



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월04일
(11) 등록번호 10-2725051
(24) 등록일자 2024년10월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)
C12N 15/115 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/22 (2013.01)
C12N 15/1037 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7008132
- (22) 출원일자(국제) 2018년09월23일
심사청구일자 2021년09월23일
- (85) 번역문제출일자 2018년03월22일
- (65) 공개번호 10-2018-0053315
- (43) 공개일자 2018년05월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/053454
- (87) 국제공개번호 WO 2017/053807
국제공개일자 2017년03월30일
- (30) 우선권주장
62/222,698 2015년09월23일 미국(US)
62/271,913 2015년12월28일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020130004563 A
W02005012359 A2
W02005044853 A2

- (73) 특허권자
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자
패니히, 파트리크
미국 94114 캘리포니아주 샌프란시스코 세븐틴스
스트리트 4116에이
리, 칭웨이, 비비안
미국 94080-4990 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스
코 디엔에이 웨이 1
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장덕순, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 64 항

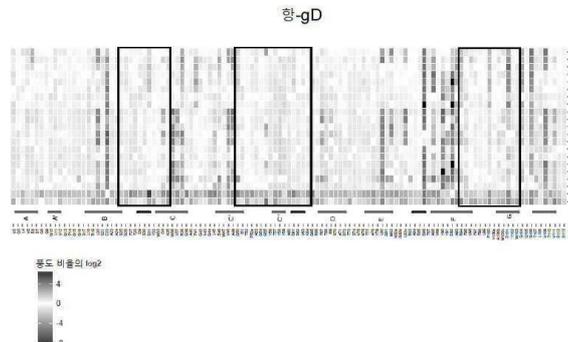
심사관 : 이동욱

(54) 발명의 명칭 항-VEGF 항체의 최적화된 변이체들

(57) 요약

본 발명은 항-VEGF 항체 및 항-VEGF 항체가 함유된 조성물 (예컨대, 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및 중합체 제제), 이의 용도, 예를 들면 혈관신생과 병리학적으로 관련된 장애 치료에 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 개선된 특성, 예를 들면, 강화된 결합 친화력, 안정성, 약동학을 갖고, 및/또는 발현을 하는 항체 변이체를 동정하는 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 15/115 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/567 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/90 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

라자고팔, 카르티칸

미국 94080-4990 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

패밀리, 아민

미국 94080-4990 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

피, 저메인

미국 94044 캘리포니아주 퍼시픽카 아마폴라 애비뉴 149

명세서

청구범위

청구항 1

혈관 내피 성장 인자(VEGF)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체이며,
다음의 6개 추가변 영역(HVR)을 포함하는 단리된 항체:

- (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)로 구성된 HVR-H1,
- (b) 아미노산 서열 GITPAGGYTRYADSVKG (서열 번호: 7)로 구성된 HVR-H2,
- (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)로 구성된 HVR-H3,
- (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)로 구성된 HVR-L1,
- (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)로 구성된 HVR-L2, 및
- (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10)로 구성된 HVR-L3.

청구항 2

제1항에 있어서, 다음의 중쇄 가변(VH) 도메인 틀구조(framework) 영역(FR)을 더 포함하는 단리된 항체:

- (a) 아미노산 서열 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (서열 번호: 13)을 포함하는 FR-H1,
- (b) 아미노산 서열 WVRQAPGKGLEWVA (서열 번호: 14)을 포함하는 FR-H2,
- (c) 아미노산 서열 RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 15)을 포함하는 FR-H3, 및
- (d) 아미노산 서열 WGQGTLVTVSS (서열 번호: 16)을 포함하는 FR-H4.

청구항 3

제1항에 있어서, 다음의 경쇄 가변(VL) 도메인 FR을 더 포함하는 단리된 항체:

- (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열 번호: 17)을 포함하는 FR-L1,
- (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18)을 포함하는 FR-L2,
- (c) 아미노산 서열 GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDAATYYC (서열 번호: 19)을 포함하는 FR-L3, 및
- (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)을 포함하는 FR-L4.

청구항 4

VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체이며,

- (a) 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 및
 - (b) 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인
- 을 포함하는 단리된 항체.

청구항 5

VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체이며,

- (a) 서열 번호: 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및
 - (b) 서열 번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄
- 를 포함하는 단리된 항체.

청구항 6

VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체이며,

(a) 서열 번호: 49의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및

(b) 서열 번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄

를 포함하는 단리된 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, VEGF가 VEGF 수용체에 결합하는 것을 방해할 수 있는 단리된 항체.

청구항 8

제1항에 있어서, 단일클론 항체, 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체인 단리된 항체.

청구항 9

제1항에 있어서, VEGF에 결합하는 항체 단편인 단리된 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 항체 단편이 Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 단리된 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 항체 단편이 Fab인 단리된 항체.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 항체 단편이 Fab-C인 단리된 항체.

청구항 13

제1항에 있어서, 단일특이적 항체인 단리된 항체.

청구항 14

제1항에 있어서, 다중특이적 항체인 단리된 항체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 단리된 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 16

제15항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 17

제16항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 18

VEGF에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 방법이며,

제16항의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및

상기 항체를 회수하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 19

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 단리된 항체를 포함하는, 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 갖는 대상체에서 혈관 신생을 감소 또는 억제하기 위한 억제학적 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 단리된 항체를 포함하는, 병리학적 혈관신생과 연관된 장애의 치료가 필요한 대상체에서 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 치료하기 위한 억제학적 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 병리학적 혈관신생과 연관된 장애가 안구 장애 또는 세포 증식성 장애인 억제학적 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 안구 장애가 노인성 황반 변성(AMD), 당뇨병성 황반 부종(DME), 당뇨병성 망막증(DR), 또는 망막 정맥 폐쇄(RVO)인 억제학적 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 안구 장애가 AMD인 억제학적 조성물.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 세포 증식성 장애가 암인 억제학적 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 단리된 항체를 포함하는, 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애를 앓는 대상체에서 맥관 투과성을 억제하기 위한 억제학적 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 단리된 항체를 포함하는, 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애를 치료하기 위한 억제학적 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애가 뇌 종양과 연관된 부종, 악성과 연관된 복수, 메이그 증후군, 폐 염증, 신장 증후군, 위심(pericardial) 삼출, 늑막 삼출 및 심혈관 질환과 연관된 투과성으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 억제학적 조성물.

청구항 28

제20항에 있어서, 유리질체강내, 눈에, 안구내, 공막가까이, 장부아래, 맥락막위 또는 국소적으로 투여되는 억제학적 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 포트 운반 장치에 의해 투여되는 억제학적 조성물.

청구항 30

제20항에 있어서, 상기 대상체가 인간인 억제학적 조성물.

청구항 31

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 단리된 항체 및 억제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 병리학적 혈관신생과 연관된 장애 또는 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애를 치료하기 위한 억제학적 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 중합체를 더 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서,

상기 중합체가 폴리아크릴산 폴리클로콜 산(PLGA) 공중합체이고,

상기 약제학적 조성물은 PLGA 로드(rod)로 제형화되는 약제학적 조성물.

청구항 34

(i) 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 단리된 항체, 및

(ii) 상기 항체에 공유적으로 부착된 친수성 중합체

를 포함하는 항체 콘주게이트.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 친수성 중합체가 히알루론산(HA) 중합체 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 중합체인 항체 콘주게이트.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 친수성 중합체가 HA 중합체인 항체 콘주게이트.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 HA 중합체가 1 메가달톤(MDa) 또는 그 미만의 분자량을 갖는 것인 항체 콘주게이트.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 HA 중합체가 분자량 25 kDa 내지 500 kDa을 갖는 것인 항체 콘주게이트.

청구항 39

제37항에 있어서, 상기 HA 중합체가 100 kDa 내지 250 kDa의 분자량을 갖는 것인 항체 콘주게이트.

청구항 40

제37항에 있어서, 상기 HA 중합체가 200 kDa의 분자량을 갖는 것인 항체 콘주게이트.

청구항 41

제36항에 있어서, 상기 HA 중합체가 가교-결합되지 않은 것인 항체 콘주게이트.

청구항 42

제36항에 있어서, 상기 항체가 VEGF에 결합하는 항체 단편인 항체 콘주게이트.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 항체 단편이 Fab, Fab-C, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 항체 콘주게이트.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 항체 단편이 Fab, Fab-C 또는 Fab'인 항체 콘주게이트.

청구항 45

제34항에 있어서, 상기 항체가 가역적 프로드럭 링커에 의해 상기 중합체에 공유적으로 부착되는 것인 항체 콘주게이트.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 중합체가 히드로겔인 항체 콘주게이트.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 히드로겔이 PEG-기반의 히드로겔인 항체 콘주게이트.

청구항 48

제46항에 있어서, 상기 히드로겔이 미세미립자(microparticulate) 비드 형태인 항체 콘주게이트.

청구항 49

제34항의 항체 콘주게이트를 포함하는, 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 갖는 대상체에서 혈관 신생을 감소 또는 억제하기 위한 억제학적 조성물.

청구항 50

제34항의 항체 콘주게이트를 포함하는, 병리학적 혈관신생과 연관된 장애의 치료가 필요한 대상체에서 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 치료하기 위한 억제학적 조성물.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 병리학적 혈관신생과 연관된 장애가 안구 장애인 억제학적 조성물.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 안구 장애가 노인성 황반 변성(AMD), 당뇨병성 황반 부종(DME), 당뇨병성 망막증(DR), 또는 망막 정맥 폐쇄(RVO)인 억제학적 조성물.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 안구 장애가 AMD인 억제학적 조성물.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 AMD가 습성 AMD인 억제학적 조성물.

청구항 55

제50항에 있어서, 유리질체강내, 눈에, 안구내, 공막가까이, 장부아래, 맥락막위 또는 국소적으로 투여되는 억제학적 조성물.

청구항 56

제55항에 있어서, 포트 운반 장치에 의해 투여되는 억제학적 조성물.

청구항 57

제50항에 있어서, 상기 대상체가 인간인 억제학적 조성물.

청구항 58

제34항의 항체 콘주게이트 및 억제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 병리학적 혈관신생과 연관된 장애 또는 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애를 치료하기 위한 억제학적 조성물.

청구항 59

(i) VEGF에 특이적으로 결합하는 항체, 및

(ii) 상기 항체에 공유적으로 부착된 HA 중합체를 포함하는 항체 콘주게이트이며, 상기 HA 중합체가 200 kDa의 분자량을 갖고, 가교-결합되지 않는 것이고, 상기 항체가

(a) 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 및

(b) 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인

을 포함하는 것인

항체 콘주게이트.

청구항 60

(i) VEGF에 특이적으로 결합하는 항체, 및

(ii) 상기 항체에 공유적으로 부착된 HA 중합체

를 포함하는 항체 콘주게이트이며,

상기 HA 중합체가 200 kDa의 분자량을 갖고, 가교-결합되지 않는 것이고,

상기 항체가

(a) 서열 번호: 48 또는 서열 번호: 49의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및

(b) 서열 번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄

를 포함하는 것인

항체 콘주게이트.

청구항 61

항체 콘주게이트이며,

(i) VEGF에 특이적으로 결합하는 항체, 및

상기 항체에 공유적으로 부착된 HA 중합체

를 포함하고,

상기 HA 중합체가 100 kDa의 분자량을 갖고, 가교-결합되지 않는 것이고,

상기 항체가

(a) 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 및

(b) 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인

을 포함하거나,

(ii) VEGF에 특이적으로 결합하는 항체, 및

상기 항체에 공유적으로 부착된 HA 중합체

를 포함하고,

상기 HA 중합체가 150 kDa의 분자량을 갖고, 가교-결합되지 않는 것이고,

상기 항체가

(a) 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 및

(b) 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인

을 포함하거나,

(iii) VEGF에 특이적으로 결합하는 항체, 및

상기 항체에 공유적으로 부착된 HA 중합체

를 포함하고,

상기 HA 중합체가 250 kDa의 분자량을 갖고, 가교-결합되지 않는 것이고,

상기 항체가

(a) 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 및

(b) 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인

을 포함하는 것인

항체 콘주게이트.

청구항 62

제59항에 있어서, 상기 항체가 VEGF에 결합하는 항체 단편인 항체 콘주게이트.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 항체 단편이 Fab 또는 Fab-C인 항체 콘주게이트.

청구항 64

제59항의 항체 콘주게이트 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 병리학적 혈관신생과 연관된 장애 또는 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애를 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

- 청구항 105
삭제
- 청구항 106
삭제
- 청구항 107
삭제
- 청구항 108
삭제
- 청구항 109
삭제
- 청구항 110
삭제
- 청구항 111
삭제
- 청구항 112
삭제
- 청구항 113
삭제
- 청구항 114
삭제
- 청구항 115
삭제
- 청구항 116
삭제
- 청구항 117
삭제
- 청구항 118
삭제
- 청구항 119
삭제
- 청구항 120
삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

청구항 165

삭제

청구항 166

삭제

청구항 167

삭제

청구항 168

삭제

- 청구항 169
- 삭제
- 청구항 170
- 삭제
- 청구항 171
- 삭제
- 청구항 172
- 삭제
- 청구항 173
- 삭제
- 청구항 174
- 삭제
- 청구항 175
- 삭제
- 청구항 176
- 삭제
- 청구항 177
- 삭제
- 청구항 178
- 삭제
- 청구항 179
- 삭제
- 청구항 180
- 삭제
- 청구항 181
- 삭제
- 청구항 182
- 삭제
- 청구항 183
- 삭제
- 청구항 184
- 삭제

- 청구항 185
- 삭제
- 청구항 186
- 삭제
- 청구항 187
- 삭제
- 청구항 188
- 삭제
- 청구항 189
- 삭제
- 청구항 190
- 삭제
- 청구항 191
- 삭제
- 청구항 192
- 삭제
- 청구항 193
- 삭제
- 청구항 194
- 삭제
- 청구항 195
- 삭제
- 청구항 196
- 삭제
- 청구항 197
- 삭제
- 청구항 198
- 삭제
- 청구항 199
- 삭제
- 청구항 200
- 삭제

청구항 201

삭제

청구항 202

삭제

청구항 203

삭제

청구항 204

삭제

청구항 205

삭제

청구항 206

삭제

청구항 207

삭제

청구항 208

삭제

청구항 209

삭제

청구항 210

삭제

청구항 211

삭제

청구항 212

삭제

청구항 213

삭제

청구항 214

삭제

청구항 215

삭제

청구항 216

삭제

청구항 217

삭제

청구항 218

삭제

청구항 219

삭제

청구항 220

삭제

청구항 221

삭제

청구항 222

삭제

청구항 223

삭제

청구항 224

삭제

청구항 225

삭제

청구항 226

삭제

청구항 227

삭제

청구항 228

삭제

청구항 229

삭제

청구항 230

삭제

청구항 231

삭제

청구항 232

삭제

청구항 233

삭제

청구항 234

삭제

청구항 235

삭제

청구항 236

삭제

청구항 237

삭제

청구항 238

삭제

청구항 239

삭제

청구항 240

삭제

청구항 241

삭제

청구항 242

삭제

청구항 243

삭제

청구항 244

삭제

청구항 245

삭제

청구항 246

삭제

청구항 247

삭제

청구항 248

삭제

청구항 249

삭제

청구항 250

삭제

청구항 251

삭제

청구항 252

삭제

청구항 253

삭제

청구항 254

삭제

청구항 255

삭제

청구항 256

삭제

청구항 257

삭제

청구항 258

삭제

청구항 259

삭제

청구항 260

삭제

청구항 261

삭제

청구항 262

삭제

청구항 263

삭제

청구항 264

삭제

청구항 265

삭제

청구항 266

삭제

청구항 267

삭제

청구항 268

삭제

청구항 269

삭제

청구항 270

삭제

청구항 271

삭제

청구항 272

삭제

청구항 273

삭제

청구항 274

삭제

청구항 275

삭제

청구항 276

삭제

청구항 277

삭제

청구항 278

삭제

청구항 279

삭제

청구항 280

삭제

청구항 281

삭제

청구항 282

삭제

청구항 283

삭제

청구항 284

삭제

청구항 285

삭제

청구항 286

삭제

청구항 287

삭제

청구항 288

삭제

청구항 289

삭제

청구항 290

삭제

청구항 291

삭제

청구항 292

삭제

청구항 293

삭제

청구항 294

삭제

청구항 295

삭제

청구항 296

삭제

청구항 297

삭제

청구항 298

삭제

청구항 299

삭제

청구항 300

삭제

청구항 301

삭제

청구항 302

삭제

청구항 303

삭제

청구항 304

삭제

청구항 305

삭제

청구항 306

삭제

청구항 307

삭제

청구항 308

삭제

청구항 309

삭제

청구항 310

삭제

청구항 311

삭제

청구항 312

삭제

청구항 313

삭제

청구항 314

삭제

청구항 315

삭제

청구항 316

삭제

청구항 317

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] **서열 목록**

[0002] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 이의 전문은 본 명세서의 참고자료에 편입된다. 2016년 9월 21일에 만들어진 전술한 ASCII 복사체는 50474-110W03_Sequence_Listing_9_21_16_ST25로 명명되며, 크기는 41,764 바이트다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 발명은 일반적으로 연구, 치료 및 진단 목적에 유익한 특성을 갖는 항-VEGF 항체 뿐만 아니라, 항-VEGF 항체가 함유된 조성물들(예컨데, 항체 콘주게이트(conjugates), 융합 단백질, 및 중합체 제제(formulations))에 관한 것이다. 본 발명은 또한 개선된 특성, 예를 들어, 향상된 결합 친화력, 안정성을 갖고 및/또는 발현을 하는 항체 변이체를 동정하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] **발명의 배경**

[0006] 혈관신생(angiogenesis)은 기존의 혈관에서 새로운 혈관이 형성되는 엄격하게-관리되는 과정이다. 적절한 혈액 순환을 보장하기 위해 발생 과정 동안 혈관 신생이 비록 중요하지만, 안구 장애(예컨데, 노인성 황반 변성, AMD) 및 세포 증식성 장애(예컨데, 암)과 같은 혈관신생과 병리학적으로 관련된 많은 질환이 있다. 혈관 내피 성장 인자(VEGF)는 혈관신생 및 VEGF 중화의 임상적으로 입증된 건인체(driver)이며, 예를 들어 항-VEGF 차단(blocking) 항체를 사용하여 병리학적 혈관신생과 관련된 장애를 치료할 수 있다.

[0007] 혈관신생과 병리학적으로 관련된 장애의 치료에 사용하기 위해, 향상된 결합 친화력, 안정성, 약동학(pharmacokinetics) 및/또는 발현을 갖는 항-VEGF 항체와 같은 항체가 필요하다. 특히, 안구 장애(예컨데, AMD(예컨데, 습성 AMD), 당뇨병성 황반 부종(DME), 당뇨병성 망막증(DR), 및 망막 정맥 폐쇄(RVO))의 치료를 위한 장시간-작용 전달을 위한 항체 조성물이 필요하다. 또한, 개선된 특성(예컨데, 강화된 결합 친화력, 안정성, 약동학, 및/또는 발현)을 갖는 이러한 항체를 확인하는 개선된 방법이 여전히 필요하다.

[0008] **발명의 요약**

[0009] 본 발명은 항-VEGF 항체, 항-VEGF 항체가 함유된 조성물(예컨데, 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및 중합체 제제), 그리고 이의 사용 방법들, 예를 들면, 혈관신생과 병리학적으로 관련된 장애(예컨데, 안구 장애 및 세포 증식성 장애)의 치료용 방법들을 제공한다. 본 발명은 또한 개선된 특성, 예를 들면, 강화된 결합 친화력, 안정성, 약동학을 갖고, 및/또는 발현을 하는 항체 변이체를 동정하는 방법에 관한 것이다.

