	90	輕鏈CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	91	輕鏈CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	92	重鏈可變域, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	93	輕鏈可變域, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	94	重鏈CDR3, <VEGF> B20-4.1
SEQ ID NO:	95	重鏈CDR2, <VEGF> B20-4.1
SEQ ID NO:	96	重鏈CDR1, <VEGF> B20-4.1
SEQ ID NO:	97	輕鏈CDR3, <VEGF> B20-4.1
SEQ ID NO:	98	輕鏈CDR2, <VEGF> B20-4.1
SEQ ID NO:	99	輕鏈CDR1, <VEGF> B20-4.1
SEQ ID NO:	100	重鏈可變域, <VEGF> B20-4.1
SEQ ID NO:	101	輕鏈可變域, <VEGF> B20-4.1
SEQ ID NO:	102	<VEGF-ANG-2> TvAb-2441-貝伐單抗-LC06之貝伐單抗重鏈Ang2i_LC06 scFv融合肽
SEQ ID NO:	103	<VEGF-ANG-2> TvAb-2441-貝伐單抗-LC08之貝伐單抗重鏈Ang2i_LC08 scFv融合肽
SEQ ID NO:	104	貝伐單抗之輕鏈
SEQ ID NO:	105	人類血管內皮生長因子(VEGF)
SEQ ID NO:	106	人類血管生成素-2(ANG-2)
SEQ ID NO:	107	人類血管生成素-1(ANG-1)
SEQ ID NO:	108	人類Tie-2受體
SEQ ID NO:	109	雙重專一性四價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分

		子scFab-Avastin-LC06-2620之重鏈1
SEQ ID NO:	110	雙重專一性四價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子scFab-Avastin-LC06-2620之輕鏈
SEQ ID NO:	111	雙重專一性四價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640之重鏈1
SEQ ID NO:	112	雙重專一性四價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640之輕鏈
SEQ ID NO:	113	雙重專一性四價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641之重鏈1
SEQ ID NO:	114	雙重專一性四價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641之輕鏈
SEQ ID NO:	115	雙重專一性三價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-KiH-C-scFab之重鏈1
SEQ ID NO:	116	雙重專一性三價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-KiH-C-scFab之重鏈2
SEQ ID NO:	117	雙重專一性三價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-KiH-C-scFab之輕鏈
SEQ ID NO:	118	雙重專一性三價<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-C-Fab-6CSS之重鏈1
SEQ ID NO:	119	雙重專一性三價<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-C-Fab-6CSS之重鏈2
SEQ ID NO:	120	雙重專一性三價<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-C-Fab-6CSS之輕鏈
SEQ ID NO:	121	雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-CH1-CL之重鏈1
SEQ ID NO:	122	雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-CH1-CL之重鏈2
SEQ ID NO:	123	雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-CH1-CL之輕鏈1
SEQ ID NO:	124	雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-CH1-CL之輕鏈2

SEQ ID NO:	125	雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-VH-VL之重鏈1
SEQ ID NO:	126	雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-VH-VL之重鏈2
SEQ ID NO:	127	雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-VH-VL之輕鏈1
SEQ ID NO:	128	雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-VH-VL之輕鏈2
SEQ ID NO:	129	雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-VH-VL-SS之重鏈1
SEQ ID NO:	130	雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-VH-VL-SS之重鏈2
SEQ ID NO:	131	雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-VH-VL-SS之輕鏈1
SEQ ID NO:	132	雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-VH-VL-SS之輕鏈2
SEQ ID NO:	133	雙重專一性二價ScFab-Fc融合<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-N-scFab之重鏈1
SEQ ID NO:	134	雙重專一性二價ScFab-Fc融合<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-N-scFab之重鏈2
SEQ ID NO:	135	雙重專一性二價ScFab-Fc融合<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-N-scFabSS之重鏈1
SEQ ID NO:	136	雙重專一性二價ScFab-Fc融合<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-N-scFabSS之重鏈2

為幫助瞭解本發明，提供以下實例、序列表及圖式，本發明之真實範疇闡明於隨附申請專利範圍中。應瞭解，可在不悖離本發明精神之情況下對所闡述之程序進行修改。

實驗程序

實例

材料及一般方法

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

重組DNA技術

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

基因合成

自由化學合成製成之寡核苷酸製備所要基因區段。藉由黏接及接合寡核苷酸(包括PCR擴增)來組裝側接有單限制性核酸內切酶裂解位點之基因區段，且隨後經由指定限制性位點(例如 KpnI/SacI 或 AscI/PacI)選殖至基於pPCRScripT (Stratagene)之pGA4選殖載體中。藉由DNA定序來確定次選殖基因片段之DNA序列。根據Geneart(Regensburg, Germany)之既定說明來對基因合成片段排序。合成編碼Ang-2/VEGF雙重專一性抗體之輕鏈及重鏈的所有基因區

段，其具有以蛋白質分泌於真核細胞中為目標的編碼前導肽之5'-端DNA序列(MGWSCIILFLVATATGVHS)及5'-BamHI與3'-XbaI限制性位點。設計具有雙硫鍵穩定之「杵白結構」修飾之重鏈的DNA序列，其在「杵狀結構」重鏈中具有S354C及T366W突變且在「白狀結構」重鏈中具有Y349C、T366S、L368A及Y407V突變。

DNA序列確定

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

DNA及蛋白質序列分析與序列資料管理

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

表現載體(實例1)

為了表現所述抗體，應用適於基於使用CMV-內含子A啟動子之cDNA組織化抑或使用CMV啟動子之基因組組織化之短暫表現(例如在HEK293 EBNA或HEK293-F細胞中)或穩定表現(例如在CHO細胞中)的表現質體變異體(例如圖2B)。

除了抗體表現卡匣之外，載體亦含有：

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

抗體基因之轉錄單元係由以下要素構成：

- 5'端之獨特限制性位點；
- 來自人類細胞巨大病毒之極早期強化子及啟動子；
- 繼之以在cDNA組織化狀況下之內含子A序列；
- 人類抗體基因之5'-未轉譯區；
- 免疫球蛋白重鏈信號序列；
- 在以免疫球蛋白外顯子-內含子組織化cDNA或基因組組織化時的人類抗體鏈(重鏈、經修飾重鏈或輕鏈)；
- 具有聚腺苷酸化信號序列之3'未轉譯區；及
- 3'端之獨特限制性位點。

藉由PCR及/或基因合成產生如下文所述之包含所選抗體之重鏈序列及C端scFv融合的融合基因，且以已知重組方法及技術藉由在基因組重鏈載體中例如使用獨特NsiI及EcoRI位點連接相符核酸序列來組裝。藉由DNA定序驗證次選殖核酸序列。為了短暫及穩定轉染，藉由質體製備法自經轉型大腸桿菌培養物(Nucleobond AX, Macherey-Nagel)製備大量質體。

表現載體(實例10-14)

使用由以下要素構成之表現載體：

- 作為選擇標記之潮黴素(hygromycin)抗性基因；
- 埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus, EBV)之複製起點oriP；
- 允許在大腸桿菌中複製此質體的來自載體pUC18之複製起點；

- 賦予大腸桿菌安比西林(ampicillin)抗性之 β -內醯胺酶基因；
- 來自人類細胞巨大病毒(HCMV)之極早期強化子及啟動子；
- 人類1-免疫球蛋白聚腺苷酸(「聚A」)信號序列；及
- 獨特BamHI及XbaI限制性位點。

藉由基因合成來製備包含重鏈或輕鏈構築體以及具有C端VH及VL結構域之「杵臼結構」構築體的免疫球蛋白融合基因，且如所述選殖至pGA18(ampR)質體中。以BamHI及XbaI限制酶(Roche Molecular Biochemicals)消化具有合成DNA區段及Roche表現載體之pG18(ampR)質體且經受瓊脂糖凝膠電泳。接著將經純化重鏈及輕鏈編碼DNA區段接合至經分離Roche表現載體BamHI/XbaI片段，從而產生最終表現載體。將最終表現載體轉型至大腸桿菌細胞中，分離出表現質體DNA(Miniprep)且進行限制酶分析及DNA定序。使正確純系生長於150 ml LB-Amp培養基中，再次分離出質體DNA(Maxiprep)，且藉由DNA定序確認序列完整性。

細胞培養技術

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

在HEK293-F系統中短暫轉染(實例1)

根據製造商說明書，使用 HEK293-F 系統 (Invitrogen)，藉由短暫轉染分別編碼重鏈或經修飾重鏈與相應輕鏈的兩種質體來產生抗體。簡言之，在振盪燒瓶或攪拌發酵器中在無血清 FreeStyle 293 表現培養基 (Invitrogen) 中以兩種各別表現質體及 293fectin 或 fectin (Invitrogen) 之混合物轉染生長於懸浮液中之 HEK293-F 細胞 (Invitrogen)。對例如 2 L 振盪燒瓶 (Corning) 而言，HEK293-F 細胞係以每毫升 1.0×10^6 個細胞之密度接種於 600 mL 中且在 120 rpm、8% CO₂ 下培育。第二天，用 A) 具有 600 µg 分別編碼等莫耳比之重鏈或經修飾重鏈與相應輕鏈之總質體 DNA (1 µg/mL) 的 20 mL Opti-MEM (Invitrogen) 與 B) 20 ml Opti-MEM + 1.2 mL 293 fectin 或 fectin (2 µl/mL) 之約 42 mL 混合物以每毫升約 1.5×10^6 個細胞之細胞密度轉染細胞。在發酵過程中根據葡萄糖消耗添加葡萄糖溶液。在 5-10 天之後收集含有所分泌之抗體之上清液，且直接自該上清液中純化分離出抗體或將該上清液冷凍及儲存。

在 HEK293-F 系統中短暫轉染 (實例 10-14)

根據製造商說明書 (Invitrogen, USA)，使用 FreeStyle™ 293 表現系統，藉由短暫轉染人類胚胎腎臟 293-F 細胞來表現重組免疫球蛋白變異體。簡言之，在 37°C / 8% CO₂ 下在 FreeStyle™ 293 表現培養基中培養懸浮 FreeStyle™ 293-F 細胞，且在轉染當天，將細胞以每毫升 $1-2 \times 10^6$ 個活細胞之密度接種於新鮮培養基中。在 Opti-MEM® I 培養基 (Invitrogen, USA) 中使用 325 µl 293fectin™ (Invitrogen,

Germany)及250 µg重鏈及輕鏈質體DNA(1:1莫耳比)製備DNA-293fectin™複合物，最終轉染體積達250 ml。在Opti-MEM® I培養基(Invitrogen, USA)中使用325 µl 293fectin™(Invitrogen, Germany)及250 µg「杵臼結構」重鏈1與2及輕鏈質體DNA(1:1:2莫耳比)製備具有兩條重鏈及一條輕鏈之「杵臼結構」DNA-293fectin複合物，最終轉染體積達250 ml。在Opti-MEM® I培養基(Invitrogen, USA)中使用325 µl 293fectin™(Invitrogen, Germany)及250 µg「杵臼結構」重鏈1及2 DNA(1:1莫耳比)製備具有兩條重鏈之「杵臼結構」DNA-293fectin複合物，最終轉染體積達250 ml。在Opti-MEM® I培養基(Invitrogen, USA)中使用325 µl 293fectin™(Invitrogen, Germany)及250 µg「杵臼結構」重鏈1與2及輕鏈質體DNA(1:1:1:1莫耳比)製備CrossMab DNA-293fectin複合物，最終轉染體積達250 ml。最終轉染體積。在轉染後7天，藉由在14000 g下離心30分鐘來收集含有抗體之細胞培養物上清液，且經由無菌過濾器(0.22 µm)過濾。將上清液儲存於-20°C下直至純化。

蛋白質測定

根據Pace等人，Protein Science, 1995, 4, 2411-1423，藉由使用基於胺基酸序列計算之莫耳消光係數測定280 nm下的光密度(OD)來測定經純化抗體及衍生物之蛋白質濃度。

上清液中之抗體濃度測定

藉由免疫沈澱法使用蛋白質A瓊脂糖-珠粒(Roche)來估算細胞培養物上清液中之抗體及衍生物濃度。將60 µL蛋

白質A瓊脂糖珠粒在TBS-NP40(50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40)中洗滌3次。隨後，向在TBS-NP40中預平衡之蛋白質A瓊脂糖珠粒上施加1-15 mL細胞培養物上清液。在室溫下培育1小時後，將珠粒在Ultrafree-MC-過濾器管柱[Amicon]上以0.5 mL TBS-NP40洗滌1次，以0.5 mL 2×磷酸鹽緩衝生理食鹽水(2×PBS, Roche)洗滌2次，且以0.5 mL 100 mM檸檬酸鈉(pH 5.0)簡單洗滌4次。藉由添加35 μ l NuPAGE® LDS樣本緩衝液(Invitrogen)溶離所結合之抗體。分別將樣本的一半與NuPAGE®樣本還原劑組合或保持未還原，且在70°C下加熱10分鐘。因此，向4-12% NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE(Invitrogen)施加20 μ l(對於非還原性SDS-PAGE使用MOPS緩衝液且對於還原性SDS-PAGE使用具有NuPAGE®抗氧化運行緩衝液添加劑(Invitrogen)之MES緩衝液)且以庫馬斯藍(Coomassie Blue)染色。

藉由蛋白質A-HPLC層析法量測細胞培養物上清液中之抗體及衍生物濃度。簡言之，向在50 mM K_2HPO_4 、300 mM NaCl(pH 7.3)中之HiTrap蛋白質A管柱(GE Healthcare)施加含有結合蛋白質A之抗體及衍生物的細胞培養物上清液且在Dionex HPLC系統上以550 mM乙酸(pH 2.5)自基質溶離。利用UV吸光度及峰面積積分值來定量所溶離之蛋白質。經純化標準IgG1抗體用作標準物。

或者，藉由夾心IgG-ELISA來量測細胞培養物上清液中之抗體及衍生物濃度。簡言之，將StreptaWell高結合鏈黴

親和素(Streptavidin)A-96孔微量滴定板(Roche)用每孔100 μ L生物素標記抗人類IgG捕捉分子F(ab')₂<h-Fc γ >BI(Dianova)以0.1 μ g/mL在室溫下塗覆1小時或在4°C下塗覆隔夜，且隨後以每孔200 μ L PBS、0.05% Tween(PBST, Sigma)洗滌3次。向各孔中添加每孔100 μ L各別含抗體細胞培養物上清液於PBS(Sigma)中之連續稀釋液，且在室溫下在微量滴定板振盪器上培育1-2小時。以每孔200 μ L PBST洗滌各孔3次，且在室溫下在微量滴定板上以100 μ L 0.1 μ g/mL之F(ab')₂<hFc γ >POD(Dianova)作為偵測抗體偵測所結合之抗體歷時1-2小時。以每孔200 μ L PBST洗滌3次洗去未經結合之偵測抗體，且藉由每孔添加100 μ L ABTS來偵測所結合之偵測抗體。在Tecan Fluor光譜儀上在405 nm量測波長下(參考波長492 nm)進行吸光度測定。

蛋白質純化

參考標準方案，自經過濾細胞培養物上清液中純化分離出蛋白質。簡言之，將抗體施加至蛋白質A瓊脂糖管柱(GE Healthcare)上且以PBS洗滌。在酸性pH值下實現抗體之溶離，隨後立即中和樣本。藉由尺寸排阻層析法(Superdex 200, GE Healthcare)在20 mM組胺酸、140 mM NaCl pH 6.0中使聚集蛋白質與單體抗體分離。合併單體抗體溶離份，若需要時使用例如MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO)離心濃縮器濃縮且儲存於-80°C下。提供部分樣本以供隨後之蛋白質分析及分析表徵，例如藉由SDS-PAGE、尺寸排阻層析法、質譜法及內毒素測定(參見圖3

及 4)。

SDS-PAGE

根據製造商說明書使用 NuPAGE® Pre-Cast凝膠系統 (Invitrogen)。詳言之，使用 4-20% NuPAGE® Novex® TRIS-甘胺酸Pre-Cast凝膠及Novex® TRIS-甘胺酸SDS運行緩衝液。(例如參見圖3)。藉由在跑膠之前添加NuPAGE® 樣本還原劑來實現樣本之還原。

分析型尺寸排阻層析法

藉由HPLC層析法進行用於測定抗體之聚集及寡聚狀態的尺寸排阻層析。簡言之，將蛋白質A純化抗體施加至在 300 mM NaCl、50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.5) 中在 Agilent HPLC 1100系統上之Tosoh TSKgel G3000SW管柱上或在2×PBS中在Dionex HPLC系統上之Superdex 200管柱 (GE Healthcare)上。利用UV吸光度及峰面積積分值來定量所溶離之蛋白質。BioRad凝膠過濾標準151-1901用作標準物。(例如參見圖4)。

質譜法

經由電噴霧電離質譜法(ESI-MS)測定及確認交叉抗體之總去糖基化質量。簡言之，在37°C下在100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7)中在達2 mg/ml之蛋白質濃度下用50 mU N-糖苷酶F(PNGaseF, ProZyme)將100 µg經純化抗體去糖基化歷時12-24小時，且隨後經由Sephadex G25管柱 (GE Healthcare)上之HPLC脫鹽。在去糖基化及還原之後藉由ESI-MS測定各別重鏈及輕鏈之質量。簡言之，將115 µl中

之 50 μg 抗體與 60 μl 1M TCEP 及 50 μl 8 M 胍鹽酸鹽一起培育，且隨後脫鹽。經由裝備有 NanoMate 源之 Q-Star Elite MS 系統上的 ESI-MS 測定總質量及經還原重鏈及輕鏈之質量。

VEGF 結合 ELISA

在 ELISA 檢定中以全長 VEGF165-His 蛋白 (R&D Systems) 評估四價抗體 (TvAb) 之結合特性 (圖 5)。為此，以 100 μl 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 於 PBS 中之重組人類 VEGF165 (R&D Systems) 在室溫下塗覆 Falcon 聚苯乙烯透明強化微量滴定板歷時 2 小時或在 4°C 下塗覆隔夜。以 300 μl PBST (0.2% Tween 20) 洗滌各孔 3 次，且在室溫下以 200 μl 2% BSA 0.1% Tween 20 阻斷 30 分鐘，且隨後以 300 μl PBST 洗滌 3 次。向各孔中以每孔 100 μL 添加經純化 <VEGF-ANG-2> TvAb 及作為參照之人類抗-ANG-2 抗體 <ANG-2> 抗體 Mab536 (Oliner 等人，Cancer Cell. 2004 年 11 月；6(5):507-16、US 2006/0122370) 及抗 VEGF 抗體 <VEGF> 抗體 G6-31 (Liang 等人，J Biol Chem. 2006 年 1 月 13 日；281(2):951-61；US 2007/0141065) 於 PBS (Sigma) 的連續稀釋液 (40 pM-0.01 pM)，且在室溫下在微量滴定板振盪器上培育 1 小時。以 300 μl PBST (0.2% Tween 20) 洗滌各孔 3 次，且在室溫下在微量滴定板振盪器上以每孔 100 μL 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 於 2% BSA 0.1% Tween 20 中之 F(ab')<hFcγ>POD (Immuno research) 作為偵測抗體偵測所結合之抗體歷時 1 小時。以每孔 300 μL PBST 洗滌 3 次洗去未經結合之偵測抗體，且藉由每孔添加 100 μL ABTS 來偵測

所結合之偵測抗體。在Tecan Fluor光譜儀上在405 nm量測波長下(參考波長492 nm)進行吸光度測定。

VEGF結合：在37°C下藉由表面電漿共振(Biacore)表徵VEGF結合之動力學特徵

為了進一步證實ELISA發現結果，根據以下方案使用表面電漿共振技術在Biacore T100儀器上定量分析<VEGF>抗體G6-31或Avastin及<VEGF-Ang-2> vAb6或TvAb-2441-貝伐單抗-LC06或TvAb-2441-貝伐單抗-LC08與VEGF之結合且使用T100套裝軟體分析。簡言之，經由與山羊抗人類IgG(JIR 109-005-098)結合將<VEGF>抗體捕捉於CM5晶片上。使用如下標準胺基偶合法藉由胺基偶合固定捕捉抗體：HBS-N緩衝液用作運行緩衝液，針對700 RU配位體密度之目標，以EDC/NHS混合物進行活化。將捕捉抗體稀釋於偶合緩衝液NaAc(pH 5.0，c=2 µg/mL)中，藉由注射1 M乙醇胺來阻斷最終仍活化之羧基。在5 µL/min流速及c(Mab <VEGF>)=10 nM下進行Mab <VEGF>抗體捕捉，以運行緩衝液+1 mg/mL BSA稀釋；應達到約30 RU之捕捉程度。rhVEGF(rhVEGF, R&D-Systems目錄號293-VE)用作分析物。在37°C下在作為運行緩衝液之PBS+0.005% (v/v)Tween20中進行VEGF結合<VEGF>抗體之動力學表徵。以50 µL/min之流速及80秒締合時間及1200秒解離時間，以300-0.29 nM rhVEGF連續濃度注射樣本。在各分析物循環之後，以10 mM甘胺酸(Glycin)pH 1.5及60秒接觸時間進行游離捕捉抗體表面之再生。藉由使用常用雙重參照

法(對照參照：rhVEGF與捕捉分子山羊抗人類IgG之結合，在量測流槽上之空白樣，rhVEGF濃度「0」，模型：朗繆耳(Langmuir)結合1:1，(因為捕捉分子結合，所以Rmax設定為局部))計算動力學常數。圖11顯示Biacore檢定之示意圖。

ANG-2結合ELISA

在ELISA檢定中以全長血管生成素-2-His蛋白(R&D Systems)評估四價抗體(TvAb)之結合特性(圖6a)。為此，以100 μ l 1 μ g/mL於PBS中之重組人類血管生成素(R&D Systems，無載劑)在室溫下塗覆Falcon聚苯乙烯透明強化微量滴定板歷時2小時或在4°C下塗覆隔夜。以300 μ l PBST(0.2% Tween 20)洗滌各孔3次，且在室溫下以200 μ l 2% BSA 0.1% Tween 20阻斷30分鐘，且隨後以300 μ l PBST洗滌3次。向各孔中以每孔100 μ L添加經純化<VEGF-ANG-2> TvAb及作為參照之<ANG-2> 抗體 Mab536及VEGF> 抗體 G6-31於PBS(Sigma)中的連續稀釋液(40 pM-0.01 pM)，且在室溫下在微量滴定板振盪器上培育1小時。以300 μ l PBST(0.2% Tween 20)洗滌各孔3次，且在室溫下在微量滴定板振盪器上以每孔100 μ L 0.1 μ g/ml於2% BSA 0.1% Tween 20中之F(ab')₂-HRP(Biozol目錄號206005)作為偵測抗體偵測所結合之抗體歷時1小時。以每孔300 μ L PBST洗滌3次洗去未經結合之偵測抗體，且藉由每孔添加100 μ L ABTS來偵測所結合之偵測抗體。在Tecan Fluor光譜儀上在405 nm量測波長下(參考波長492 nm)進行

吸光度測定。

與 ANG-1 及 ANG-2 之比較性結合 (ANG-1 及 ANG-2 結合 ELISA)

在 ELISA 檢定中以全長血管生成素-2-His 蛋白 (R&D Systems #623-AN/CF 或內部製得之材料) 或血管生成素-1-His (R&D systems #923-AN) 評估抗體之結合特性。因此，以 100 μ l 1 μ g/mL 於 PBS (Sigma) 中之重組人類血管生成素-1 或血管生成素-2 (無載劑) 在室溫下塗覆 96 孔培養板 (Falcon 聚苯乙烯透明強化微量滴定板或 Nunc Maxisorb) 歷時 2 小時，或在 4°C 下塗覆隔夜。以 300 μ l PBST (0.2% Tween 20) 洗滌各孔 3 次，且在室溫下以 200 μ l 2% BSA 0.1% Tween 20 阻斷 30 分鐘，且隨後以 300 μ l PBST 洗滌 3 次。向各孔中以每孔 100 μ L 添加經純化測試抗體於 PBS 中之連續稀釋液 (40 pM-0.01 pM)，且在室溫下在微量滴定板振盪器上培育 1 小時。以 300 μ l PBST (0.2% Tween 20) 洗滌各孔 3 次，且在室溫下在微量滴定板振盪器上以每孔 100 μ L 0.1 μ g/ml 於 2% BSA 0.1% Tween 20 中之 F(ab')₂ <hk> POD (Biozol 目錄號 206005) 作為偵測抗體偵測所結合之抗體歷時 1 小時。以每孔 300 μ L PBST 洗滌 3 次洗去未經結合之偵測抗體，且藉由每孔添加 100 μ L ABTS 來偵測所結合之偵測抗體。在 Tecan Fluor 光譜儀上在 405 nm 量測波長下 (參考波長 492 nm) 進行吸光度測定。

ANG-2 結合 BIACORE

藉由表面電漿共振使用 BIACORE T100 儀器 (GE

Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden)研究抗體與例如人類ANG-2之抗原的結合。簡言之，為了進行親和力量測，經由胺偶合將山羊<hIgG-Fcγ>多株抗體固定於CM5晶片上，以便呈現針對人類ANG-2之抗體(圖6B)。在25°C下在HBS緩衝液(HBS-P(10 mM HEPES、150 mM NaCl、0.005% Tween 20, ph 7.4))中量測結合。以在溶液中介於6.25 nM與200 nM之間的各種濃度添加經純化ANG-2-His(R&D systems或經內部純化)。藉由ANG-2注射3分鐘來量測締合；藉由以HBS緩衝液洗滌晶片表面3分鐘來量測解離，且使用1:1朗繆耳結合模型(Langmuir binding model)估算KD值。由於ANG-2製劑之不均勻性，因此不能觀測到1:1結合；因此KD值僅為相對估算值。自樣本曲線減去陰性對照資料(例如緩衝液曲線)，以便校正系統固有的基線漂移且減少雜訊。使用Biacore T100評估軟體第1.1.1版分析感測器圖譜及計算親和力資料。或者，可經由PentaHis抗體(PentaHis-Ab，無BSA, Qiagen第34660號)以2000-1700 RU之捕捉程度捕捉Ang-2，該抗體已經由胺偶合固定於CM5晶片上(無BSA)(參見下文)。

對huANG-2與Tie-2之結合的抑制(ELISA)

在室溫下在384孔微量滴定板(MicroCoat, DE，目錄號464718)上進行相互作用ELISA。在各培育步驟之後，以PBST洗滌培養板3次。以0.5 µg/ml Tie-2蛋白(R&D Systems, UK，目錄號313-TI)塗覆ELISA培養板至少2小時。此後，以補充有0.2% Tween-20及2% BSA之PBS