[0010] 한 측면에서, 본 발명은 혈관 내피 성장 인자(VEGF)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때

상기 항체는 다음의 6개의 추가변 영역 (HVRs)을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GX₁TPX₂GGX₃X₄X₅YX₆DSVX₇X₈ (서열 번호: 2)를 포함하는 HVR-H2, 이때 X₁은 Ile 또는 His이며, X₂는 Ala 또는 Arg이며, X₃은 Tyr 또는 Lys이며, X₄는 Thr 또는 Glu이며, X₅는 Arg, Tyr, Gln, 또는 Glu이며, X₆은 Ala 또는 Glu이며, X₇은 Lys 또는 Glu이며, 그리고 X₈은 Gly 또는 Glu이며; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQX₁VSTAVA (서열 번호: 4)를 포함하는 HVR-L1, 이때 X₁은 Asp 또는 Arg이고; (e) 아미노산 서열 X₁ASFLYS (서열 번호: 5)를 포함하는 HVR-L2, 이때 X₁은 Ser 또는 Met이며; 그리고 (f) 아미노산 서열 X₁QGYGX₂PFT (서열 번호: 6)를 포함하는 HVR-L3, 이때 X₁은 Gln, Asn, 또는 Thr이며, 그리고 X₂는 Ala, Asn, Gln, 또는 Arg이다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 다음의 6개 HVRs를 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYTRYADSVKG (서열 번호: 7), GITPAGGYEYADSVKG (서열 번호: 21), 또는 GITPAGGYEYADSVKG (서열 번호: 22)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10) 또는 QQGYGNPFT (서열 번호: 23)를 포함하는 HVR-L3.

[0011] 상기 측면의 일부 구체예들에서, 상기 항체는 다음의 6개 HVRs를 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYTRYADSVKG (서열 번호: 7)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10)를 포함하는 HVR-L3. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 다음의 중쇄 가변 (VH) 도메인 틀구조(framework) 영역 (FRs)을 더 포함한다: (a) 아미노산 서열 EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTIS (서열 번호: 13)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQAPGKLEWVA (서열 번호: 14)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 15)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGLTVTVSS (서열 번호: 16)를 포함하는 FR-H4. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 다음의 경쇄 가변 (VL) 도메인 FRs를 더 포함한다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC (서열 번호: 17)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (서열 번호: 19)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4.

[0012] 상기 측면의 일부 구체예들에서, 상기 항체는 다음의 6개의 HVRs를 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)을 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYEYADSVKG (서열 번호: 22)을 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)을 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)을 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)을 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGNPFT (서열 번호: 23)을 포함하는 HVR-L3. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 다음의 VL 도메인 FRs를 더 포함한다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC (서열 번호: 17)을 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18)을 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (서열 번호: 24)을 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)을 포함하는 FR-L4.

[0013] 상기 측면의 일부 구체예들에서, 상기 항체는 다음의 6개 HVRs를 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYEYADSVKG (서열 번호: 22)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10)를 포함하는 HVR-L3. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 다음의 VL 도메인 FRs를 포함한다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC (서열 번호: 17), DIQMTQSPESLSASVGDVITC (서열 번호: 25), 또는 DIQMTQSPSSLSASVGDVITC (서열 번호: 26)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18) 또는 WYQQKPGEAPKLLIY (서열 번호: 27)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (서열 번호: 19) 또는 GVPSRFSGSGSGTDFTLTIESLQPEDAATYYC (서열 번호: 28)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 다음의 VH 도메인 FRs를 포함한다: (a) 아미노산 서열 EEQLVEEGGLVQPGESELSLCAASGFEIS (서열 번호: 29) 또는 EEQLVEEGGLVQPGESELSLCAASGFEIS (서열 번호: 51)를 포

합하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQEPGELEWVA (서열 번호: 30)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 31)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGLVTVSS (서열 번호: 32)를 포함하는 FR-H4.

[0014] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열, 서열 번호: 11, 40, 또는 42에 대하여 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; (b) 아미노산 서열, 서열 번호: 12, 41, 또는 46에 대하여 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 도메인 및 (b)에서와 같은 VL 도메인을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 VH 도메인은 다음의 FRs를 더 포함한다: (a) 아미노산 서열 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (서열 번호: 13)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQAPGKLEWVA (서열 번호: 14) 또는 WVRQEPGKLEWVA (서열 번호: 39)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 15)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGLVTVSS (서열 번호: 16)를 포함하는 FR-H4. 일부 구체예들에서, 상기 VH 도메인은 아미노산 서열, 서열 번호: 11을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 VL 도메인은 다음의 FRs를 더 포함한다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열 번호: 17) 또는 DIQMTQSPSSLSASVGDRTIDC (서열 번호: 45)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDAATYYC (서열 번호: 19), GVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDSATYYC (서열 번호: 44), 또는 GVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYC (서열 번호: 54)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20) 또는 FGQGTKVEK (서열 번호: 55)를 포함하는 FR-L4. 일부 구체예들에서, 상기 VL 도메인은 아미노산 서열, 서열 번호:12를 포함한다.

[0015] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열, 서열 번호: 11을 포함하는 VH 도메인과 (b) 아미노산 서열, 서열 번호: 12를 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0016] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열, 서열 번호: 40을 포함하는 VH 도메인과 (b) 아미노산 서열, 서열 번호: 12를 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0017] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열, 서열 번호: 42를 포함하는 VH 도메인과 (b) 아미노산 서열, 서열 번호: 12를 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0018] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열, 서열 번호: 42를 포함하는 VH 도메인과 (b) 아미노산 서열, 서열 번호: 41을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0019] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열 서열 번호: 33, 또는 51에 대하여 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; (b) 아미노산 서열 서열 번호: 12, 34, 35, 36, 37, 또는 38에 대하여 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 도메인 및 (b)에서와 같은 VL 도메인을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 다음의 FRs를 더 포함한다: (a) 아미노산 서열 EEQLVEEGGLVQPGESLELSAASGFEIS (서열 번호: 29) 또는 EEQLVEEGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열 번호: 52)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQEPGELEWVA (서열 번호: 30)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 31)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGLVTVSS (서열 번호: 32)를 포함하는 FR-H4. 일부 구체예들에서, 상기 VH 도메인은 아미노산 서열, 서열 번호: 33을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 VH 도메인은 아미노산 서열, 서열 번호: 51을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 다음의 FRs를 더 포함한다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열 번호: 17), DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열 번호: 25), 또는 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열 번호: 26)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18) 또는 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 27)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDAATYYC (서열 번호: 19), GVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC (서열 번호: 24), 또는 GVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDAATYYC (서열 번호: 28)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4. 일부 구체예들에서, 상기 VL 도메인은 아미노산 서열, 서열 번호:34를 포함한다. 상기 VL 도메인은 아미노산 서열, 서

열 번호:35를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 VL 도메인은 아미노산 서열, 서열 번호: 36을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 VL 도메인은 아미노산 서열, 서열 번호: 37을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 VL 도메인은 아미노산 서열, 서열 번호: 12를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 VL 도메인은 아미노산 서열, 서열 번호: 38을 포함한다.

- [0020] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열, 서열 번호: 33을 포함하는 VH 도메인과 (b) 아미노산 서열, 서열 번호: 38을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0021] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열, 서열 번호: 33을 포함하는 VH 도메인과 (b) 아미노산 서열, 서열 번호: 34를 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0022] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열, 서열 번호: 33을 포함하는 VH 도메인과 (b) 아미노산 서열, 서열 번호: 35를 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0023] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열, 서열 번호: 33을 포함하는 VH 도메인과 (b) 아미노산 서열, 서열 번호: 36을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0024] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열, 서열 번호: 33을 포함하는 VH 도메인과 (b) 아미노산 서열, 서열 번호: 37을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0025] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열, 서열 번호: 33을 포함하는 VH 도메인과 (b) 아미노산 서열, 서열 번호: 12를 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0026] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열, 서열 번호: 51을 포함하는 VH 도메인과 (b) 아미노산 서열, 서열 번호: 38을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0027] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열, 서열 번호: 51을 포함하는 VH 도메인과 (b) 아미노산 서열, 서열 번호: 35를 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0028] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열, 서열 번호: 51을 포함하는 VH 도메인과 (b) 아미노산 서열, 서열 번호: 37을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0029] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열, 서열 번호: 51을 포함하는 VH 도메인과 (b) 아미노산 서열, 서열 번호: 12를 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0030] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열, 서열 번호: 48을 포함하는 중쇄 그리고 (b) 아미노산 서열, 서열 번호: 50을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0031] 또다른 측면에서, 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 특징으로 하며, 이때 상기 항체는 (a) 아미노산 서열, 서열 번호: 49를 포함하는 중쇄 그리고 (b) 아미노산 서열, 서열 번호: 50을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0032] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 항체는 VEGF가 VEGF 수용체에 결합하는 것을 방해할 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 VEGF 수용체는 VEGF 수용체 1 (Flt-1)이다. 일부 구체예들에서, 상기 VEGF 수용체는 VEGF 수용체 2 (KDR)이다.
- [0033] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 항체는 약 2 nM 또는 이보다 낮은 Kd를 갖는 인간 VEGF (hVEGF)에 결합한다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 약 75 pM 내지 약 2 nM의 Kd로 hVEGF에 결합한다. 일부 구체

예들에서, 상기 항체는 약 75 pM 내지 약 600 pM의 Kd로 hVEGF에 결합한다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 약 75 pM 내지 약 500 pM의 Kd로 hVEGF에 결합한다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 약 80 pM의 Kd로 hVEGF에 결합한다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 약 60 pM의 Kd로 hVEGF에 결합한다.

- [0034] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 항체는 약 83.5°C 이상의 용융 온도(T_m)를 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 약 85°C 내지 약 91°C의 T_m을 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 약 89°C의 T_m을 갖는다.
- [0035] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 항체는 8 미만의 등전점 (pI)을 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 약 5 내지 약 7의 pI를 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 약 5 내지 약 6의 pI를 갖는다.
- [0036] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 항체는 단일클론, 인간, 인화된(humanized), 또는 키메라(chimeric) 항체다.
- [0037] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 항체는 VEGF에 결합하는 항체 단편(fragment)이다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 단편은 Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv, 그리고 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 단편은 Fab이다.
- [0038] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 항체는 단일특이적(monospecific) 항체다. 선행 측면들중 임의의 다른 구체예들에서, 상기 항체는 다중특이적(multispecific) 항체다. 일부 구체예들에서, 상기 다중특이적 항체는 이중특이적(bispecific) 항체다. 일부 구체예들에서, 상기 이중특이적 항체는 VEGF 및 제 2의 생물학적 분자에 결합하고, 이때 이 분자는 인터루킨 1β (IL-1β); 인터루킨-6 (IL-6); 인터루킨-6 수용체 (IL-6R); 인터루킨-13 (IL-13); IL-13 수용체 (IL-13R); PDGF; 앙지오포이에틴(angiopoietin); 앙지오포이에틴 2; Tie2; S1P; 인테그린(integrins) αβ3, αβ5, 및 α5β1; 베타셀룰린(betacellulin); 아펠린(apelin)/APJ; 에리트르포이에틴(erythropoietin); 보체 인자(complement factor) D; TNF α; HtrA1; VEGF 수용체; ST-2 수용체; 그리고 노인성 황반 변성 (AMD) 위험에 유전적으로 연계된 단백질로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 VEGF 수용체는 VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, 막-결합된 VEGF-수용체 (mbVEGFR), 또는 가용성 VEGF 수용체 (sVEGFR)이다. 일부 구체예들에서, AMD 위험에 유전적으로 연계된 단백질은 보체 경로 구성요소 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a, 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; 인터루킨-8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1; 그리고 TNFRSF10A로 구성된 군에서 선택된다.
- [0039] 또다른 측면에서, 본 발명은 본 명세서에서 기술된 임의의 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 (예컨데, 단리된 폴리뉴클레오티드)를 특징으로 한다. 또다른 측면에서, 본 발명은 상기 항체를 발현시키기 위하여 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 (예컨데, 발현 벡터)를 특징으로 한다. 또다른 측면에서, 본 발명은 전술한 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터가 포함된 숙주 세포를 특징으로 한다. 일부 구체예들에서, 상기 숙주 세포는 포유류 세포다. 일부 구체예들에서, 상기 포유류 세포는 293 세포, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 효모 세포, 또는 식물 세포다. 일부 구체예들에서, 상기 숙주 세포는 원핵 세포다. 일부 구체예들에서, 상기 원핵 세포는 대장균(*E. coli*)이다.
- [0040] 또다른 측면에서, 본 발명은 본 명세서에서 기술된 임의의 항체를 만드는 방법을 특징으로 하는데, 이 방법은 배양 배지에서 전술한 임의의 벡터(예컨데, 발현 벡터)를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 상기 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 상기 항체를 회수하는 것을 더 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 포유류 세포는 293 세포, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 효모 세포, 또는 식물 세포다. 일부 구체예들에서, 상기 숙주 세포는 원핵 세포다. 일부 구체예들에서, 상기 원핵 세포는 대장균(*E. coli*)이다.
- [0041] 또다른 측면에서, 본 발명은 병리학적인 혈관신생과 연관된 장애를 가진 대상에게서 혈관신생을 감소 또는 억제하는 방법을 특징으로 하며, 이 방법은 이 대상에게 유효량의 전술한 항체중 임의의 하나를 투여하는 것을 포함하며, 이로 인하여 이 대상에게서 혈관신생이 감소 또는 억제된다. 일부 구체예들에서, 상기 병리학적인 혈관신생과 연관된 장애는 안구 장애 또는 세포 증식성 장애다. 일부 구체예들에서, 상기 병리학적인 혈관신생과 연관된 장애는 안구 장애다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 장애는 노인성 황반 변성 (AMD), 황반 변성, 황반 부종, 당뇨병성 황반 부종 (DME) (초점, 비-중심 DME 및 확산, 중심-관련된 DME 포함), 망막증, 당뇨병성 망막증 (DR) (증식성 DR (PDR), 비-증식성 DR (NPDR), 및 높은-고도 DR 포함), 다른 허혈-관련된 망막증, 미숙아 망막증 (ROP), 망막 정맥 폐쇄 (RVO) (중심형 (CRVO) 및 분기형 (BRVO) 포함), CNV (근시성 CNV 포함), 각막 혈관신생, 각막 혈관신생과 연합된 질환, 망막 혈관신생, 망막/맥락막 혈관신생과 관련된 질환, 병적 근시, 본

히펠-린다우(von Hippel-Lindau) 질환, 눈의 히스토플라스마증, 가족성 출 유리체망막증 (FEVR), 코우츠 (Coats') 질환, 노리(Norrie) 질환, 골다공증-가성신경교종 증후군 (OPPG), 결막밑 출혈, 피부홍조, 안구 신생 혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염 (RP), 고혈압 망막증, 망막 혈관종 확산, 황반 모세혈관확장증, 홍채 혈관신생, 안구내 혈관신생, 망막 변성, 포낭성 황반 부종 (CME), 맥관염, 부종, 망막염, 결막염 (감염성 결막염 및 비-감염성 (예컨대, 알레르기성) 결막염 포함), 레베르(Leber) 선천성 흑내장, 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염, 눈 히스토플라스마증, 다래끼, 건성안, 외상에 의한 눈 손상, 및 쇼그렌 (Sjögren's) 질환으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 장애는 AMD, DME, DR, 또는 RVO이다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 장애는 AMD이다. 일부 구체예들에서, AMD는 습성 AMD이다. 일부 구체예들에서, 상기 병리학적 혈관신생과 연관된 장애는 세포 증식성 장애다. 일부 구체예들에서, 상기 세포 증식성 장애는 암이다. 일부 구체예들에서, 상기 암은 유방암, 결장직장암, 비-소(small) 세포 폐암, 비-호지킨 (Hodgkins) 림프종 (NHL), 신장암, 전립선암, 간암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 중피종, 및 다발성 골수종으로 구성된 군에서 선택된다.

[0042] 또다른 측면에서, 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 치료하는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 유효량의 전술한 항체중 임의의 하나를 이러한 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 병리학적 혈관신생과 연관된 장애는 안구 장애 또는 세포 증식성 장애다. 일부 구체예들에서, 상기 병리학적 혈관신생과 연관된 장애는 안구 장애다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 장애는 노인성 황반 변성 (AMD), 황반 변성, 황반 부종, 당뇨병성 황반 부종 (DME) (초점, 비-중심 DME 및 확산, 중심-관련된 DME 포함), 망막증, 당뇨병성 망막증 (DR) (증식성 DR (PDR), 비-증식성 DR (NPDR), 및 높은-고도 DR 포함), 다른 허혈-관련된 망막증, 미숙아 망막증 (ROP), 망막 정맥 폐쇄 (RVO) (중심형 (CRVO) 및 분기형 (BRVO) 포함), CNV (근시성 CNV 포함), 각막 혈관신생, 각막 혈관신생과 연합된 질환, 망막 혈관신생, 망막/맥락막 혈관신생과 관련된 질환, 병적 근시, 본 히펠-린다우 질환, 눈의 히스토플라스마증, 가족성 출 유리체망막증 (FEVR), 코우츠 질환, 노리 질환, 골다공증-가성신경교종 증후군 (OPPG), 결막밑 출혈, 피부홍조, 안구 신생 혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염 (RP), 고혈압 망막증, 망막 혈관종 확산, 황반 모세혈관확장증, 홍채 혈관신생, 안구내 혈관신생, 망막 변성, 포낭성 황반 부종 (CME), 맥관염, 부종, 망막염, 결막염 (감염성 결막염 및 비-감염성 (예컨대, 알레르기성) 결막염 포함), 레베르 선천성 흑내장, 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염, 눈 히스토플라스마증, 다래끼, 건성안, 외상에 의한 눈 손상, 및 쇼그렌 질환으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 장애는 AMD, DME, DR, 또는 RVO이다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 장애는 AMD이다. 일부 구체예들에서, AMD는 습성 AMD이다. 일부 구체예들에서, 상기 병리학적 혈관신생과 연관된 장애는 세포 증식성 장애다. 일부 구체예들에서, 상기 세포 증식성 장애는 암이다. 일부 구체예들에서, 상기 암은 유방암, 결장직장암, 비-소(small) 세포 폐암, 비-호지킨 림프종 (NHL), 신장암, 전립선암, 간암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 중피종, 및 다발성 골수종으로 구성된 군에서 선택된다.

[0043] 또다른 측면에서, 본 발명은 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애를 앓고 있는 대상에게서 맥관 투과성 (permeability)을 억제하는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 유효량의 전술한 항체중 임의의 하나를 이 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 이로 인하여 이 대상에게서 맥관 투과성이 억제.

[0044] 또다른 측면에서, 본 발명은 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애, 상기 방법은 유효량의 전술한 항체중 임의의 하나를 이러한 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0045] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애는 뇌 종양과 연합된 부종, 악성과 연합된 복수(ascites), 메이그 증후군(Meigs' syndrome), 폐 염증, 신장 증후군, 위심(pericardial) 삼출(effusion), 늑막 삼출, 및 심혈관 질환과 연합된 투과성으로 구성된 군에서 선택된다.

[0046] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 방법은 이 대상에게 유효량의 제 2의 물질을 투여하는 것을 더 포함하는데, 이때 상기 제 2의 물질은 또다른 항체, 화학치료제, 세포독성 물질, 항-혈관신생 물질, 면역억제 물질, 프로드럭(prodrug), 사이토킨, 사이토킨 항진제, 세포독성 방사능요법, 코르티코스테로이드, 항-구토제, 암 백신, 진통제, 성장-억제 물질, 그리고 제 2의 생물학적 분자에 결합하는 화합물로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 항-혈관신생 물질은 VEGF 항진제이다. 일부 구체예들에서, 상기 VEGF 항진제는 항-VEGF 항체, 항-VEGF 수용체 항체, 가용성 VEGF 수용체 융합 단백질, 압타머, 항-VEGF DARPIn®, 또는 VEGFR 티로신 키나제 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 항-VEGF 항체는 라니비주마브 (LUCENTIS®), RTH-258, 또는 이중특이적 항-VEGF 항체이다. 일부 구체예들에서, 상기 이중특이적 항-VEGF 항체는 항-VEGF/항-Ang2 항체다. 일부 구체예들에서, 상기 항-VEGF/항-Ang2 항체는 RG-7716이다. 일부 구체예들에서, 상기 가용

성 VEGF 수용체 융합 단백질은 아플리베르셉트 (EYLEA®)이다. 일부 구체예들에서, 상기 압타머는 폐갑타니브 (MACUGEN®)이다. 일부 구체예들에서, 상기 항-VEGF DARPin®은 아비시파르 페골이다. 일부 구체예들에서, 상기 VEGFR 티로신 키나제 억제제는 4-(4-브로모-2-플루오로아닐로)-6-메톡시-7-(1-메틸피페리딘-4-일메톡시)퀴나졸린 (ZD6474), 4-(4-플루오로-2-메틸인돌-5-일옥시)-6-메톡시-7-(3-피롤리딘-1-일프로폭시)퀴나졸린 (AZD2171), 바탈라니브 (PTK787), 세막스아미니브 (SU5416), 및 SUTENT® (수니티니브)로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 제 2의 생물학적 분자는 IL-1β; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; 양지오포이에틴; 양지오포이에틴 2; Tie2; S1P; 인테그린 αvβ3, αvβ5, 및 α5β1; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트르포이에틴; 보체 인자 D; TNF α; HtrA1; VEGF 수용체; ST-2 수용체; 그리고 AMD 위험에 유전적으로 연계된 단백질로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 VEGF 수용체는 VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR, 또는 sVEGFR이다. 일부 구체예들에서, AMD 위험에 유전적으로 연계된 단백질은 보체 경로 구성요소 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a, 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1; 그리고 TNFRSF10A로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 제 2의 생물학적 분자에 결합하는 화합물은 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 구체예들에서, 상기 항원-결합 항체 단편은 Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv, 그리고 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군에서 선택된다.

[0047] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 항체는 유리질체강내(intravitreally), 눈에(ocularly), 안구내(intraocularly), 공막가까이(juxtасclerally), 장부아래(subtenonly), 맥락막위(superchoroidally), 국소적으로, 정맥내로, 근육내로, 피내로(intradermally), 경피로, 동맥내로, 복강내로, 병소내로(intralesionally), 두개내로(intracranially), 관절내로, 전립선내로, 늑막내로, 기관내로, 경막내로, 비강내로, 질내로, 직장내로, 국소적으로, 종양안으로, 복강내로, 복막으로, 심실내로, 피하로, 결막밑으로, 내부 소포로, 점막으로, 위심으로, 배꼽밑으로, 안와내로(intraorbitally), 구강으로, 경피로, 흡입에 의해, 주사에 의해, 안약으로, 이식에 의해, 주입에 의해, 연속 주입에 의해, 직접적으로 담겨있는 표적 세포의(bathing target cells) 국소화된 관류에 의해, 카테테르에 의해, 세척에 의해, 크림 안에, 또는 액체 조성물 안에서 투여된다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 유리질체강내, 눈에, 안구내, 공막가까이, 장부아래, 맥락막위, 또는 국소적으로 투여된다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 유리질체강내 주사로 투여된다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 국소적으로 안약으로 또는 연고로 투여된다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 포트 운반 장치(port delivery device)에 의해 투여된다. 일부 구체예들에서, 이 대상은 인간이다.

[0048] 또다른 측면에서, 본 발명은 전술한 항체중 임의의 하나가 포함된 약학 조성물을 특징으로 한다. 일부 구체예들에서, 상기 약학 제제는 중합체를 더 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체는 생분해가능한 중합체다. 일부 구체예들에서, 상기 약학 조성물은 중합체 용매 데포우(depot), 중합체 임플란트, 또는 중합체 미셀(micelle)로 제형화된다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체는 폴리락티드산 폴리글리콜산 (PLGA) 공중합체이다. 일부 구체예들에서, 상기 약학 조성물은 PLGA 로드(rod)로 제형화된다. 일부 구체예들에서, 상기 약학 조성물은 포유동물에서 병리학적 혈관신생과 연관된 장애 또는 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애의 치료에 이용된다. 일부 구체예들에서, 상기 병리학적 혈관신생과 연관된 장애는 안구 장애 또는 세포 증식성 장애다. 일부 구체예들에서, 상기 병리학적 혈관신생과 연관된 장애는 안구 장애다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 장애는 노인성 황반 변성 (AMD), 황반 변성, 황반 부종, 당뇨병성 황반 부종 (DME) (초점, 비-중심 DME 및 확산, 중심-관련된 DME 포함), 망막증, 당뇨병성 망막증 (DR) (증식성 DR (PDR), 비-증식성 DR (NPDR), 및 높은-고도 DR 포함), 다른 허혈-관련된 망막증, 미숙아 망막증 (ROP), 망막 정맥 폐쇄 (RVO) (중심형 (CRVO) 및 분기형 (BRVO) 포함), CNV (근시성 CNV 포함), 각막 혈관신생, 각막 혈관신생과 연합된 질환, 망막 혈관신생, 망막/맥락막 혈관신생과 관련된 질환, 병적 근시, 본 히펠-린다우 질환, 눈의 히스토플라스마증, 가족성 출 유리체망막증 (FEVR), 코우츠 질환, 노리 질환, 골다공증-가성신경교종 증후군 (OPPG), 결막밑 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염 (RP), 고혈압 망막증, 망막 혈관중 확산, 황반 모세혈관확장증, 홍채 혈관신생, 안구내 혈관신생, 망막 변성, 포낭성 황반 부종 (CME), 맥락염, 부종, 망막염, 결막염 (감염성 결막염 및 비-감염성 (예컨데, 알레르기성) 결막염 포함), 레베르 선천성 흑내장, 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염, 눈 히스토플라스마증, 다래끼, 건성안, 외상에 의한 눈 손상, 및 쇼그렌 질환으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 장애는 AMD, DME, DR, 또는 RVO이다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 장애는 AMD이다. 일부 구체예들에서, AMD는 습성 AMD이다. 일부 구체예들에서, 상기 병리학적 혈관신생과 연관된 장애는 세포 증식성 장애다. 일부 구체예들에서, 상기 세포 증식성 장애는 암이다. 일부 구체예들에서, 상기 암은 유방암, 결장직장암, 비-소(small) 세포 폐암, 비-호지킨 림프종 (NHL), 신장암, 전립선암, 간암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 중피종, 및 다발성 골수종으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애는 뇌 종양과 연합된 부종, 악성과

연합된 복수, 메이그 증후군, 폐 염증, 신장 증후군, 위심(pericardial) 삼출, 늑막 삼출, 및 심혈관 질환과 연합된 투과성으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 약학 조성물은 제 2의 물질을 더 포함하며, 이때 상기 제 2의 물질은 또다른 항체, 화학치료제, 세포독성 물질, 항-혈관신생 물질, 면역억제 물질, 프로드러, 사이토킨, 사이토킨 항진제, 세포독성 방사능요법, 코르티코스테로이드, 항-구토제, 암 백신, 진통제, 성장-억제 물질, 및 제 2의 생물학적 분자에 결합하는 화합물로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 항-혈관신생 물질은 VEGF 항진제이다. 일부 구체예들에서, 상기 VEGF 항진제는 항-VEGF 항체, 항-VEGF 수용체 항체, 가용성 VEGF 수용체 융합 단백질, aptamer(아프타머), 항-VEGF DARPIn®, 또는 VEGFR 티로신 키나제 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 항-VEGF 항체는 라니비주마브 (LUCENTIS®), RTH-258, 또는 이중 특이적 항-VEGF 항체이다. 일부 구체예들에서, 상기 이중특이적 항-VEGF 항체는 항-VEGF/항-Ang2 항체이다. 일부 구체예들에서, 상기 항-VEGF/항-Ang2 항체는 RG-7716이다. 일부 구체예들에서, 상기 가용성 VEGF 수용체 융합 단백질은 아플리베르셉트 (EYLEA®)이다. 일부 구체예들에서, 상기 아프타머는 페갑타니브 (MACUGEN®)이다. 일부 구체예들에서, 상기 항-VEGF DARPIn®는 아비시파르 페골(abicipar pegol)이다. 일부 구체예들에서, 상기 VEGFR 티로신 키나제 억제제는 4-(4-브로모-2-플루오로아닐로)-6-메톡시-7-(1-메틸피페리딘-4-일메톡시)퀴나졸린 (ZD6474), 4-(4-플루오로-2-메틸인돌-5-일옥시)-6-메톡시-7-(3-피롤리딘-1-일프로폭시)퀴나졸린 (AZD2171), 바탈라니브 (PTK787), 세막스아미니브 (SU5416), 및 SUTENT® (수니티니브)로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 제 2의 생물학적 분자는 IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; 앙지오포이에틴; 앙지오포이에틴 2; Tie2; S1P; 인테그린 $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, 및 $\alpha 5 \beta 1$; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트르포이에틴; 보체 인자 D; TNF α ; HtrA1; VEGF 수용체; ST-2 수용체; 그리고 AMD 위험에 유전적으로 연계된 단백질로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 VEGF 수용체는 VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR, 또는 sVEGFR이다. 일부 구체예들에서, AMD 위험에 유전적으로 연계된 단백질은 보체 경로 구성요소 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a, 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1; 그리고 TNFRSF10A로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 제 2의 생물학적 분자에 결합하는 화합물은 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 구체예들에서, 상기 항원-결합 항체 단편은 Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv, 그리고 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군에서 선택된다.

[0049] 또다른 측면에서, 본 발명은 (i) 전술한 항체중 임의의 하나의 항체, 그리고 (ii) 상기 항체에 공유적으로 부착된 친수성 중합체가 포함된 항체 콘주게이트를 특징으로 한다. 일부 구체예들에서, 상기 친수성 중합체는 히알루론산 (HA) 중합체 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 중합체이다. 일부 구체예들에서, 상기 친수성 중합체는 HA 중합체이다. 일부 구체예들에서, 상기 HA 중합체는 약 1 메가달톤 (MDa) 또는 그 미만의 분자량을 갖는다. 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 HA 중합체는 약 25 kDa 내지 약 500 kDa 사이의 분자량을 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 HA 중합체는 약 100 kDa 내지 약 250 kDa 사이의 분자량을 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 HA 중합체는 약 200 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 HA 중합체는 가교-결합(cross-linked)되지 않는다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 VEGF에 결합하는 항체 단편이다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 단편은 Fab, Fab-C, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, 그리고 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 단편은 Fab, Fab-C, 또는 Fab'이다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 콘주게이트의 유체역학적 반경은 약 10 nm 내지 약 60 nm 이다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 콘주게이트의 유체역학적 반경은 약 25 nm 내지 약 35 nm이다. 일부 구체예들에서, 상기 유체역학적 반경은 약 28 nm이다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 콘주게이트는 상기 친수성 중합체에 공유적으로 부착되어 있지 않은 기준 항체에 비교하여, 증가된 안구 반감기를 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 반감기는 기준 항체와 비교하여 최소한 약 2-배 증가된다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 반감기는 기준 항체와 비교하여 최소한 약 4-배 증가된다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 반감기는 유리체 반감기이다. 일부 구체예들에서, 상기 기준 항체는 상기 항체 콘주게이트의 항체와 동일하다.

[0050] 또다른 측면에서, 본 발명은 (i) VEGF에 특이적으로 결합하는 항체 그리고 (ii) 이 항체에 공유적으로 부착된 HA 중합체를 포함하는 항체 콘주게이트를 특징으로 하며, 이때 상기 HA 중합체는 1 MDa 또는 이보다 낮은 분자량을 갖는다. 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 HA 중합체는 약 25 kDa 내지 약 500 kDa 사이의 분자량을 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 HA 중합체는 약 100 kDa 내지 약 250 kDa 사이의 분자량을 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 HA 중합체는 약 200 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 HA 중합체는 가교-결합되지 않는다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 VEGF에 결합하는 항체 단편이다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 단편은 Fab, Fab-C, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, 그리고 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 단편은 Fab, Fab-C, 또는 Fab'이다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 콘

쥬게이트의 유체역학적 반경은 약 10 nm 내지 약 60 nm 이다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 콘쥬게이트의 유체역학적 반경은 약 25 nm 내지 약 35 nm이다. 일부 구체예들에서, 상기 유체역학적 반경은 약 28 nm이다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 콘쥬게이트는 상기 친수성 중합체에 공유적으로 부착되어 있지 않은 기준 항체에 비교하여, 증가된 안구 반감기(ocular half-life)를 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 반감기는 기준 항체와 비교하여 최소한 약 2-배 증가된다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 반감기는 기준 항체와 비교하여 최소한 약 4-배 증가된다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 반감기는 유리체 반감기다. 일부 구체예들에서, 상기 기준 항체는 상기 항체 콘쥬게이트의 항체와 동일하다.

[0051] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 항체는 가역적 프로드릭 링커에 의해 상기 중합체에 공유적으로 부착된다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체는 히드로겔(hydrogel)이다. 일부 구체예들에서, 상기 히드로겔은 PEG-기반의 히드로겔이다. 일부 구체예들에서, 상기 히드로겔은 미세미립자(microparticulate) 비드 모양이다.

[0052] 또다른 측면에서, 본 발명은 HA 결합 도메인에 공유적으로 부착된 전술한 항체중 임의의 하나 항체를 포함하는 융합 단백질을 특징으로 한다. 일부 구체예들에서, 상기 HA 결합 도메인은 항체의 중쇄 또는 경쇄에 공유적으로 부착된다. 일부 구체예들에서, 상기 HA 결합 도메인은 중쇄의 C-말단 또는 경쇄의 C-말단에 공유적으로 부착된다. 일부 구체예들에서, 상기 HA 결합 도메인은 중쇄의 C-말단에 공유적으로 부착된다. 일부 구체예들에서, 상기 HA 결합 도메인은 경쇄의 C-말단에 공유적으로 부착된다. 일부 구체예들에서, 상기 융합 단백질은 상기 항체와 상기 HA 결합 도메인 사이에 위치하는 링커를 더 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 링커는 아미노산 서열 GGGGS (서열 번호: 61)을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 링커는 아미노산 서열 GGGGS (서열 번호: 61)로 구성된다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 VEGF에 결합하는 항체 단편이다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 단편은 Fab, Fab-C, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, 그리고 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 단편은 Fab이다. 일부 구체예들에서, 상기 HA 결합 도메인은 Fab의 CH1 도메인의 C-말단에 공유적으로 부착된다. 일부 구체예들에서, 상기 HA 결합 단백질은 Fab의 CL 도메인의 C-말단에 공유적으로 부착된다. 일부 구체예들에서, 상기 HA 결합 도메인은 링크 모듈(link module), G1 도메인, 그리고 리신-풍부한 올리고펩티드로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 HA 결합 도메인은 링크 모듈이다. 일부 구체예들에서, 상기 링크 모듈은 종양 괴사 인자-자극된 유전자 6 (TSG6), CD44, 림프관 내피 히알루로난 수용체 1 (LYVE-1), 히알루로난 및 프로테오글리칸 링크 단백질 (HAPLN) 1, HAPLN2, HAPLN3, HAPLN4, 아그레칸(aggrecan), 브레비칸(brevican), 뉴로칸(neurocan), 포스파칸(phosphacan), 베르시칸(versican), CAB61358, KIA0527, 스타빌린-1, 및 스타빌린-2 링크 모듈로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 링크 모듈은 TSG6 링크 모듈이다. 일부 구체예들에서, 상기 TSG6 링크 모듈은 인간 TSG6 링크 모듈 또는 토끼의 TSG6 링크 모듈이다. 일부 구체예들에서, 상기 TSG6 링크 모듈은 인간 TSG6 링크 모듈이다. 일부 구체예들에서, 상기 인간 TSG6 링크 모듈은 인간 TSG6의 아미노산 잔기 36-128을 포함한다.

[0053] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 융합 단백질은 최소한 하나의 추가 HA 결합 도메인을 더 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 최소한 하나의 추가 HA 결합 도메인은 이 항체의 중쇄 또는 경쇄에 공유적으로 부착된다. 일부 구체예들에서, 상기 최소한 하나의 추가 HA 결합 단백질은 링커를 통하여 상기 항체에 연계된다. 일부 구체예들에서, 상기 링커는 아미노산 서열 GGGGS (서열 번호: 61)을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 링커는 아미노산 서열 GGGGS (서열 번호: 61)로 구성된다. 일부 구체예들에서, 제 1의 HA 결합 도메인은 중쇄에 공유적으로 부착되고, 제 2의 HA 결합 도메인은 경쇄에 공유적으로 부착된다. 일부 구체예들에서, 상기 제 1의 HA 결합 도메인은 중쇄의 C-말단에 공유적으로 부착되고, 상기 제 2의 HA 결합 도메인은 경쇄의 C-말단에 공유적으로 부착된다. 일부 구체예들에서, 상기 최소한 하나의 추가 HA 결합 단백질은 링크 모듈, G1 도메인, 그리고 리신-풍부 올리고펩티드로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 최소한 하나의 추가 HA 결합 단백질은 링크 모듈이다. 일부 구체예들에서, 상기 링크 모듈은 TSG6 링크 모듈이다. 일부 구체예들에서, 상기 TSG6 링크 모듈은 인간 TSG6 링크 모듈 또는 토끼의 TSG6 링크 모듈이다. 일부 구체예들에서, 상기 TSG6 링크 모듈은 인간 TSG6 링크 모듈이다. 일부 구체예들에서, 상기 인간 TSG6 링크 모듈은 인간 TSG6의 아미노산 잔기 36-128을 포함한다.

[0054] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 융합 단백질은 VEGF 및 HA에 특이적으로 결합한다. 일부 구체예들에서, 상기 융합 단백질은 약 2 μM 또는 이보다 낮은 Kd로 HA에 결합한다. 일부 구체예들에서, 상기 융합 단백질은 약 1 nM 내지 약 500 nM 사이의 Kd로 HA에 결합한다. 일부 구체예들에서, 상기 융합 단백질은 약 1 nM 내지 약 50 nM 사이의 Kd로 HA에 결합한다. 일부 구체예들에서, 상기 융합 단백질은 약 10 nM Kd로 HA에 결합한다.