(Roche Diagnostics GmbH, DE)阻斷各孔1小時。將經純化抗體於PBS中之稀釋液與0.2 µg/ml hu血管生成素-2(R&D Systems, UK, 目錄號623-AN)一起在室溫下培育1小時。洗滌後, 添加0.5 µg/ml生物素標記抗血管生成素-2純系BAM0981(R&D Systems, UK)與1:3000稀釋之抗生蛋白鏈菌素HRP(Roche Diagnostics GmbH, DE, 目錄號11089153001)之混合物歷時1小時。此後, 以PBST洗滌培養板6次。在室溫下, 以新鮮製備之ABTS試劑(Roche Diagnostics GmbH, DE, 緩衝液#204 530 001, 片劑#11 112 422 001)使培養板顯色30分鐘。在405 nm下量測吸光度。

ANG-2-VEGF橋接ELISA

在ELISA檢定中用經固定全長VEGF165-His蛋白(R&D Systems)及人類ANG-2-His蛋白(R&D Systems)偵測所結合之雙重專一性抗體來評估四價抗體(TvAb)之結合特性(圖7)。僅雙重專一性<VEGF-ANG-2> TvAb能夠同時結合VEGF及ANG-2, 且因此橋接兩個抗原, 而單專一性「標準」IgG1抗體應不能夠同時結合VEGF及ANG-2(圖7)。

為此, 以100 µl 2 µg/mL於PBS中之重組人類VEGF165(R&D Systems)在室溫下塗覆Falcon聚苯乙烯透明強化微量滴定板歷時2小時或在4°C下塗覆隔夜。以300 µl PBST(0.2% Tween 20)洗滌各孔3次, 且在室溫下以200 µl 2% BSA 0.1% Tween 20阻斷30分鐘, 且隨後以300 µl PBST洗滌3次。向各孔中以每孔100 µL添加經純化<VEGF-ANG-2> TvAb及作為參照之<ANG-2> 抗體Mab536及

<VEGF>抗體 G6-31於PBS(Sigma)中的連續稀釋液(40 pM-0.01 pM)，且在室溫下在微量滴定板振盪器上培育1小時。以300 µl PBST(0.2% Tween 20)洗滌各孔3次，且藉由添加100 µl 0.5 µg/ml於PBS中之人類ANG-2-His(R&D Systems)偵測所結合之抗體。以300 µl PBST(0.2% Tween 20)洗滌各孔3次，且在室溫下以100 µl 0.5 µg/mL <ANG-2>mIgG1-生物素抗體(BAM0981, R&D Systems)偵測所結合之ANG-2歷時1小時。以300 µl PBST(0.2% Tween 20)洗滌3次洗去未經結合之偵測抗體，且在室溫下藉由添加100 µl按1:4稀釋於阻斷緩衝液中之1:2000抗生蛋白鏈菌素-POD結合物(Roche Diagnostics GmbH，目錄號11089153)偵測所結合之抗體歷時1小時。以300 µl PBST(0.2% Tween 20)洗滌3-6次洗去未經結合之抗生蛋白鏈菌素-POD結合物，且藉由每孔添加100 µL ABTS來偵測所結合之抗生蛋白鏈菌素-POD結合物。在Tecan Fluor光譜儀上在405 nm量測波長下(參考波長492 nm)進行吸光度測定。

利用 Biacore 證明 雙重 專一性 四價 抗體 <VEGF-Ang-2> TvAb6 與 VEGF-A 及 Ang-2 之同時結合

為了進一步證實來自橋接ELISA之資料，建立另一檢定以根據以下方案使用表面電漿共振技術在Biacore T100儀器上確認與VEGF及Ang-2之同時結合，且使用T100套裝軟體(T100 Control第2.01版、T100 Evaluation第2.01版、T100 Kinetics Summary第1.01版)分析：經由PentaHis抗體(PentaHis-Ab，無BSA，Qiagen第34660號)以2000-1700 RU

之捕捉程度捕捉 Ang-2 於 PBS + 0.005%(v/v) Tween20 運行緩衝液中，該抗體已經由胺偶合固定於 CM5 晶片上(無 BSA)。HBS-N 緩衝液在偶合期間用作運行緩衝液，利用混合物 EDC/NHS 達成活化。將無 BSA 之 PentaHis-Ab 捕捉抗體稀釋於偶合緩衝液 NaAc(pH 4.5, c=30 µg/mL) 中，藉由注射 1 M 乙醇胺來阻斷最終仍活化之羧基；測出 5000 及 17000 RU 之配位體密度。在 5 µL/min 之流速下以經運行緩衝液 + 1 mg/mL BSA 稀釋之 PentaHis-Ab 捕捉 500 nM 濃度之 Ang-2。隨後，藉由與 rhVEGF 一起培育及形成夾心複合物來證明結合 Ang-2 及 VEGF 之 <Ang-2, VEGF> 雙重專一性抗體。為此，在 50 µL/min 之流速及 100 nM 之濃度下雙重專一性 <VEGF-Ang-2> TvAb6 與 Ang-2 結合，以運行緩衝液 + 1 mg/mL BSA 稀釋，且藉由在 PBS+0.005%(v/v) Tween20 運行緩衝液中在 50 µL/min 之流速及 150 nM 之 VEGF 濃度下與 VEGF(rhVEGF, R&D-Systems 目錄號 293-VE) 一起培育來偵測同時結合。締合時間 120 秒，解離時間 1200 秒。在每次循環後在 50 µL/min 之流速下以 2×10 mM Glycin pH 2.0 及 60 秒之接觸時間進行再生。使用常用雙重參照法(對照參照：雙重專一性抗體與 rhVEGF 結合以捕捉分子 PentaHisAb)來校正感測器圖譜。以 rhVEGF 濃度「0」量測各 Ab 之空白樣。圖 13 中顯示 Biacore 檢定之流程。圖 15 中顯示替代性 Biacore 檢定形式。

產生 HEK293-Tie2 細胞株

為了測定血管生成素-2 抗體對 ANGPT2 刺激之 Tie2 磷酸

化及細胞上 ANGPT2 與 Tie2 之結合的干擾，產生重組 HEK293-Tie 細胞株。簡言之，使用 Fugene(Roche Applied Science)作為轉染試劑將編碼在 CMV 啟動子控制下之全長人類 Tie2(SEQ ID 108)及新黴素抗性標記的基於 pcDNA3 之質體 (RB22-pcDNA3 Topo hTie2) 轉染至 HEK293 細胞 (ATCC) 中，且在 DMEM 10% FCS、500 $\mu\text{g/ml}$ G418 中選擇抗性細胞。經由選殖柱分離個別純系，且隨後用 FACS 分析 Tie2 表現。純系 22 被識別為甚至在無 G418 存在下亦具有高量且穩定之 Tie2 表現之純系 (HEK293-Tie2 純系 22)。HEK293-Tie2 純系 22 隨後用於細胞檢定：ANGPT2 誘導之 Tie2 磷酸化及 ANGPT2 細胞配位體結合檢定。

ANGPT2 誘導之 Tie2 磷酸化檢定

根據以下檢定原理量測 ANGPT2 抗體對 ANGPT2 誘導之 Tie2 磷酸化的抑制。在不存在或存在 ANGPT2 之狀況下以 ANGPT2 刺激 HEK293-Tie2 純系 22 歷時 5 分鐘，且用夾心 ELISA 來定量 P-Tie2。簡言之，使每孔 2×10^5 個 HEK293-Tie2 純系 22 細胞在聚-D-離胺酸塗覆之 96 孔微量滴定盤上在 100 μl DMEM、10% FCS、500 $\mu\text{g/ml}$ 遺傳黴素 (Geneticin) 中生長隔夜。第二天，在微量滴定板中準備 ANGPT2 抗體之滴定列 (4 倍濃縮，每孔 75 μl 最終體積，一式兩份)，且與 75 μl ANGPT2 [R&D systems # 623-AN] 稀釋液 (3.2 $\mu\text{g/ml}$ 作為 4 倍濃溶液) 混合。將抗體及 ANGPT2 在室溫下預培育 15 分鐘。向 HEK293-Tie2 純系 22 細胞 (與 1 mM NaV_3O_4 (Sigma #S6508) 一起預培育 5 分鐘) 中添加 100 μl 混

合物，且在37℃下培育5分鐘。隨後，每孔以200 µl冰冷之PBS+1 mM NaV₃O₄洗滌細胞，且藉由每孔添加120 µl溶解緩衝液(20 mM Tris, pH 8.0、137 mM NaCl、1% NP-40、10%丙三醇、2 mM EDTA、1 mM NaV₃O₄、1 mM PMSF及10 µg/ml抑肽酶(Aprotinin))在冰上溶解。在4℃下在微量滴定板振盪器上溶解細胞30分鐘，且在未預先進行離心及總蛋白質測定之狀況下將100 µl溶胞物直接轉移至p-Tie2 ELISA微量滴定板(R&D Systems, R&D #DY990)中。根據製造商說明書定量P-Tie2量，且使用Excel插入式XLfit4分析(一位點劑量反應，205型)測定抑制之IC₅₀值。可比較一個實驗內之IC₅₀值，但各實驗的IC₅₀值可能不同。

VEGF誘導之HUVEC增殖檢定

選擇 VEGF 誘導之 HUVEC(人臍靜脈內皮細胞，Promocell #C-12200)增殖來量測VEGF抗體之細胞功能。簡言之，將每96孔5000個HUVEC細胞(低繼代次數，≤5次繼代)在膠原蛋白I塗覆之BD Biocoat膠原蛋白I 96孔微量滴定板(BD #354407/35640)中在100 µl饑餓培養基(EBM-2內皮細胞基礎培養基2(Promocell # C-22211)、0.5% FCS、盤尼西林(Penicilline)/鏈黴素(Streptomycine))中培育隔夜。使不同濃度之抗體與rhVEGF(30 ng/ml最終濃度，BD #354107)混合，且在室溫下預培育15分鐘。隨後，將混合物添加至HUVEC細胞中，且將其於37℃、5% CO₂下培育72小時。在分析當天，使培養板平衡至室溫歷時30分鐘，且根據手冊(Promega, # G7571/2/3)使用CellTiter-Glo™發

光細胞活力檢定套組來測定細胞活力/增殖。以分光光度計測定發光。

四價雙重專一性及四價單專一性抗體之設計

本發明之結合 VEGF(VEGF-A)及 ANG-2(血管生成素-2)之雙重專一性抗體包含結合 VEGF 之第一抗原結合位點及結合 ANG-2 之第二抗原結合位點。作為結合 VEGF 之第一抗原結合位點，可使用各例如自 Liang, W.C. 等人，J Biol Chem. 281(2) (2006) 951-61 及 US 2007/0141065 中詳細描述之人類噬菌體呈現庫源性抗 VEGF 抗體 G6-31 產生的 SEQ ID NO: 23 之重鏈可變域及 SEQ ID NO: 24 之輕鏈可變域。或者，例如專一地結合 VEGF 之第二抗原結合位點包含來自抗 VEGF 抗體 <VEGF> 貝伐單抗及 <VEGF> B20-4.1.、較佳來自 <VEGF> 貝伐單抗的 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 100 之重鏈可變域及 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 101 之輕鏈可變域。

可使用包含重鏈可變域 SEQ ID NO: 31 及輕鏈可變域 SEQ ID NO: 32 或具有突變 T92L、H93Q 及 W94T 之 SEQ ID NO: 32 (Kabat 編號) 之第二抗原結合位點，該等重鏈及輕鏈可變域皆自 Oliner, J. 等人，Cancer Cell. 6(5) (2004) 507-16 及 US 2006/0122370 中詳細描述之人類抗 ANG-2 抗體 <ANG-2> Mab536 產生。或者，例如專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點包含來自抗 ANG-2 抗體 <ANG-2> Ang2s_R3_LC03、<ANG-2> Ang2i_LC06、<ANG-2> Ang2i_LC07、<ANG-2> Ang2k_LC08、<ANG-2> Ang2s_LC09、<ANG-2>

Ang2i_LC10或<ANG-2> Ang2k_LC11、較佳來自<ANG-2> Ang2i_LC06或<ANG-2> Ang2k_LC08的SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 84或SEQ ID NO: 92之重鏈可變域，及輕鏈可變域SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 85、SEQ ID NO: 93。

為了產生組合兩種抗體之特徵的試劑，建構新穎四價雙重專一性抗體源性蛋白質實體。在此等分子中，一種抗體之重組單鏈結合分子經由重組蛋白質融合技術與保持於全長IgG1形式之另一抗體連接。此第二抗體具有所要第二結合專一性。

藉由基因合成及重組分子生物技術，各別抗體之重鏈可變域(VH)及輕鏈可變域(VL)藉由甘胺酸絲胺酸(G4S)₃或(G4S)₄單鏈連接子連接以產生單鏈Fv(scFv)，其使用(G)₆-或(G4S)₃-連接子與另一抗體重鏈之C端連接。

此外，如先前所述將半胱胺酸殘基引入至結合ANG-2或VEGF之scFv的VH(包括Kabat位置44)及VL(包括Kabat位置100)域中(例如WO 94/029350；Reiter, Y.等人，Nature biotechnology (1996) 1239-1245；Young, N.M.等人，FEBS Letters (1995) 135-139；或Rajagopal, V.等人，Protein Engineering (1997) 1453-59)。

以重組方式產生所有此等分子，加以純化及表徵，且評估蛋白質表現、穩定性及生物活性。

表3中給出用於產生四價雙重專一性<VEGF-ANG-2>、<ANG-2-VEGF>抗體及四價單專一性<ANG-2>抗體的雙重專一性抗體設計之概述。對於此研究，使用術語「TvAb」來描述各種四價蛋白質實體。

為了獲得雙重專一性四價抗體<VEGF-ANG-2> TvAb5及TvAb6，使自源自人類抗ANG-2抗體<ANG-2> Mab536的SEQ ID NO: 31之重鏈可變域(VH)及具有突變T92L、H93Q及W94T之SEQ ID NO: 32之輕鏈可變域(VL)產生的結合血管生成素-2之單鏈Fv(scFv)與對應於SEQ ID NO: 23之人類抗VEGF抗體<VEGF> G6-31的重鏈載體之C端的序列融合且與基於SEQ ID NO: 24之各別輕鏈表現載體共表現。經設計之形式的圖示顯示於圖1B中且列於表3中。

為了獲得雙重專一性四價抗體TvAb9及TvAb15，使自源自人類抗VEGF抗體<VEGF> G6-31的SEQ ID NO: 23之重鏈可變域(VH)及SEQ ID NO: 24之輕鏈可變域(VL)產生的結合VEGF之單鏈Fv(scFv)與對應於SEQ ID NO: 31之人類抗ANG-2抗體<ANG-2> Mab536的重鏈載體之C端的序列融合，且與基於SEQ ID NO: 32之各別輕鏈表現載體共表現。經設計之形式的圖示顯示於圖1B中且列於表3中。

表3-具有C端scFv連接之不同雙重專一性四價抗體形式及
相應TvAb命名(表中之「-」意謂「不存在」)

分子名稱(雙重專一性抗體之TvAb命名)	抗體骨架源自	scFv源自	可變域VH及VL: SEQ ID NO:	與抗體連接之scFv的位置	單鏈連接子	肽連接子	scFv雙硫鍵VH44/VL100穩定化
G6-31 (1000)	<VEGF> G6-31	-	23+24	-	-	-	-
Mab536 (1000)	<ANG-2> Mab536	-	31+32	-	-	-	-
貝伐單抗	<VEGF> 貝伐單抗	-	23+24	-	-	-	-
Ang2i_LC06 (LC06)	<ANG-2> Ang2i_LC06	-	52+53	-	-	-	-
Ang2k_LC06 (LC08)	<ANG-2> Ang2k_LC08	-	68+69	-	-	-	-
TvAb5 (2310)	<VEGF> G6-31	<ANG-2> Mab536	23+24, 31+具有突變T92L、H93Q及W94T之32	C端HC	(G4S)3	(G)6	-
TvAb6 (2331)	<VEGF> G6-31	<ANG-2> Mab536	23+24, 31+具有突變T92L、H93Q及W94T之32	C端HC	(G4S)3	(G4S)3	scFv雙硫鍵VH44/VL100穩定化
TvAb9 (2330)	<ANG-2> Mab536	<VEGF> G6-31	31+32及23+24	C端HC	(G4S)3	(G4S)3	-
TvAb15 (2431)	<ANG-2> Mab536	<VEGF> G6-31	31+32及23+24	C端HC	(G4S)4	(G4S)3	scFv雙硫鍵VH44/VL100穩定化
TvAb-2441-貝伐單抗-LC06	貝伐單抗	LC06	7+8及52+53	C端HC	(G4S)4	(G4S)4	scFv雙硫鍵VH44/VL100穩定化
TvAb-2441-貝伐單抗-LC08	貝伐單抗	LC08	7+8及68+69	C端HC	(G4S)4	(G4S)4	scFv雙硫鍵VH44/VL100穩定化
TvAb-3421_貝伐單抗_LC06	貝伐單抗	LC06	7+8及52+53	N端HC	(G4S)4	(G4S)2	scFv雙硫鍵VH44/VL100穩定化
TvAb-4421_貝伐單抗_LC06	貝伐單抗	LC06	7+8及52+53	C端LC	(G4S)4	(G4S)2	scFv雙硫鍵VH44/VL100穩定化
TvAb-4461_貝伐單抗_LC06	貝伐單抗	LC06	7+8及52+53	C端LC	(G4S)4	(G4S)6	scFv雙硫鍵VH44/VL100穩定化

TvAb形式例如係基於：

- a) aa) 人類抗 VEGF 抗體 <VEGF>G6-31 及 ab) 自 SEQ ID NO: 31 之重鏈可變域(VH)及具有突變 T92L、H93Q 及 W94T 之 SEQ ID NO: 32 之輕鏈可變域(VL)產生的兩個結合血管生成素-2 之單鏈 Fv(scFv)，其連接於抗 VEGF 抗體 <VEGF> G6-31(SEQ ID NO: 23) 之重鏈的 C 端；或
- b) ba) 人類抗 ANG-2 抗體 <ANG-2> Mab536 及 bb) 自 SEQ ID NO: 23 之重鏈可變域(VH)及 SEQ ID NO: 24 之輕鏈可變域(VL)產生的兩個結合 VEGF 之單鏈 Fv(scFv)，其連接於抗 ANG-2 抗體 <ANG-2> Mab536(SEQ ID NO: 31) 之重鏈的 C 端；或
- c) ca) 人類抗 VEGF 抗體 <VEGF> 貝伐單抗(Avastin)及 cb) 自 SEQ ID NO: 52 或 SEQ ID NO: 68 之重鏈可變域(VH)及 SEQ ID NO: 53 或 SEQ ID NO: 69 之輕鏈可變域(VL)產生的兩個結合血管生成素-2 之單鏈 Fv(scFv)，其連接於抗 VEGF 抗體 <VEGF> 貝伐單抗(Avastin) 之重鏈之 C 端(所得融合肽之序列為與貝伐單抗 SEQ ID NO: 104 之輕鏈共表現的 SEQ ID NO: 102 或 SEQ ID NO: 103)。(或者，兩個結合血管生成素-2 之單鏈 Fv(scFv) 亦可連接於輕鏈之 C 端或重鏈之 N 端)。

除兩個單鏈 Fv(scFv) 之外，單鏈 Fab 片段亦可如上文(使用肽連接體與 C 或 N 端融合)、歐洲申請案第 09004909.9 號及實例 10 中所述來使用。

實例 1

雙重專一性四價抗體之表現及純化

<VEGF-ANG-2> TvAb5、TvAb6、TvAb-2441-貝伐單抗-LC06及TvAb-2441-貝伐單抗-LC08

如上文所述在基因組表現載體中建構相應四價雙重專一性抗體TvAb5及TvAb6之輕鏈及重鏈。使質體在大腸桿菌中擴增，加以純化且隨後轉染以便在HEK293-F細胞中短暫表現重組蛋白質(利用Invitrogen之FreeStyle 293系統)。7天後，收集HEK 293-F細胞上清液，過濾，且利用蛋白質A及尺寸排阻層析法純化雙重專一性抗體。藉由非還原及還原條件下之SDS-PAGE及分析型尺寸排阻層析法確認所有雙重專一性抗體構築體之均質性。在還原條件下(圖3)，具有C端scFv融合之<VEGF-ANG-2> TvAb6之多肽重鏈在SDS-PAGE上顯示約75 kDa的表觀分子尺寸，類似於所計算之分子量。質譜分析確認經純化抗體構築體之身分。所有構築體之表現程度係藉由蛋白質A HPLC分析，且類似於「標準」IgG之表現產量。如由蛋白質A HPLC所測定，蛋白質產量達到每公升細胞培養物上清液達150 mg TvAb6 <VEGF-ANG-2>。

在重鏈處具有C端融合scFv之經純化非雙硫鍵穩定構築體TvAb5的尺寸排阻層析分析顯示在單體抗體經由尺寸排阻層析純化後相較於「標準」IgG再次聚集之傾向增大(所謂「菊鏈」現象)。此發現已由其他實例證實(Rajagopal, V.等人，Prot. Engin. (1997) 1453-1459；Kobayashi, H.等

人，Nucl Med Biol. (1998) 387-393或Schmidt, M.等人，Oncogene (1999) 18, 1711-1721)，該等實例顯示含有並非因VH與VL之間的鏈間雙硫鍵而穩定之scFv的分子展現聚集傾向增大及產量降低。應用scFv部分之雙硫鍵穩定化來解決該等雙重專一性抗體聚集的問題。為此，在scFv之VH及VL內在確定位置(根據Kabat編號方案的位置VH44/VL100)處引入單個半胱胺酸置換。此等突變使VH與VL之間能夠形成穩定的鏈間雙硫鍵，此又使所得雙硫鍵穩定scFv模塊穩定。在TvAb6 <VEGF-ANG-2>中之Fv的C端處引入scFv中之VH44/VL100雙硫鍵產生穩定四價抗體，該抗體在純化後不再顯示有聚集傾向且保持單體狀態(圖4)。此外，TvAb6 <VEGF-ANG-2>顯示在重複凍融循環(例如在活體外及活體內應用之3 mg/kg的濃度下)後聚集傾向無增加。

類似於所述程序製備及以分析方式表徵表3中所述之所有其他TvAb分子(例如TvAb-2441-貝伐單抗-LC06及TvAb-2441-貝伐單抗-LC08)。

實例2

雙重專一性四價抗體<VEGF-ANG-2> TvAb6、TvAb-2441-貝伐單抗-LC06及TvAb-2441-貝伐單抗-LC08與VEGF-A及ANG-2之同時結合

將不同雙重專一性抗體形式之IgG模塊中所保持的Fv及scFv模塊之結合與結合模塊及雙重專一性抗體所源自之「野生型」IgG的結合比較。藉由進行生物化學結合

ELISA及應用表面電漿共振(Biacore)在等莫耳濃度下進行此等分析。

對<VEGF-ANG-2> TvAb6而言，如由上文所述之VEGF結合ELISA所示，其在0.625 pM等莫耳濃度下以與親本抗體G6-31相當的程度結合VEGF(圖5)。當TvAb之Fv區與G6-31之Fv區一致時可預期此發現結果。<VEGF-ANG-2> TvAb6與<VEGF> G6-31之間的略微差異係由蛋白質濃度的小差異及C端scFv對<hFc>-POD偵測抗體之結合的輕微空間干擾引起，且可藉由應用<hk> POD(Biozol目錄號206005)偵測抗體(如用於ANG-2結合ELISA)克服。

在37°C下使用典型濃度系列使用Biacore確認此等發現(圖11)。此等資料顯示 $4.7-4.8 \times 10^6 \text{ 1/(Ms)}$ 之快速Kon速率 $k(a)$ ，在最高濃度之VEGF下達到飽和。Koff速率達到技術規範之極限(亦即 $5 \times 10^{-6} \text{ (s/s)}$)，此可能仍然係因為在此條件下由於二聚分析物rhVEGF所致之二價結合(親和力效應)，儘管使用極低配位體密度導致10-15 RU之最終VEGF反應亦然。然而，不同<VEGF>抗體之動力學常數可以此方法來比較且在該方法之誤差範圍內，在四價雙重專一性抗體<VEGF-Ang-2> TvAb6與初始抗體<VEGF> G6-31之動力學常數之間不存在可偵測出之明顯差異。在此等條件下，利用此方法得知，<VEGF-Ang-2> TvAb6與<VEGF> G6-31之動力學常數實質上相同。因此，可推斷出TvAb6完全保留其VEGF結合特性。表4顯示各別動力學常數且圖12顯示Ka-Kd圖中兩種<VEGF>抗體<VEGF-Ang-2> TvAb6

及<VEGF>G6-31的動力學特徵。

表 14：<VEGF-Ang-2> TvAb6及<VEGF> G6-31之動力學特性

在37°C下量測	Ka	kd	t1/2	KD
抗體	[1/(Ms)]	[1/s]	[min]	[M]
<VEGF> G6-31	4.83E+06	9.33E-06	1237.8	1.93E-12
<VEGF-Ang-2> TvAb6	4.72E+06	7.24E-06	1596.7	1.53E-12

在另一實驗中，如上文所述利用ANG-2結合ELISA使用<hk>-POD偵測抗體(Biozol目錄號206005)顯示出<VEGF-ANG-2> TvAb6在0.039 pM之等莫耳濃度下以與Mab536相當之方式結合ANG-2(圖6A)。此顯示TvAb6之scFv模塊保留其在TvAb構築體中之結合特性。

為了進一步證實此發現結果，使<ANG-2> Mab536及<VEGF-ANG-2> TvAb6藉由二次抗體固定於Biacore CM5晶片上且測定與人類ANG-2之結合動力學。由於ANG-2製劑之不均勻性，因此不能觀測到1:1結合；因此KD值僅為相對估算值。Biacore分析顯示<VEGF-ANG-2> TvAb6針對ANG-2之估算KD值為4.4 nM。相較而言，Mab536之估算KD值為1.6 nM。在該方法之誤差範圍內，不能觀測到<ANG-2> Mab536與<VEGF-ANG-2> TvAb6之間的結合模式及親和力之差異(圖6B)。因此，可推斷TvAb6之scFv模塊完全保留其在TvAb構築體中之結合特性。