- [0055] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 융합 단백질은 HA 결합 도메인에 공유적으로 부착되어 있지 않은 기준 항체에 비교하여 증가된 안구 반감기를 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 반감기는 기준 항체와 비교하여 최소한 약 2-배 증가된다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 반감기는 기준 항체와 비교하여 최소한 약 4-배 증가된다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 반감기는 유리체 반감기다. 일부 구체예들에서, 상기 기준 항체는 상기 융합 단백질의 항체와 동일하다.
- [0056] 또다른 측면에서, 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 가진 대상에게서 혈관신생을 감소 또는 억제하는 방법을 특징으로 하며, 이 방법은 이 대상에게 유효량의 전술한 항체 콘주게이트중 임의의 하나를 투여하는 것을 포함하며, 이로 인하여 이 대상에게서 혈관신생이 감소 또는 억제된다.
- [0057] 또다른 측면에서, 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 치료하는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 유효량의 전술한 항체 콘주게이트중 임의의 하나를 이러한 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0058] 또다른 측면에서, 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 가진 대상에게서 혈관신생을 감소 또는 억제하는 방법을 특징으로 하며, 이 방법은 이 대상에게 유효량의 전술한 융합 단백질중 임의의 하나를 투여하는 것을 포함하며, 이로 인하여 이 대상에게서 혈관신생이 감소 또는 억제된다.
- [0059] 또다른 측면에서, 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 치료하는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 유효량의 전술한 융합 단백질중 임의의 하나를 이러한 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0060] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 병리학적 혈관신생과 연관된 장애는 안구 장애다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 장애는 AMD, 황반 변성, 황반 부종, DME (초점, 비-중심 DME 및 확산, 중심-관련된 DME 포함), 망막증, DR (PDR, NPDR, 및 높은-고도 DR 포함), 다른 허혈-관련된 망막증, ROP, RVO (CRVO 및 BRVO 형태 포함), CNV (근시성 CNV 포함), 각막 혈관신생, 각막 혈관신생과 연관된 질환, 망막 혈관신생, 망막/맥락막 혈관신생과 관련된 질환, 병적 근시, 본 히켄-린다우 질환, 눈의 히스토플라스마증, FEVR, 코우츠 질환, 노리 질환, OPPG, 결막밑 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신생혈관 녹내장, RP, 고혈압 망막증, 망막 혈관종 확산, 황반 모세혈관확장증, 홍채 혈관신생, 안구내 혈관신생, 망막 변성, CME, 맥관염, 부종, 망막염, 결막염 (감염성 결막염 및 비-감염성 (예컨데, 알레르기성) 결막염 포함), 레베르 선천성 흑내장, 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염, 눈 히스토플라스마증, 다래끼, 건성안, 외상에 의한 눈 손상, 및 쇼그렌 질환으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 장애는 AMD, DME, DR, 또는 RVO이다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 장애는 AMD이다. 일부 구체예들에서, AMD는 습성 AMD이다.
- [0061] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 방법은 이 대상에게 유효량의 제 2의 물질을 투여하는 것을 더 포함하고, 이때 상기 제 2의 물질은 또다른 항체, 항-혈관신생 물질, 사이토킨, 사이토킨 항진제, 코르티코스테로이드, 진통제, 및 제 2의 생물학적 분자에 결합하는 화합물로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 항-혈관신생 물질은 VEGF 항진제이다. 일부 구체예들에서, 상기 VEGF 항진제는 항-VEGF 항체, 항-VEGF 수용체 항체, 가용성 VEGF 수용체 융합 단백질, 압타머, 항-VEGF DARPIn®, 또는 VEGFR 티로신 키나제 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 항-VEGF 항체는 라니비주마브 (LUCENTIS®), RTH-258, 또는 이중특이적 항-VEGF 항체이다. 일부 구체예들에서, 상기 이중특이적 항-VEGF 항체는 항-VEGF/항-Ang2 항체다. 일부 구체예들에서, 상기 항-VEGF/항-Ang2 항체는 RG-7716이다. 일부 구체예들에서, 상기 가용성 VEGF 수용체 융합 단백질은 아플리베르셉트 (EYLEA®)이다. 일부 구체예들에서, 상기 압타머는 페갑타니브 (MACUGEN®)이다. 일부 구체예들에서, 상기 항-VEGF DARPIn®는 아비시파르 페골이다. 일부 구체예들에서, 상기 VEGFR 티로신 키나제 억제제는 4-(4-브로모-2-플루오로아닐로)-6-메톡시-7-(1-메틸피페리딘-4-일메톡시)퀴나졸린 (ZD6474), 4-(4-플루오로-2-메틸인돌-5-일옥시)-6-메톡시-7-(3-피롤리딘-1-일프로폭시)퀴나졸린 (AZD2171), 바탈라니브 (PTK787), 세막스아미니브 (SU5416), 및 SUTENT® (수니티니브)로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 제 2의 생물학적 분자는 IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; 앙지오포이에틴; 앙지오포이에틴 2; Tie2; SIP; 인테그린 $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, 및 $\alpha 5 \beta 1$; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트로포이에틴; 보체 인자 D; TNF α ; HtrA1; VEGF 수용체; ST-2 수용체; 그리고 AMD 위험에 유전적으로 연계된 단백질로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 VEGF 수용체는 VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR, 또는 sVEGFR이다. 일부 구체예들에서, AMD 위험에 유전적으로 연계된 단백질은 보체 경로 구성요소 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a, 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1; 그리고 TNFRSF10A로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 제 2의 생물학적 분자에 결합하는 화합물은 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 구체예들에서, 상기 항원-결합 항체 단편은 Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv, 그리고

(Fab')₂ 단편으로 구성된 군에서 선택된다.

- [0062] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 항체 콘주게이트는 유리질체강내, 눈에, 안구내, 공막가까이, 장부아래, 맥락막위, 국소적으로, 정맥내로, 근육내로, 피내로, 경피로, 동맥내로, 복강내로, 병소내로, 두개내로, 관절내로, 전립선내로, 늑막내로, 기관내로, 경막내로, 비강내로, 질내로, 직장내로, 국소적으로, 종양안으로, 복강내로, 복막으로, 심실내로, 피하로, 결막밑으로, 내부 소포로, 점막으로, 위심으로, 배꼽밑으로, 안와내로, 구강으로, 경피로, 흡입에 의해, 주사에 의해, 안약으로, 이식에 의해, 주입에 의해, 연속 주입에 의해, 직접적으로 담겨있는 표적 세포의 국소화된 관류에 의해, 카테테르에 의해, 세척에 의해, 크립 안에, 또는 액체 조성물 안에서 투여된다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 콘주게이트는 유리질체강내, 눈에, 안구내, 공막가까이, 장부아래, 맥락막위, 또는 국소적으로 투여된다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 콘주게이트는 유리질체강내 주사에 의해 투여된다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 콘주게이트는 국소적으로 안약으로 또는 연고로 투여된다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 콘주게이트는 포트 운반 장치에 의해 투여된다.
- [0063] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 용합 단백질은 유리질체강내, 눈에, 안구내, 공막가까이, 장부아래, 맥락막위, 국소적으로, 정맥내로, 근육내로, 피내로, 경피로, 동맥내로, 복강내로, 병소내로, 두개내로, 관절내로, 전립선내로, 늑막내로, 기관내로, 경막내로, 비강내로, 질내로, 직장내로, 국소적으로, 종양안으로, 복강내로, 복막으로, 심실내로, 피하로, 결막밑으로, 내부 소포로, 점막으로, 위심으로, 배꼽밑으로, 안와내로, 구강으로, 경피로, 흡입에 의해, 주사에 의해, 안약으로, 이식에 의해, 주입에 의해, 연속 주입에 의해, 직접적으로 담겨있는 표적 세포의 국소화된 관류에 의해, 카테테르에 의해, 세척에 의해, 크립 안에, 또는 액체 조성물 안에서 투여된다. 일부 구체예들에서, 상기 용합 단백질은 유리질체강내, 눈에, 안구내, 공막가까이, 장부아래, 맥락막위, 또는 국소적으로 투여된다. 일부 구체예들에서, 상기 용합 단백질은 유리질체강내 주사에 의해 투여된다. 일부 구체예들에서, 상기 용합 단백질은 국소적으로 안약으로 또는 연고로 투여된다. 일부 구체예들에서, 상기 용합 단백질은 포트 운반 장치에 의해 투여된다. 일부 구체예들에서, 이 대상은 인간이다.
- [0064] 또다른 측면에서, 본 발명은 전술한 항체중 임의의 하나가 포함된 약학 조성물 콘주게이트를 특징으로 한다.
- [0065] 또다른 측면에서, 본 발명은 전술한 용합 단백질중 임의의 하나가 포함된 약학 조성물을 특징으로 한다.
- [0066] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 약학 조성물은 포유류는 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 치료하는데 이용된다. 일부 구체예들에서, 상기 병리학적 혈관신생과 연관된 장애는 안구 장애다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 장애는 AMD, 황반 변성, 황반 부종, DME (초점, 비-중심 DME 및 확산, 중심-관련된 DME 포함), 망막증, DR (PDR, NPDR, 및 높은-고도 DR 포함), 다른 허혈-관련된 망막증, ROP, RVO (CRVO 및 BRVO 형태 포함), CNV (근시성 CNV 포함), 각막 혈관신생, 각막 혈관신생과 연관된 질환, 망막 혈관신생, 망막/맥락막 혈관신생과 관련된 질환, 병적 근시, 본 히켈-린다우 질환, 눈의 히스토플라스마증, FEVR, 코우즈 질환, 노리 질환, OPPG, 결막밑 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신생혈관 녹내장, RP, 고혈압 망막증, 망막 혈관중 확산, 황반 모세혈관확장증, 홍채 혈관신생, 안구내 혈관신생, 망막 변성, CME, 맥관염, 부종, 망막염, 결막염 (감염성 결막염 및 비-감염성 (예컨데, 알레르기성) 결막염 포함), 레베르 선천성 흑내장, 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염, 눈 히스토플라스마증, 다래끼, 건성안, 외상에 의한 눈 손상, 및 쇼그렌 질환으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 장애는 AMD, DME, DR, 또는 RVO이다. 일부 구체예들에서, 상기 안구 장애는 AMD이다. 일부 구체예들에서, AMD는 습성 AMD이다.
- [0067] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 약학 조성물은 제 2의 물질을 투여하는 것을 더 포함하며, 이때 상기 제 2의 물질은 또다른 항체, 항-혈관신생 물질, 사이토킨, 사이토킨 항진제, 코르티코스테로이드, 진통제, 및 제 2의 생물학적 분자에 결합하는 화합물로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 항-혈관신생 물질은 VEGF 항진제이다. 일부 구체예들에서, 상기 VEGF 항진제는 항-VEGF 항체, 항-VEGF 수용체 항체, 가용성 VEGF 수용체 용합 단백질, 압타머, 항-VEGF DARPIn®, 또는 VEGFR 티로신 키나제 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 항-VEGF 항체는 라니비주마브 (LUCENTIS®), RTH-258, 또는 이중특이적 항-VEGF 항체이다. 일부 구체예들에서, 상기 이중특이적 항-VEGF 항체는 항-VEGF/항-Ang2 항체다. 일부 구체예들에서, 상기 항-VEGF/항-Ang2 항체는 RG-7716이다. 일부 구체예들에서, 상기 가용성 VEGF 수용체 용합 단백질은 아플리베르셉트 (EYLEA®)이다. 일부 구체예들에서, 상기 압타머는 폐갑타니브 (MACUGEN®)이다. 일부 구체예들에서, 상기 항-VEGF DARPIn®는 아비시파르 폐골이다. 일부 구체예들에서, 상기 VEGFR 티로신 키나제 억제제는 4-(4-브로모-2-플루오로아닐로)-6-메톡시-7-(1-메틸피페리딘-4-일메톡시)퀴나졸린 (ZD6474), 4-(4-플루오로-2-메틸인돌-5-일옥시)-6-메톡시-7-(3-피롤리딘-1-일프로폭시)퀴나졸린 (AZD2171), 바탈라니브 (PTK787), 세막스아미니브 (SU5416),

및 SUTENT® (수니티니브)로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 제 2의 생물학적 분자는 IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; 양지오포이에틴; 양지오포이에틴 2; Tie2; S1P; 인테그린 α v β 3, α v β 5, 및 α 5 β 1; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트르포이에틴; 보체 인자 D; TNF α ; HtrA1; VEGF 수용체; ST-2 수용체; 그리고 AMD 위험에 유전적으로 연계된 단백질로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 VEGF 수용체는 VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR, 또는 sVEGFR이다. 일부 구체예들에서, AMD 위험에 유전적으로 연계된 단백질은 보체 경로 구성요소 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a, 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1; 그리고 TNFRSF10A로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 제 2의 생물학적 분자에 결합하는 화합물은 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 구체예들에서, 상기 항원-결합 항체 단편은 Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv, 그리고 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군에서 선택된다.

[0068] 또다른 측면에서, 본 발명은 표적 분자에 항체의 강화된 결합을 부여하는 아미노산 잔기 변경을 동정하는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) 후보(candidate) 항체 변이체들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 디스플레이 라이브러리(display library)를 제공하며, 이때 각각의 후보 항체 변이체는 기준 항체와 비교하였을 때, VH 또는 VL에 아미노산 잔기 변경을 포함하며, 그리고 이때 상기 VH 또는 VL의 모든 위치에서 아미노산 잔기 변형이 디스플레이 라이브러리에 존재하고; (b) 상기 표적 분자에 상기 후보 항체 변이체들의 결합을 기반으로 상기 디스플레이 라이브러리를 분류함으로써, 분류된(sorted) 라이브러리가 형성되고, 이때 상기 분류된 라이브러리는 상기 기준 항체와 비교하였을 때 상기 표적 분자에 강화된 결합을 부여하는 후보 항체 변이체들을 포함하며; 그리고 (c) 대량의 병행(parallel) 서열화를 통하여 결정되는, 디스플레이 라이브러리와 상기 분류된 라이브러리에 존재하는 각각의 아미노산 잔기 변경의 빈도를 비교하고, 이로 인하여 상기 디스플레이 라이브러리와 비교하였을 때, 상기 분류된 라이브러리에 각 아미노산 잔기 변경이 더 많은 지를 결정하고, 이로 인하여 상기 아미노산 잔기 변경은 상기 디스플레이 라이브러리와 비교하여, 상기 분류된 라이브러리에 더 많다면, 이 표적 분자에 강화된 결합을 부여하는 것으로 동정된다.

[0069] 또다른 측면에서, 본 발명은 항체에 강화된 안정성을 부여하는 아미노산 잔기 변경을 동정하는 방법을 특징으로 하는데, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) 후보 항체 변이체들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 디스플레이 라이브러리를 제공하며, 이때 각각의 후보 항체 변이체는 기준 항체와 비교하였을 때, VH 또는 VL에 아미노산 잔기 변경을 포함하며, 그리고 이때 상기 VH 또는 VL의 모든 위치에서 아미노산 잔기 변형이 디스플레이 라이브러리에 존재하고; (b) 상기 표적 분자에 상기 후보 항체 변이체들의 결합을 기반으로 상기 디스플레이 라이브러리를 분류함으로써, 분류된 라이브러리가 형성되고, 이때 상기 분류된 라이브러리는 상기 기준 항체와 비교하였을 때 상기 표적 분자에 강화된 안정성을 부여하는 후보 항체 변이체들을 포함하며; 그리고 (c) 대량의 병행 서열화를 통하여 결정되는, 디스플레이 라이브러리와 상기 분류된 라이브러리에 존재하는 각각의 아미노산 잔기 변경의 빈도를 비교하고, 이로 인하여 상기 디스플레이 라이브러리와 비교하였을 때, 상기 분류된 라이브러리에 각 아미노산 잔기 변경이 더 많은 지를 결정하고, 이로 인하여 상기 아미노산 잔기 변경은 상기 디스플레이 라이브러리와 비교하여, 상기 분류된 라이브러리에 더 많다면, 이 표적 분자에 강화된 안정성을 부여하는 것으로 동정된다.

[0070] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 방법은 (b) 단계 다음에 대량의 병행 서열화를 통하여 상기 디스플레이 라이브러리와 상기 분류된 라이브러리에 각 아미노산 변경이 존재하는 빈도를 결정하는 것을 더 포함한다.

[0071] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 아미노산 잔기 변경은 상기 디스플레이 라이브러리와 비교하였을 때, 상기 분류된 라이브러리에 최소한 2-배 더 많다.

[0072] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 디스플레이 라이브러리는 파아지 디스플레이 라이브러리, 박테리아 디스플레이 라이브러리, 효모 디스플레이 라이브러리, 포유류 디스플레이 라이브러리, 리보솜 디스플레이 라이브러리, 및 mRNA 디스플레이 라이브러리로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 디스플레이 라이브러리는 파아지 디스플레이 라이브러리이다.

[0073] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 아미노산 잔기 변경은 축퇴(degenerate) 코돈 세트에 의해 인코드된다. 일부 구체예들에서, 상기 축퇴 코돈 세트는 *NMK* 또는 *NNS* 코돈 세트이며, 이때 *N* 은 A, C, G, 또는 T 이고; *K* 는 G 또는 T이고; 그리고 *S* 는 C 또는 G이다. 일부 구체예들에서, 상기 축퇴 코돈 세트는 *NMK* 코돈 세트이다.

[0074] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 단계 (b)의 분류는 상기 디스플레이 라이브러리에 고정된

(immobilized) 표적 분자 또는 에피토프(epitope)를 접촉시키는 것을 포함한다.

- [0075] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 단계 (b)의 분급은 상기 디스플레이 라이브러리에 가용성 표적 분자 또는 에피토프를 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0076] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 디스플레이 라이브러리는 최소한 1×10^6 개의 후보 항체 변이체들을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 디스플레이 라이브러리는 최소한 1×10^8 개의 항체 변이체들을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 디스플레이 라이브러리는 최소한 1×10^9 개의 항체 변이체들을 포함한다.
- [0077] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 대량의 병행 서열화는 심도(deep) 서열화, 초(ultra)-심도 서열화, 및/또는 차-세대(next-generation) 서열화를 포함한다.
- [0078] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 항체는 단일클론 항체이다.
- [0079] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 항체는 IgG 항체이다.
- [0080] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 항체는 항체 단편이다. 일부 구체예들에서, 항체 단편은 Fab, scFv, Fv, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, 및 디아바디(diabody)로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 단편은 Fab이다.
- [0081] 선행 측면들중 임의의 일부 구체예들에서, 상기 방법은 이 방법의 단계들에 의해 동정된 아미노산 잔기 변경을 포함하는 항체를 만드는 것을 더 포함한다.
- [0082] 일부 측면들에 있어서, 전술한 항체중 임의의 하나를 이용하여 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 가진 대상에서 혈관 신생을 감소 또는 억제하기 위한 약물을 제조할 수 있다.
- [0083] 일부 측면들에 있어서, 전술한 항체중 임의의 하나를 이용하여 병리학적 혈관신생과 연관된 장애의 치료를 필요로 하는 대상에게서 이를 치료하는 약물을 제조할 수 있다.
- [0084] 일부 측면들에 있어서, 전술한 항체중 임의의 하나를 이용하여 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애를 앓고 있는 대상에게서 맥관 투과성을 억제하는 약물을 제조할 수 있다.
- [0085] 일부 측면들에 있어서, 전술한 항체중 임의의 하나의 항체는 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 가진 대상에게서 혈관 신생을 감소 또는 억제에게서 혈관 신생을 감소 또는 억제하는 방법에 이용할 수 있다.
- [0086] 일부 측면들에 있어서, 전술한 항체중 임의의 하나의 항체는 병리학적 혈관신생과 연관된 장애의 치료를 필요로 하는 대상에게서 이를 치료하는 방법에 이용할 수 있다.
- [0087] 일부 측면들에 있어서, 전술한 항체중 임의의 하나의 항체는 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애를 앓고 있는 대상에게서 맥관 투과성을 억제하는 방법에 이용할 수 있다.
- [0088] 또다른 측면에서, 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 가진 대상에게서 혈관 신생을 감소 또는 억제하는 방법에 사용하기 위한 전술한 항체중 임의의 하나의 항체를 포함하는 조성물을 특징으로 한다.
- [0089] 또다른 측면에서, 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애의 치료를 필요로 하는 대상에게서 이를 치료하는 방법에 사용을 위한 전술한 항체중 임의의 하나의 항체를 포함하는 조성물을 특징으로 한다.
- [0090] 또다른 측면에서, 본 발명은 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애를 앓고 있는 대상에게서 맥관 투과성을 억제하는 방법에 사용을 위한 전술한 항체중 임의의 하나의 항체를 포함하는 조성물을 특징으로 한다.
- [0091] 일부 측면들에 있어서, 전술한 항체 콘주게이트 중 임의의 하나를 이용하여 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 가진 대상에서 혈관 신생을 감소 또는 억제하기 위한 약물을 제조할 수 있다.
- [0092] 일부 측면들에 있어서, 전술한 항체 콘주게이트 중 임의의 하나를 이용하여 병리학적 혈관신생과 연관된 장애의 치료를 필요로 하는 대상에게서 이를 치료하는 약물을 제조할 수 있다.
- [0093] 일부 측면들에 있어서, 전술한 항체 콘주게이트 중 임의의 하나는 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 가진 대상에게서 혈관 신생을 감소 또는 억제에게서 혈관 신생을 감소 또는 억제하는 방법에 이용할 수 있다.
- [0094] 일부 측면들에 있어서, 전술한 항체 콘주게이트 중 임의의 하나는 병리학적 혈관신생과 연관된 장애의 치료를 필요로 하는 대상에게서 이를 치료하는 방법에 이용할 수 있다.