為了證實<VEGF-ANG-2> TvAb6能夠同時結合VEGF及ANG-2，應用如上文所述之橋接ELISA檢定及Biacore檢定。

藉由應用上文所述之 VEGF-ANG-2-橋接 ELISA，顯示僅 <VEGF-ANG-2> TvAb6 能夠在 0.625 pM 之等莫耳濃度下同時結合 VEGF 及 ANG-2，而單專一性「標準」IgG1 抗體 <ANG-2> Mab536 及 <VEGF> G6-31 不能夠同時結合 VEGF 及 ANG-2 (圖 7)。

圖 14 顯示來自 Biacore 檢定之各別資料。可顯示出四價雙重專一性抗體 <VEGF-Ang-2> TvAb6 同時結合兩種抗原 Ang-2 及 VEGF。陰性對照正如所料：單專一性抗體 <Ang-2> Mab536 顯示僅結合 Ang-2，但無 VEGF 結合。單專一性抗體 <VEGF> G6-31 顯示結合 VEGF，但完全不與 Ang-2 結合 (資料未顯示)。根據結合 Ang-2 塗覆表面且隨後結合二聚 VEGF 之四價雙重專一性抗體 <VEGF-Ang-2> TvAb6 的相對反應單位，可計算出結合化學計量在 1:1 至 1:1.4 範圍內。總之，藉由應用所述之 ELISA 及 Biacore 檢定，顯示僅 <VEGF-Ang-2> TvAb6 能夠同時結合 VEGF 及 Ang-2，而單專一性「標準」IgG1 抗體 <Ang-2> Mab536 及 <VEGF> G6-31 不能夠同時結合 VEGF 及 Ang-2 (圖 15)。

在圖 15A 中所示之類似 Biacore 檢定中，對於構築體 TvAb-2441-貝伐單抗-LC06 及 TvAb-2441-貝伐單抗-LC08 獲得類似結果。藉由表面電漿共振使用 BIACORE T100 儀器 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden) 研究抗體與例如人類 ANG-2 及 VEGF 之抗原的結合。簡言之，為了進行親和力量測，經由胺偶合將山羊 <hIgG-Fc γ > 多株抗體固定於 CM4 晶片上，以便呈現針對人類 ANG-2 及 VEGF 之

雙重專一性抗體。在25°C下在HBS緩衝液(HBS-P(10 mM HEPES、150 mM NaCl、0.005% Tween 20, pH 7.4))中量測結合。以在溶液中介於6.25 nM與200 nM之間的各種濃度添加經純化ANG-2-His(R&D systems或經內部純化)。藉由ANG-2注射3分鐘來量測締合；藉由以HBS緩衝液洗滌晶片表面3分鐘來量測解離，且使用1:1朗繆耳結合模型(Langmuir binding model)估算KD值。由於ANG-2製劑之不均勻性，因此不能觀測到1:1結合；因此KD值僅為相對估算值。

以在溶液中介於6.25 nM與200 nM之間的各種濃度添加VEGF(R&D systems)。藉由VEGF注射3分鐘來量測締合；藉由以HBS緩衝液洗滌晶片表面3分鐘來量測解離，且使用1:1朗繆耳結合模型估算KD值。

結合搭配物之注射順序可加以轉換，首先VEGF且接著Ang2，或反之亦然。

自樣本曲線減去陰性對照資料(例如緩衝液曲線)，以便校正系統固有的基線漂移且減少雜訊。使用Biacore T100評估軟體第1.1.1版分析感測器圖譜及計算親和力資料。

抗體	親和力hAng-2	親和力hVEGF
TvAb-2441-貝伐單抗-LC06	2.3 nM	0.35 nM
TvAb-2441-貝伐單抗-LC08	0.7 nM	0.34 nM
G6-31	--	< 0.1 nM
MAb536	3 nM	--
貝伐單抗	--	0.59 nM

最終，可藉由與ANGPT2及VEGF一起以連續方式培育來證實TvAb-2441-貝伐單抗-LC06及TvAb-2441-貝伐單抗-LC08之同時結合。如圖15B中所示，ANGPT2及VEGF可同時與雙重專一性抗體結合。

實例3

雙硫鍵穩定之雙重專一性四價抗體<VEGF-ANG-2> TvAb6相較於<ANG-2> Mab536、<VEGF> G6-31及Mab536與G6-31之組合在分階段皮下Colo205異種移植模型中在Scid Beige小鼠中之活體內功效

在兩階段皮下Colo205異種移植模型研究(Ang2_PZ_Colo205_003及Ang2_PZ_Colo205_005)中，在雌性Scid Beige小鼠中，在不同劑量下，比較經純化之雙硫鍵穩定<VEGF-ANG-2> TvAb6(n00.2331，參見表3)與抗體<ANG-2> Mab536、<VEGF> G6-31及<ANG-2> Mab536與<VEGF> G6-31之組合。

提供20 mM組胺酸、140 mM NaCl(pH 6.0)中之抗體<ANG-2> Mab536作為冷凍儲備溶液(c=4.5 mg/mL)，提供20 mM組胺酸、140 mM NaCl(pH 6.0)中之<VEGF> G6-31作為冷凍溶液(c=0.6 mg/mL)，且提供20 mM組胺酸、140 mM NaCl(pH 6.0)中之<VEGF-ANG-2> TvAb6作為冷凍儲備溶液(c=0.5 mg/mL)。若需要，則在注射前將抗體溶液自儲備液適當稀釋於PBS中，且PBS係用作媒劑。

細胞株及培養條件：Colo205人類結腸直腸癌細胞最初獲自ATCC，且在擴展後寄存於Roche Penzberg國際細胞庫

中。在37°C下，在水飽和氛圍中，在5% CO₂下，在補充有10%胎牛血清(PAA Laboratories, Austria)及2 mM L-麩胺鹽胺之RPMI 1640培養基(PAA, Laboratories, Austria)中以常規方式培養腫瘤細胞株。第2-5繼代用於移植。

動物：雌性 SCID Beige小鼠；到達時年齡4-5週(購自 Charles River Germany)，根據所提交之準則(GV-Solas; Felasa; TierschG)保持於12小時光照/12小時黑暗之每日循環的特定無病原體條件下。實驗研究方案係由地方政府評審及批准。到達後，將動物保持在動物設施之隔離部分中歷時一週，以習慣新環境且以供觀測。在常規基礎上進行連續健康監測。任意地提供膳食(Provimi Kliba 3337)及水(酸化pH 2.5-3)。研究開始時，小鼠年齡為約10週。

監測：每日監控動物之臨床症狀且偵測不利影響。為了在整個實驗期間進行監測，記錄動物體重且在分階段後用測徑規量測腫瘤體積。

腫瘤細胞注射：在注射當天，將Colo205細胞離心，洗滌1次且再懸浮於PBS中。在以PBS作另一次洗滌後，使用細胞計數器及分析器系統(Vi-CELL, Beckman Coulter)測定細胞濃度及細胞尺寸。為了注射Colo205細胞，將最終效價調整至每毫升 5.0×10^7 個細胞，活力為約90%。隨後，將100 μ l此懸浮液(對應於每隻動物 2.5×10^6 個細胞)皮下注射至小鼠右側腹中。

分別在細胞移植後16天(研究Ang2_PZ_Colo205_003)及細胞移植後14天(研究Ang2_PZ_Colo205_005)的隨機分組

當天，在 100 mm^3 或 150 mm^3 之平均腫瘤體積下開始動物處理。

直至研究 Ang2_PZ_Colo205_003 第 74 天之給藥時程 (參見圖 8A)：

組	動物數	化合物	劑量 (mg/kg)	投與途徑/模式	處理次數	累積劑量 mg/kg
1	10	媒劑		每週一次， 腹膜內	4	
2	10	<VEGF> G6-31	6 mg/kg	每週一次， 腹膜內	8	48
3	10	<ANG-2> Mab536	6 mg/kg	每週一次， 腹膜內	8	48
4	10	<VEGF> G6-31+ <ANG-2> Mab536	5mg/kg+ 6 mg/kg	每週一次， 腹膜內	8	40
				每週一次， 腹膜內	8	48
5	10	<VEGF- ANG-2> TvAb6	7mg/kg	每週一次， 腹膜內	8	56

在研究 Ang2_PZ_Colo205_003 中，<VEGF-ANG-2> TvAb6 之等莫耳比率由於出錯而劑量不足。在研究 Ang2_PZ_Colo205_005 中調整 <VEGF-ANG-2> TvAb6 之劑量，從而用 <VEGF-ANG-2> TvAb6 以及 <VEGF> G6-31 與 <ANG-2> Mab536 之組合使動物接受等莫耳比之 ANG-2 及 VEGF 結合位點。

直至 Ang2_PZ_Colo205_003 研究第 74 天之腫瘤生長抑制 (參見圖 8a)：

7 mg/kg劑量下之<VEGF-ANG-2> TvAb6展現與5 mg/kg之<VEGF> G6-31與6 mg/kg之<ANG-2> Mab536的組合及6 mg/kg劑量下作為單獨藥劑之<VEGF> G6-31相當之功效(圖 8A)，且優於6 mg/kg劑量下之單獨藥劑<ANG-2> Mab536。由於皮下 Colo205模型對能阻斷人類以及鼠類VEGF導致幾乎完全之腫瘤生長抑制的<VEGF> G6-31抗體極具反應性，因此在所選實驗條件下<VEGF-ANG-2> TvAb6不能與作為單獨藥劑之G6-31(6 mg/kg)區分開來，而<VEGF-ANG-2> TvAb6在明顯較低的累積劑量下顯示與<ANG-2> Mab536與<VEGF>G6-31之組合相當之抑制(<VEGF-ANG-2> TvAb6=56 mg/kg抗體，相較於<ANG-2> Mab536與<VEGF>G6-31之組合=40+48=88 mg/kg抗體)。

直至研究Ang2_PZ_Colo205_005第63天之給藥時程：

組	動物數	化合物	劑量 (mg/kg)	投與途徑/ 模式	處理 次數	累積 劑量
6	10	媒劑		每週一次， 腹膜內	6	
7	10	<VEGF> G6-31	3	每週一次， 腹膜內	7	21 mg/kg
8	10	<VEGF> G6-31+ <ANG-2> Mab536	3 3	每週一次， 腹膜內 每週一次， 腹膜內	7 7	21 mg/kg 21 mg/kg
9	10	<ANG-2> Mab536	3	每週一次， 腹膜內	7	21 mg/kg
10	10	<VEGF-ANG-2> TvAb6	4	每週一次， 腹膜內	7	28 mg/kg

直至 Ang2_PZ_Colo205_005 研究第 63 天之腫瘤生長抑制 4 mg/kg 劑量下之 <VEGF-ANG-2> TvAb6 展現與各為 3 mg/kg 之 <VEGF>G6-31 與 <ANG-2> Mab536 之組合相當的功效，且優於 3 mg/kg 劑量下之單獨藥劑 <VEGF>G6-31 以及 <ANG-2> Mab536 (圖 8B)。此為第一實例，其顯示靶向 VEGF 及 ANG-2 之雙重專一性抗體在較低劑量下 (關於抗體之總計濃度-組合之累積劑量為 28 mg/kg 雙重專一性抗體 TvAb6 相對於 $21+21=42$ m/kg) 可導致產生與阻斷 VEGF 及 ANG-2 的各別單獨藥劑之組合相當的強力抗腫瘤功效，且優於任一單獨藥劑。

實例 4

對 VEGF 誘導之管形成的阻斷

為了確認雙重專一性四價 <VEGF-ANG-2> TvAb6 中保留有抗 VEGF 相關活性，在 VEGF 誘導之管形成檢定 AngioKit TCS CellWorks (CellSystems) 中顯示 <VEGF-ANG-2> TvAb6 介導之對管形成的劑量依賴性抑制與單專一性抗體 <VEGF>G6-31 相當。根據以下程序進行 AngioKit TCS CellWorks 檢定：在第 1 天、第 4 天、第 7 天及第 9 天以抗體處理之前，每次以 2 ng/ml VEGF 刺激細胞。藉由在第 11 天使用 CD31-PE 抗體 (BD Pharmingen #555446) 染色內皮細胞來顯現血管。在 4 倍放大率下拍照且使用 MetaMorph (Molecular Devices) 中之血管生成管形成應用模組來定量分析管長度值及分支點數。藉由每試樣 4 張照片的重複及分析來計算值及標準偏差。圖 9 顯示各別結果且圖 10 A 及

圖 10B 顯示定量分析。血管生成素-2 對管形成無影響，且因此在此研究中未研究 ANG-2 的抑制。資料顯示雙重專一性 <VEGF-ANG-2> TvAb6 及單專一性 <VEGF> G6-31 抗體對抑制 VEGF 刺激之管形成同等有效。

實例 5

Tie2 磷酸化

為了確認雙重專一性四價 <VEGF-ANGPT2> 抗體 TvAb-2441-貝伐單抗-LC06 及 TvAb-2441-貝伐單抗-LC08 中保留有抗 ANGPT2 相關活性，在如上文所述之 ANGPT2 刺激之 Tie2 磷酸化檢定中顯示 TvAb-2441-貝伐單抗-LC06 及 TvAb-2441-貝伐單抗-LC08 以與其母純系 LC06 及 LC08 相當之方式干擾 ANGPT2 刺激之 Tie2 磷酸化。

在第一實驗中，兩種雙重專一性抗體 TvAb-2441-貝伐單抗-LC06 及 TvAb-2441-貝伐單抗-LC08 顯示以與母純系 LC06 及 LC08 相當之 IC50 值劑量依賴性地干擾 ANGPT2 刺激之 Tie2 磷酸化，如圖 16A 中所示。TvAb-2441-貝伐單抗-LC06 以約 721 ng/ml 之 IC50 值干擾 ANGPT2 刺激之 Tie2 磷酸化，而 LC06 以約 508 ng/ml 之 IC50 值干擾 ANGPT2 刺激之 Tie2 磷酸化。TvAb-2441-貝伐單抗-LC08 以約 364 ng/ml 之 IC50 值干擾 ANGPT2 刺激之 Tie2 磷酸化，而 LC08 以約 499 ng/ml 之 IC50 值干擾 ANGPT2 刺激之 Tie2 磷酸化。

在第二實驗中，兩種雙重專一性抗體 TvAb-2441-貝伐單抗-LC06 及 TvAb-2441-貝伐單抗-LC08 顯示以與母純系 LC06 及 LC08 相當之 IC50 值劑量依賴性地干擾 ANGPT2 刺激

之 Tie2 磷酸化，如圖 16B 中所示。TvAb-2441-貝伐單抗-LC06 以約 488 ng/ml 之 IC50 值干擾 ANGPT2 刺激之 Tie2 磷酸化，而 LC06 以約 424 ng/ml 之 IC50 值干擾 ANGPT2 刺激之 Tie2 磷酸化。TvAb-2441-貝伐單抗-LC08 以約 490 ng/ml 之 IC50 值干擾 ANGPT2 刺激之 Tie2 磷酸化，而 LC08 以約 399 ng/ml 之 IC50 值干擾 ANGPT2 刺激之 Tie2 磷酸化。

總之，此等資料顯示雙重專一性四價 <VEGF-ANGPT2> 抗體 TvAb-2441-貝伐單抗-LC06 及 TvAb-2441-貝伐單抗-LC08 以與其母純系 LC06 及 LC08 相當之方式在此細胞檢定之誤差範圍內干擾 ANGPT2 刺激之 Tie2 磷酸化。

實例 6

對 huANG-2 與 Tie-2 之結合的抑制 (ELISA)

在室溫下在 384 孔微量滴定板 (MicroCoat, DE, 目錄號 464718) 上進行相互作用 ELISA。在各培育步驟之後，以 PBST 洗滌培養板 3 次。以 0.5 µg/ml Tie-2 蛋白 (R&D Systems, UK, 目錄號 313-TI) 塗覆 ELISA 培養板至少 2 小時。此後，以補充有 0.2% Tween-20 及 2% BSA 之 PBS (Roche Diagnostics GmbH, DE) 阻斷各孔 1 小時。將經純化抗體於 PBS 中之稀釋液與 0.2 µg/ml hu 血管生成素-2 (R&D Systems, UK, 目錄號 623-AN) 一起在室溫下培育 1 小時。洗滌後，添加 0.5 µg/ml 生物素標記抗血管生成素-2 純系 BAM0981 (R&D Systems, UK) 與 1:3000 稀釋之抗生物素 HRP (Roche Diagnostics GmbH, DE, 目錄號 11089153001) 之混合物歷時 1 小時。此後，以 PBST 洗滌培

養板6次。在室溫下，以新鮮製備之ABTS試劑(Roche Diagnostics GmbH, DE，緩衝液#204 530 001，片劑#11112 422 001)使培養板顯色30分鐘。在405 nm下量測吸光度。

Ang2相互作用ELISA之匯總資料：

<VEGF-ANG-2>雙重專一性抗體 (或單專一性親本抗體)	AVG IC50 (ng/ml)	STDEV
	hANG2	
<VEGF-ANG-2> G6_31	>20000	
TvAb-2441_G6_31_Ang2i_LC06	75	39
TvAb-2441_G6_31_Ang2k_LC08	66	31
TvAb-2441_貝伐單抗_LC06	44	8
TvAb-2441_貝伐單抗_LC08	42	11
<ANG-2> Mab 536	15	8
<VEGF>貝伐單抗	>20000	
TvAb-3421_貝伐單抗_LC06	31	1
TvAb-4421_貝伐單抗_LC06	35	17
TvAb-4461_貝伐單抗_LC06	46	10

實例7

對hVEGF與hVEGF受體之結合的抑制(ELISA)

在室溫下在384孔微量滴定板(MicroCoat, DE，目錄號464718)上進行測試。在各培育步驟之後，以PBST洗滌培養板3次。開始時，以0.5 µg/ml hVEGF-R蛋白(R&D Systems, UK，目錄號321-FL)塗覆培養板，持續至少2小時。此後，以補充有0.2% Tween-20及2% BSA之

PBS(Roche Diagnostics GmbH, DE)阻斷各孔1小時。將經純化抗體於PBS中之稀釋液與0.15 µg/ml huVEGF121(R&D Systems, UK, 目錄號298-VS)一起在室溫下培育1小時。洗滌後，添加0.5 µg/ml抗VEGF純系Mab923(R&D Systems, UK)與1:2000結合辣根過氧化酶(HRP)之F(ab')₂抗小鼠IgG (GE Healthcare, UK, 目錄號NA9310V)的混合物歷時1小時。此後，以PBST洗滌培養板6次。在室溫下，以新鮮製備之ABTS試劑(Roche Diagnostics GmbH, DE, 緩衝液#204 530 001, 片劑#11 112 422 001)使培養板顯色30分鐘。在405 nm下量測吸光度。

VEGF相互作用ELISA之匯總資料：

<VEGF-ANG-2>雙重專一性抗體	AVG IC50 (ng/ml)	STDEV
	VEGF	
<VEGF-ANG-2> G6_31	1431	130
TvAb-2441_G6_31_Ang2i_LC06	1654	213
TvAb-2441_G6_31_Ang2k_LC08	1392	184
TvAb-2441_貝伐單抗_LC06	2831	503
TvAb-2441_貝伐單抗_LC08	2305	972
TvAb-<ANG-2> Mab 536	>20000	
TvAb-<VEGF>貝伐單抗	1584	357
TvAb-3421_貝伐單抗_LC06	2660	284
TvAb-4421_貝伐單抗_LC06	1980	1319
TvAb-4461_貝伐單抗_LC06	1677	394

實例 8

HUVEC增殖

為了確認雙重專一性四價 <VEGF-ANG2> 抗體 TvAb-2441-貝伐單抗-LC06及 TvAb-2441-貝伐單抗-LC08中保留有抗 VEGF 相關活性，顯示 TvAb-2441-貝伐單抗-LC06及 TvAb-2441-貝伐單抗-LC08在如上文所述之 VEGF 誘導之 HUVEC 增殖檢定中以與其母純系 LC06及 LC08相當之方式干擾 VEGF 誘導之 HUVEC 增殖。

圖 18 顯示 TvAb-2441-貝伐單抗-LC06及 TvAb-2441-貝伐單抗-LC08實際上以濃度依賴性方式與親本抗體貝伐單抗相當地干擾 VEGF 誘導之 HUVEC 增殖。

實例 9

人類 ANG-1 及人類 ANG-2 之 ELISA 結合檢定

在如上文所述之 ANG-1 或 ANG-2 結合 ELISA 中測定親本 <ANG-2> 抗體 Ang2i-LC06、Ang2i-LC07 及 Ang2k-LC08 與人類 ANG-1 及人類 ANG-2 之結合(參見與 ANG-1 及 ANG-2 之比較性結合 (ANG-1 及 ANG-2 結合 ELISA))。簡言之，ELISA 型檢定係基於人類野生型血管生成素-1 或 -2 在微量滴定板中之固定。經由 <人類 Fc>(抗 IgG) 抗體以 POD 結合物量測針對經固定 ANG-1 或 ANG-2 之抗體結合。連續稀釋 <ANG-2> 抗體允許測定 EC₅₀ 濃度。使用人類抗 ANG-2 抗體 <ANG-2> 抗體 Mab536(Oliner 等人，Cancer Cell. 2004 年 11 月；6(5):507-16、US 2006/0122370) 作為參照。所測定 EC₅₀ 濃度概示於下表中。

抗體	hANG-1結合 EC50	hANG-2結合 EC50
<ANG-2>MAb536	2538 ng/mL	133 ng/mL
<ANG-2> Ang2i-LC06	> 8000 ng/mL	84 ng/mL
<ANG-2> Ang2i-LC07	> 8000 ng/mL	3006 ng/mL
<ANG-2> Ang2i-LC08	4044 ng/mL	105 ng/mL

所有抗體均專一地結合於ANG-2。MAb536及Ang2k-LC08亦顯示針對ANG-1之專一性結合，而Ang2i-LC06及Ang2i-LC07並不專一地結合ANG-1，因為其具有高於8000 ng/ml(偵測極限)之EC50值。

實例10

雙重專一性四價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子scFab-Avastin-LC06-2620、scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640及scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641之表現及純化

類似於以上實例1及材料與方法中所述之程序，表現及純化雙重專一性四價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子scFab-Avastin-LC06-2620、scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640及scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641(所有三者均基於<VEGF>貝伐單抗及<ANG-2> Ang2i-LC06)。如上文實例中所述測定結合親和力及其他特性。此等雙重專一性抗體之相關(最終經修飾)輕鏈及重鏈胺基酸序列在SEQ ID NO: 109-110(scFab-Avastin-LC06-2620)、SEQ ID NO: 111-112(scFab-Avastin-LC06-2640)及SEQ ID NO: 113-114(scFab-Avastin-LC06-2641)中給出。

關鍵資料	scFAB-Avastin-LC06-2620	scFAB-Avastin-LC06-2640	scFAB-Avastin-LC06-2641
表現(產量)	29 µg/mL	27 µg/mL	18 µg/mL
純化(產量，蛋白質A均質性)	21 mg, 57%	19 mg, 86%	12 mg, 90%
在製備型SEC後之均質性	98%	98%	99%
功能			
hANG-2親和力(Biacore)	1.9 E-9 M	1.8 E-9 M	1.9 E-9 M
hVEGF親和力(Biacore)	1 E-10 M	1E-10 M	1E-10 M

實例 11

雙重專一性三價單鏈 Fab <VEGF-ANG-2> 抗體分子 Avastin-LC06-KiH-C-scFab之表現及純化

類似於以上實例1及材料與方法中所述之程序，表現及純化基於<VEGF>貝伐單抗及<ANG-2> Ang2i-LC06之雙重專一性三價單鏈 Fab<VEGF-ANG-2> 抗體分子 Avastin-LC06-KiH-C-scFab。如上文實例中所述測定結合親和力及其他特性。此雙重專一性抗體之相關(最終經修飾)輕鏈及重鏈胺基酸序列在SEQ ID NO: 115-117(Avastin-LC06-KiH-C-scFab)中給出。

關鍵資料	Avastin-LC06-KiH-C-scFab
表現(產量)	15 µg/mL
純化(產量，蛋白質A均質性)	4.8 mg, 91%
在製備型SEC後之均質性	97%
功能	
hANG-2親和力(Biacore)	4.4 E-9 M
hVEGF親和力(Biacore)	1 E-10 M

實例 12**雙重專一性三價 <VEGF-ANG-2> 抗體分子 Avastin-LC06-C-Fab-6CSS 之表現及純化**

類似於以上實例 1 及材料與方法中所述之程序 (亦參見上文)，表現及純化基於 <VEGF> 貝伐單抗及 <ANG-2> Ang2i-LC06 之雙重專一性三價 <VEGF-ANG-2> 抗體分子 Avastin-LC06-C-Fab-6CSS。如上文實例中所述測定結合親和力及其他特性。此形式之雙重專一性三價抗體分子大體描述於歐洲申請案第 09005108.7 號中。此雙重專一性 <VEGF-ANG-2> 抗體之相關 (最終經修飾) 輕鏈及重鏈胺基酸序列在 SEQ ID NO: 118-120 (Avastin-LC06-C-Fab-6CSS) 中給出。

關鍵資料	scFAB-Avastin-LC06-2620	scFAB-Avastin-LC06-2640	scFAB-Avastin-LC06-2641
表現(產量)	29 µg/mL	27 µg/mL	18 µg/mL
純化(產量，蛋白質A均質性)	21 mg, 57%	19 mg, 86%	12 mg, 90%
在製備型SEC後之均質性	98%	98%	99%
功能			
hANG-2親和力(Biacore)	1.9 E-9 M	1.8 E-9 M	1.9 E-9 M
hVEGF親和力(Biacore)	1 E-10 M	1E-10 M	1E-10 M

實例 13**雙重專一性二價結構域交換 <VEGF-ANG-2> 抗體分子 Avastin-LC06-CH1-CL、Avastin-LC06-VH-VL 及 Avastin-LC06-VH-VL-SS 之表現及純化**

類似於以上實例 1 及材料與方法中所述之程序，表現及

純化基於<VEGF>貝伐單抗及<ANG-2> Ang2i-LC06之雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子 Avastin-LC06-CH1-CL(CH-CL交換係如 WO 2009/080253 中所述)、Avastin-LC06-VH-VL(VH-VL交換係如 WO 2009/080252 中所述)及 Avastin-LC06-VH-VL-SS(VH-VL交換係如 WO 2009/080252 中所述，且另外引入 VH44 VL100 雙硫橋)。如上文實例中所述測定結合親和力及其他特性。此等雙重專一性抗體之相關(最終經修飾)輕鏈及重鏈胺基酸序列在 SEQ ID NO: 121-124(Avastin-LC06-CH1-CL)、SEQ ID NO: 125-128(Avastin-LC06-VH-VL) 及 SEQ ID NO: 129-132 (Avastin-LC06-VH-VL-SS)中給出。

關鍵資料	Avastin-LC06-CM-CH1-CL	Avastin-LC06-CM-VH-VL	Avastin-LC06-VH-VL-SS
表現(產量)	87 µg/mL	44 µg/mL	65 µg/mL
純化(產量，蛋白質A均質性)	50 mg, 62%	22 mg, 95%	91 mg, 74%
在製備型SEC後之均質性	84%	> 99%	95%
功能			
hANG-2親和力(Biacore)	1.3 E-9 M	2.1 E-9 M	1.46 E-9 M
hVEGF親和力(Biacore)	1 E-10 M	1 E-10 M	1 E-10 M

實例 14

雙重專一性二價 ScFab-Fc 融合<VEGF-ANG-2>抗體分子 Avastin-LC06-N-scFab 及 Avastin-LC06-N-scFabSS 之表現及純化

類似於以上實例 1 及材料與方法中所述之程序，表現及

純化基於<VEGF>貝伐單抗及<ANG-2> Ang2i-LC06之雙重專一性二價ScFab-Fc融合<VEGF-ANG-2>抗體分子Avastin-LC06-N-scFab及Avastin-LC06-N-scFabSS。如上文實例中所述測定結合親和力及其他特性。此等雙重專一性抗體之相關經修飾重鏈胺基酸序列在SEQ ID NO: 133-134 (Avastin-LC06-N-scFab)及SEQ ID NO: 135-136(Avastin-LC06-N-scFabSS)中給出。

關鍵資料	Avastin-LC06-N-scFab	Avastin-LC06-N-scFabSS
表現(產量)		62 µg/mL
純化(產量, 蛋白質A均質性)		43%
功能		
hANG-2親和力(Biacore)		1 nM
hVEGF親和力(Biacore)		1 nM

實例 15

實例 10 至 14 之雙重專一性<VEGF-ANG-2>抗體分子的對hVEGF與hVEGF受體之結合的抑制(ELISA)、對VEGF誘導之管形成的阻斷、對huANG-2與Tie-2之結合的抑制(ELISA)、Tie2磷酸化及HUVEC增殖

可類似於以上材料與方法及實例 4 至 9 中所述之程序來測定實例 10 至 14 之雙重專一性<VEGF-ANG-2>抗體分子的對hVEGF與hVEGF受體之結合的抑制(ELISA)、對VEGF誘導之管形成的阻斷、對huANG-2與Tie-2之結合的抑制(ELISA)、Tie2磷酸化及HUVEC增殖。

實例16

雙重專一性抗體<VEGF-ANG-2>抗體相較於<ANG-2> ANG2i-LC06及<ANG-2> ANG2i-LC06與Avastin之組合在難治癒Colo205異種移植模型中在Scid Beige小鼠中之活體內功效(在對貝伐單抗(Avastin)治療具抗性後)

細胞株及培養條件：

Colo205人類結腸直腸癌細胞最初獲自ATCC，且在擴展後寄存於Roche Penzberg國際細胞庫中。在37°C下，在水飽和氛圍中，在5% CO₂下，在補充有10%胎牛血清(PAA Laboratories, Austria)及2 mM L-麩胺醯胺之RPMI 1640培養基(PAA, Laboratories, Austria)中以常規方式培養腫瘤細胞株。第2-5繼代用於移植。

動物：

雌性SCID Beige小鼠；到達時年齡4-5週(購自Charles River Germany)，根據所提交之準則(GV-Solas; Felasa; TierschG)保持於12小時光照/12小時黑暗之每日循環的特定無病原體條件下。實驗研究方案係由地方政府評審及批准。到達後，將動物保持在動物設施之隔離部分中歷時一週，以習慣新環境且以供觀測。在常規基礎上進行連續健康監測。任意地提供膳食(Provimi Kliba 3337)及水(酸化pH 2.5-3)。研究開始時，小鼠年齡為約10週。

腫瘤細胞注射：

在注射當天，自培養瓶(Greiner)收集腫瘤細胞(胰蛋白酶-EDTA)且轉移至50 ml培養基中，洗滌1次且再懸浮於

PBS中。在使用PBS進行另一洗滌步驟及過濾(細胞過濾器；Falcon $\phi 100\ \mu\text{m}$)後，將最終細胞效價調整為 $2.5 \times 10^7/\text{ml}$ 。以移液管小心地混合腫瘤細胞懸浮液以避免細胞聚集。此後，使用寬針($1.10 \times 40\ \text{mm}$)將細胞懸浮液填充至1.0 ml結核菌素注射器(Braun Melsungen)中；改變針尺寸($0.45 \times 25\ \text{mm}$)以供注射且每次注射使用新針。使用具有預培育室(塑膠玻璃)、個別小鼠鼻罩(矽)及非可燃性或非爆炸性麻醉化合物異氟醚(cp-pharma)之小動物Stephens吸入單元在封閉循環系統中進行麻醉。在注射之前兩天，剃去動物皮毛且以解剖鉗小心地提起經麻醉動物之皮膚以供細胞注射，且在動物右側腹皮下注射100 μl 細胞懸浮液($= 2.5 \times 10^6$ 個細胞)。

動物處理

預處理：

在細胞移植後14天(研究Ang2_PZ_Colo205_008)分別在100 mm^3 至150 mm^3 之平均腫瘤體積下開始動物處理。對小鼠每週一次以Avastin(10 mg/kg)處理，歷時5週之時間。

二次處理：

此後，小鼠隨機接受第二次處理且分為四組，每組10隻小鼠。在二次處理開始時在第51天，腫瘤體積在336至341 mm^3 範圍內。對小鼠以下表所示之不同化合物每週一次經腹膜內處理。

組	動物數	化合物	劑量(mg/kg) (nMol/kg)	投與途徑/ 模式	處理 次數	累積劑量 (mg/kg)
11	10	Avastin	10 mg/kg (68 nMol/kg)	每週一次， 腹膜內	11	110
12	10	ANG2i- LC06	10 mg/kg (68 nMol/kg)	每週一次， 腹膜內	6	60
13	10	ANG2i- LC06+ Avastin	10 mg/kg (68 nMol/kg)+ 10 mg/kg (68 nMol/kg)	每週一次， 腹膜內 每週一次， 腹膜內	6 11	60 110
14	10	TvAb- 2441-貝伐 單抗-LC06	13 mg/kg (64 nMol/kg)	每週一次， 腹膜內	6	78

監測：

每週兩次監控動物之健康狀況。在細胞注射後每週兩次記錄體重。在分階段之日開始且隨後在整個處理期間每週兩次用測徑規量測腫瘤尺寸。根據NCI方案計算腫瘤體積(腫瘤重量= $1/2ab^2$ ，其中「a」及「b」分別為腫瘤之長直徑及短直徑)。終止標準為臨界腫瘤質量(達1.7 g或 $\varnothing > 1.5$ cm)、體重損失與基線相差超過20%、腫瘤潰爛或動物總體狀況不良。

結果：第91天基於中值之腫瘤生長抑制(以百分比計)

	TGI
ANG2i-LC06 10 mg/kg(68 nMol/kg)腹膜內；Avastin 10 mg/kg(68 nMol/kg)腹膜內	45.3
ANG2i-LC06 10 mg/kg腹膜內(68 nMol/kg)	44.4
TvAb-2441-貝伐單抗-LC06_13 mg/kg腹膜內(64 nMol/kg)	60.4

結果顯示，在貝伐單抗(Avastin)抗性異種移植腫瘤模型 Colo205 中在 Scid Beige 小鼠中，雙重專一性<VEGF-ANG-2>抗體 TvAb-2441-貝伐單抗-LC06 相較於以單獨之單專一性抗體 ANG2i-LC06 或 ANG2i-LC06 與 Avastin 之組合處理顯示較高腫瘤生長抑制率(在較低劑量下)。

實例 17

在皮下 Calu-3 NSCLC 異種移植中腫瘤血管生成之活體內抑制

-使用經標記之抗 CD31 經由非侵入式活體內成像偵測血管生成

細胞株及培養條件：

自患有肺癌之男性高加索人建立此人類肺腺癌細胞株。自 Roche, Kamakura 獲得細胞且室內繼代用於處理細胞庫。在 37°C 下，在水飽和氛圍下，在 5% CO₂ 下，在補充有 10% 胎牛血清(PAN Biotech, Germany)及 2 mM L-麩胺鹽胺(PAN Biotech, Germany)之 RPMI1640 培養基(PAN Biotech, Germany)中以常規方式培養腫瘤細胞。以胰蛋白酶/EDTA 1×(PAN)進行培養繼代，每週分裂一次。

動物：

雌性 BALB/c 裸小鼠；到達時年齡 4-5 週(購自 Charles River Germany)，根據所提交之準則(GV-Solas; Felasa; TierschG)保持於 12 小時光照/12 小時黑暗之每日循環的特定無病原體條件下。實驗研究方案係由地方政府評審及批准。到達後，將動物保持在動物設施之隔離部分中歷時一

週，以習慣新環境且以供觀測。在常規基礎上進行連續健康監測。任意地提供膳食(Provimi Kliba 3337)及水(酸化 pH 2.5-3)。研究開始時，小鼠年齡為約10週。

腫瘤細胞注射：

在注射當天，自培養瓶(Greiner)收集腫瘤細胞(胰蛋白酶-EDTA)且轉移至50 ml培養基中，洗滌1次且再懸浮於PBS中。在使用PBS進行另一洗滌步驟及過濾(細胞過濾器；Falcon $\phi 100\ \mu\text{m}$)後，將最終細胞效價調整為 $5.0 \times 10^7/\text{ml}$ 。以移液管小心地混合腫瘤細胞懸浮液以避免細胞聚集。此後，使用寬針(1.10×40 mm)將細胞懸浮液填充至1.0 ml結核菌素注射器(Braun Melsungen)中；改變針尺寸(0.45×25 mm)以供注射且每次注射使用新針。使用具有預培育室(塑膠玻璃)、個別小鼠鼻罩(矽)及非可燃性或非爆炸性麻醉化合物異氟醚(cp-pharma)之小動物Stephens吸入單元在封閉循環系統中進行麻醉。在注射之前兩天，剃去動物皮毛且以解剖鉗小心地提起經麻醉動物之皮膚以供細胞注射，且在動物右側腹皮下注射100 μl 細胞懸浮液(= 5.0×10^6 個細胞)。

動物處理

在研究第35天，將小鼠根據其體重及腫瘤尺寸隨機分為統計學上均勻分布之組。對於以治療性抗體處理而言，各組由10隻小鼠組成且每週一次經腹膜內以治療性抗體進行處理，歷時6週時間段。(參見圖19)。

第1組：媒劑(Xolair)10 mg/kg

第2組： Avastin 10 mg/kg

第3組： 單專一性<VEGF>Avastin 10 mg/kg加上單專一性
<ANG-2> Ang2i-LC06 10 mg/kg(=Avastin/Ang2i-
LC06)的組合

第4組： 雙重專一性<VEGF-ANG-2>抗體 2441-Avastin-
scFv-LC06 13.3 mg/kg

監測：

每週兩次監控動物之健康狀況。在細胞注射後每週兩次記錄體重。在分階段之日開始且隨後在整個處理期間每週兩次用測徑規量測腫瘤尺寸。根據NCI方案計算腫瘤體積(腫瘤重量= $1/2ab^2$ ，其中「a」及「b」分別為腫瘤之長直徑及短直徑)。終止標準為臨界腫瘤質量(達1.7 g或 $\varnothing > 1.5$ cm)、體重損失與基線相差超過20%、腫瘤潰爛或動物總體狀況不良。

以經標記抗CD 31抗體監測血管及血管生成

初步研究顯示抗CD31抗體為最適於使腫瘤維管結構成像之藥劑。此藥劑靶向小鼠內皮CD31受體且以低信號背景比顯現單一血管。因此，抗CD31抗體之成像代表一種使腫瘤維管結構成像之可行方式。在第35天、第49天及第79天，對各治療組選擇3隻小鼠且每隻小鼠經靜脈內注射50 μ g經有機螢光團Alexa610共價標記之抗CD3抗體。在吸入麻醉下在每次投與經標記抗體後24小時進行近紅外成像。藉由使用MAESTRO系統之影像比較工具來顯現腫瘤維管結構之增加或減少。在以對照mab Xolair及治療性抗

體 Avastin 處理下，自第 35 天至第 79 天觀測到腫瘤血管增加。與此相反，以 Avastin 加上 Ang2i-LC06 及 2441-Avastin-scFv-LC06 組合處理展現腫瘤維管結構減少(圖 19)。

藉由手工繪出量測區域來定量腫瘤區域，且以強度值評估信號強度(總信號/暴露時間)。第 35 天至第 49 天及第 49 天至第 79 天的 CD31 信號之平均變化繪示於圖 19 中。所有處理組均顯示第 35 天至第 49 天腫瘤維管結構有增加。儘管在第 1 組(Xolair)及第 2 組(Avastin)中 CD31 腫瘤信號穩定增加，但第 3 組(Avastin 加上 <ANG-2> Ang2i-LC06 之組合)及第 4 組(雙重專一性 <VEGF-ANG-2> 抗體 2441-Avastin-scFv-LC06)中腫瘤維管結構顯著減少，同時第 4 組顯然顯示最明顯的抗血管生成效應(圖 19)。

在最後活體內成像研究後立即對腫瘤進行組織培養(第 79 天)，固定於福馬林中且嵌埋入石蠟中以供離體研究。螢光顯微法顯示在經對照 mab Xolair 處理之腫瘤中有許多清晰的毛細管。在以 Avastin 處理之小鼠中觀測到若干腫瘤血管。與此對比，處理組 3 及 4 相較於處理組 1 及 2 在腫瘤中具有顯著較少及較不清晰之血管，而第 4 組顯示最明顯的效應。第 4 組顯示較低微血管密度，毛細管普遍較小且未結構化，且其展示如第 1 組、第 2 組及第 3 組之較弱抗 CD31 螢光信號。組織化學 HE 染色顯示雙重專一性抗體之處理組中腫瘤內壞死區達 90%，第 4 組即顯示出同樣結果。

實例 18

在分階段皮下 Colo205 異種移植模型中在 Scid Beige 小鼠中

雙重專一性抗體<VEGF-ANG-2>之活體內功效且與親本單專一性抗體(單獨或組合)比較

細胞株及培養條件：

Colo205人類結腸直腸癌細胞最初獲自ATCC，且在擴展後寄存於Roche Penzberg國際細胞庫中。在37℃下，在水飽和氛圍中，在5% CO₂下，在補充有10%胎牛血清(PAA Laboratories, Austria)及2 mM L-麩胺鹽胺之RPMI 1640培養基(PAA, Laboratories, Austria)中以常規方式培養腫瘤細胞株。第2-5繼代用於移植。

動物：

雌性SCID Beige小鼠；到達時年齡4-5週(購自Charles River Germany)，根據所提交之準則(GV-Solas; Felasa; TierschG)保持於12小時光照/12小時黑暗之每日循環的特定無病原體條件下。實驗研究方案係由地方政府評審及批准。到達後，將動物保持在動物設施之隔離部分中歷時一週，以習慣新環境且以供觀測。在常規基礎上進行連續健康監測。任意地提供膳食(Provimi Kliba 3337)及水(酸化pH 2.5-3)。研究開始時，小鼠年齡為約10週。

腫瘤細胞注射：

在注射當天，將Colo205細胞離心，洗滌1次且再懸浮於PBS中。在以PBS作另一次洗滌後，使用細胞計數器及分析器系統(Vi-CELL, Beckman Coulter)測定細胞濃度及細胞尺寸。為了注射Colo205細胞，將最終效價調整至每毫升 5.0×10^7 個細胞，活力約為90%。隨後，將100 µl此懸浮

液(對應於每隻動物 2.5×10^6 個細胞)皮下注射至小鼠右側腹中。

分別在細胞移植後16天(研究Ang2_PZ_Colo205_009)的隨機分組當天，在 100 mm^3 之平均腫瘤體積下開始動物處理。

研究Ang2_PZ_Colo205_009之給藥時程：

動物數	化合物	劑量(mg/kg)	投與途徑/模式
10	Xolair	10	每週一次，腹膜內
10	<VEGF> Avastin	10	每週一次，腹膜內
10	<ANG-2> Ang2i-LC06	10	每週一次，腹膜內
10	Ang2i-LC06 +Avastin	10 10	每週一次，腹膜內 每週一次，腹膜內
10	<VEGF-ANG-2> TvAb-2441-貝伐單抗-LC06	13.3	每週一次，腹膜內
10	<VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-CH1-CL	20	每週一次，腹膜內
10	<VEGF-ANG-2> scFAB-Avastin-LC06-2620	16.6	每週一次，腹膜內

監測：

每週兩次監測動物之健康狀況。在細胞注射後每週兩次記錄體重。在分階段之日開始且隨後在整個處理期間每週兩次用測徑規量測腫瘤尺寸。根據NCI方案計算腫瘤體積(腫瘤重量 $=1/2ab^2$ ，其中「a」及「b」分別為腫瘤之長直徑及短直徑)。終止標準為臨界腫瘤質量(達1.7 g或 $\varnothing > 1.5 \text{ cm}$)、體重損失與基線相差超過20%、腫瘤潰爛或動物總

體狀況不良。

結果：

第61天基於中值之腫瘤生長抑制(TGI)(以百分比計)

	TGI
<VEGF> Avastin	66
<ANG-2> Ang2i-LC06	47
Ang2i-LC06 +Avastin	78
<VEGF-ANG-2> TvAb-2441-貝伐單抗-LC06	87
<VEGF-ANG-2> Avastin-LC06-CH1-CL	92
<VEGF-ANG-2> scFAB-Avastin-LC06-2620	86

結果顯示，所有三種雙重專一性<VEGF-ANG-2>Avastin (貝伐單抗)-ANG2i-LC06抗體(均基於貝伐單抗序列SEQ ID No: 7及8且基於ANG2i-LC06序列SEQ ID No: 52及53)在異種移植腫瘤模型Colo205中在Scid Beige小鼠中相較於以單獨之單專一性抗體ANG2i-LC06及Avastin或ANG2i-LC06與Avastin之組合處理顯示較高腫瘤生長抑制率。

【圖式簡單說明】

圖1A：本發明之結合VEGF及ANG-2之雙重專一性抗體的一項四價實施例之示意性結構，其中抗原A或B中之一者為VEGF，而另一者為ANG-2。該結構係基於經由肽連接子連接有結合於抗原B之兩個(視情況經雙硫鍵穩定之)單鏈Fv的結合抗原A之全長抗體。

圖1B：使用TvAb命名法產生之雙重專一性四價抗體(參

見實例)之圖示，其中 scFv 之雙硫鍵經穩定抑或未經穩定。

圖 2A：雙硫鍵穩定之<VEGF-ANG-2>雙重專一性四價抗體(=<VEGF-ANG-2> TvAb6；第 2331 號，參見表 3)的圖示。

圖 2B：用於表現雙硫鍵穩定之<VEGF-ANG-2> TvAb6 的經修飾重鏈及輕鏈載體之質體圖。

圖 3：在還原及非還原條件下經純化之雙硫鍵穩定<VEGF-ANG-2> TvAb6 相較於「標準」人類 IgG1 抗體 G6-31(<VEGF> HuMab G6-31)的 SDS-PAGE 圖。

圖 4：經純化之雙硫鍵穩定<VEGF-ANG-2> TvAb6 相較於「標準」人類 IgG1 抗體 G6-31 之尺寸排阻層析譜圖，其顯示雙硫鍵穩定之 TvAb6 在純化後不再形成聚集體。

圖 5：VEGF 結合 ELISA 之示意圖及結果。雙硫鍵穩定之<VEGF-ANG-2> TvAb6 結合 VEGF，與<VEGF> G6-31 相當。<ANG-2> Mab536 不與 VEGF 結合。

圖 6A：ANG-2 結合 ELISA 之示意圖及結果。雙硫鍵穩定之<VEGF-ANG-2> TvAb6 結合 ANG-2，與<ANG-2> Mab536 相當。<VEGF> G6-31 不與 ANG-2 結合。

圖 6B：以表面電漿共振(Biacore)進行之 ANG-2 結合分析的示意圖及結果。雙硫鍵穩定之<VEGF-ANG-2> TvAb6 以與<ANG-2> Mab536 相當之親和力結合 ANG-2。

圖 7：VEGF-ANG-2 橋接 ELISA 之示意圖及結果。雙硫鍵穩定之<VEGF-ANG-2> TvAb6 同時結合 VEGF 及 ANG-2，

而 <VEGF> G6-31 及 <ANG-2> Mab536 不能夠同時結合 VEGF 及 ANG-2。

圖 8a：在分階段皮下 Colo205 異種移植模型中在 Scid Beige 小鼠中雙硫鍵穩定之 <VEGF-ANG-2> TvAb6 相較於 <ANG-2> Mab536、<VEGF> G6-31 及 Mab536 與 G6-31 之組合的功效(研究 ANG2_Pz_Colo205_003)。

圖 8b：在分階段皮下 Colo205 異種移植模型中在 Scid Beige 小鼠中雙硫鍵穩定之 <VEGF-ANG-2> TvAb6 相較於 <ANG-2> Mab536、<VEGF> G6-31 及 Mab536 與 G6-31 之組合的功效(研究 ANG2_Pz_Colo205_005)。

圖 9：利用雙重專一性四價抗體 <VEGF-ANG-2> TvAb6 阻斷 VEGF 誘導之管形成的結果。

圖 10A+B：利用 b 雙硫鍵穩定之 <VEGF-ANG-2> TvAb6 阻斷 VEGF 誘導之管形成的定量分析結果。

圖 11：以表面電漿共振(Biacore)進行之 VEGF 結合分析的示意圖。

圖 12：兩種 <VEGF> 抗體 <VEGF-Ang-2> TvAb6 及 <VEGF> G6-31 在 Ka-Kd 圖中之動力學特徵。

圖 13：偵測 ANGPT2 及 VEGF 與雙重專一性抗體之同時結合的表面電漿共振(Biacore)檢定之示意圖。

圖 14：表面電漿共振(Biacore)實驗之結果，其顯示 TvAb6 同時結合於 ANGPT2 及 VEGF。

圖 15A+B：A) <VEGF-ANG-2> 雙重專一性抗體之雙重專一性及同時 Biacore 結合檢定之圖示。B) Biacore 資料，其

展示 ANG-2 及 VEGF 與 TvAb-2441-貝伐單抗-LC06 同時結合。

圖 16A+B：雙重專一性抗體<VEGF-ANG-2> TvAb-2441-貝伐單抗-LC06 及<VEGF-ANG-2> TvAb-2441 相較於抗-Ang2 抗體<ANG-2> Ang2i-LC06 及<ANG-2> Ang2k-LC08 的 Tie2 磷酸化。

圖 17：人類血管生成素相互作用 ELISA 之圖示。

圖 18：<VEGF-ANG-2> TvAb-2441-貝伐單抗-LC06 及<VEGF-ANG-2> TvAb-2441-貝伐單抗-LC08 及貝伐單抗對 VEGF 誘導之 HUVEC 增殖的抑制之比較結果。

圖 19：在利用經標記之抗 CD31 抗體及治療期間 CD31 信號之相對變化監測的 Calu3 異種移植模型中雙重專一性抗體<VEGF-ANG-2> 貝伐單抗-LC06 抗體相較於<ANG-2> ANG2i-LC06 及<ANG-2> ANG2i-LC06 與 Avastin(貝伐單抗)之組合的活體內抗血管生成功效。

序列表

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司

<120> 雙重專一性之抗-VEGF/抗-ANG-2 抗體

<130> 25401 FT

<140> 098134012

<141> 2009-10-07

<150> EP 08017607.6; EP 08021834.0

<151> 2008-10-08; 2008-12-16

<160> 136

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR3，<VEGF>貝伐單抗 (bevacizumab)

<400> 1

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR2，<VEGF>貝伐單抗

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR1，<VEGF>貝伐單抗

<400> 3

Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR3，<VEGF>貝伐單抗

<400> 4

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr

1

5

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR2，<VEGF>貝伐單抗

<400> 5

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR1，<VEGF>貝伐單抗

<400> 6

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 7
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈可變域，<VEGF>貝伐單抗

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 107

<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈可變域，<VEGF>貝伐單抗

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR3，<VEGF>蘭尼單抗 (ranibizumab)

<400> 9

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR2，<VEGF>蘭尼單抗

<400> 10

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR1，<VEGF>蘭尼單抗

<400> 11

His Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR3，<VEGF>蘭尼單抗

<400> 12

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR2，<VEGF>蘭尼單抗

<400> 13

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR1，<VEGF>蘭尼單抗

<400> 14

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 15

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈可變域，<VEGF>蘭尼單抗

<400> 15

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

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

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

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

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈可變域，<VEGF>蘭尼單抗

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR3，<VEGF> HuMab G6-31

<400> 17

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR2，<VEGF> HuMab G6-31

<400> 18

Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR1, <VEGF> HuMab G6-31

<400> 19

Asp Tyr Trp Ile His
 1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR3, <VEGF> HuMab G6-31

<400> 20

Gln Gln Gly Tyr Gly Asn Pro Phe Thr
 1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR2, <VEGF> HuMab G6-31

<400> 21

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR1, <VEGF> HuMab G6-31

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 23

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈可變域, <VEGF> HuMab G6-31

<400> 23

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

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

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈可變域，<VEGF> HuMab G6-31

<400> 24

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Asn Pro Phe
85 90 95

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

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR3，<ANG-2> Mab 536

<400> 25

Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Tyr
1 5 10

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR2，<ANG-2> Mab 536

<400> 26

Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR1，<ANG-2> Mab 536

<400> 27

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR3，<ANG-2> Mab 536

<400> 28

Met Gln Gly Thr His Trp Pro Pro Thr
1 5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR2，<ANG-2> Mab 536

<400> 29

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR1，<ANG-2> Mab 536

<400> 30

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 31

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈可變域，<ANG-2> Mab 536

<400> 31

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈可變域，<ANG-2> Mab 536

<400> 32

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> (G4S)4連接子
 <400> 33
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser
 20
 <210> 34
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 34
 Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 1 5 10 15
 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 20 25 30
 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 35 40 45
 Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 50 55 60
 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 65 70 75 80
 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 85 90 95
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100
 <210> 35
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 35