- [0095] 또다른 측면에서, 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 가진 대상에게서 혈관 신생을 감소 또는 억제하는 방법에 사용하기 위한 전술한 항체 콘주게이트 중 임의의 하나를 포함하는 조성물을 특징으로 한다.
- [0096] 또다른 측면에서, 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애의 치료를 필요로 하는 대상에게서 이를 치료하는 방법에 사용을 위한 전술한 항체 콘주게이트중 임의의 하나의 항체 콘주게이트를 포함하는 조성물을 특징으로 한다.
- [0097] 일부 측면들에 있어서, 전술한 융합 단백질중 임의의 하나를 이용하여 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 가진 대상에게서 혈관 신생을 감소 또는 억제용 약물을 제조할 수 있다.
- [0098] 일부 측면들에 있어서, 전술한 융합 단백질중 임의의 하나를 이용하여 병리학적 혈관신생과 연관된 장애의 치료를 필요로 하는 대상에게서 이를 치료하는 약물을 제조할 수 있다.
- [0099] 일부 측면들에 있어서, 전술한 융합 단백질중 임의의 하나를 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 가진 대상에게서 혈관 신생을 감소 또는 억제하는 방법에 이용할 수 있다.
- [0100] 일부 측면들에 있어서, 전술한 융합 단백질중 임의의 하나를 병리학적 혈관신생과 연관된 장애의 치료를 필요로 하는 대상에게서 이를 치료하는 방법에 이용할 수 있다.
- [0101] 또다른 측면에서, 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 가진 대상에게서 혈관 신생을 감소 또는 억제하는 방법에 사용하기 위한 전술한 융합 단백질중 임의의 하나를 포함하는 조성물을 특징으로 한다.
- [0102] 또다른 측면에서, 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애의 치료를 필요로 하는 대상에게서 이를 치료하는 방법에 사용을 위한 전술한 융합 단백질중 임의의 하나를 포함하는 조성물을 특징으로 한다.
- [0103] 치료 방법들 (예컨데, 항체 성질, 추가 치료제, 혈관신생과 병리학적으로 관련된 장애 (예컨데, 안구 장애 이를테면, AMD, DME, DR, 또는 RVO), 투여 경로 (예컨데, 유리체내 주사), 그리고 이와 유사한 것들)에 관하여 기술된 임의의 구체예들은 상기에서 기술하는 약물, 용도 및 조성물 문맥에 이용될 수 있음을 인지할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0104] 도면의 간단한 설명

도 1a-1f는 항-gD tag 항체 (항-gD), 단백질 L, 또는 단백질 A에 대항하는 *MMK* 워크(walk) VH (도. 1a-1c) 및 VL (도. 1d-1f) 라이브러리로부터 얻는 패닝(pannings)에서 모든 돌연변이체 대한 풍도(enrichment) 비율의 \log_2 (또는 \log_2 풍도 비율로도 지칭됨)를 보여주는 히트맵(heatmaps)이다. 위치 2에서 시작되는 상기 아미노산 서열 야생형 G6.31 VH (도. 1a-1c) 또는 VL (도. 1d-1f)는 각 히트맵의 아래에 나타난다. 도 1a는 항-gD에 대항하는 *MMK* 워크 VH 라이브러리의 패닝으로 얻은 결과를 나타낸다. 도 1b는 단백질 L에 대항하는 *MMK* 워크 VH 라이브러리의 패닝으로 얻은 결과를 나타낸다. 도 1c는 단백질 A에 대항하는 *MMK* 워크 VH 라이브러리의 패닝으로 얻은 결과를 나타낸다. 도 1d는 항-gD에 대항하는 *MMK* 워크 VL 라이브러리의 패닝으로 얻은 결과를 나타낸다. 도 1e는 단백질 L에 대항하는 *MMK* 워크 VL 라이브러리의 패닝으로 얻은 결과를 나타낸다. 도 1f는 단백질 A에 대항하는 *MMK* 워크 VL 라이브러리의 패닝으로 얻은 결과를 나타낸다.

도 2a-2b는 항-gD-tag 항체 ("gD"), 단백질 A ("protA"), 및 단백질 L ("protL")에 대항하는 상기 VH (도 2a) 및 상기 VL (도 2b)의 패닝으로부터 \log_2 풍도 비율 간의 상관관계를 나타내는 일련의 도면과 표이다. 표들은 (i) gD와 protA 간의; (ii) gD와 protL 간의; 그리고 (iii) protA와 protL간의 비교를 위한 피어슨(Pearson) 상관계수 (r^2 ; "Cor")를 나타낸다. 소수성 코어 ("core"), 연장된(extended) 소수성 코어 ("연장된 코어"), VH/VL 인터페이스 ("인터페이스(interface)")에 속하는 것으로 분류된 위치, 또는 중요한 수소 결합 중요한 수소 결합, 염 다리를 형성하는 위치 또는 기타 관심 위치("기타(other)")에서 돌연변이 풍도 비율에 관한 상관관계가 또한 결정되었다. 이들 도면은 파아지 상에서 Fab 분자의 폴딩(folding)을 탐지하기 위하여 항-gD 항체, 단백질 A, 또는 단백질 L을 이용하면 유사한 결과가 얻어진다는 것을 보여준다. 상이한 패닝에서 이들 풍도 비율에서 유의적으로 차이가 나는 유일한 돌연변이들은 단백질 A 또는 단백질 L 결합 부위에 직접적으로 위치한 것들이다. 이들 잔기는 차례로 "단백질 A", "단백질 L 1", 및 "단백질 L 2" (단백질 L의 경우 2개 결합 부위가 존재)로 라벨된다. 단백질 L의 결합 부위는 Graille et al. *Structure* 9(8): 679-687, 2001에서 기술하고 있으며, 이것은 전문이 본 명세서의 참고자료에 편입된다. 단백질 G의 결합 부위는 Graille et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(10): 5399-5404, 2000에서 기술하고 있으며, 이것은 전문이 본 명세서의 참고자료에 편입된다.

도 3a-3b는 상기 VH (도 3a) 및 VL (도 3b)에서 주어진 위치에서 모든 돌연변이에 대한 log₂ 풍도 비율을 나타내는 그래프다. 소수성 코어 (짙은 회색), 연장된 소수성 코어 (중간 회색), 또는 VH/VL 인터페이스 (얇은 회색)에 위치하느냐에 따라 위치에 음영을 주었다. 보존되고, 돌연변이를 용인하지 않는 위치 (log₂ 풍도 비율 Z-점수 <-0.5)를 표시하였다.

도 3c-3d는 차례로 상기 VH (도3c) 및 VL (도 3d)의 구조에서 보존된 위치들의 소재를 보여주는 상기 자유-항원 G6 Fab (단백질 데이터뱅크 (PDB) 코드: 2FJF)의 결정 구조다. 음영은 도 3a-3b에서와 동일하다. 또한, 중요한 수소 결합, 염 다리를 형성하는, 또는 다른 중요한 보존된 위치들이 표시되어 있다.

도 4a-4b는 VEGF에 대항하는 MWK 위크 VH (도 4A) 및 VL (도 4B) 라이브러리의 패닝에 의해 획득된 모든 단일 아미노산 치환의 log₂ 풍도 비율을 나타내는 히트맵이다.

도 5a-5b는 VH (도 5a) 및 VL (도 5b) 라이브러리의 VEGF 패닝으로 획득된 log₂ 풍도 비율은 이중-양식(bi-modal) 분포를 갖는다는 것을 보여주는 그래프다. 검출 한계를 초과하는 충분하지 않은 돌연변이는 특정 실험에서 관찰된 최대 감소(depletion)로 설정되었다. 돌연변이는 HVR에서의 위치, gD 패닝을 사용하여 식별된 보존된 틀구조 또는 이 틀구조의 나머지 부분에 따라 색상이 지정된다.

도 5c-5d는 부모계(parental) 항체 G6.31 (도 5C)와 비교하여 Kd에서의 변화(도 5c) 또는 G6.31과 비교하여 용융 온도 (T_m)의 변화 (도 5d)를 갖는 선택된 돌연변이의 VEGF 패닝의 log₂ 풍도 비율 간의 비교를 나타내는 그래프다. 도 5a-5b에서와 동일한 음영 계획을 이용한다.

도 5e-5f는 선택된 돌연변이의 소재를 구(sphere)로 나타낸 G6 Fab의 VH (도 5e) 및 VL (도 5f)(PDB 코드 2FJG)의 VEGF-결합된 형태의 결정 구조다. VEGF의 표면은 표면 묘사(representation)로 나타낸다. 도 5a-5b에서와 동일한 음영 계획을 이용한다. 라벨은 G6.31과 비교하였을 때, T_m (°C)에서의 변화, 그리고 결합 친화력 (Kd)의 변화 배수를 나타낸다.

도 6a는 자유-항원 G6 Fab (PDB 2FJF)의 결정 구조에서 존재하는 분자들의 겹쳐짐을 시각화한 것으로, 분자들에 의해 나타나는 상이한 Fab 엘보우 각(elbow angles)을 보여준다.

도 6b-6c는 차례로 작은 Fab 엘보우 각 (도 6b, 짙은 회색)을 갖는 분자와 큰 Fab 엘보우 각 (도 6c, 얇은 회색)을 갖는 분자에서 VL-VH 인터페이스 그리고 LC-83F 및 LC-106I의 측쇄 입체 구조를 상세하게 보여주는 그림이다. β-스트랜드 E, 헬릭스 α-1, 그리고 이들 두 요소를 연결하는 루프는 간결함을 위하여 생략한다.

도 7a는 PDB의 319 인간 항체 구조로부터 위치 LC-F83의 chi1 (χ₁) 각을 나타내는 그래프(우측 패널)이다. 렌더링 (좌측 패널)은 "인(in)" 및 "아웃(out)" 입체구조에서 LC-F83의 위치를 나타낸다.

도 7b는 위치 105에서 psi (Ψ) 각, 그리고 위치 106에서 phi (Φ) 각에 대한 엘보우 각 골격 입체구조를 나타내는 그래프(우측 패널)이다. 도 7a에 나타낸 바와 같이 이들의 chi1 각에 따라 구조를 음영화한다. 렌더링 (좌측 패널)은 "인(in)" 및 "아웃(out)" 입체구조에서 경쇄 (LC) 위치 103-108를 나타낸다.

도 7c는 "인(in)"-입체구조와 "아웃(out)"-입체구조에서 LC-F83을 갖는 항체 구조에 대한 엘보우 각(상부 우측)과 VL/CL 인터페이스 영역(아래 우측)을 나타내는 일련의 그래프다. 이들 결과는 LC-F83를 휴대하는 PDB와 LC-83A를 휴대하는 22개의 인간 구조로부터 319개 인간 Fab 구조의 Fab 엘보우 각과 VL/CL 인터페이스 크기를 비교한다. 좌측 패널은 큰 엘보우 각과 작은 엘보우 각을 갖는 G6 분자의 겹쳐진 렌더링을 나타낸다. 상기 VL/CL 인터페이스 영역은 원으로 표시된다.

도 8a는 큰 엘보우 각 (G6 쇄 VU, G6-VU)을 갖는 G6 Fab 결정구조와 작은 엘보우 각을 갖는 결정 구조 (G6 쇄 BA, G6-BA)에 대한 LC-F83의 chi1 각을 나타내는 그래프다.

도 8b는 표시된 분자의 분자 역학(dynamics) 시뮬레이션 결과를 나타내는 그래프다. 엘보우 각은 시간에 대한 함수로 플롯된다.

도 8c는 VH/VL 뒤틀림 각 ("HL-각")의 함수로써 Fab 엘보우 각을 플롯팅한 분자 역학 시뮬레이션 결과를 나타내는 그래프다. 산점도/등고선도(scatter/contour plot)는 분자 역학 시뮬레이션 동안 VU.F83 (짙은 회색) 및 VU.F83A (얇은 회색)가 취하는 VH/VL 뒤틀림 각과 엘보우 각을 보여준다. 2개 분자에 대한 2군데 별개 집단을 볼 수 있다.

도 9a는 100 ns 분자 역학 시뮬레이션의 최종 75ns 동안 획득된, 분자 BA-F83 ("아웃(out)"-입체구조의 LC-

F83), BA-F83A, VU-F93 ("인(in)"-입체구조의 LC-F83) 및 VU-F83A의 Fab 엘보우 각을 보여주는 그래프다. 모든 시료는 변이 분석(ANOVA)/Tukey's Honest 유의적 차이 (HSD) 테스트에 의해 측정하였을 때, BA-F83 및 BA-F83A를 제외하고, 상당히 상이하였다($p < 0.001$).

도 9b는 "아웃(out)" 입체구조 (검정)의 LC-F83을 갖는, 5개의 G6_{결합안된} 분자 및 "인(in)" 입체구조 (짙은 회색)의 LC-F83을 갖는, 5개의 G6_{결합안된} 분자에 대한 VH/VL 뒤틀림구조, 뿐만 아니라 VEGF-결합된 G6 구조 ("AG 결합된", 옅은 회색)의 VH/VL 뒤틀림 각을 나타내는 그래프다.

도 9c는 도 9a에서와 같이, 동일한 100ns 분자 역학 시뮬레이션 동안 동일한 분자의 VH/VL 뒤틀림 각 분포를 보여주는 그래프다. ANOVA/Tukey HSD 테스트에서 측정하였을 때, 모든 시료는 BA-F83A 및 VU-F83A를 제외하고, 상당히 상이하였다($p < 0.001$).

도 9d는 G6.31과 G6.31_{LC-F83A} 사이에 상이한 상이한 수소-중수소 교환 패턴을 갖는 영역을 보여주는, 결합안된 G6의 결정 구조의 렌더링이다. 짙은 회색 음영이 표시된 영역은 G6.31과 비교하였을 때, G6.31_{LC-F83A}에서 더 느린 교환을 갖고, 한편 중간 회색 음영이 표시된 영역은 G6.31과 비교하였을 때, G6.31_{LC-F83A}에서 더 빠른 교환을 갖는다. F83A 돌연변이와 DE 루프의 위치는 실선으로 표시된다.

도 10a는 IGKV1 생식선(germlines)으로부터 기인된 항체 서열의 표시된 VL 위치에 있어서 체세포 돌연변이의 분포를 나타내는 그래프다. 위쪽 패널의 돌연변이 분포는 Genbank, 단백질 데이터베이스 (PDB), Kabat 데이터베이스, Abysis 데이터베이스, 및 IMGT 데이터베이스 ("공적 데이터 세트")로부터 공개적으로 이용가능한 인간 항체 서열을 이용하여 얻었다. 아래 패널의 돌연변이 분포는 1000명 이상의 개인의 림프구 조직으로부터 얻은 cDNA의 단일 분자 실시간 서열화 (SMRT)를 이용하여 얻었다. 공적으로 이용가능한 서열의 N-말단에서 높은 돌연변이 비율은 인공 클로닝으로부터 유래될 수 있다.

도 10b는 도 10a, 실시예 8 (Sanger) 또는 SMRT 데이터 세트(PacBio)에서 설명된 공적 데이터 세트로부터 GK1.39 서열의 경우 위치 LC-83에서 가장 흔한 돌연변이를 보여주는 그래프다. IGKV1.39는 위치 LC-83에 페닐알라닌을 휴대한다. 각각의 아미노산 크기에 따라 점에 색이 부여된다. 큰 아미노산은 노란색이며, 작은 아미노산은 검붉은 색이다.

도 10c는 공적 데이터 세트 (Sanger) 또는 SMRT 데이터 세트 (PacBio)에서 발견된 모든 IGKJ 서열에서 위치 LC-106에서 가장 흔한 돌연변이를 보여주는 그래프다. 각각의 아미노산 크기에 따라 점에 음영이 부여된다. 큰 아미노산은 옅은 회색이고, 작은 아미노산은 짙은 회색이다.

도 10d는 BIACORE® 표면 플라즈몬 공명 (좌측 패널)으로 측정하였을 때, G6.31의 선택된 돌연변이 변이체들의 친화력(Kd) (좌측 패널), 그리고 시차주사 형광측정계 (DSF)로 측정하였을 때, 선택된 G6.31 돌연변이 변이체들의 용융 온도 T_m (우측 패널)를 보여주는 일련의 그래프다. 좌측 패널의 원은 오차 막대로 표시된 각각의 표준 편차를 갖는, 3회 반복(replicates)에서 평균을 나타낸다. 우측 패널의 원은 3회 반복의 평균 값과 오차 막대로 표시된 각각의 표준 편차를 나타낸다.

도 11a는 실시예 11에서 설명된 바와 같이, 토끼 눈에 각각의 Fab를 유리체내 (IVT) 투여한 후, 각각 G6.31 AAEE, G6.31 WT, 및 G6.31 AARR에 대한 수용액 및 유리체 약동학을 나타내는 그래프다.

도 11b는 실시예 11에서 설명된 바와 같이, 토끼 눈에 각각의 Fab를 유리체내 (IVT) 투여한 후, 혈청으로부터 G6.31 AAEE, G6.31 WT, 및 G6.31 AARR 각각의 제거를 보여주는 그래프다.

도 12는 표시된 항체 클론의 모세관 전기영동-도데실 술페이트 나트륨(CE-SDS)에 의한 단편화(fragmentation) 분석을 보여주는 표다. 단편화는 37°C, BS 안에서 4 주, 12 주, 및 24 주 후, 낮은 분자량의 존재 (%LMW) 백분율로 나타낸다. 상기 단편화는 야생형 G6.31과 비교하였을 때, 모든 N94A 변이체에서 일관되게 감소된다. 고 분자량 존재 (%HMW)는 불순물 또는 응집물을 나타낸다. 이 분석에서 주요 피크 크기는 단편화 정도와 직접적으로 상관관계에 있지는 않지만, 단편 크기와 염료 라벨링 정도에 의존적이다. 상기 항-VEGF Fab 라니비주마브는 대조로 사용된다.

도 13은 실시예 12에서 설명된 바와 같이, Fab 농도를 변화시키면서, 부모계 G6.31과 비교하였을 때, G6.31 변이체 LC-N94A의 VEGF-유도된 HUVEC 플롯을 이동 억제를 나타내는 그래프다.