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 36
<211> 327
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 37
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 38

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val
1 5

<210> 39

<211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈CDR2，<ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 39

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈CDR1，<ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 40

Asn Ala Trp Met Ser
 1 5

<210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR3，<ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 41

Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Met Tyr Thr
 1 5 10

<210> 42
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR2，<ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 42

His Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5

<210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR1，<ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 43

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Arg Leu Asn
 1 5 10

<210> 44
 <211> 118

<212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈可變域，<ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 44

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

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

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Thr Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 45
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈可變域，<ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 45

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Met
 85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr

100 105 110

<210> 46
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈CDR3，<ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 46

Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly
 1 5 10 15

Ala Phe Asp Ile
 20

<210> 47
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈CDR2，<ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 47

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 48
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈CDR1，<ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 48

Gly Tyr Tyr Met His
 1 5

<210> 49
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR3，<ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 49

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val
 1 5 10

<210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR2，<ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 50

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5<210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工<220>
<223> 輕鏈CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 51

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
1 5 10<210> 52
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工<220>
<223> 重鏈可變域, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 52

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 53
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工<220>
<223> 輕鏈可變域, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 53

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

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

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

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

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

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

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

<210> 54
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR3 , <ANG-2> Ang2i_LC07

<400> 54

Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly
1 5 10 15

Ala Phe Asp Ile
20

<210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR2 , <ANG-2> Ang2i_LC07

<400> 55

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 56
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR1 , <ANG-2> Ang2i_LC07

<400> 56

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈CDR3 , <ANG-2> Ang2i_LC07

<400> 57

Gln Val Trp Asp Ser Asp Ser Asp Gln Gly Val
1 5 10

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈CDR2 , <ANG-2> Ang2i_LC07

<400> 58

Asp Asp Ser Glu Arg Pro Ser
1 5

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈CDR1 , <ANG-2> Ang2i_LC07

<400> 59

Gly Gly Asn Phe Ile Gly Gly Lys Ser Val His
1 5 10

<210> 60
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈可變域 , <ANG-2> Ang2i_LC07

<400> 60

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 61
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈可變域，<ANG-2> Ang2i_LC07

<400> 61

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

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

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

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

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

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

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

<210> 62
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR3，<ANG-2> Ang2k_LC08

<400> 62

Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 63
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR2 , <ANG-2> Ang2k_LC08

<400> 63

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR1 , <ANG-2> Ang2k_LC08

<400> 64

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR3 , <ANG-2> Ang2k_LC08

<400> 65

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val
1 5 10

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR2 , <ANG-2> Ang2k_LC08

<400> 66

Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 67

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR1 , <ANG-2> Ang2k_LC08

<400> 67

Ser Gly Phe Ala Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Asn
1 5 10

<210> 68

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈可變域 , <ANG-2> Ang2k_LC08

<400> 68

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈可變域，<ANG-2> Ang2k_LC08

<400> 69

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

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

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

Ile Tyr Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

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

<210> 70

<211> 7

<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR3 , <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 70

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val
1 5

<210> 71
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR2 , <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 71

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 72
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR1 , <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 72

Asn Ala Trp Met Ser
1 5

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈CDR3 , <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 73

Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro
1 5

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈CDR2 , <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 74

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 75
<211> 16
<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR1，<ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 75

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 76

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈可變域，<ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 76

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

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

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Thr Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val Trp Gly Ser Pro Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 77

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈可變域，<ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 77

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

Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr
20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr
100 105

<210> 78
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR3，<ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 78

Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly
1 5 10 15

Ala Phe Asp Ile
20

<210> 79
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR2，<ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 79

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 80
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR1，<ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 80

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 81
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈CDR3，<ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 81

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val
1 5 10

<210> 82
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈CDR2，<ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 82

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 83
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈CDR1，<ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 83

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
1 5 10

<210> 84
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈可變域，<ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 84

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 85
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈可變域，<ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 85

Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr
 1 5 10 15

Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln
 20 25 30

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg
 35 40 45

Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr
 50 55 60

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

Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val Phe Gly Gly
 85 90 95

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105

<210> 86
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈CDR3，<ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 86

Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 87
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈CDR2，<ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 87

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 88

<211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈CDR1，<ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 88

Ser Tyr Gly Met His
 1 5

<210> 89
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR3，<ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 89

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Pro Gly Val
 1 5 10

<210> 90
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR2，<ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 90

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 1 5

<210> 91
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR1，<ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 91

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
 1 5 10

<210> 92
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈可變域，<ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 92

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 93
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈可變域，<ANG-2> Ang2k_LC11

<220>
<221> misc_feature
<222> (98)..(98)
<223> Xaa可為任何天然存在之胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (102)..(102)
<223> Xaa可為任何天然存在之胺基酸

<400> 93

Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr
1 5 10 15

Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln
20 25 30

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg
35 40 45

Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr
50 55 60

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

Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Pro Gly Val Phe Gly
85 90 95

Gly Xaa Thr Lys Leu Xaa Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 94
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工

<220>
 <223> 重鏈CDR3，<VEGF> B20-4.1

<400> 94

Trp Gly His Ser Thr Ser Pro Trp Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 95
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈CDR2，<VEGF> B20-4.1

<400> 95

Ala Ile Trp Pro Phe Gly Gly Tyr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 96
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈CDR1，<VEGF> B20-4.1

<400> 96

Phe Ser Ile Asn Gly Ser Trp Ile
 1 5

<210> 97
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR3，<VEGF> B20-4.1

<400> 97

Gln Gln Ser Asn Thr Ser Pro Leu Thr
 1 5

<210> 98
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR2，<VEGF> B20-4.1

<400> 98

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 99
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR1，<VEGF> B20-4.1

<400> 99

Arg Ala Ser Gln Val Ile Arg Arg Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 100

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈可變域，<VEGF> B20-4.1

<400> 100

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Ile Asn Gly Ser
20 25 30

Trp Ile Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Ala Ile Trp Pro Phe Gly Gly Tyr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Gly His Ser Thr Ser Pro Trp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val
115

<210> 101

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈可變域，<VEGF> B20-4.1

<400> 101

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Ser Pro Leu
85 90 95

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

<210> 102

<211> 730

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-貝伐單抗-LC06之貝伐單抗重鏈
Ang2i_LC06 scFv融合肽

<400> 102

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser
 465 470 475 480
 Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
 485 490 495
 Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln

500 505 510

Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser
515 520 525

Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr
530 535 540

Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg
545 550 555 560

Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr
565 570 575

Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp
580 585 590

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro
610 615 620

Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala
625 630 635 640

Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp
645 650 655

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp
660 665 670

Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
675 680 685

Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu
690 695 700

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val
705 710 715 720

Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
725 730

<210> 103
<211> 727
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-貝伐單抗-LC08之貝伐單抗重鏈
Ang2i_LC08 scFv融合肽

<400> 103

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

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

20	25	30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45		
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe 50 55 60		
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val 100 105 110		
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly 115 120 125		
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 130 135 140		
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val 145 150 155 160		
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe 165 170 175		
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val 180 185 190		
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val 195 200 205		
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys 210 215 220		
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu 225 230 235 240		
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr 245 250 255		
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val 260 265 270		
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val 275 280 285		
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser 290 295 300		
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu 305 310 315 320		

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser
 465 470 475 480
 Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
 485 490 495
 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln
 500 505 510
 Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly
 515 520 525
 Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 530 535 540
 Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 545 550 555 560
 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Thr Leu Asp Ile
 565 570 575
 Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 580 585 590
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 595 600 605
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro
 610 615 620

Pro Ser Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser
625 630 635 640

Gly Phe Ala Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln
645 650 655

Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Asn Asp Gln Arg
660 665 670

Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser
675 680 685

Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
690 695 700

Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Cys
705 710 715 720

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
725

<210> 104
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 貝伐單抗之輕鏈

<400> 104

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 105

<211> 191

<212> PRT

<213> 智人

<400> 105

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly
130 135 140

Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr
145 150 155 160

Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
165 170 175

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
180 185 190

<210> 106
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 具有前導序列及His標籤之人類血管生成素-2 (ANG-2)

<400> 106

Met Trp Gln Ile Val Phe Phe Thr Leu Ser Cys Asp Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Ala Tyr Asn Asn Phe Arg Lys Ser Met Asp Ser Ile Gly Lys Lys
 20 25 30

Gln Tyr Gln Val Gln His Gly Ser Cys Ser Tyr Thr Phe Leu Leu Pro
 35 40 45

Glu Met Asp Asn Cys Arg Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Val Ser Asn Ala
 50 55 60

Val Gln Arg Asp Ala Pro Leu Glu Tyr Asp Asp Ser Val Gln Arg Leu
 65 70 75 80

Gln Val Leu Glu Asn Ile Met Glu Asn Asn Thr Gln Trp Leu Met Lys
 85 90 95

Leu Glu Asn Tyr Ile Gln Asp Asn Met Lys Lys Glu Met Val Glu Ile
 100 105 110

Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn Gln Thr Ala Val Met Ile Glu Ile Gly
 115 120 125

Thr Asn Leu Leu Asn Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys Leu Thr Asp
 130 135 140

Val Glu Ala Gln Val Leu Asn Gln Thr Thr Arg Leu Glu Leu Gln Leu
 145 150 155 160

Leu Glu His Ser Leu Ser Thr Asn Lys Leu Glu Lys Gln Ile Leu Asp
 165 170 175

Gln Thr Ser Glu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Lys Asn Ser Phe Leu Glu
 180 185 190

Lys Lys Val Leu Ala Met Glu Asp Lys His Ile Ile Gln Leu Gln Ser
 195 200 205

Ile Lys Glu Glu Lys Asp Gln Leu Gln Val Leu Val Ser Lys Gln Asn
 210 215 220

Ser Ile Ile Glu Glu Leu Glu Lys Lys Ile Val Thr Ala Thr Val Asn
 225 230 235 240

Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln His Asp Leu Met Glu Thr Val Asn
 245 250 255

Asn Leu Leu Thr Met Met Ser Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asp Pro Thr

260	265	270
Val Ala Lys Glu Glu Gln Ile Ser Phe Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe 275 280 285		
Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn 290 295 300		
Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly Gly 305 310 315 320		
Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln 325 330 335		
Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu 340 345 350		
Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg 355 360 365		
Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr 370 375 380		
Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg 385 390 395 400		
Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile 405 410 415		
Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys 420 425 430		
Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp 435 440 445		
Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln 450 455 460		
Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser 465 470 475 480		
Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala Asp Phe 485 490 495		
Ser Gly His His His His His His 500		
<210> 107		
<211> 506		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 具有前導序列及His標籤之人類血管生成素-1 (ANG-1)		
<400> 107		
Met Thr Val Phe Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Ala Ile Leu Thr His 1 5 10 15		

Ile Gly Cys Ser Asn Gln Arg Arg Ser Pro Glu Asn Ser Gly Arg Arg
 20 25 30
 Tyr Asn Arg Ile Gln His Gly Gln Cys Ala Tyr Thr Phe Ile Leu Pro
 35 40 45
 Glu His Asp Gly Asn Cys Arg Glu Ser Thr Thr Asp Gln Tyr Asn Thr
 50 55 60
 Asn Ala Leu Gln Arg Asp Ala Pro His Val Glu Pro Asp Phe Ser Ser
 65 70 75 80
 Gln Lys Leu Gln His Leu Glu His Val Met Glu Asn Tyr Thr Gln Trp
 85 90 95
 Leu Gln Lys Leu Glu Asn Tyr Ile Val Glu Asn Met Lys Ser Glu Met
 100 105 110
 Ala Gln Ile Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr Met Leu
 115 120 125
 Glu Ile Gly Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys
 130 135 140
 Leu Thr Asp Val Glu Thr Gln Val Leu Asn Gln Thr Ser Arg Leu Glu
 145 150 155 160
 Ile Gln Leu Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln
 165 170 175
 Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser
 180 185 190
 Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu
 195 200 205
 Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr
 210 215 220
 Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala
 225 230 235 240
 Thr Thr Asn Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu Met Asp
 245 250 255
 Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu
 260 265 270
 Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp
 275 280 285
 Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile
 290 295 300
 Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn

305 310 315 320
 Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp
 325 330 335
 Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser
 340 345 350
 Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln
 355 360 365
 Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg
 370 375 380
 Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn
 385 390 395 400
 Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser
 405 410 415
 Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn
 420 425 430
 Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp
 435 440 445
 Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala
 450 455 460
 Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys
 465 470 475 480
 Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu
 485 490 495
 Asp Phe Ser Gly His His His His His His
 500 505
 <210> 108
 <211> 1124
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 108
 Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Gly Thr Val Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu
 20 25 30
 Pro Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly
 35 40 45
 Trp Arg Pro His Glu Pro Ile Thr Ile Gly Arg Asp Phe Glu Ala Leu
 50 55 60
 Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg

65		70		75		80
Glu Trp Ala Lys	Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile					
	85			90		95
Asn Gly Ala Tyr	Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg					
	100			105		110
Ile Arg Thr	Met Lys Met Arg Gln Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr					
	115			120		125
Leu Thr Met	Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn Ile Ser Phe Lys					
	130			135		140
Lys Val Leu Ile	Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser					
	145			150		155
Phe Ile His	Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val					
	165			170		175
His Leu Pro	His Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg					
	180			185		190
Tyr Ile Gly	Gly Asn Leu Phe Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val					
	195			200		205
Arg Arg Cys	Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn His Leu Cys					
	210			215		220
Thr Ala Cys	Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys					
	225			230		235
Ile Cys Pro	Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu					
	245			250		255
Leu His Thr	Phe Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu					
	260			265		270
Gly Cys Lys	Ser Tyr Val Phe Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser					
	275			280		285
Cys Ala Thr	Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys His Pro					
	290			295		300
Gly Phe Tyr	Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly					
	305			310		315
Glu Met Cys	Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln					
	325			330		335
Gly Leu Gln	Cys Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Thr Pro Lys Ile					
	340			345		350
Val Asp Leu	Pro Asp His Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys Phe Asn Pro					
	355			360		365

Ile Cys Lys Ala Ser Gly Trp Pro Leu Pro Thr Asn Glu Glu Met Thr
 370 375 380
 Leu Val Lys Pro Asp Gly Thr Val Leu His Pro Lys Asp Phe Asn His
 385 390 395 400
 Thr Asp His Phe Ser Val Ala Ile Phe Thr Ile His Arg Ile Leu Pro
 405 410 415
 Pro Asp Ser Gly Val Trp Val Cys Ser Val Asn Thr Val Ala Gly Met
 420 425 430
 Val Glu Lys Pro Phe Asn Ile Ser Val Lys Val Leu Pro Lys Pro Leu
 435 440 445
 Asn Ala Pro Asn Val Ile Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Val Ile Asn
 450 455 460
 Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Pro Ile Lys Ser Lys Lys
 465 470 475 480
 Leu Leu Tyr Lys Pro Val Asn His Tyr Glu Ala Trp Gln His Ile Gln
 485 490 495
 Val Thr Asn Glu Ile Val Thr Leu Asn Tyr Leu Glu Pro Arg Thr Glu
 500 505 510
 Tyr Glu Leu Cys Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly Gly Glu Gly
 515 520 525
 His Pro Gly Pro Val Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro
 530 535 540
 Pro Pro Arg Gly Leu Asn Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Thr Leu Asn
 545 550 555 560
 Leu Thr Trp Gln Pro Ile Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Val
 565 570 575
 Glu Val Glu Arg Arg Ser Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys
 580 585 590
 Val Pro Gly Asn Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu His Pro Arg
 595 600 605
 Glu Gln Tyr Val Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu
 610 615 620
 Trp Ser Glu Asp Leu Thr Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro
 625 630 635 640
 Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val
 645 650 655
 Ile Ser Trp Thr Ile Leu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Thr Ile
 660 665 670

Arg Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Val Asp Val Lys
 675 680 685
 Ile Lys Asn Ala Thr Ile Thr Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro
 690 695 700
 Glu Thr Ala Tyr Gln Val Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser
 705 710 715 720
 Ser Asn Pro Ala Phe Ser His Glu Leu Val Thr Leu Pro Glu Ser Gln
 725 730 735
 Ala Pro Ala Asp Leu Gly Gly Gly Lys Met Leu Leu Ile Ala Ile Leu
 740 745 750
 Gly Ser Ala Gly Met Thr Cys Leu Thr Val Leu Leu Ala Phe Leu Ile
 755 760 765
 Ile Leu Gln Leu Lys Arg Ala Asn Val Gln Arg Arg Met Ala Gln Ala
 770 775 780
 Phe Gln Asn Val Arg Glu Glu Pro Ala Val Gln Phe Asn Ser Gly Thr
 785 790 795 800
 Leu Ala Leu Asn Arg Lys Val Lys Asn Asn Pro Asp Pro Thr Ile Tyr
 805 810 815
 Pro Val Leu Asp Trp Asn Asp Ile Lys Phe Gln Asp Val Ile Gly Glu
 820 825 830
 Gly Asn Phe Gly Gln Val Leu Lys Ala Arg Ile Lys Lys Asp Gly Leu
 835 840 845
 Arg Met Asp Ala Ala Ile Lys Arg Met Lys Glu Tyr Ala Ser Lys Asp
 850 855 860
 Asp His Arg Asp Phe Ala Gly Glu Leu Glu Val Leu Cys Lys Leu Gly
 865 870 875 880
 His His Pro Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Glu His Arg Gly
 885 890 895
 Tyr Leu Tyr Leu Ala Ile Glu Tyr Ala Pro His Gly Asn Leu Leu Asp
 900 905 910
 Phe Leu Arg Lys Ser Arg Val Leu Glu Thr Asp Pro Ala Phe Ala Ile
 915 920 925
 Ala Asn Ser Thr Ala Ser Thr Leu Ser Ser Gln Gln Leu Leu His Phe
 930 935 940
 Ala Ala Asp Val Ala Arg Gly Met Asp Tyr Leu Ser Gln Lys Gln Phe
 945 950 955 960
 Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn Tyr
 965 970 975

Val Ala Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ser Arg Gly Gln Glu Val Tyr
 980 985 990

Val Lys Lys Thr Met Gly Arg Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Ile Glu
 995 1000 1005

Ser Leu Asn Tyr Ser Val Tyr Thr Thr Asn Ser Asp Val Trp Ser
 1010 1015 1020

Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Val Ser Leu Gly Gly Thr Pro
 1025 1030 1035

Tyr Cys Gly Met Thr Cys Ala Glu Leu Tyr Glu Lys Leu Pro Gln
 1040 1045 1050

Gly Tyr Arg Leu Glu Lys Pro Leu Asn Cys Asp Asp Glu Val Tyr
 1055 1060 1065

Asp Leu Met Arg Gln Cys Trp Arg Glu Lys Pro Tyr Glu Arg Pro
 1070 1075 1080

Ser Phe Ala Gln Ile Leu Val Ser Leu Asn Arg Met Leu Glu Glu
 1085 1090 1095

Arg Lys Thr Tyr Val Asn Thr Thr Leu Tyr Glu Lys Phe Thr Tyr
 1100 1105 1110

Ala Gly Ile Asp Cys Ser Ala Glu Glu Ala Ala
 1115 1120

<210> 109
 <211> 946
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 雙重專一性四價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子
 scFAB-Avastin-LC06-2620之重鏈1

<400> 109

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

385		390		395		400									
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
			405						410					415	
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser
			420					425					430		
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser
		435					440					445			
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln
	450				455					460					
Pro	Gly	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Gln	Thr
465					470				475					480	
Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Gly	Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	His
				485					490					495	
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Val	Tyr	Asp
			500					505					510		
Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn
		515					520					525			
Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly	Asp
	530					535					540				
Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	His	Tyr
545					550				555					560	
Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
			565					570					575		
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
			580					585					590		
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
		595				600						605			
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
	610					615				620					
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
625				630					635					640	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
			645					650					655		
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
			660				665					670			
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
	675					680				685					

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
690 695 700

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu
705 710 715 720

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
725 730 735

Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
740 745 750

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
755 760 765

Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
770 775 780

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp
785 790 795 800

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp
805 810 815

Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
820 825 830

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
835 840 845

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
850 855 860

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
865 870 875 880

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
885 890 895

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
900 905 910

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
915 920 925

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
930 935 940

Thr His
945

<210> 110
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性四價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子
scFab-Avastin-LC06-2620之輕鏈

<400> 110

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 111

<211> 956

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 雙重專一性四價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子
scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640之重鏈1

<400> 111

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro
 465 470 475 480
 Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
 485 490 495
 Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 500 505 510
 Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 515 520 525
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
 530 535 540
 Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 545 550 555 560
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr
 565 570 575
 Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 580 585 590
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 595 600 605
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 610 615 620

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
625 630 635 640

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
645 650 655

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
660 665 670

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
675 680 685

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
690 695 700

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
705 710 715 720

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
725 730 735

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
740 745 750

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
755 760 765

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
770 775 780

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
785 790 795 800

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
805 810 815

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
820 825 830

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
835 840 845

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
850 855 860

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
865 870 875 880

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
885 890 895

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
900 905 910

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

915	920	925
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp		
930	935	940
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His		
945	950	955
<210> 112		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 雙重專一性四價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子		
scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640之輕鏈		
<400> 112		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr		
20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile		
35	40	45
Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		

210

<210> 113
 <211> 956
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 雙重專一性四價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子
 scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641之重鏈1

<400> 113

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

	245		250		255	
Leu Met Ile	Ser Arg Thr Pro Glu	Val Thr Cys Val Val	Val Asp Val			
	260	265	270			
Ser His Glu	Asp Pro Glu Val Lys	Phe Asn Trp Tyr Val	Asp Gly Val			
	275	280	285			
Glu Val His	Asn Ala Lys Thr Lys	Pro Arg Glu Glu	Gln Tyr Asn Ser			
	290	295	300			
Thr Tyr Arg	Val Val Ser Val	Leu Thr Val Leu	His Gln Asp Trp	Leu		
	305	310	315		320	
Asn Gly Lys	Glu Tyr Lys Cys Lys	Val Ser Asn Lys	Ala Leu Pro	Ala		
	325	330	335			
Pro Ile Glu	Lys Thr Ile Ser Lys	Ala Lys Gly Gln	Pro Arg Glu	Pro		
	340	345	350			
Gln Val Tyr	Thr Leu Pro Pro Ser	Arg Asp Glu Leu	Thr Lys Asn Gln			
	355	360	365			
Val Ser Leu	Thr Cys Leu Val Lys	Gly Phe Tyr Pro	Ser Asp Ile Ala			
	370	375	380			
Val Glu Trp	Glu Ser Asn Gly Gln	Pro Glu Asn Asn	Tyr Lys Thr Thr			
	385	390	395		400	
Pro Pro Val	Leu Asp Ser Asp	Gly Ser Phe Phe	Leu Tyr Ser Lys	Leu		
	405	410	415			
Thr Val Asp	Lys Ser Arg Trp Gln	Gln Gly Asn Val	Phe Ser Cys Ser			
	420	425	430			
Val Met His	Glu Ala Leu His Asn	His Tyr Thr Gln	Lys Ser Leu Ser			
	435	440	445			
Leu Ser Pro	Gly Lys Gly Gly	Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Gly Ser	Gly		
	450	455	460			
Gly Gly Gly	Ser Gly Gly Gly	Ser Gln Pro Gly	Leu Thr Gln Pro			
	465	470	475		480	
Pro Ser Val	Ser Val Ala Pro	Gly Gln Thr Ala	Arg Ile Thr Cys	Gly		
	485	490	495			
Gly Asn Asn	Ile Gly Ser Lys Ser	Val His Trp Tyr	Gln Gln Lys Pro			
	500	505	510			
Gly Gln Ala	Pro Val Leu Val Val	Tyr Asp Asp Ser	Asp Arg Pro Ser			
	515	520	525			
Gly Ile Pro	Glu Arg Phe Ser	Gly Ser Asn Ser	Gly Asn Thr Ala	Thr		
	530	535	540			

Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
545 550 555 560

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr
565 570 575

Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
580 585 590

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
595 600 605

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
610 615 620

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
625 630 635 640

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
645 650 655

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
660 665 670

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
675 680 685

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
690 695 700

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
705 710 715 720

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
725 730 735

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
740 745 750

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met
755 760 765

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
770 775 780

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
785 790 795 800

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
805 810 815

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
820 825 830

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
835 840 845

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
850 855 860

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
865 870 875 880

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
885 890 895

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
900 905 910

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
915 920 925

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
930 935 940

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
945 950 955

<210> 114
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性四價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子
scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641之輕鏈

<400> 114

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 115
<211> 946
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性三價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06-KiH-C-scFab之重鏈1

<400> 115

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 450 455 460
 Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr
 465 470 475 480

Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
 485 490 495
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp
 500 505 510
 Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn
 515 520 525
 Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp
 530 535 540
 Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr
 545 550 555 560
 Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala
 565 570 575
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 580 585 590
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 595 600 605
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 610 615 620
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 625 630 635 640
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 645 650 655
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 660 665 670
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 675 680 685
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 690 695 700
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu
 705 710 715 720
 Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 725 730 735
 Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 740 745 750
 Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
 755 760 765
 Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr

770 775 780
 Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp
 785 790 795 800
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp
 805 810 815
 Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 820 825 830
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 835 840 845
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 850 855 860
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 865 870 875 880
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 885 890 895
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 900 905 910
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 915 920 925
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 930 935 940
 Thr His
 945
 <210> 116
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 雙重專一性三價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子
 Avastin-LC06-KiH-C-scFab之重鏈2
 <400> 116
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val	100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly	115	120	125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly	130	135	140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val	145	150	160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe	165	170	175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val	180	185	190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val	195	200	205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys	210	215	220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu	225	230	240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	245	250	255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	260	265	270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser	290	295	300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	305	310	315
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala	325	330	335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro	340	345	350
Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln	355	360	365

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

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

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

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 117
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性三價單鏈Fab <VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06-KiH-C-scFab之輕鏈

<400> 117

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 118
<211> 698
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性三價<VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06-C-Fab-6CSS之重鏈1

<400> 118

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

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

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 465 470 475 480
 Gly Gly Ser Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala
 485 490 495

Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser
500 505 510

Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu
515 520 525

Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe
530 535 540

Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val
545 550 555 560

Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser
565 570 575

Ser Asp His Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg
580 585 590

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
595 600 605

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
610 615 620

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
625 630 635 640

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
645 650 655

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
660 665 670

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
675 680 685

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
690 695

<210> 119
<211> 719
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性三價<VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06-C-Fab-6CSS之重鏈2

<400> 119

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 465 470 475 480
 Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 485 490 495
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 500 505 510
 Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu
 515 520 525
 Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala
 530 535 540
 Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
 545 550 555 560
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 565 570 575
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly
 580 585 590
 Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 595 600 605
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 610 615 620
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 625 630 635 640
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

645

650

655

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
660 665 670

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
675 680 685

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
690 695 700

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
705 710 715

<210> 120
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性三價<VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06-C-Fab-6CSS之輕鏈

<400> 120

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

180

185

190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 121
<211> 459
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06-CH1-CL之重鏈1

<400> 121

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
145 150 155 160

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
165 170 175

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
195 200 205

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

210	215	220
Lys Lys Val Glu Pro	Lys Ser Cys Asp Lys	Thr His Thr Cys Pro Pro
225	230	235 240
Cys Pro Ala Pro Glu	Leu Leu Gly Gly Pro	Ser Val Phe Leu Phe Pro
245	250	255
Pro Lys Pro Lys Asp	Thr Leu Met Ile Ser	Arg Thr Pro Glu Val Thr
260	265	270
Cys Val Val Val Asp	Val Ser His Glu Asp	Pro Glu Val Lys Phe Asn
275	280	285
Trp Tyr Val Asp Gly	Val Glu Val His Asn	Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290	295	300
Glu Glu Gln Tyr Asn	Ser Thr Tyr Arg Val	Val Ser Val Leu Thr Val
305	310	315 320
Leu His Gln Asp Trp	Leu Asn Gly Lys Glu	Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325	330	335
Asn Lys Ala Leu Pro	Ala Pro Ile Glu Lys	Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340	345	350
Gly Gln Pro Arg Glu	Pro Gln Val Tyr Thr	Leu Pro Pro Cys Arg Asp
355	360	365
Glu Leu Thr Lys Asn	Gln Val Ser Leu Trp	Cys Leu Val Lys Gly Phe
370	375	380
Tyr Pro Ser Asp Ile	Ala Val Glu Trp Glu	Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385	390	395 400
Asn Asn Tyr Lys Thr	Thr Pro Pro Val Leu	Asp Ser Asp Gly Ser Phe
405	410	415
Phe Leu Tyr Ser Lys	Leu Thr Val Asp Lys	Ser Arg Trp Gln Gln Gly
420	425	430
Asn Val Phe Ser Cys	Ser Val Met His Glu	Ala Leu His Asn His Tyr
435	440	445
Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro Gly	Lys
450	455	

<210> 122
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子
 Avastin-LC06-CH1-CL之重鏈2

<400> 122
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr	20	25	30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val	35	40	45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe	50	55	60
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr	65	70	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val	100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala	115	120	125
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	130	135	140
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	145	150	160
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	165	170	175
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	180	185	190
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	195	200	205
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	210	215	220
Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	225	230	240
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys	245	250	255
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val	260	265	270
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr	275	280	285
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu	290	295	300

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

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

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
355 360 365

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 123
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06-CH1-CL之輕鏈1

<400> 123

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

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

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

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

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

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

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 124
<211> 212
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06-CH1-CL之輕鏈2

<400> 124

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys
210

<210> 125
<211> 459
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06-VH-VL之重鏈1

<400> 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
145 150 155 160

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 126
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子
 Avastin-LC06-VH-VL之重鏈2

<400> 126

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 210 215 220

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
385 390 395 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435

<210> 127
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06- VH-VL之輕鏈1

<400> 127

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

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

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

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

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

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

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 128
<211> 230
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06- VH-VL之輕鏈2

<400> 128

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
115 120 125

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
130 135 140

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
145 150 155 160

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
165 170 175

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
195 200 205

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 129
<211> 459
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06-VH-VL-SS之重鏈1

<400> 129

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 145 150 155 160
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415

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

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 130

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06-VH-VL-SS之重鏈2

<400> 130

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
210 215 220

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
385 390 395 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435

<210> 131
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06-VH-VL-SS之輕鏈1

<400> 131

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

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

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

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

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

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

Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 132
<211> 230
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性二價結構域交換<VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06-VH-VL-SS之輕鏈2

<400> 132

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
115 120 125

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
130 135 140

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
145 150 155 160

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
165 170 175

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
195 200 205

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 133
<211> 706
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性二價ScFab-Fc融合<VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06-N-scFab之重鏈1

<400> 133

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

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

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95
 Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala
 245 250 255
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 260 265 270
 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 275 280 285
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly
 290 295 300
 Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp
 305 310 315 320
 Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp
 325 330 335
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr
 340 345 350
 Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln

355	360	365
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val 370 375 380		
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala 385 390 395 400		
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser 405 410 415		
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val 420 425 430		
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro 435 440 445		
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys 450 455 460		
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp 465 470 475 480		
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly 485 490 495		
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile 500 505 510		
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu 515 520 525		
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His 530 535 540		
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg 545 550 555 560		
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 565 570 575		
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu 580 585 590		
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr 595 600 605		
Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu 610 615 620		
Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp 625 630 635 640		
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val 645 650 655		

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

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

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

Gly Lys
705

<210> 134
<211> 699
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性二價ScFab-Fc融合<VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06-N-scFab之重鏈2

<400> 134

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 245 250 255
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 260 265 270
 Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 275 280 285
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro
 290 295 300
 Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr
 305 310 315 320
 Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 325 330 335
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser
 340 345 350
 His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 355 360 365
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 370 375 380
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 385 390 395 400
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 405 410 415
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 420 425 430
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 435 440 445
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 450 455 460
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 465 470 475 480
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 485 490 495

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
515 520 525

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
530 535 540

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
545 550 555 560

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

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
580 585 590

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
595 600 605

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
610 615 620

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
625 630 635 640

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
645 650 655

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
660 665 670

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
675 680 685

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695

<210> 135
<211> 706
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 雙重專一性二價ScFab-Fc融合<VEGF-ANG-2>抗體分子
Avastin-LC06-N-scFabSS之重鏈1

<400> 135

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

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

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95
 Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala
 245 250 255
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 260 265 270
 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 275 280 285
 Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly
 290 295 300
 Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp
 305 310 315 320
 Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp
 325 330 335
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr
 340 345 350

Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 355 360 365
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 370 375 380
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 385 390 395 400
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 405 410 415
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 420 425 430
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 435 440 445
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 450 455 460
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 465 470 475 480
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 485 490 495
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 500 505 510
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 515 520 525
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 530 535 540
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 545 550 555 560
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 565 570 575
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 580 585 590
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 595 600 605
 Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 610 615 620
 Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 625 630 635 640
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

645 650 655
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 660 665 670
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 675 680 685
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 690 695 700
 Gly Lys
 705
 <210> 136
 <211> 699
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 雙重專一性二價ScFab-Fc融合<VEGF-ANG-2>抗體分子
 Avastin-LC06-N-scFabSS之重鏈2
 <400> 136
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser 195 200 205		
Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 210 215 220		
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 225 230 235 240		
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly 245 250 255		
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly 260 265 270		
Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly 275 280 285		
Lys Cys Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro 290 295 300		
Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr 305 310 315 320		
Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp 325 330 335		
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser 340 345 350		
His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser 355 360 365		
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser 370 375 380		
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp 385 390 395 400		
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr 405 410 415		
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr 420 425 430		
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln 435 440 445		
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp 450 455 460		
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro 465 470 475 480		

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
485 490 495

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
515 520 525

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
530 535 540

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
545 550 555 560

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

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
580 585 590

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
595 600 605

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
610 615 620

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
625 630 635 640

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
645 650 655

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
660 665 670

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
675 680 685

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 98134012

※申請日： 98.10.7

※IPC 分類：~~C12N~~

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

雙重專一性之抗-VEGF/抗-ANG-2抗體

BISPECIFIC ANTI-VEGF/ANTI-ANG-2 ANTIBODIES

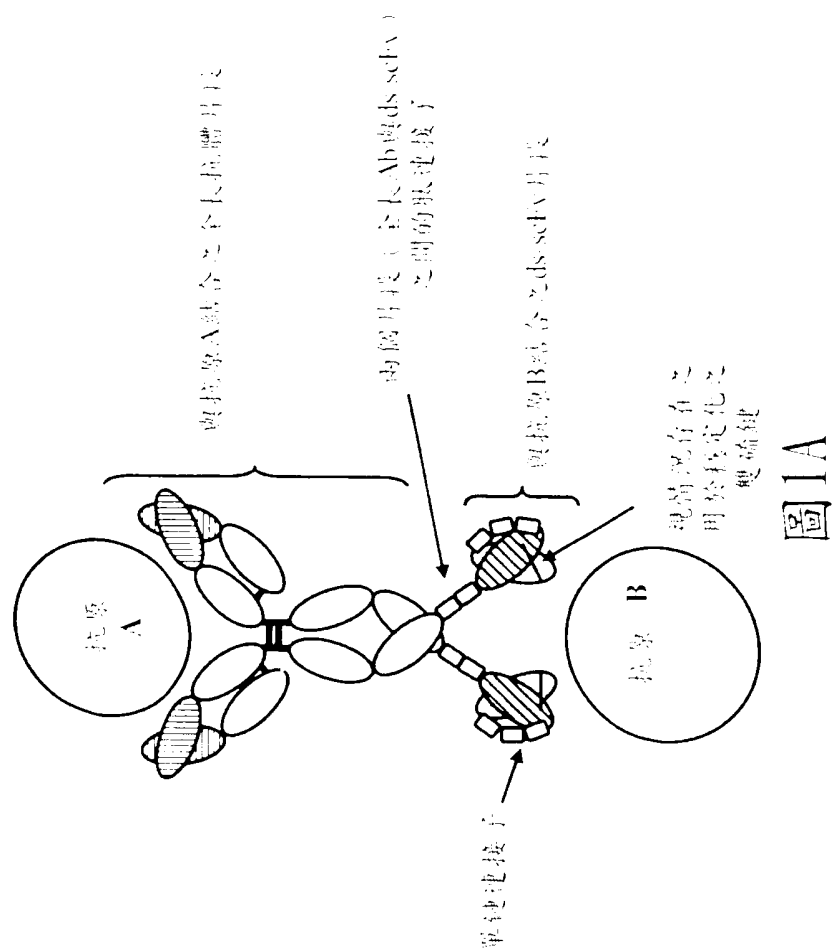
二、中文發明摘要：

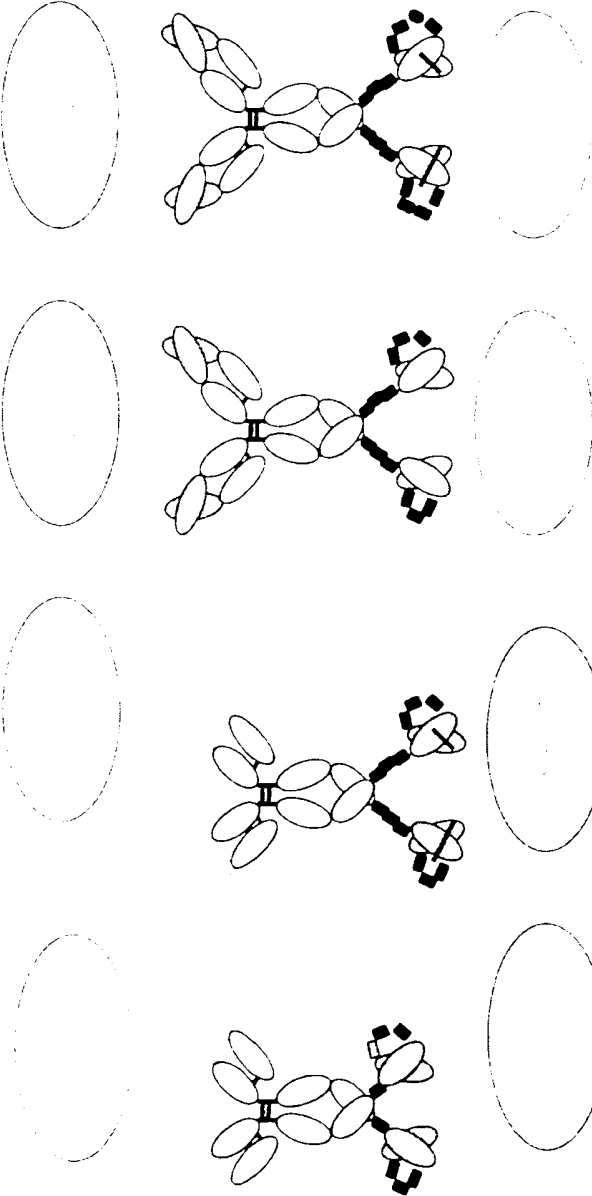
本發明係關於針對人類 VEGF 及針對人類 ANG-2 之雙重專一性抗體，其製造方法、含有該等抗體之醫藥組合物，及其用途。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to bispecific antibodies against human VEGF and against human ANG-2, methods for their production, pharmaceutical compositions containing said antibodies, and uses thereof.

八、圖式：

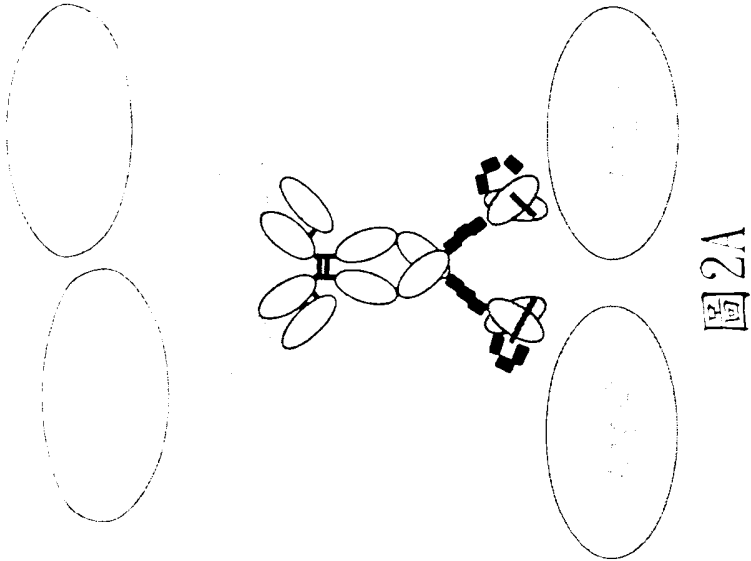




TvAb5	C端 重建 融合 形式:	2310
TvAb6	C端 重建 融合 形式:	2331
TvAb9	C端 重建 融合 形式:	2330
TvAb15	C端 重建 融合 形式:	2431

圖1B





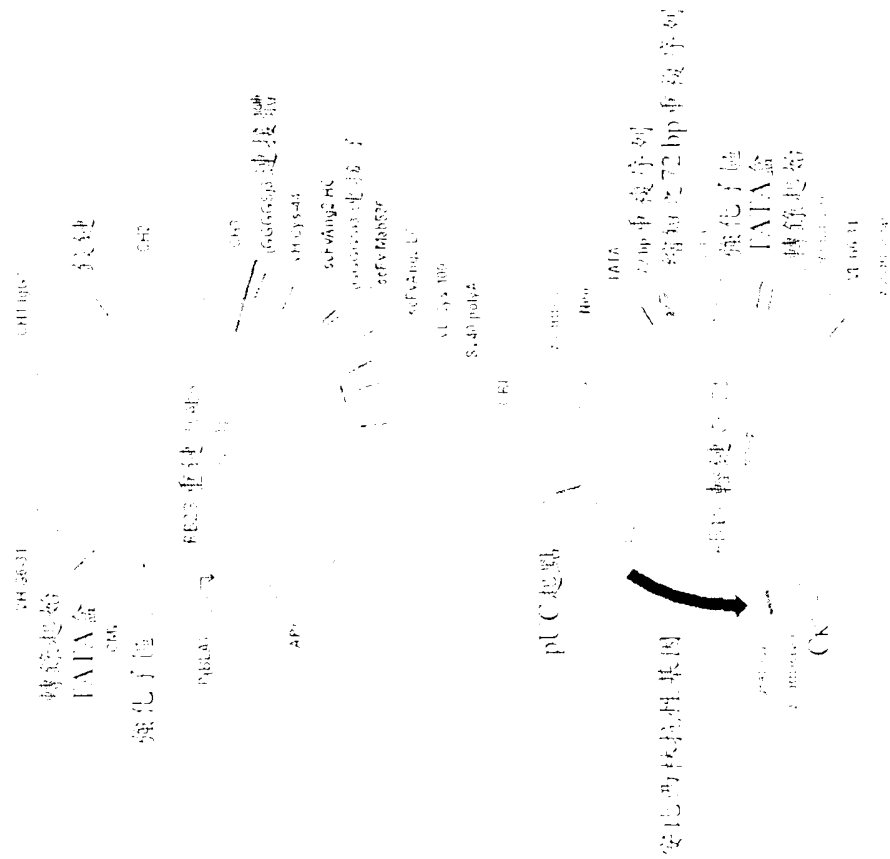
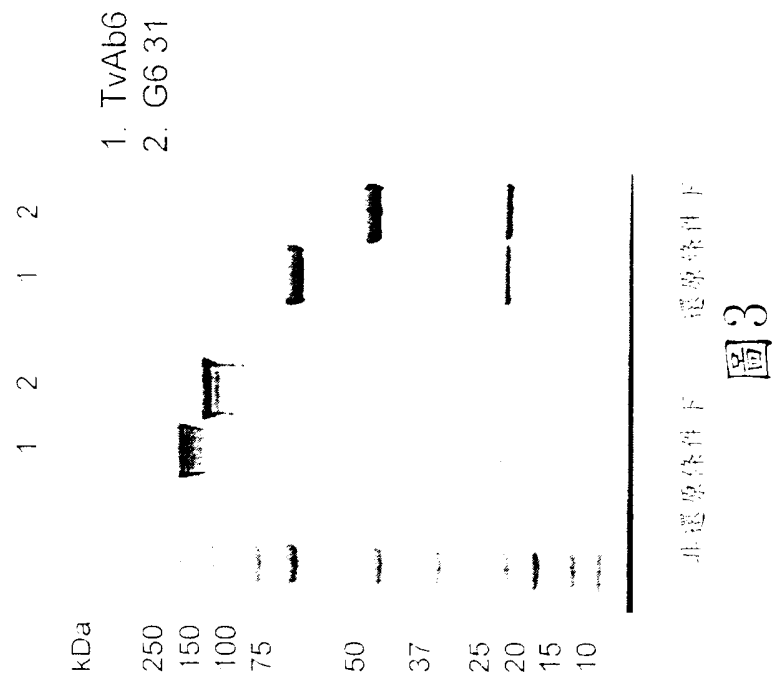
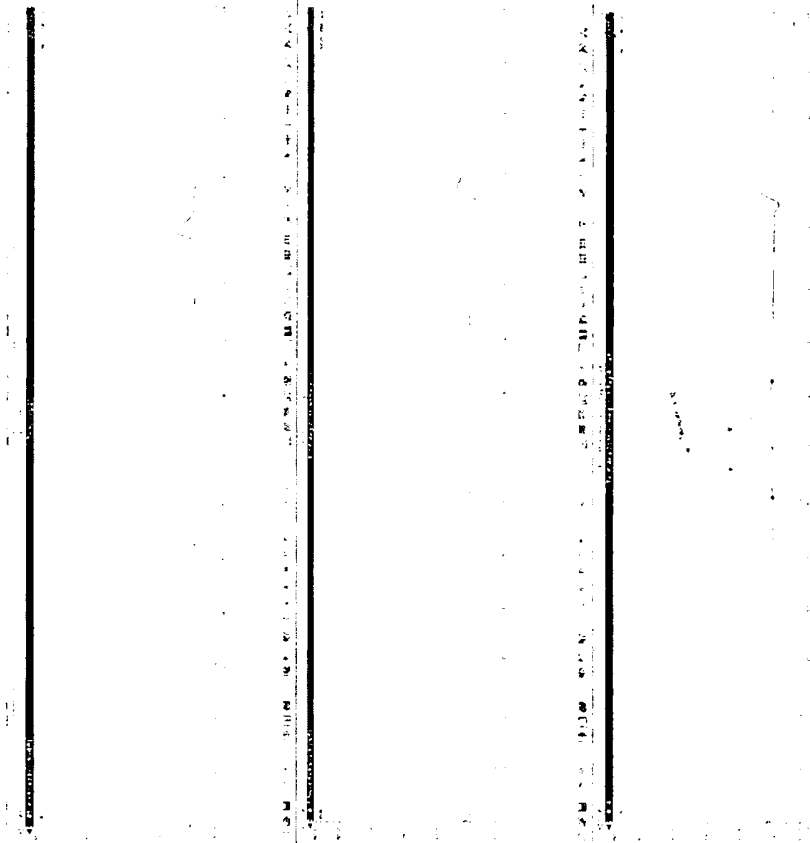


圖2B





1. 蛋白單A池
G6-31: 10 % 聚集
TvAb6: 25 % 聚集

2. 純化後之SEC池
G6-31: > 99 % 單體
TvAb6: > 99 % 單體

3. 在4°C 24小時後之SEC池
G6-31: > 99 % 單體
TvAb6: > 99 % 單體

圖4

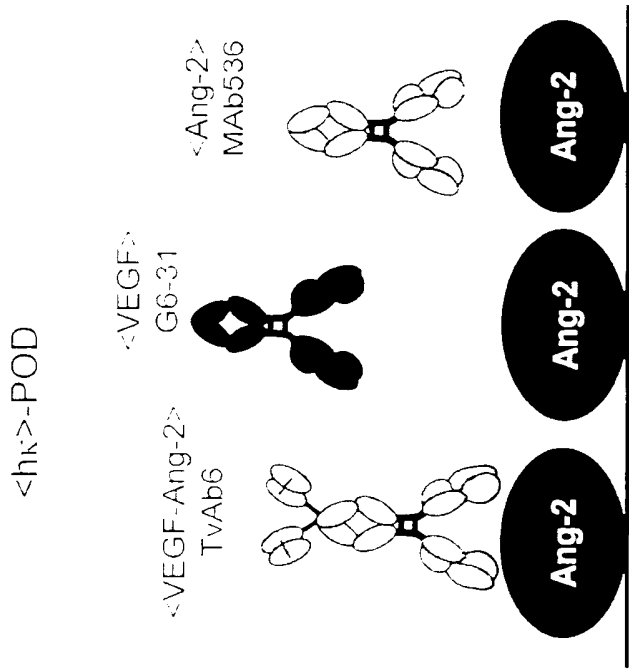
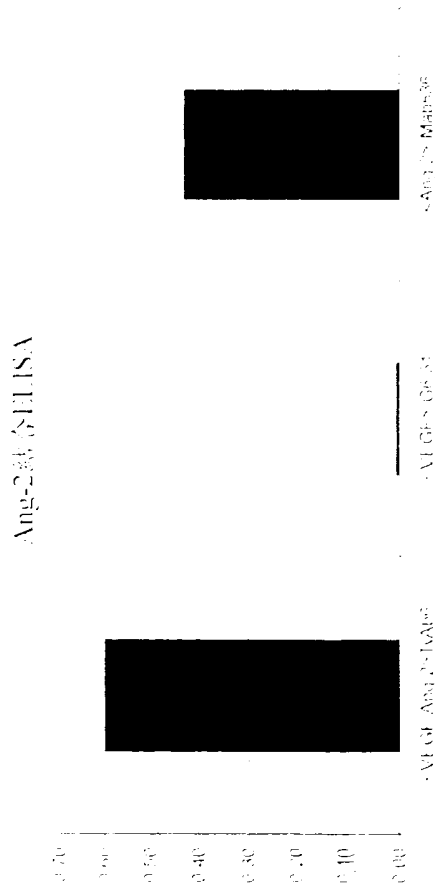


圖 6A



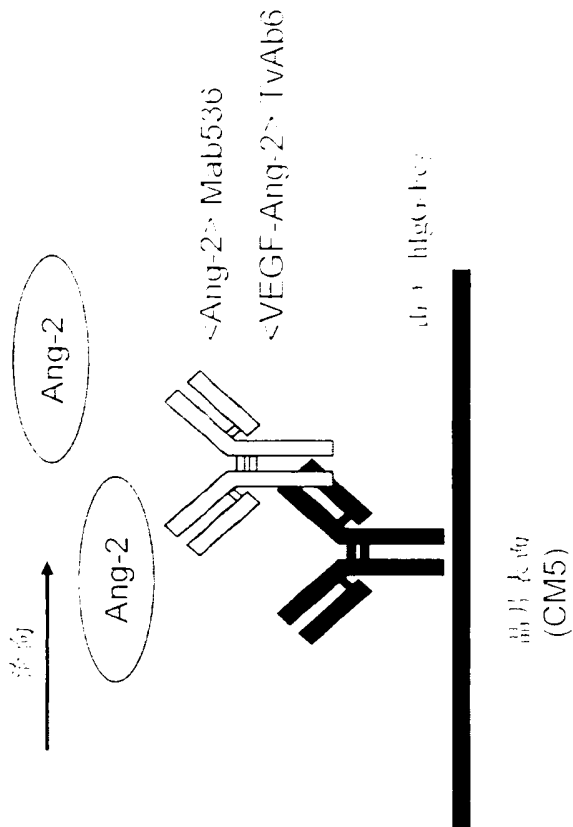
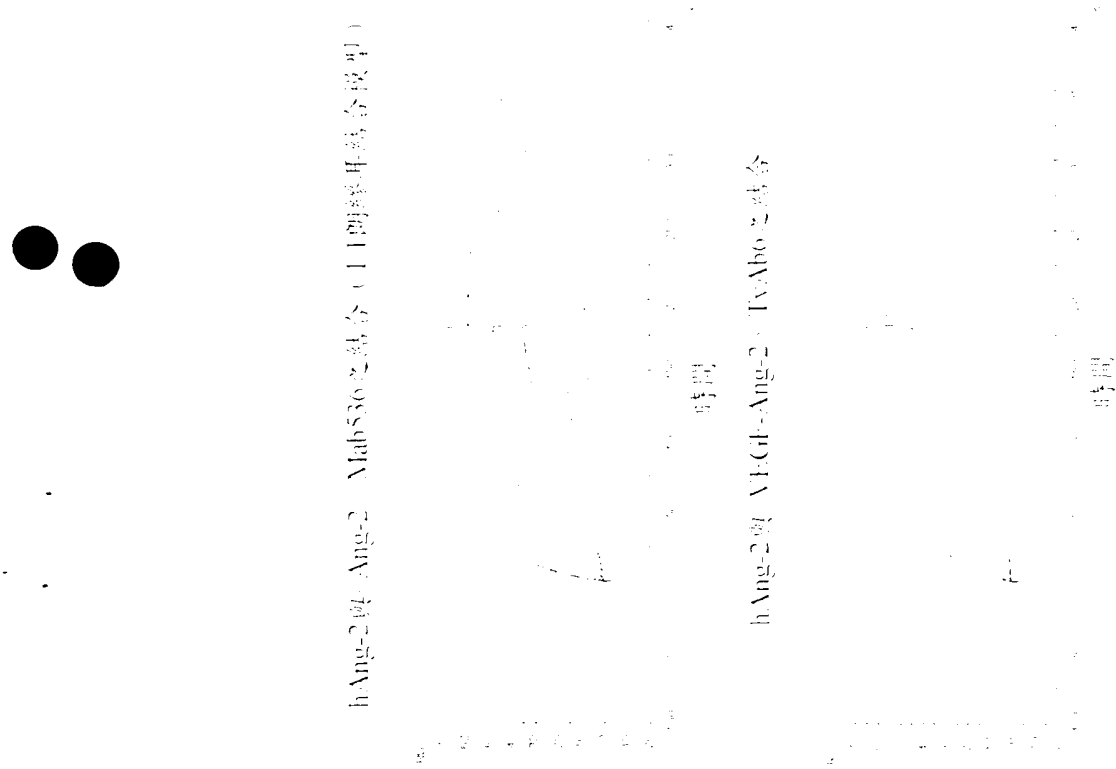