도 14는 HA40K-rabFab, HA200K-rabFab, 및 HA600K-rabFab의 중량-평균 몰 질량 (Mw)과 함께, 크기 배제 크로마

토그래피 (SEC) 및 굴절 지수 (RI) 다-각도 광산란 (MALS) (SEC-RI-MALS) 분석을 나타내는 그래프다.

도 15는 HYAL-2-배양된 HA 및 HA100K-rabFab의 SEC-MALS 분석으로 평가되었을 때, 히알루론산 (HA) 콘주게이트된 rabFab는 히알루노니다제-2 (HYAL2)에 의해 절단에 효소적 민감성(susceptibility)을 유지한다는 것을 보여주는 그래프다. HA-rabFab 시료의 경우, 우측 Mw 축은 오직 콘주게이트의 HA 성분의 Mw로 표현된다.

도 16은 토끼의 유리체내 주사후, 유리체로부터 라니비주마브, rabFab, 및 HA100K-rabFab ("선형 HA-rabFab의 제거를 보여주는 그래프다. rabFab의 경우 대략적으로 2.5 일의 반감기와 비교하였을 때, HA100K-rabFab는 대략적으로 11.9 일의 반감기를 나타내었다.

도 17에서는 유리체 잔류 시간은 토끼 유리체에서 유체역학적 반경 (Rh; 그래프에서 "R_H"로 표시됨)과 선형 상관관계에 있음을 보여주는 그래프다. rabFab, rabFab-20kDPEG, rabFab-40kDPEG 및 HA100K-rabFab에 대한 역사적 데이터(채워진 원)를 이용하여 측정된 Rh 값에 근거한 HA100K-G6.31 AARR (흰 원), HA200K-G6.31 AARR (흰 사각형) 및 HA300K-G6.31 (흰 삼각형)의 반감기를 예측할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0105] **발명의 상세한 설명**

[0106] **I. 정의**

[0107] 본 명세서에 사용된 용어 "약(about)"이란 이 기술 분야의 당업자에게 잘 공지된 바와 같이, 각각의 값에 대한 통상적인 오차 범위를 나타낸다. 본 명세서의 값 또는 매개변수에 대한 "약(about)"의 언급은 그 값 또는 매개변수 그 자체(per se)를 나타내는 구체예를 포함 (및 설명)한다.

[0108] 본 명세서에서 목적을 위하여 "수용체 인간 틀구조(acceptor human framework)"이란 하기에서 정의된 바와 같이, 인간 면역글로블린 틀구조 또는 인간 콘센수스(consensus) 틀구조에서 유도된 아미노산 서열 경쇄 가변도메인 (VL) 틀구조, 또는 중쇄 가변 도메인 (VH) 틀구조이 포함된 틀구조이다. 인간 면역글로블린 틀구조 또는 인간 콘센수스 틀구조로부터 "유도된(derived from)" 수용체 인간 틀구조는 이의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 아미노산 변화의 수는 10개 또는 그 미만, 9개 또는 그 미만, 8개 또는 그 미만, 7개 또는 그 미만, 6개 또는 그 미만, 5개 또는 그 미만, 4개 또는 그 미만, 3개 또는 그 미만, 또는 2개 또는 그 미만이 된다. 일부 구체예들에서, 상기 VL 수용체 인간 틀구조는 상기 VL 인간 면역글로블린 틀구조 서열 또는 인간 콘센수스 틀구조 서열의 서열과 동일하다.

[0109] "친화력(affinity)"이란 분자의 단일 결합 부위 (예컨데, 항체)와 이의 결합 짝 (예컨데, 항원) 사이에 비공유 상호작용의 총 강도를 말한다. 다른 언급이 없는 한, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "결합 친화력(binding affinity)"이란 결합 쌍의 구성요소들간 (예컨데, 항체와 항원)에 1:1 상호작용을 반영한 고유한 결합 친화력을 지칭한다. 분자 X가 이의 짝 Y에 대한 친화력은 일반적으로 해리 상수 (Kd)로 나타낼 수 있다. 친화력은 본 명세서에서 설명된 것이 포함된 당분야에 공통적인 방법들에 의해 측정될 수 있다. 결합 친화도를 측정하기 위한 특이적으로 설명되고, 예시적인 구체예를 하기에 기재한다.

[0110] "만기 친화력(affinity matured)" 항체란 하나 또는 그 이상의 초가변 영역 (HVRs) 및/또는 틀구조 영역 (FRs)에서 하나 또는 그 이상의 변형을 갖는 항체를 말하며, 이러한 변형을 소유하지 않은 부모계 항체와 비교하였을 때, 이런 변형은 항원에 대한 해당 항체의 친화력을 개선시키는 결과를 초래한다.

[0111] 용어 "맥관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor)" 또는 "VEGF"는 서열 번호: 47 (Swiss Prot 수탁 번호 P15692, 유전자 ID (NCBI): 7422 참고)로 구체화된 바와 같이, 혈관 내피 성장 인자단백질 A를 지칭한다. 용어 "VEGF"는 아미노산 서열, 서열 번호: 47을 갖는 단백질, 뿐만 아니라 이의 상동체(homologues) 및 이의 아이소폼(isoforms)을 포괄한다. 용어 "VEGF"는 자연-발생적 대립형질과 Ferrara *Mol. Biol. Cell.* 21:687 (2010), Leung et al., *Science*, 246:1306 (1989), 및 Houck et al., *Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991)에서 기술된 바와 같이, VEGF₁₆₅의 플라스민 절단에 의해 생성된 110-아미노산 인간 맥관 내피 세포 성장 인자를 비롯한 프로세스된 형태와 함께, 공지의 아이소폼, 예컨데, VEGF의 접합(splice) 아이소폼, 예컨데, VEGF₁₁₁, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, 및 VEGF₂₀₆을 또한 포괄한다. 용어 "VEGF"는 인간이 아닌 종, 이를 테면, 마우스, 랫(rat) 또는 영장류의 VEGFs를 또한 지칭한다. 때로, 특정 종의 VEGF 경우, 이를 테면, 인간 VEGF의 경

우는 hVEGF로, 뮤린 VEGF의 경우 mVEGF, 그리고 이와 유사하게 표시한다. 용어 "VEGF"는 165-아미노산 인간 맥관 내피 세포 성장 인자의 경우 아미노산 8 내지 109 또는 1 내지 109를 포함하는 폴리펩티드의 절두된 형태를 또한 지칭하는데 이용될 수 있다. VEGF의 이러한 형태에 대한 언급은 예컨대, "VEGF₁₀₉", "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" 또는 "VEGF₁₆₅"로 확인될 수 있다. "절두된(truncated)" 고유의 VEGF의 아미노산 위치는 고유의 VEGF 서열에서 나타내는 바와 같이 번호매김된다. 예를 들면, 절두된 고유의 VEGF에서 아미노산 위치 17 (메티오닌)은 고유의 VEGF에서 또한 위치 17(메티오닌)이다. 상기 절두된 고유의 VEGF는 고유의 VEGF와 필적가능한 KDR 및 Flt-1 수용체에 대한 결합 친화력을 갖는다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "VEGF 변이체(variant)"는 고유의 VEGF 서열에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 돌연변이가 포함된 VEGF 폴리펩티드를 지칭한다. 임의선택적으로, 상기 하나 또는 그 이상의 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환(들)을 함유한다. 본 명세서에서 기술된 VEGF 변이체들의 속기를 목적으로, 숫자는 추정상의(putative) 고유의 VEGF의 아미노산 서열 (Leung et al., *supra* 및 Houck et al., *supra*에서 제공됨)을 따라 아미노산 잔기 위치를 말한다. 다른 언급이 없는 한, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "VEGF"는 VEGF-A를 나타낸다.

[0112] 용어 "항-VEGF 항체", "VEGF에 결합하는 항체", 그리고 "VEGF에 특이적으로 결합하는 항체"란 충분한 친화력으로 VEGF에 결합할 수 있는 항체를 지칭하며, 상기 항체는 VEGF를 표적으로 하는 진단 및/또는 치료제로 유용하다. 한 구체예에서, 항-VEGF 항체가 무관한, 비-VEGF 단백질에 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA)으로 측정하였을 때, 상기 항체가 VEGF에 결합하는 것의 약 10% 미만이다. 특정 구체예들에서, VEGF에 결합하는 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$, 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예컨대 10^{-8} M 또는 그 미만, 예컨대, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예컨대, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (Kd)를 갖는다. 특정 구체예들에서, 항-VEGF 항체는 상이한 종에서 기인된 VEGF중에서 보존된 VEGF의 에피토프 에 결합한다.

[0113] 본 명세서에서 용어 "항체(antibody)"는 단클론 항체, 다클론 항체, 다중특이적 항체 (가령, 이중특이적 항체), 그리고 원하는 항원-결합 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함하나, 이에 국한되지 않은 다양한 항체 구조를 포괄하는 광범위한 의미로 이용된다.

[0114] "항체 단편(antibody fragment)"은 손상되지 않은(intact) 항체가 결합하는 항원에 결합하는 손상되지 않은 항체의 부분을 포함하는 손상되지 않은 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예로는 Fv, Fab, Fab', Fab-C, Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디(diabodies); 선형 항체; 단일 쇠 항체 분자 (예: scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중 특이적 항체를 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 일부 경우에서, 항체 단편의 예로는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 단일 쇠 항체 분자 (예: scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중 특이적 항체를 포함하나, 이에 국한되지 않는다.

[0115] 항체를 과과인으로 절단하면 2개의 동일한 항원-결합 단편, 소위 "Fab" 단편, 그리고 바로 결정화되는 능력을 반영하는 이롭인 잔류 "Fc" 단편이 생성된다. 상기 Fab 단편은 전적으로 경쇄 (L)와 상기 중쇄(H)의 가변 영역 도메인(VH), 그리고 하나의 중쇄의 제 1 불변 도메인(CH1)으로 구성된다. 항체를 펩신 처리하면, 이가 (divalent) 항원-결합 활성을 갖는 2개의 이항화결합 연계된 Fab 단편에 대개 상응하고, 여전히 항원과 가교 (cross-linking)하는 큰 F(ab')₂ 단일 단편이 수득된다. Fab' 단편은 항체 힌지(hinge)의 영역으로부터 하나 또는 그 이상의 시스테인을 함유하는 CH1 도메인의 카르복시 말단에서 추가적으로 몇 개 잔기를 갖기 때문에, Fab 단편과는 차이가 있다. Fab-C 분자는 이 서열이 제 1 힌지 시스테인에서 절두되어, 발현시 바로 자유 시스테인을 갖는 Fab를 초래하는 Fab 분자다 (예컨대, Shatz et al. *Mol. Pharmaceutics* 2016; PubMed identifier (PMID) 27244474 참고). 예를 들면, Fab-C 분자는 중쇄의 위치 Cys227에 자유 시스테인을 보유할 수 있다. 다른 경우들에서, Fab-C 분자는 중쇄의 위치 Cys229에 자유 시스테인을 보유할 수 있다. Fab'-SH는 본 명세서에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)은 자유 티올 기를 가지는 Fab'를 나타내는 표시다. F(ab')₂ 항체 단편은 원래 이들 사이에 힌지 시스테인을 보유하는 Fab' 단편 쌍으로 만들어졌다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링 또한 공지되어 있다.

[0116] 본 명세서에서 용어 "Fc 영역(region)"은 불변 영역의 최소한 일부분이 포함된 면역글로블린 중쇄의 C-말단 영역을 특정하는데 이용된다. 상기 용어는 고유한 서열 Fc 영역들 및 변이체 Fc 영역들을 포함한다. 한 구체예에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 중쇄의 Cys226, 또는 Pro230으로부터 카르복실-말단까지 이어진다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 리신 (Lys447)은 존재할 수도 또는 존재하지 않을 수도 있다. 명시적으로 다른 언급이 없는 한, Fc 영역 또는 불변 영역에서 아미노산 잔기의 번호매김은 EU 번호매김 체계, Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health,

Bethesda, MD, (1991)에서 설명된 소위 EU 색인에 따른다.

- [0117] "Fv"는 단단하고, 비-공유 결합된 하나의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 도메인의 이합체(dimer)로 구성된다. 이들 두 도메인의 폴딩으로 아미노산 잔기가 항원 결합에 기여하고, 그리고 항체에 항원 결합 특이성을 부여하는 6개 초가변 루프 (H 및 L 쇠 각각으로부터 3개 루프)가 생성된다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 단지 3개의 HVRs를 포함하는 Fv의 절반)은 비록 전체 결합 부위보다 친화력이 더 낮기는 하지만, 여전히 항원을 인지하고, 이에 결합하는 능력을 갖는다.
- [0118] "단일-쇄 Fv"는 또한 "sFv" 또는 "scFv"로 줄여서 부르기도 하는데, 이것은 단일 폴리펩티드 쇠로 연결된 VH와 VL 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게는, sFv 폴리펩티드는 상기 VH와 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 더 포함하는데, 이 링커는 상기 sFv가 항원 결합을 위한 바람직한 구조를 형성하도록 한다. sFv에 대한 내용은 Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)를 참고한다.
- [0119] 용어 "디아바디(diabodies)"는 VH와 VL 도메인 사이에 짧은 링커(약 5-10개의 잔기)를 갖고, V 도메인의 쇠 내부가 아닌 쇠간 페어링이 이루어지고, 이로 인하여 2개의 항원 결합 부위를 갖는 이가(bivalent) 단편이 형성되는, sFv 단편 (전술한 단락 참고)을 구축하여 만들어진 작은 항체 단편을 말한다. 이중특이적 디아바디는 "크로스오버(crossover)" sFv 단편의 이형이합체이며, 이때 두 항체의 VH와 VL 도메인들은 상이한 폴리펩티드 쇠상에 있다. 디아바디는 예를 들면, EP 404,097; WO 93/11161; 그리고 Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)에 더욱 상세하게 기술되어 있다.
- [0120] "차단(blocking)" 항체 또는 "항진제(antagonist)" 항체는 이 항체가 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제 또는 감소시키는 항체다. 특정 차단 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완벽하게 저해시킨다.
- [0121] 기준 항체와 "동일한 에피토프에 결합하는 항체(antibody that binds to the same epitope)"는 경쟁 분석에서 기준 항체의 항원에 대한 결합을 50 % 또는 그 이상 차단하는 항체를 의미하고, 역으로, 상기 기준 항체는 경쟁 분석에서 그의 항원에 대한 항체의 결합을 50 % 또는 그 이상 차단한다. 예시적인 경쟁 분석이 본 명세서에서 제공된다.
- [0122] 용어 "키메라(chimeric)" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 부분이 특정 원천 또는 종들로부터 유도되지만, 한편 이 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지 부분은 상이한 원천 또는 종들로부터 유도된 항체를 지칭한다.
- [0123] 항체의 "클래스(class)"란 이의 중쇄가 보유하는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 항체에는 5가지 주요 부류가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 그리고 이들중 몇 가지는 하위클래스(이소타입), 예를 들면, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, 및 IgA₂로 더 세분될 수 있다. 면역글로블린의 상이한 클래스에 대응하는 중쇄 불변 도메인은 차례로 α , δ , ϵ , γ , 및 μ 로 불린다.
- [0124] 용어 "작동 기능(effector functions)"이란 항체 이소타입(isotype)에 의해 가변적인, 항체의 Fc 영역에 기인된 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 작동 기능의 실시예로는 다음을 포함한다: C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성(CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC); 식작용; 세포 표면 수용체들 (예로써 B 세포 수용체)의 하향-조절; 그리고 B 세포 활성화.
- [0125] "틀구조(framework)" 또는 "틀구조 영역(framework region)" 또는 "FR"은 초가변 영역 (HVR) 잔기이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인들로 구성된다: FR1, FR2, FR3, 및 FR4.
- [0126] 용어 "전장(full-length) 항체", "무손상(intact) 항체", 및 "전체(whole) 항체"는 본 명세서에서 호환 이용되는데, 고유한 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖는 또는 본 명세서에서 정의된 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.
- [0127] "인간 항체(human antibody)"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산된 항체에 대응하는 또는 인간 항체 레퍼토리를 이용하는 또는 다른 인간 항체-인코딩 서열을 이용하는 비-인간 원천으로부터 유도된 항체에 대응하는 아미노산 서열을 보유하는 항체다. 인간 항체의 정의는 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화된 항체를 특이적으로 배제한다.
- [0128] "인간 콘센수스 틀구조(human consensus framework)"는 인간 면역글로블린 VL 또는 VH 틀구조 서열의 선별에서

가장 빈번하게 발생하는 아미노산 잔기를 제시하는 틀구조다. 일반적으로, 인간 면역글로블린 VL 또는 VH 서열은 가변적 도메인 서열들의 하위집단으로부터 선별된다. 일반적으로, 서열의 하위집단은 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH 공개 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3와 같은 하위집단이다. 한 구체예에서, 상기 VL의 경우, 상기 하위집단은 Kabat et al., *supra*와 같은 하위집단 카파 I이다. 한 구체예에서, 상기 VH의 경우, 상기 하위집단은 Kabat et al., *supra*와 같은 하위집단 III 이다.

[0129] 비-인간 (예컨데, 설치류) 항체의 "인화된(humanized) 형태"는 비-인간 항체로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체다. 대부분의 경우, 인화된 항체는 수령체의 초가변 영역의 잔기가 인간이 아닌 종 (공여 항체) 이를 태면, 원하는 항체 특이성, 친화력, 및 능력을 보유한 이를 태면, 마우스, 랫, 토끼 또는 비-인간 영장류의 초가변 영역의 잔기로 대체된, 인간 면역글로블린 (수령 항체)이다. 일부 경우에서, 상기 인간 면역글로블린의 FR 잔기는 대응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 또한, 인화 항체는 수령 항체 또는 공여 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 더욱 정제하기 위해 만들진다. 일반적으로, 상기 인화 항체는 실질적으로 최소한 하나의, 그리고 전형적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함하는데, 이때 초가변 루프의 모든 또는 실질적으로 모든 것은 비-인간 면역글로블린에 대응하며, FRs의 모든 또는 실질적으로 모든 것은 인간 면역글로블린 서열의 것에 대응한다. 상기 인화된 항체는 임의선택적으로 면역글로블린 불변 영역 (Fc)의 최소한 일부분, 전형적으로는 인간 면역글로블린의 것을 또한 포함할 수 있다. 더욱 상세한 것은, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); 그리고 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)을 참고.

[0130] 용어 "가변적(variable)"이란 가변 도메인의 특정 세그먼트가 항체 사이에서 광범위하게 상이하다는 사실을 의미한다. 상기 가변 또는 "V" 도메인은 항원 결합을 매개하고, 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 특정한다. 그러나, 상기 가변성은 가변 도메인의 전체 범위에 고르게 분배되지 않는다. 대신, 상기 V 영역은 각각 9-12개 아미노산 길이의 "초가변 영역(hypervariable regions)"으로 불리는 더 짧은 영역에 의해 분리된 15-30 개의 아미노산의 틀구조 영역 (FRs)이라고 불리는 상대적으로 불변 띠로 구성된다. 본 명세서에서 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 항원-결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 의미한다. 상기 초가변 영역은 일반적으로, 예를 들면, VL에서 대략적으로 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3)의 아미노산 잔기와 VH에서 대략적으로 잔기 26-35 (H1), 49-65 (H2) 및 95-102 (H3)의 아미노산 잔기 (한 구체예에서, H1은 대략적으로 잔기 31-35)를 포함하고; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) 및/또는 VL에서 "초가변 루프" (예컨데, 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 및 91-96 (L3), 그리고 VH에서 26-32 (H1), 53-55 (H2), 및 96-101 (H3)을 포함한다; Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987). 고유의 중쇄 및 경쇄의 각 가변 도메인은 3개의 초가변 영역에 의해 연결된, 대체로 베타-시트 배위를 취하는 4개의 FRs를 포함하며, 그리고 이는 루프 연계를 만들고, 일부 경우에는 베타-시트 구조의 일부가 된다. 각 쇠에서 초가변 영역은 FRs에 근접하게, 그리고 다른 쇠의 초가변 영역과 함께 유지되며, 항체의 항원-결합 부위 형성에 기여한다. (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) 참고). 따라서, HVR 및 FR 서열들은 일반적으로 VH (또는 VL)에서 다음의 서열로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4. 불변 도메인은 항체와 항원의 결합에 직접적으로 관여하지는 않지만, 항체 의존성 세포 세포 독성 (ADCC)에서의 항체의 참여와 같은 다양한 작동체 기능을 나타낸다.