圖6B

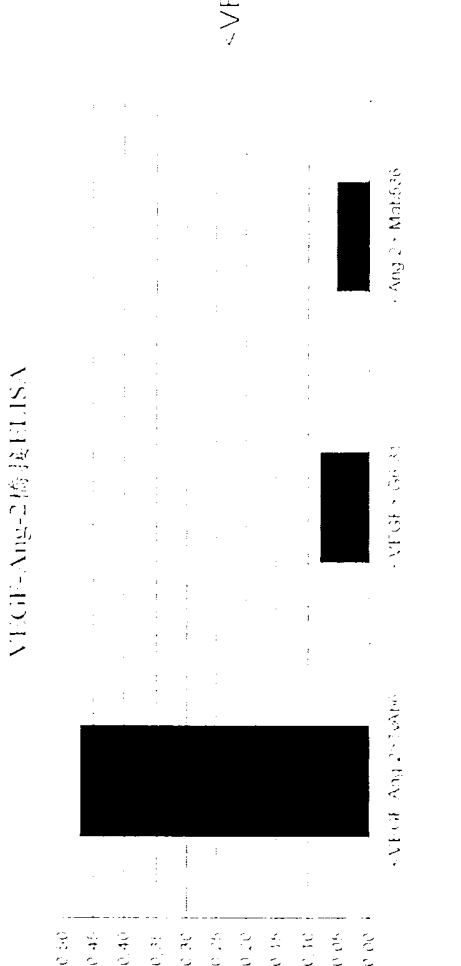
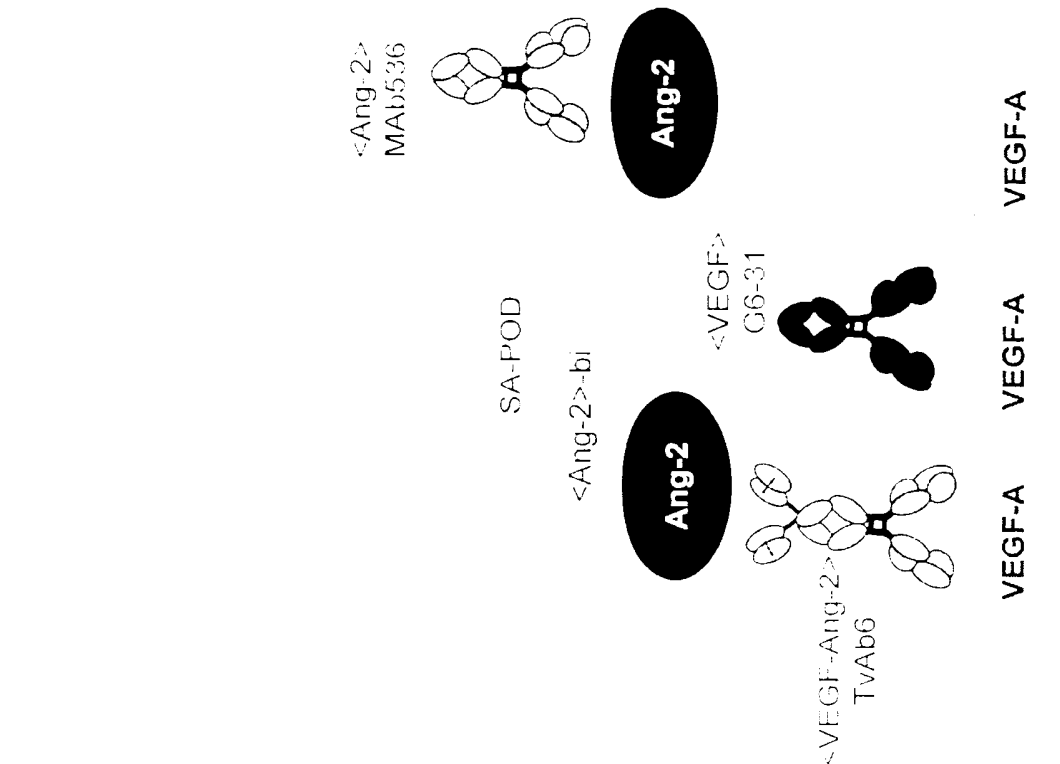


Figure 7



ANG2_PZ_COLO205_003

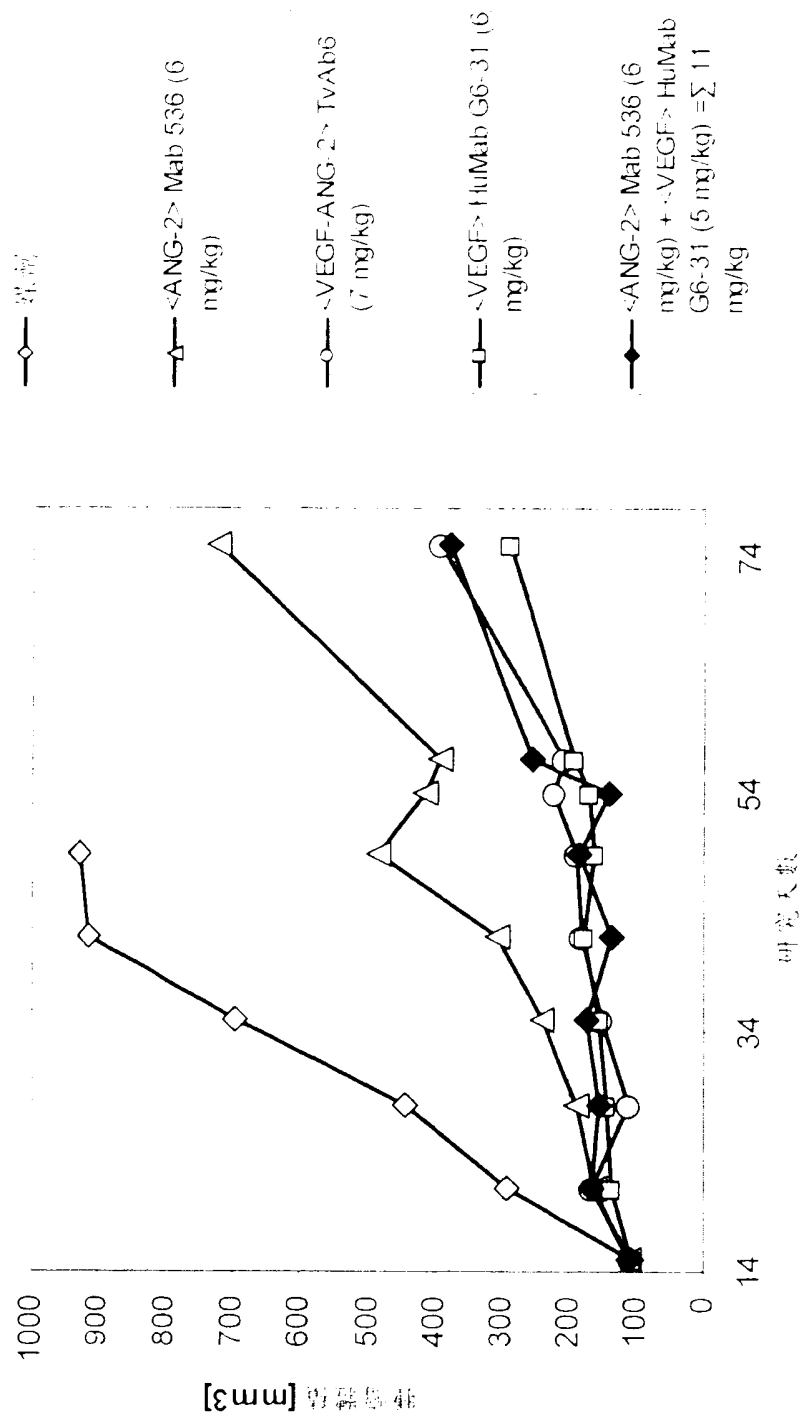


圖 8A

ANG2_PZ_COLO205_005

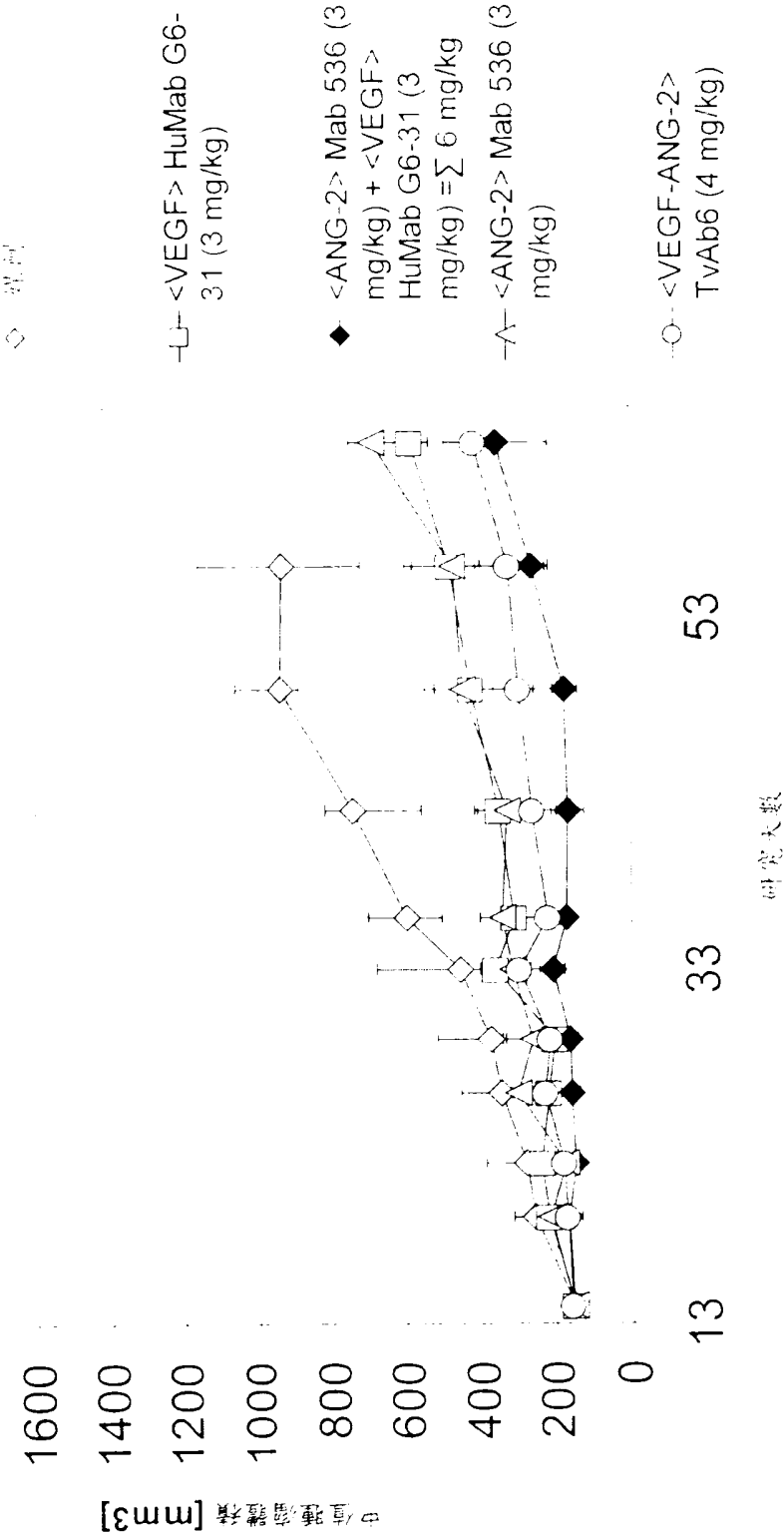


圖8B

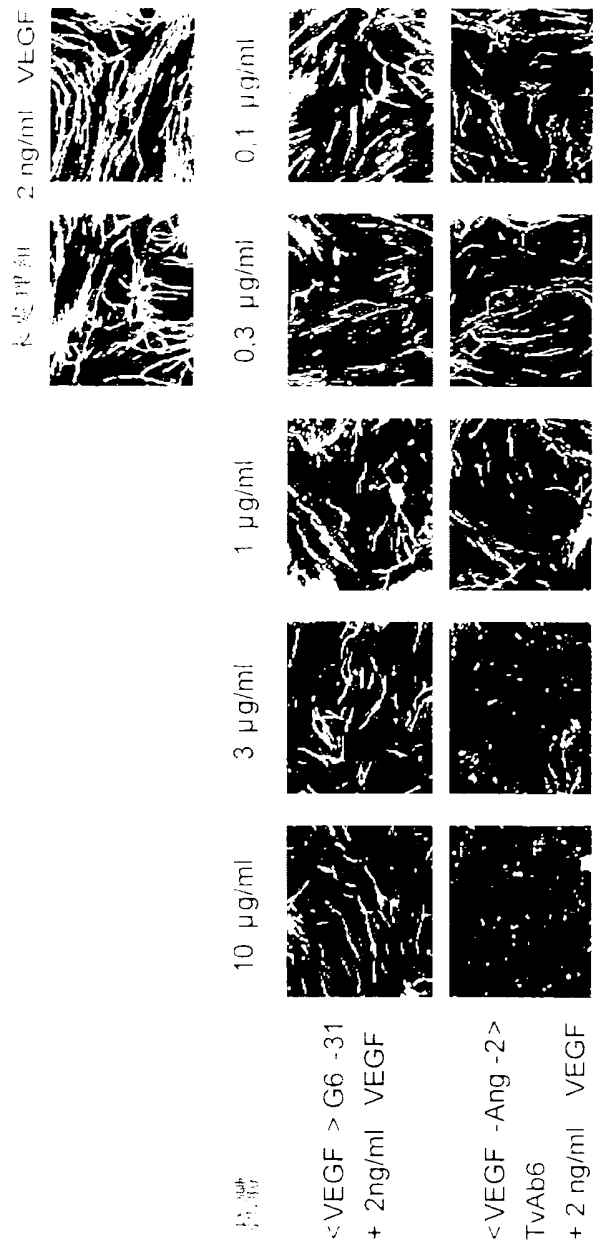
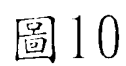


図9





發明人姓名
Inventor's Name

發明人姓名 (R&D)

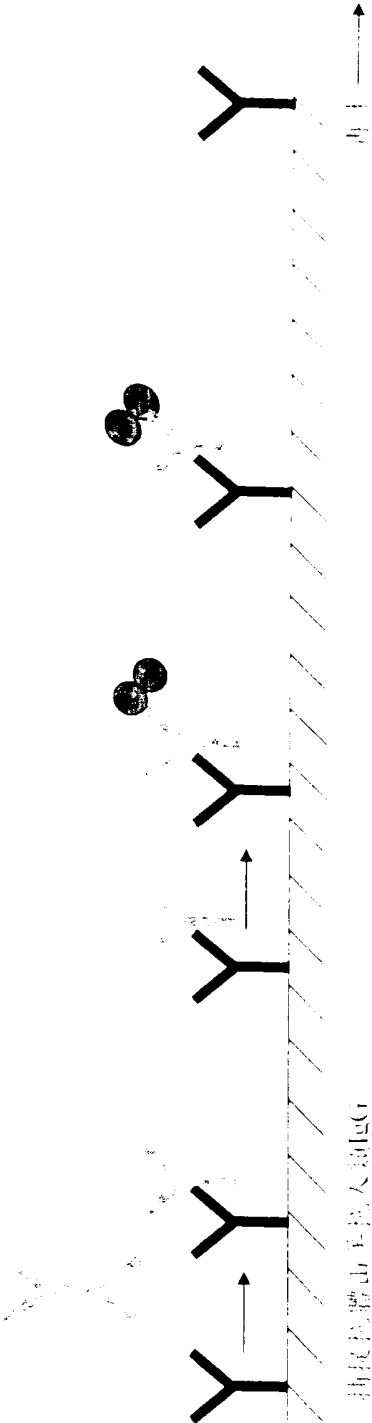
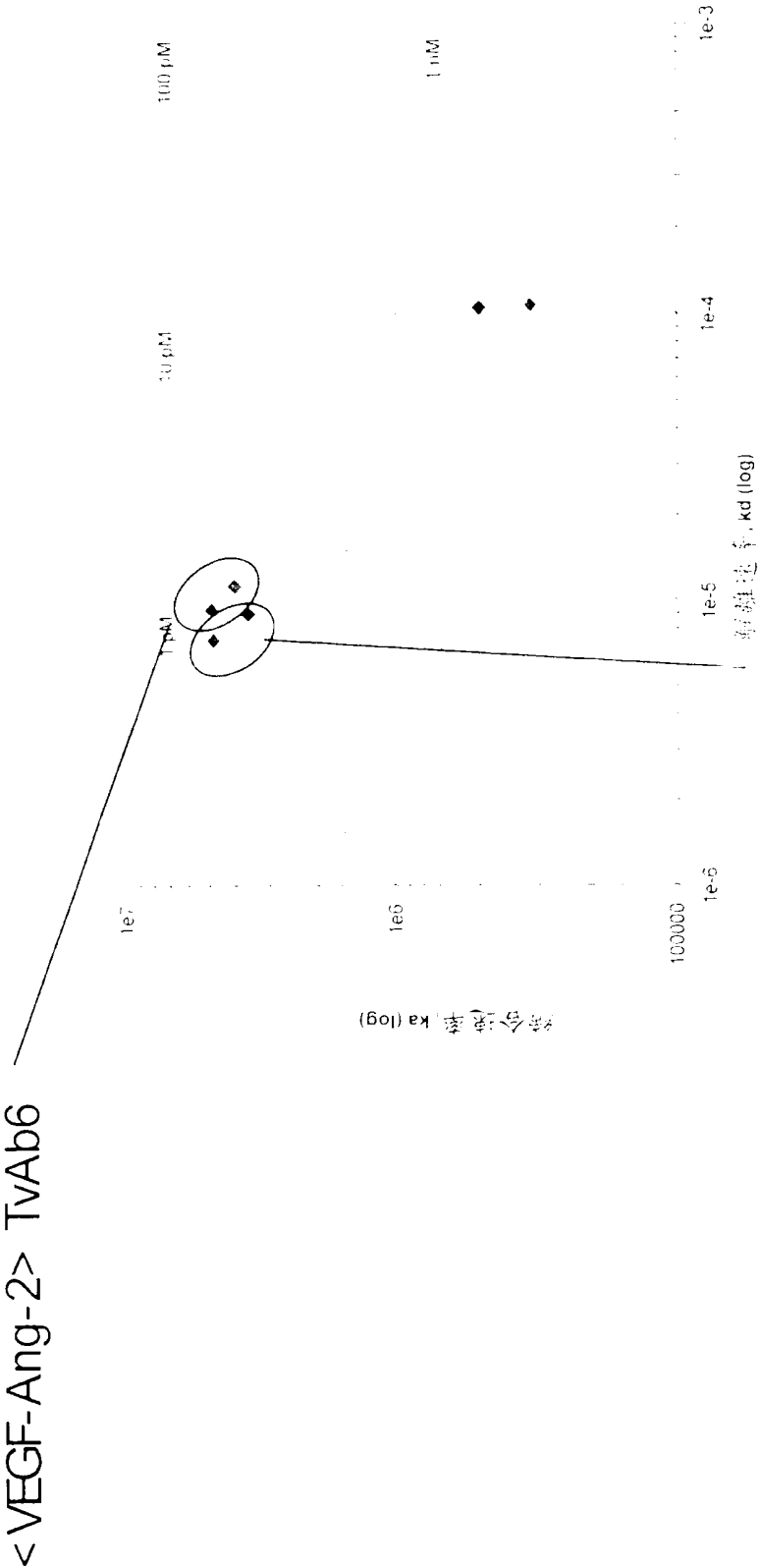


圖11



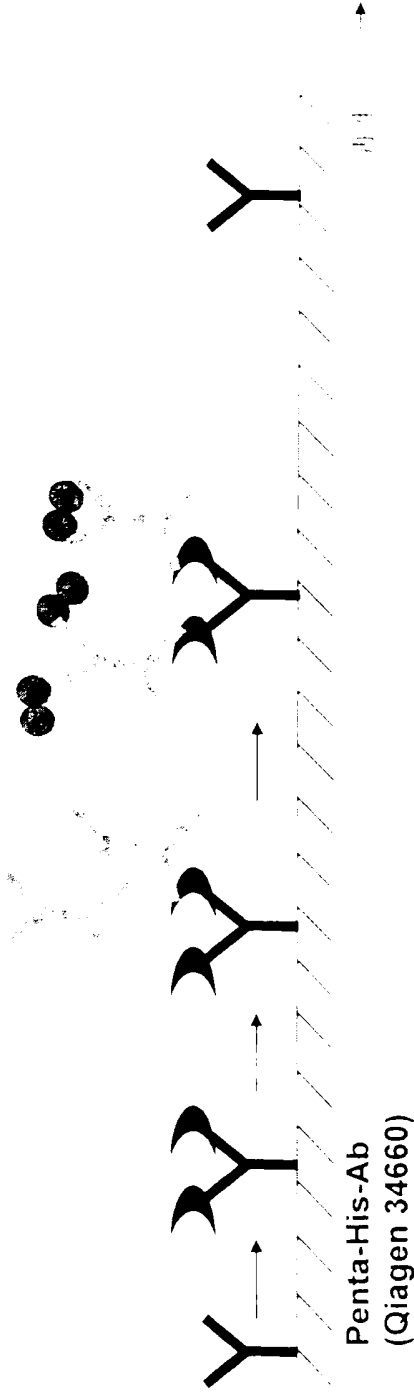
<VEGF> G6-31

圖12

1. 注射 IVcAb

注射 hAng-2-His

2. 注射 hVEGF (R&D)



CVS 培养

圖13

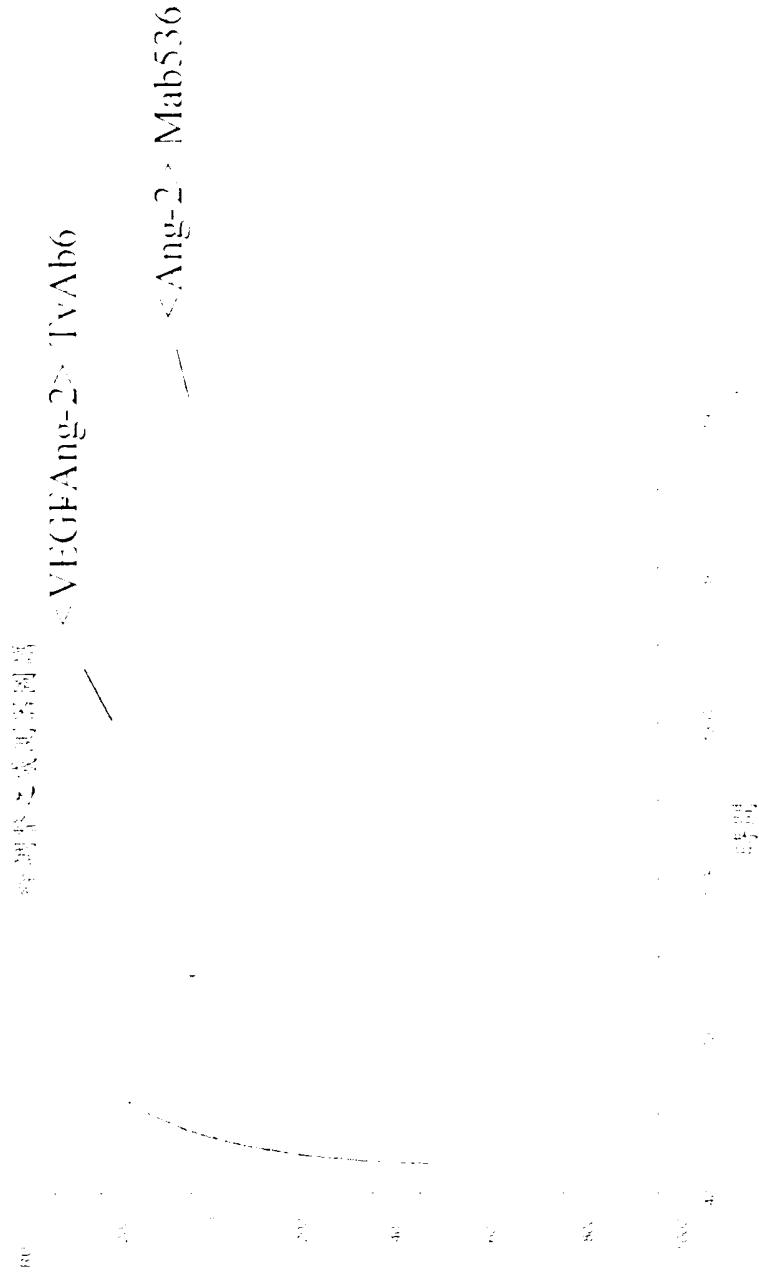
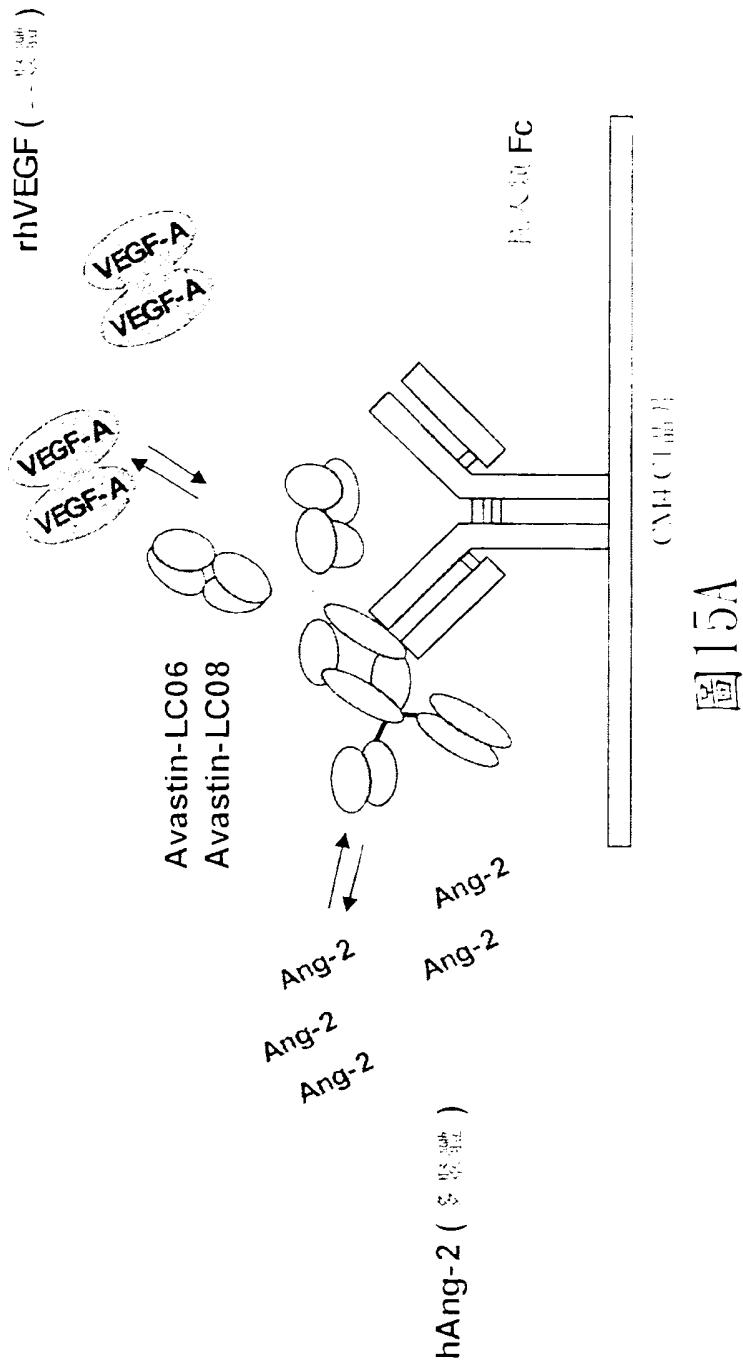


圖 14



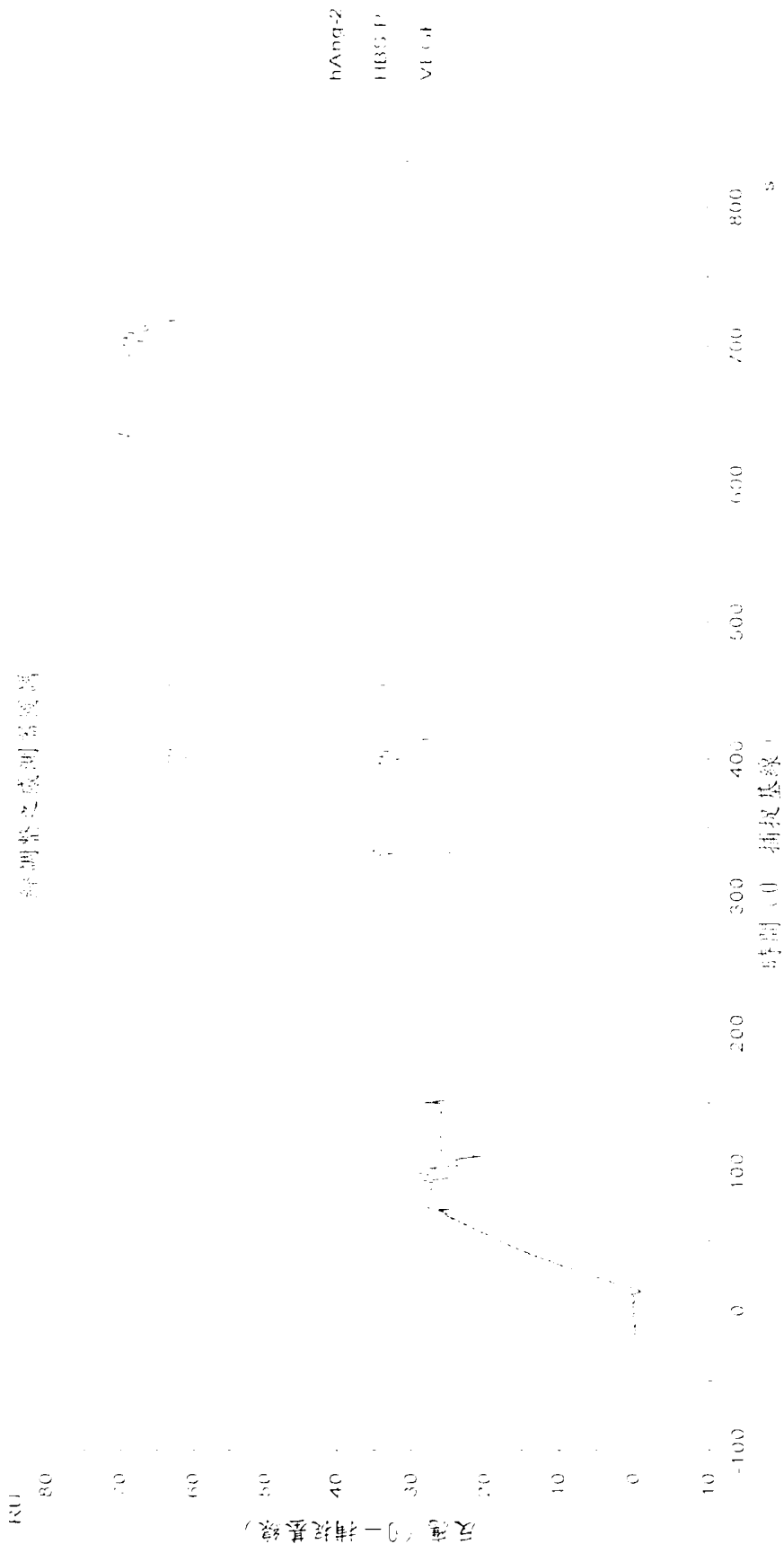


圖 15B

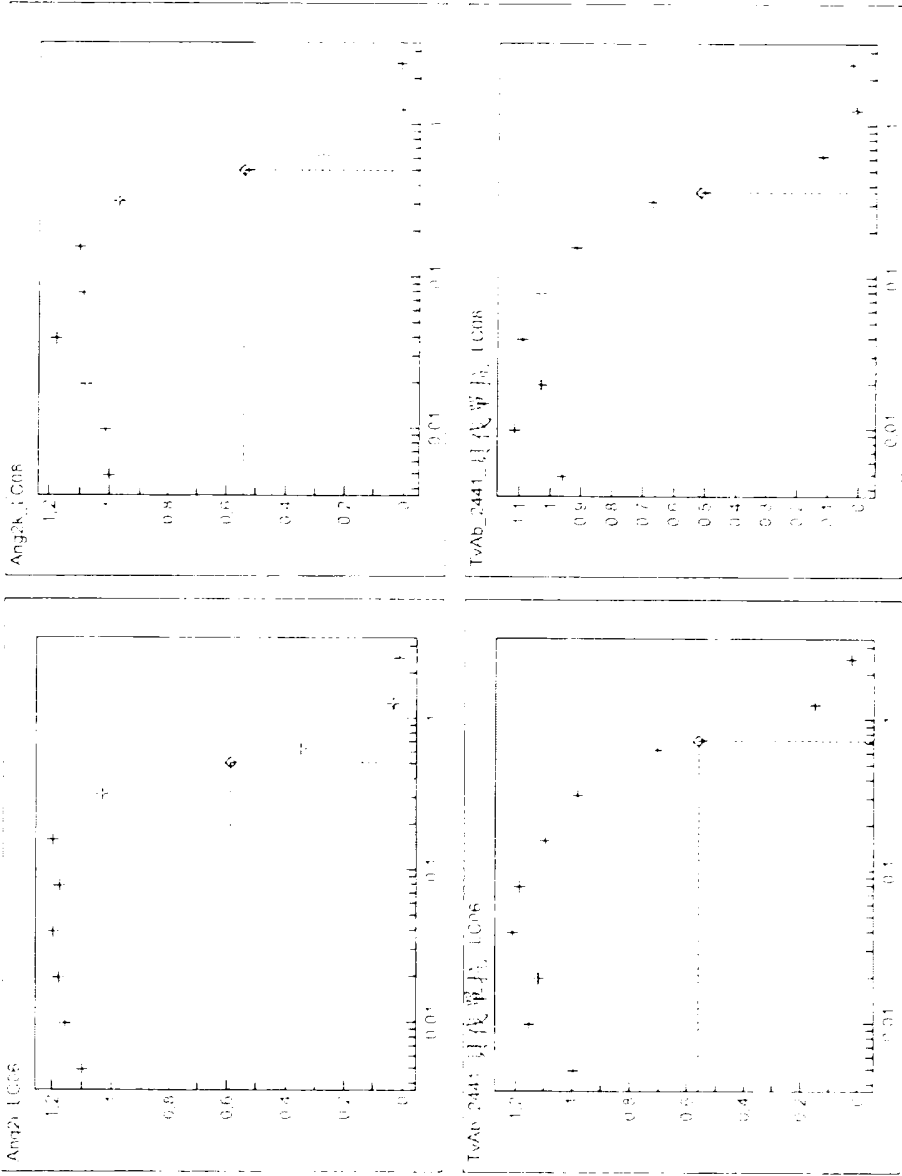


圖 16A

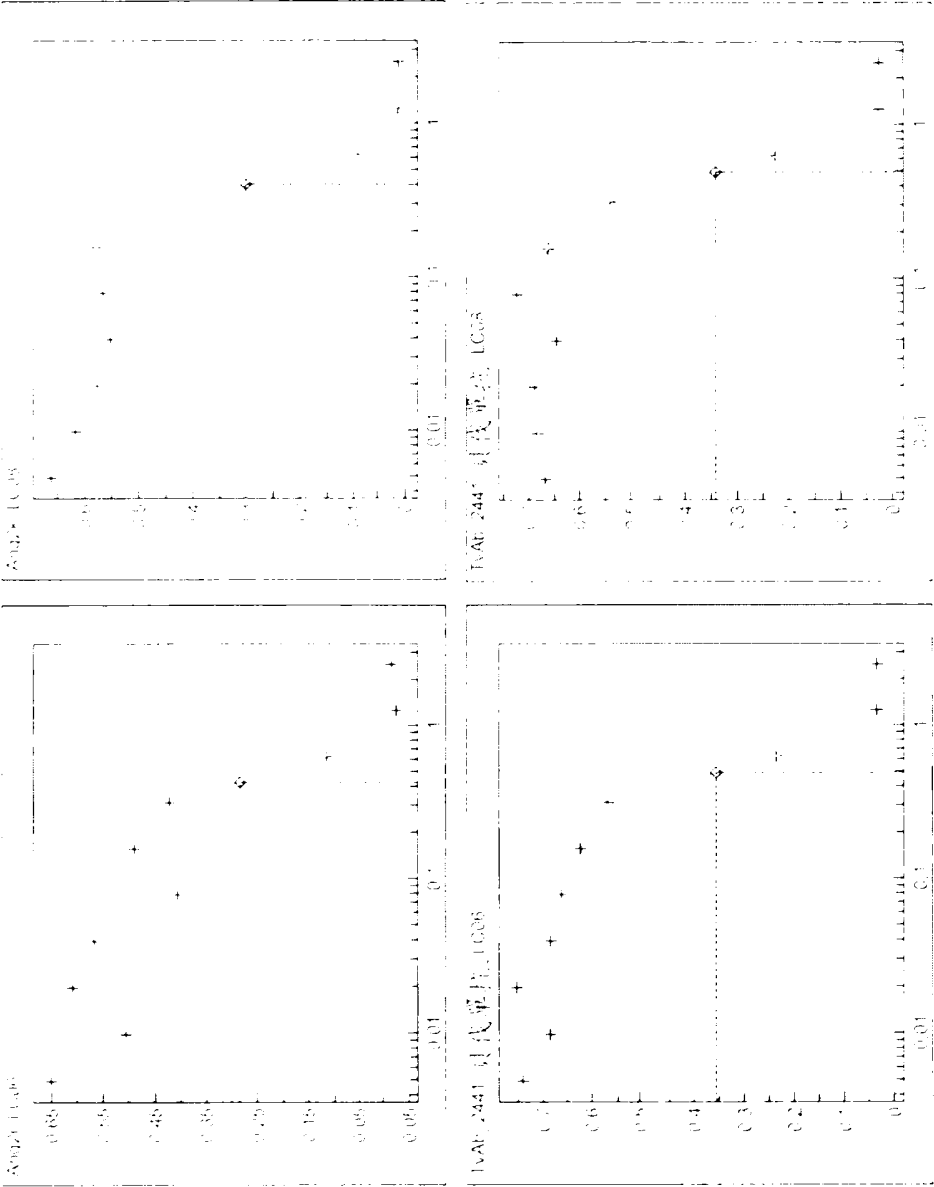


圖 16B

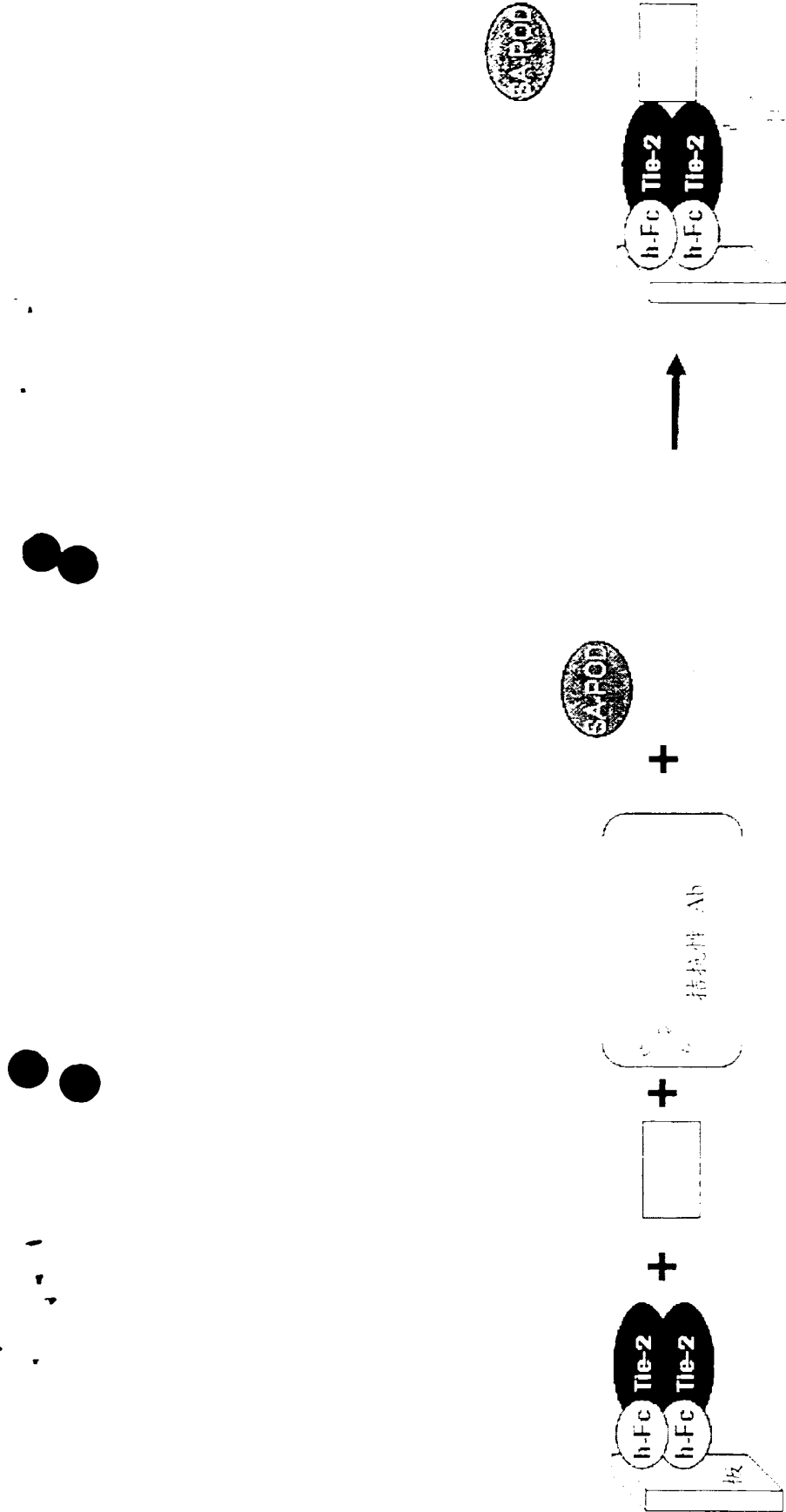


圖17

抗VEGF抑制之HUVEC增殖之抑制

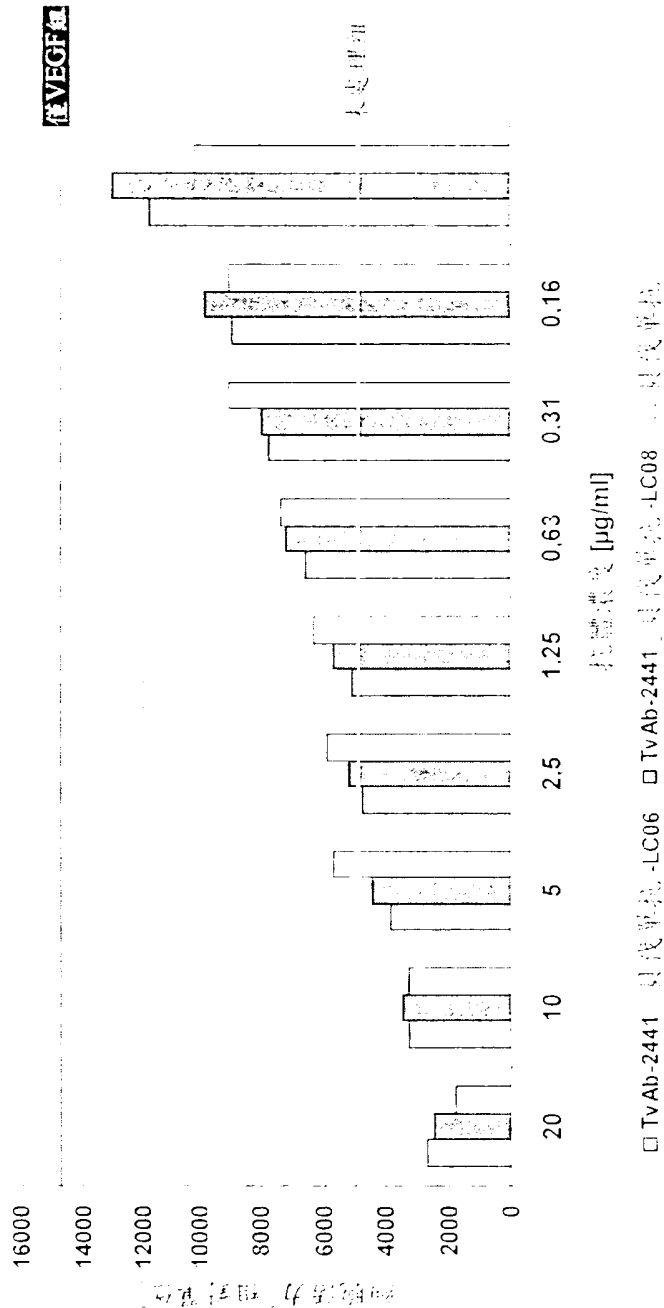


圖18

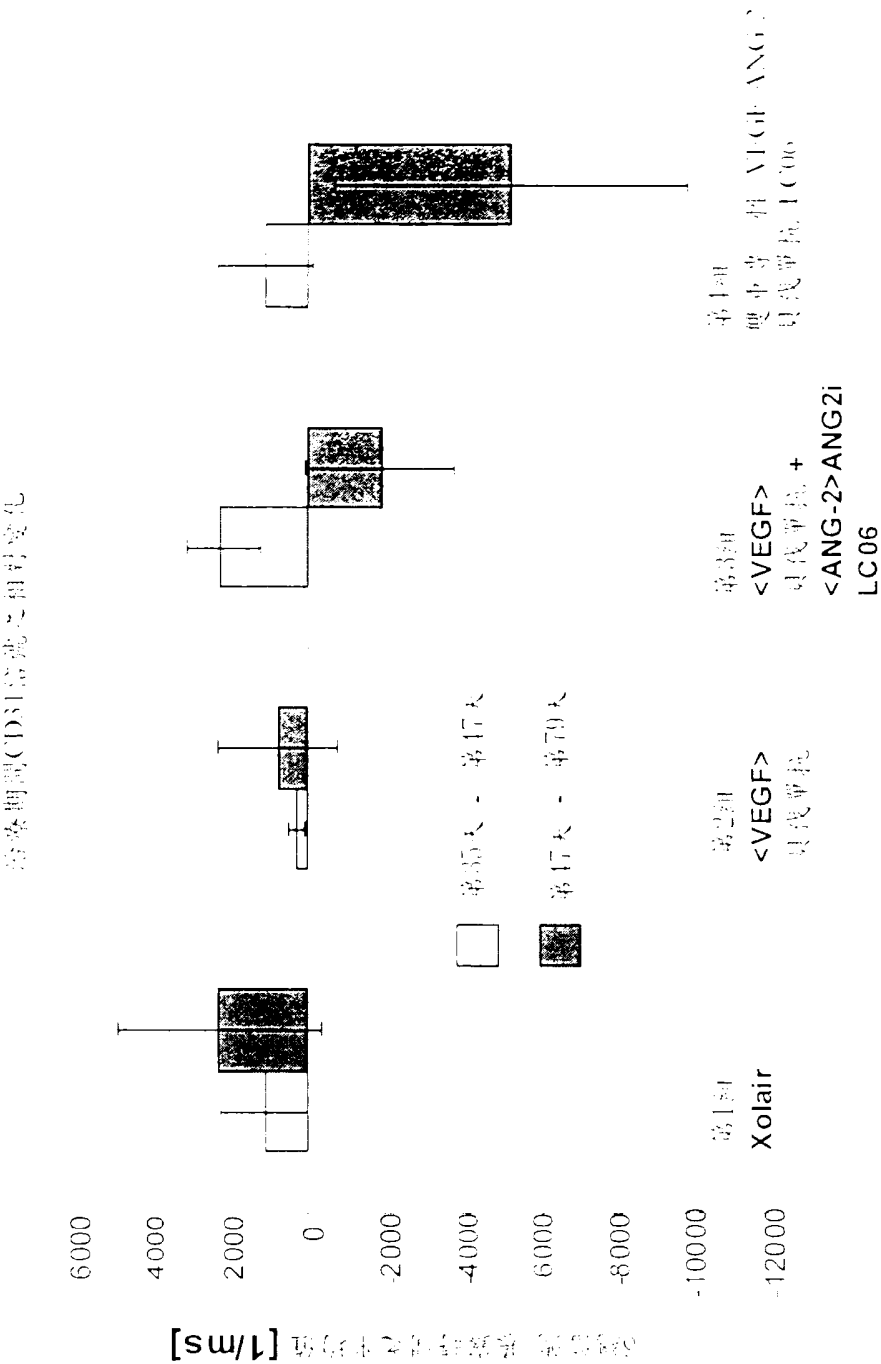


圖 19

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1A) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

101年10月29日修正本

七、申請專利範圍：

1. 一種雙重專一性抗體，其專一地結合於人類血管內皮生長因子(VEGF)及人類血管生成素-2(ANG-2)且包含專一地結合人類 VEGF 之第一抗原結合位點及專一地結合人類 ANG-2 之第二抗原結合位點，其特徵在於
 - i) 該等抗原結合位點各為一對抗體重鏈可變域及抗體輕鏈可變域；
 - ii) 該專一地結合 VEGF 之第一抗原結合位點在該重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 1 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 2 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 3 之 CDR1 區，且在該輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 4 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 5 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 6 之 CDR1 區；及
 - iii) 該專一地結合 ANG-2 之第二抗原結合位點在該重鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 46 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 47 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 48 之 CDR1 區，且在該輕鏈可變域中包含 SEQ ID NO: 49 之 CDR3 區、SEQ ID NO: 50 之 CDR2 區及 SEQ ID NO: 51 之 CDR1 區。
2. 如請求項 1 之雙重專一性抗體，其特徵在於該專一地結合人類 ANG-2 之第二抗原結合位點並不專一地結合於人類血管生成素 1(ANG-1)。
3. 如請求項 1 或 2 之雙重專一性抗體，其特徵在於對 VEGF 具專一性之抗原結合位點之結合親和力 KD/對 ANG-2 具專一性之抗原結合位點之 KD 之比為 1.0-10.0。
4. 如請求項 1 或 2 之雙重專一性抗體，其特徵在於該抗體為

二價。

5. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至4中任一項之抗體。
6. 如請求項5之醫藥組合物，其係用於治療癌症。
7. 如請求項5之醫藥組合物，其係用於治療血管疾病。
8. 一種如請求項1至4中任一項之抗體之用途，其係用於製造治療癌症之藥物。
9. 一種如請求項1至4中任一項之抗體之用途，其係用於製造治療血管疾病之藥物。
10. 一種核酸，其編碼如請求項1至4中任一項之雙重專一性抗體。
11. 一種表現載體，其含有如請求項10之核酸，其能夠在原核或真核宿主細胞中表現該核酸。
12. 一種原核或真核宿主細胞，其包含如請求項11之載體。
13. 一種產生如請求項1至4中任一項之雙重專一性抗體之方法，其特徵在於：在原核或真核宿主細胞中表現如請求項10之核酸，且自該細胞或細胞培養物上清液回收該雙重專一性抗體。