[0131] 용어 "Kabat에서와 같은 가변 도메인 잔기 번호매김" 또는 "Kabat와 같은 아미노산 위치 번호매김", 및 이의 변이는 Kabat et al., *supra*의 항체 편집에서 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용되는 번호매김 체계를 의미한다. 이 번호매김 체계를 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축 또는 삽입에 상응하도록 몇 개 더 적은 수의 아미노산을, 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들면, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 다음에 단일 아미노산 삽입 (Kabat에 따르면 잔기 52a)와 중쇄 FR 잔기 82 다음에 삽입된 잔기(가령, Kabat에 따르면 잔기 82a, 82b, 및 82c, 등등)를 포함할 수 있다. Kabat의 잔기 번호매김은 "표준" Kabat 번호매김 서열과 항체의 서열의 상동성 영역을 배열하여 주어진 항체에 대하여 결정될 수 있다.

[0132] Kabat 넘버링 시스템은 일반적으로 가변 도메인의 잔기(경쇄의 대략 잔기 1-107과 중쇄의 잔기 1-113)를 나타낼 때 사용된다 (가령, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*. (가령 Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.

(1991)). "EU 번호매김 체계" 또는 "EU 색인"은 번역글로블린 중쇄 불변 영역에서 잔기를 지칭할 때 일반적으로 사용된다 (예컨대, Kabat et al., *supra*에서 보고된 EU 색인). "Kabat에서와 같은 EU 색인"은 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 번호매김을 나타낸다. 본 명세서에서 달리 언급하지 않는 한, 항체의 가변 도메인에서의 잔기 번호에 대한 언급은 Kabat 번호매김 체계에 의한 잔기 번호를 의미한다. 본 명세서에서 달리 언급하지 않는 한, 항체의 가변 도메인에서의 잔기 번호에 대한 언급은 EU 번호매김 체계에 의한 잔기 번호를 의미한다(예컨대, US 가출원 번호 60/640,323, EU 번호매김에 대한 도면 참고).

[0133] 다른 언급이 없는 한, HVR 잔기와 가변적 도메인 (예로써, FR 잔기)에 있는 다른 잔기들은 Kabat et al., *supra*에 따라 번호매김된다.

[0134] "면역콘주게이트(immunoconjugate)"는 세포독성 물질을 포함하나, 이에 국한되지 않는 하나 또는 그 이상의 이질성 분자(들)에 접합된 항체다.

[0135] 본원에 개시된 다양한 항체를 기술하는데 사용되는 "단리된 항체(isolated antibody)"라는 용어는 발현된 세포 또는 세포 배양물로부터 동정되고, 분리 및/또는 회수된 항체를 의미한다. 자연 환경의 오염 성분들은 상기 폴리펩티드에 대한 진단 또는 치료요법적 용도를 일반적으로 간섭하는 물질이며, 그리고 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성(proteinaceous) 또는 비-단백질성 용질을 함유할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 항체는 예를 들면, 전기영동(예로써, SDS-페이지, 등전초점조절 (IEF), 모세관전기이동) 또는 크로마토그래프 (예로써, 이온교환 또는 역상 HPLC)에 의해 측정되었을 때 95% 또는 99% 순도이상으로 정제된다. 항체 순도의 평가 방법에 대한 검토는 예로써, Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007)를 참고한다. 선호되는 구체예들에서, 상기 항체는 (1) 스피닝 컵 시퀀네이터 (spinning cup sequenator)를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개 잔기를 획득하기에 충분한 정도까지, 또는 (2) Coomassie 블루 또는, 바람직하게는, 은 (silver) 착색을 이용하여 비-환원 또는 환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의해 균질한 수준까지 정제될 수 있다. 단리된 항체는 폴리펩티드 자연 환경의 최소한 하나의 성분이 존재하지 않기 때문에, 재조합 세포 내에서 제작리(*in situ*) 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로, 단리된 폴리펩티드는 최소한 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0136] 용어 "단일클론 항체(monoclonal antibody)"는 본 명세서에서 이용된 바와 같이 실질적으로 동질성 항체의 집단으로부터 획득한 항체, 가령, 이러한 집단을 포함하는 개별 항체는 동일하거나 및/또는 동일한 에피토프에 결합하지만, 예로써, 자연 발생적 돌연변이를 포함하는 또는 단일클론 항체 조제물 생산 동안 발생하는 가능한 변이체 항체의 경우는 제외되며, 이러한 변이체들은 일반적으로 소량 존재한다. 상이한 결정인자 (에피토프)에 대항하는 상이한 항체를 일반적으로 함유하는 다중클론성 항체 조제물과 대조적으로, 단일클론 항체 조제물의 각 단일클론 항체는 항원에 있는 단일 결정인자를 지향한다. 따라서, 수식어 "단일클론(monoclonal)"은 상기 항체의 특징은 실질적으로 동질성 집단의 항체로부터 획득되나, 이 항체 생산에 임의의 특정 방법이 요구되지 않는 것으로 간주되는 것을 나타낸다. 예를 들면, 본 발명에 따라 이용되는 단일클론 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법들, 파아지-디스플레이 방법들, 그리고 상기 인간 번역글로블린 좌(*loci*)의 전부 또는 일부를 포함하는 유전자삽입 동물을 이용하는 방법들을 포함하나, 이에 국한되지 않는 다양한 기술에 의해 만들어질 수 있으며, 단일클론 항체를 만드는 이러한 방법들과 다른 예시적인 방법들은 본 명세서에서 설명된다.

[0137] 용어 "다중특이적 항체(multispecific antibody)"는 광범위한 의미로 사용되며, 특히 중쇄 가변 도메인 (VH)와 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하는 항체를 포함하며, 이때 상기 VH-VL 단위는 다중에피토프 특이성 (가령, 하나의 생물학적 분자 상에 2개의 상이한 에피토프에 결합 또는 상이한 생물학적 분자상의 각 에피토프에 결합할 수 있는)을 갖는다. 이러한 다중특이적 항체는 전장의 항체, 2개 또는 그 이상의 VL 및 VH 도메인을 갖는 항체, 항체 단편 이를 테면, Fab, Fab', Fab-C, Fv, dsFv, scFv, 디아바디(diabodies), 이중특이적 디아바디 및 트리 아바디, 공유적으로 또는 비-공유적으로 연계된 항체 단편을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. "다중에피토프 (polyepitopic) 특이성"이란 동일한 또는 상이한 표적(들) 상에서 2개 또는 그 이상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 능력을 말한다. "중복 특이성(dual specificity)" 또는 "이중특이성(bispecificity)"이란 동일한 또는 상이한 표적(들) 상에서 2개의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 능력을 말한다. 그러나, 이중특이적 항체와 달리, 중복-특이적 항체는 아미노산 서열이 동일한 2 개의 항원-결합 팔(arms)을 가지며, 각 Fab 팔은 2 개의 항원을 인식할 수 있다. 중복-특이성은 항체가 단일 Fab 또는 IgG 분자와 같이, 2 개의 상이한 항원과의 높은 친화성으로 상호 작용할 수 있도록 한다. 한 구체예에 따르면, IgG1에서 다중특이적 항체는 5 μM 내지 0.001 pM, 3 μM 내지 0.001 pM, 1 μM 내지 0.001 pM, 0.5 μM 내지 0.001 pM 또는 0.1 μM 내지 0.001 pM의 친화력으로 각 에피토프에 결합한다. "단일특이적(monospecific)"이란 오직 하나의 에피토프에만

결합하는 능력을 말한다.

- [0138] "고유 항체(native antibodies)"는 다양한 구조를 가진 자연 발생적 면역글로블린 분자들을 지칭한다. 예를 들면, 고유한 IgG 항체는 이중사량체 당단백질로써, 약 150,000 달톤이며, 2개의 동일한 경쇄와 2개의 동일한 중쇄를 포함하며, 이들은 이황화 결합에 의해 연결되어 있다. N-말단에서 C-말단으로, 각 중쇄는 가변적 영역(VH),-이는 가변적 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변적 도메인으로 불리며-, 이어서 3개의 불변 도메인(CH1, CH2, 및 CH3)이 이어진다. 유사하게, N-말단에서 C-말단으로, 각 경쇄는 가변적 영역(VL), -가변적 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변적 도메인으로 불림-, 불변 경쇄(CL) 도메인이 이어진다. 항체의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열에 근거하여 2가지 유형 소위 카파(κ) 및 람다(λ)중 하나로 지정될 수 있다.
- [0139] 표적 분자에 항체의 결합에 있어서, 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 상의 에피토프에 "특이적 결합(specific binding)" 또는 "~에 특이적으로 결합하는(specifically binds to~)" 또는 "~에 특이적(specific for~)"이라는 용어는 비-특이적 상호작용으로부터 측정가능할 수준으로 상이한 결합을 의미한다. 특이적 결합은 예를 들어, 대조 분자의 결합과 비교하여, 분자의 결합을 측정함으로써 측정될 수 있다. 예를 들면, 특이적 결합은 표적과 유사한 대조 분자, 예를 들어 과량의 라벨되지 않은 표적과의 경쟁에 의해 결정될 수 있다. 이 경우, 라벨된 표적의 프로브에 대한 결합이 과량의 라벨되지 않은 표적에 의해 경쟁적으로 억제되면 특이적 결합이라고 한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 상의 에피토프에 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는" 또는 "~에 특이적"이라는 용어는 예를 들면, 표적에 대하여 10^{-4} M 또는 이보다 낮은, 대안으로 10^{-5} M 또는 이보다 낮은, 대안으로 10^{-6} M 또는 이보다 낮은, 대안으로 10^{-7} M 또는 이보다 낮은, 대안으로 10^{-8} M 또는 이보다 낮은, 대안으로 10^{-9} M 또는 이보다 낮은, 대안으로 10^{-10} M 또는 이보다 낮은, 대안으로 10^{-11} M 또는 이보다 낮은, 대안으로 10^{-12} M 또는 이보다 낮은, 또는 10^{-4} M 내지 10^{-6} M 또는 10^{-6} M 내지 10^{-10} M 또는 10^{-7} M 내지 10^{-9} M 범위의 Kd를 갖는 분자에 의해 나타날 수 있다. 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 친화성 및 Kd 값은 반비례 관계에 있다. 항원에 대한 높은 친화성은 낮은 Kd 값에 의해 측정된다. 한 구체예에서, 용어 "특이적 결합"이란 임의의 다른 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프에 실질적으로 결합하지 않으면서, 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 상의 에피토프에 분자가 결합하는 결합을 의미한다.
- [0140] "항-VEGF 항체를 인코딩하는 핵산"은 항체 중쇄 및 경쇄 (또는 이의 단편들)을 인코딩하는 하나 또는 그 이상의 핵산 분자들을 지칭하며, 단일 벡터 또는 별도의 벡터 안에 있는 이러한 핵산 분자(들), 그리고 숙주 세포내 하나 또는 그 이상의 위치에 존재하는 핵산 분자(들)이 포함된다.
- [0141] 용어 "벡터(vector)"는 본 명세서에서 이용된 바와 같이, 이에 연계된 또다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 말한다. 상기 용어는 자가-복제 핵산 구조의 벡터, 뿐만 아니라 이것이 도입된 숙주 세포의 계놈 안에 혼입된 벡터를 포함한다. 특정 벡터는 작용가능하도록 연계된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터를 본 명세서에서 "발현 벡터(expression vectors)"라고 한다.
- [0142] 용어 "숙주 세포(host cell)", "숙주 세포 계통(cell line)", 및 "숙주 세포 배양물(culture)"은 호환 이용되며, 외생 핵산이 도입된, 세포 및 이러한 세포들의 후대가 포함된 세포들을 지칭한다. 숙주 세포들은 "형질 변환체(transformants)"와 "형질변환된(transformed) 세포들"이 포함되는데, 이들은 계대의 수와 무관하게, 1차 형질변환된 세포와 이로부터 유도된 후대를 포함한다. 후대는 핵산 함량에 있어서 부모계 세포와 완벽하게 동일하지는 않고, 돌연변이를 포함할 수 있다. 원래 형질변환된 세포에 대하여 선별된 또는 선택된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 보유한 돌연변이 후대가 본 명세서에 포함된다.
- [0143] 참고 폴리펩티드 서열에 대하여 "아미노산 서열 동일성 백분율(percent amino acid sequence identity(%))"은 참고 서열 및 후보 서열들을 배열하고, 필요에 따라 최대 백분율의 서열 동일성을 획득하기 위하여 갭을 도입한 후, 참고 폴리펩티드 서열에 있는 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에 있는 아미노산 잔기의 백분율로 정의되며, 임의의 보존 치환은 서열 동일성 부분으로 간주되지 않는다. 아미노산 서열 동일성 백분율을 결정하기 위한 목적으로 배열은 당업자의 기술 분야에 있는 다양한 방법을 통하여 이루어질 수 있는데, 예를 들면, 공개 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 이를 테면 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 이용하여 이루어질 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 배열을 획득하기 위한 임의의 알고리즘을 포함하는, 서열 배열을 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 그러나, 본 명세서의 목적을 위하여, 아미노산 서열 동일성 % 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2을 이용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터

프로그램은 Genentech, Inc.의 것이며, 이의 원천 코드는 U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559에 사용자 문서에 정리되어 있으며, 이것은 U.S. 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 Genentech, Inc., South San Francisco, California에서 공개적으로 이용가능하며, 또는 원천 코드로부터 만들 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함하여 UNIX 운영 체제에서 사용하도록 컴파일해야 한다. 모든 서열 비교 매개변수는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되며 가변적이지 않다.

[0144] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교를 위하여 이용되는 상황에서, 주어진 아미노산 서열 A과 주어진 아미노산 서열 B의 아미노산 서열 동일성 % (이는 주어진 아미노산 서열 B과 또는 이에 대항하여 아미노산 서열 동일성 특정 %를 가진 또는 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로 말을 바꿀 수 있다)는 다음과 같이 산출된다: 분획 X/Y에 100을 곱한다, 이때 X는 A와 B의 프로그램 배열에서 서열 배열 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일하게 필적되는 것으로 기록되는 아미노산 잔기의 수를 말하며, Y는 B의 전체 아미노산 잔기 수가 된다. 아미노산 서열 A의 길이는 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않는 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %는 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 대등하지 않을 것으로 인지된다. 다른 특정 언급이 없는 한, 본 명세서에서 이용된 모든 아미노산 서열 동일성 % 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 바로 직전 단락에서 설명된 바와 같이 획득된다.

[0145] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "투여하는(administering)"이란 화합물 (예컨데, 본 발명의 항-VEGF 항체, 본 발명의 항체 콘주게이트, 본 발명의 융합 단백질, 본 발명의 중합체 제제, 또는 본 발명의 항-VEGF 항체를 인코딩하는 핵산) 또는 조성물 (예컨데, 약학 조성물, 예컨데, 본 발명의 항-VEGF 항체, 본 발명의 항체 콘주게이트, 본 발명의 융합 단백질, 또는 본 발명의 중합체 제제를 포함하는 약학 조성물)의 주어진 투여량을 개체에게 투여하는 방법을 의미한다. 본 명세서에서 기술된 방법에 이용되는 조성물은 예를 들면, 유리질체강내 (예컨데, 유리체내 주사에 의해), 안약으로, 근육내로, 정맥내로, 피내로(intradermally), 경피로, 동맥내로, 복강내로, 병소내로, 두개내로, 관절내로, 전립선내로, 늑막내로, 기관내로, 경막내로, 비강내로, 질내로, 직장내로, 국소적으로, 종양안으로, 복막으로, 피하로, 결막 밑으로, 내부 소포로, 점막으로, 위심으로, 배꼽 밑으로, 안구내, 안와내로, 구강으로, 국소적으로, 경피로, 흡입에 의해, 주사에 의해, 이식에 의해, 주입에 의해, 연속 주입에 의해, 직접적으로 담겨있는 표적 세포의 국소화된 관류에 의해, 카테테르에 의해, 세척에 의해, 크립 안에, 또는 액체 조성물 안에서 투여될 수 있다. 본 명세서에서 기술된 방법에 이용되는 조성물은 전신 또는 국소로 또한 투여될 수 있다. 투여 방법은 다양한 인자 (예를 들어, 투여되는 화합물 또는 조성물 및 치료될 상태, 질환 또는 장애의 중증도)에 따라 달라질 수 있다.

[0146] 혈관신생(angiogenesis)은 기존의 혈관에서 새로운 혈관이 형성되는 과정이다. 혈관 신생은 중배엽 세포 전구체로부터 내피 세포를 새로 형성하는 혈관형성(vasculogenesis)과 구별된다. 혈관신생과 병리학적으로 관련된 장애는 본 발명의 조성물 및 방법에 의해 치료될 수 있다. 이들 장애는 비-신생물 장애와 세포 증식성 장애를 모두 포함한다. 세포 증식성 장애는 하기 기술된 것들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 비-신생물 장애는 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: 안과 질환 (비-제한적 안과 질환은 예를 들면, 증식성 당뇨병성 망막증을 포함하는 망막증, 맥락막 혈관신생 (CNV), 노인성 황반 변성 (AMD), 당뇨병 및 기타 허혈-관련된 망막증, 당뇨병성 황반 부종 (DME), 병적 근시, 본 히펠-런다우 질환, 눈의 히스토플라스마증, 망막 정맥 폐쇄 (중심형 (CRVO) 및 분기형 (BRVO) 포함), 각막 혈관신생, 망막 혈관신생, 미숙아 망막증 (ROP), 가족성 삼출 유리체망막증 (FEVR), 코우츠 질환, 노리 질환, 골다공증-가성신경교종 증후군 (OPPG), 결막 밑 출혈, 피부홍조, 안구 신생 혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 및 고혈압 망막증), 자가면역 질환 (예컨데, 류마티스 관절염 (RA), 건선, 강직성 척추염 및 염증성 장 질환 (예컨데, 크론(Crohn) 질환 및 궤양성 결장염)), 바람직하지 않거나 비정상 비대, 관절염, 건선 관절염, 건선 플라크, 유육종증, 족상동맥 경화증 족상동맥 경화성 플라크, 동맥 경화증, 맥관 재협착, 동정맥 기형 (AVM), 수막종, 혈관종, 혈관섬유종, 갑상선 과다증 (그레이브(Grave's) 질환 포함), 각막 및 기타 조직 이식, 폐 염증, 급성 폐 손상/ARDS, 패혈증, 원발성 폐 고혈압, 악성 폐 삼출, 뇌부종 (예컨데, 급성 뇌졸중/폐쇄 두부 손상/외상과 관련된), 유허막 염증, RA에서 파누스(pannus) 형성, 골염성 근염, 비대성 골 형성, 골관절염 (OA), 난치성 복수, 다낭성 난소 질환, 자궁 내막증, 제 3 간격 유체 질환 (채장염, 구획 증후군, 화상, 장 질환), 만성 천식, 자궁 섬유양(uterine fibroids), 조산, 만성 염증, 이를 테면, IBD (크론 질환 및 궤양성 결장염), 염증성 신장 질환 (사구체 신염, 특히 메산지음증식성 사구체신염, 용혈성 요독 증후군, 당뇨병성 신병증 및 고혈압성 신병증), 이식후 발생하는 질병, 신장 동종 이식거부 반응, 염증성 질환, 신장 증후군, 바람직하지 않는 또는 비정상 조직 덩어리 성장 (비-암), 호혈성 관절, 비대성 흉터, 모발 성장 억제, 오슬러-웨버 (Osler-Weber) 증후군, 화농성 육아종후 증후군 섬유 아세포, 경피증, 트라코마, 혈관 유착, 활막염, 피부염, 자간전증, 복수, 위심(pericardial) 삼출 (이를 테면, 심막염과 연합된), 그리고 늑막 삼출. 추가

안구 장애는 하기에서 기술된다.

- [0147] 병리학적 혈관신생과 연합될 수 있는 기타 장애는 다음을 포함한다: 유착불량골절 (치유되지 않은 골절), 화농성 육아종, 트라코마, 호혈성 관절, 혈관 유착, 비대성 흉터, 이식편 거부, 섬유막관 조직, 여드름성 주사비, 후천성 면역 결핍증, 동맥 폐색, 아토피성 각막염, 세균성 궤양, 베첷(Bechet's) 질환, 경동맥 폐색성 질환, 만성염증, 만성 망막 박리, 만성 포도막염, 만성 유리체염, 콘택트 렌즈 과다착용, 각막 이식편 거부, 각막 이식편 혈관신생, 일스(Eales) 질환, 유행성 결막염, 진균성 궤양, 헤르페스 심플렉스 감염, 대상포진, 과다점성 증후군, 카포시(Kaposi's) 육종, 백혈병, 지질 변성, 라임(Lyme's) 질환, 경계성 각막염, 무렌(Mooren) 궤양, 나병 이외에 미코박테리아 감염, 근시, 광학 피트(optic pits), 골관절염, 파젯(Paget's) 병, 편평부염, 유천포창, 플렉텐성결막염(phylectenulosis), 다발염, 레이저 합병증, 근시, 광학 피트, 골관절염, 파젯 병, 편평부염, 유천포창, 플렉텐성결막염, 다발동맥염, 레이저 후 합병증, 원생 동물 감염, 탄력섬유성가황색종(pseudoxanthoma elasticum), 날개 익상 각막염, 방사상 각막 절개술, 수두 섬유 아세포, 사르코이드증, 공막염, 겸상적혈구세포 빈혈, 쇼그렌 증후군, 스타가르트(Stargarts) 질환, 스티븐 존슨(Steven's Johnson) 질환, 상부 변연계 각막염(superior limbic keratitis), 매독, 전신 루프스, 테리엔(Terrien's) 경계성 변성, 특소 플라즈마증, 외상, 정맥 폐쇄, 비타민 A 결핍 및 베게너(Wegeners) 유육종증, 당뇨와 연관된 원치않는 혈관신생, 기생충 질환, 비정상 상처 치유, 외과술 후 비대, 부상 또는 외상, 모발 성장 억제, 배란 및 황체형성 억제, 임플란트 억제 및 자궁에서 배아 발달 억제를 포함한다.
- [0148] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "안구 장애(ocular disorder)"는 병적 혈관신생과 연합된 안과 장애(또는 본 명세서에서 "안과 질환"과 호환된다). 안구 장애는 망막 또는 각막과 같은 안구 조직의 구조에 새로운 혈관의 변형 또는 조절불가능한 증식 및/또는 침범을 특징으로할 수 있다. 비-제한적 안구 장애는 예를 들면, AMD (예컨데, 습성 AMD, 건성 AMD, 중간 AMD, 진행된 AMD, 및 지도모양 망막위축 (GA)), 황반 변성, 황반 부종, DME (예컨데, 초점, 비-중심 DME 및 확산, 중심-관련된 DME), 망막증, 당뇨병성 망막증 (DR) (예컨데, 증식성 DR (PDR), 비-증식성 DR (NPDR), 및 높은-고도 DR), 기타 허혈-관련된 망막증, ROP, 망막 정맥 폐쇄 (RVO) (예컨데, 중심형 (CRVO) 및 분기형 (BRVO)), CNV (예컨데, 근시성 CNV), 각막 혈관신생, 각막 혈관신생과 연합된 질환, 망막 혈관신생, 망막/맥락막 혈관신생과 연합된 질환, 병적 근시, 본 히펠-린다우 질환, 눈의 히스토플라스마증, FEVR, 코우츠 질환, 노리 질환, OPPG, 결막밑 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염 (RP), 고혈압 망막증, 망막 혈관종 확산, 황반 모세혈관확장증, 홍채 혈관신생, 안구내 혈관신생, 망막 변성, 포낭성 황반 부종 (CME), 맥관염, 부종, 망막염, 결막염 (예컨데, 감염성 결막염 및 비-감염성 (가령, 알레르기성) 결막염), 레베르 선천성 흑내장 (또한 레베르의 선천성 흑내장 또는 LCA), 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염 (예컨데, 다초점 맥락막염), 눈 히스토플라스마증, 다래끼, 건성안, 외상에 의한 눈 손상, 쇼그렌 질환, 및 기타 안과 질환을 포함하며, 이때 상기 질환 또는 장애는 안구 혈관신생, 맥관 누출, 및/또는 망막 부종과 연관있다. 부가적인 예시적인 안구 질환은 모든 형태의 증식성 유리체 망막 병증을 포함하는 섬유 혈관 또는 섬유 조직의 비정상적인 증식에 의해 유발되는 루베시스 (각의 혈관 신생) 및 질환과 관련된 질환을 포함한다.
- [0149] 각막 혈관신생과 연합된 예시적인 질환은 상피결막염, 비타민 A 결핍, 콘택트 렌즈 과다착용, 아토피성 각막염, 상부 변연계 각막염, 날개 익상 각막염, 쇼그렌 증후군, 여드름성 주사비, 플렉텐성결막염, 매독, 미코박테리아 (*Mycobacteria*) 감염, 지질 변성, 화학적 화상, 세균성 궤양, 진균성 궤양, 헤르페스 심플렉스 감염, 대상포진, 원생동물 감염, 카포시 육종, 무렌 궤양, 테리엔 경계성 변성, 경계성 각막염, 류마티스 관절염, 전신 루프스, 다발동맥염, 외상, 웨그너 사르코이드증, 공막염, 스티븐-존슨 증후군, 유천포창(periphigoid) 방사성 각막절개술, 및 각막 이식편(graph) 거부를 포함하나, 이에 국한되지 않는다.
- [0150] 망막/맥락막 혈관신생과 연관된 예시적인 질환은 당뇨병성 망막증, 황반 변성, 겸상적혈구 빈혈증, 사르코이드증, 매독, 탄력섬유성가황색종, 파제트 질환, 정맥 폐색, 동맥 폐색, 경동맥 폐색성 질환, 만성 포도막염/유리체염, 미코박테리아 감염, 라임 질환, 전신 홍반성 루프스, 미숙아 망막증, 색소성 망막염, 망막 부종(황반 부종 포함), 일스 질환, 베첷 질환, 망막염 또는 맥락막염의 원인이 되는 감염 (예컨데, 다초점 맥락막염), 추정되는 눈 히스토플라스마증, 베스트(Best's) 질환(난황상 황반 변성), 근시, 광학 피트, 스타르가르트 질환, 편평부염, 망막 박리 (예컨데, 만성 망막 박리), 과다점성 증후군, 특소플라스마증, 외상, 레이저 합병증을 포함하나, 이에 국한되지 않는다.
- [0151] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애"는 예를 들면, 뇌 종양과 연합된 부종, 악성과 연합된 복수, 메이그 증후군, 폐 염증, 신장 증후군, 위심(pericardial) 삼출, 늑막 삼출, 심혈관 질환과 연합된 투과성, 이를 테면, 심근경색, 뇌졸중 그리고 이와 유사한 것들 이후 나타나는 질환을 포함

한다.

- [0152] 상술한 분류는 상호 배타적인 것이 아니며, 장애는 다수의 범주에 속할 수 있다는 것을 이해해야 한다.
- [0153] 용어 "세포 증식성 장애(cell proliferative disorder)" 및 "증식성 장애(proliferative disorder)"는 비정상적인 세포 증식의 정도와 관련된 장애를 지칭한다. 한 구체예에서, 상기 세포 증식성 장애는 암이다.
- [0154] 용어 "암(cancer)", "암의(cancerous)", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "종양"은 본 명세서에서 이용된 바와 같이, 상호 배타적이지 않다.
- [0155] 본 명세서에서 이용된 "종양(tumor)"은 악성 또는 양성이건 간에 모든 신생물 세포 성장과 증식, 그리고 모든 전-암성 및 암 세포와 조직을 지칭한다.
- [0156] "혈관 신생 인자 또는 물질(angiogenic factor or agent)"은 혈관 발달을 촉진하는, 예를 들어 혈관 신생, 내피 세포 성장, 혈관의 안정 및/또는 혈관 형성 등을 촉진시키는 성장 인자이다. 예를 들면, 혈관신생 인자는 예컨대, VEGF 및 VEGF 패밀리, PlGF, PDGF 패밀리, 섬유아세포 성장 인자 패밀리 (FGFs), TIE 리간드(양지오포이에틴), 에피린, Del-1, 섬유아세포 성장 인자: 산성 (aFGF) 및 염기성 (bFGF), 폴리스테틴(Follistatin), 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 간세포 성장 인자 (HGF)/분산 인자 (SF), 인터루킨-8 (IL-8), 렙틴, 미드킨 (Midkine), 태반 성장 인자, 혈소판-유래된 내피 세포 성장 인자 (PD-ECGF), 혈소판-유래된 성장 인자, 특히 PDGF-BB 또는 PDGFR-베타, 플레오토로핀 (PTN), 프로그래놀린, 프로리페린, 형질전환 성장 인자-알파 (TGF-알파), 형질전환 성장 인자-베타 (TGF-베타), 종양 괴사 인자-알파 (TNF-알파), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)/맥관 투과성 인자 (VPF), 등을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 상처 치유를 가속화시키는 인자, 이를 테면, 성장 호르몬, 인슐린-유사 성장 인자-I (IGF-I), VIGF, 상피 성장 인자 (EGF), CTGF 및 이의 패밀리 구성 요소, 그리고 TGF-알파 및 TGF-베타를 또한 포함할 수 있다. 예를 들면, Klagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (예컨대, 표 1에 열거된 공지의 혈관신생 인자들); 그리고 Sato, *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) 참고.
- [0157] "항-혈관 신생물질(anti-angiogenesis agent)" 또는 "신생혈관형성 억제제(angiogenesis inhibitor)"는 혈관 신생, 맥관 신생, 또는 바람직하지 않은 맥관 투과성을 직접 또는 간접적으로 저해하는 저 분자량 물질, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 단리된 단백질, 재조합 단백질, 항체 또는 이의 콘주게이트 또는 이의 융합 단백질을 지칭한다. 항-혈관물질은 혈관 형성 인자 또는 그의 수용체의 혈관 신생 활성을 결합 및 차단하는 제제를 포함하는 것으로 이해해야 한다. 예를 들면, 항-혈관신생 물질은 상기에서 정의된 바와 같이 혈관신생 물질에 대한 항체 또는 기타 항진제로써, 예컨대, VEGF 항진제 (예컨대, VEGF-A 또는 상기 VEGF-A 수용체(예컨대, KDR 수용체 또는 Flt-1 수용체)에 대한 항체), PDGF 항진제 (예컨대, 항-PDGFR 억제제 이를 테면, GLEEVEC™ (이마티니브 메실레이트(Imatinib Mesylate)))이다. 항-혈관신생 물질은 고유의 혈관신생 억제제, 예컨대, 양지오스테틴, 엔도스테틴, 등을 포함한다. 예를 들면, Klagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (예컨대, 표 3은 악성 흑색종에서 항-혈관신생요법 열거); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (예컨대, 표 2는 공지의 항혈관신생 인자 열거); 그리고, Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) (예컨대, 표 1은 임상 시험에 이용되는 항-혈관신생 물질 열거) 참고.
- [0158] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "VEGF 항진제"는 VEGF에 결합하고, VEGF 발현 수준을 감소시키고, 또는 하나 또는 그 이상의 VEGF 수용체에 VEGF 결합, VEGF 신호생성, 및 VEGF-매개된 혈관신생 및 내피 세포 생존 또는 증식을 포함하나, 이에 국한되지 않는 VEGF 생물학적 활성을 중화, 차단, 억제, 폐기, 감소 또는 간섭하는 능력을 가진 분자를 지칭한다. 예를 들면, VEGF 생물학적 활성을 중화, 차단, 억제, 폐기, 감소 또는 간섭하는 능력을 가진 분자는 하나 또는 그 이상의 VEGF 수용체 (VEGFR) (예컨대, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, 막-결합된 VEGF 수용체 (mbVEGFR), 또는 가용성 VEGF 수용체 (sVEGFR))에 결합함으로써 이의 효과를 발휘할 수 있다. 본 발명의 방법에 유용한 VEGF 항진제로 포함되는 것은 VEGF에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드, 항-VEGF 항체 및 이의 항원-결합 단편, 수용체 분자 및 VEGF에 특이적으로 결합하는 유도체로써, 이러한 결합으로 인하여 하나 또는 그 이상의 수용체, 융합 단백질 (예컨대, VEGF-Trap (Regeneron)), 및 VEGF₁₂₁-겔로닌 (Peregrine)에 대한 이의 결합이 격리된다. VEGF 항진제는 VEGF 폴리펩티드의 항진제 변이체들, VEGF 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자의 최소한 단편에 상보적인 안티센스 핵염기 올리고머; VEGF 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자의 최소한 단편에 상보적인 작은 RNAs; VEGF를 표적으로 하는 리보자임; VEGF에 대한 펩티바디; 그리고 VEGF 압타머를 또한 포함한다. VEGF 항진제는 VEGFR에 결합하는 폴리펩티드, 항-VEGFR 항체, 그리고 VEGFR에 결합하는

항원-결합 단편 및 유도체, 또는 융합 단백질을 포함하며, 이러한 결합으로 인하여 VEGF 생물학적 활성 (예컨데, VEGF 신호생성)을 차단, 억제, 폐기, 감소 또는 간섭한다. VEGF 항진제는 VEGF 또는 VEGFR에 결합하고, 그리고 VEGF 생물학적 활성을 차단, 억제, 폐기, 감소 또는 간섭하는 비펩티드 소분자를 또한 포함한다. 따라서, 용어 "VEGF 활성"은 VEGF의 VEGF-매개된 생물학적 활성을 구체적으로 포함한다. 특정 구체예들에서, 상기 VEGF 항진제는 VEGF의 발현 수준 또는 생물학적 활성을 최소한 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상으로 감소 또는 억제한다. 일부 구체예들에서, 상기 VEGF-특이적 항진제에 의해 억제되는 VEGF는 VEGF (8-109), VEGF (1-109), 또는 VEGF₁₆₅이다.

[0159] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 VEGF 항진제는 항-VEGFR2 항체 및 관련된 분자(예컨데, 라무씨루마브, 타니비루마브, 아플리베르셉트), 항-VEGFR1 항체 및 관련된 분자(예컨데, 이크루쿠마브, 아플리베르셉트 (VEGF Trap-Eye; EYLEA®), 및 ziv-아플리베르셉트 (VEGF Trap; ZALTRAP®)), 이중특이적 VEGF 항체 (예컨데, MP-0250, 바니씨주마브(VEGF-ANG2), 및 US 2001/0236388에서 공개된 이중특이적 항체), 항-VEGF, 항-VEGFR1, 및 항-VEGFR2 팔, 항-VEGF 항체 (예컨데, 베바씨주마브, 세바씨주마브, 및 라니비주마브)의 2개의 조합을 포함하는 이중특이적 항체, 그리고 비펩티드 소(small) 분자 VEGF 항진제 (예컨데, 파조파니브, 아씨티니브, 반데타니브, 스티바르가, 카보잔티니브, 렌바티니브, 닌테다니브, 오란티니브, 테라티니브, 도비티니그, 쉐디라니브, 모테사니브, 슐파티니브, 아파티니브, 포레티니브, 파미티니브, 및 티보자니브)를 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 추가 VEGF 항진제는 하기에서 기술된다.

[0160] 물질, 가령, 약학 제형의 "유효량(effective amount)"이란 필요한 치료 또는 예방 결과를 달성하는데 필요한 투여량 및 필요한 시간 동안 효과적인 양을 지칭한다.

[0161] "개체(individual)" 또는 "대상(subject)"은 포유류다. 포유류는 길들여진 동물 (예를 들면, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류 (예를 들면, 인간 및 비-인간 영장류, 이를 테면 원숭이), 토끼, 그리고 설치류 (예를 들면, 마우스 및 랫(rats))을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 특정 구체예들에서, 개체, 또는 대상은 인간이다. "대상"은 "환자"일 수 있다.

[0162] 용어 "암"과 "암의"란 조절불가능한 세포 성장을 전형적으로 특징으로 하는 포유류의 생리학적 상태를 지칭하거나 또는 설명한다. 암의 예로는 암종, 림프종, 모세포종, 및 백혈병을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 이러한 암의 더 구체적인 예는 편평 세포 암, 소-세포 폐암, 비-소(small) 세포 폐암, 위장 암, 췌장 암, 교아세포종, 자궁경부 암, 난소암, 간암, 방광 암, 간종양, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 암종, 타액선 암종, 콩팥 암, 신장암, 전립선암, 음문암, 갑상선 암, 간암종 및 다양한 유형의 두경부암을 포함한다. "포유류(mammal)"란 치료 목적으로 인간, 가축 및 농장 동물, 비인간 영장류, 동물원, 스포츠 또는 개, 말, 고양이, 소 등과 같은 애완동물을 비롯하여 포유류로 분류된 동물을 의미한다.

[0163] "장애(disorder)"는 항체 치료 효과가 있는 임의의 상태를 말한다. 예를 들면, 비정상적인 혈관 신생 (과도하거나 부적절하거나 통제되지 않은 혈관 신생) 또는 혈관 투과성으로 인하여 고생하거나 이를 예방할 필요가 있는 포유 동물. 여기에는 만성 및 급성 질환 또는 문제의 장애에 포유 동물을 쉽게 걸리게 하는 병리학적 상태를 비롯한 질병이 포함된다. 본원에서 치료되는 비-제한적 장애의 예로는 혈관신생과 병리학적으로 관련된 장애 (예컨데, 안구 장애 및 세포 증식성 장애) 그리고 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애를 포함한다.

[0164] 용어 "항-신생물 조성물(anti-neoplastic compositio)"은 최소한 하나의 활성 치료제, 예컨데, "항-암 물질"을 포함하는 암 치료에 유용한 조성물을 말한다. 치료제 (항-암 물질)의 예로는 예컨데, 화학치료제, 성장 억제 물질, 세포독성 물질, 방사능 요법에 이용되는 물질, 항-혈관신생 물질, 자가사멸 물질, 항-튜블린 물질, 그리고 암을 치료하는 기타-물질, 이를 테면, 항-HER-2 항체, 항-CD20 항체, 상피 성장 인자 수용체 (EGFR) 항진제 (예컨데, 티로신 키나제 억제제), HER1/EGFR 억제제 (예컨데, 에롤로티니브 (TARCEVA™), 혈소관 유도된 성장 인자 억제제 (예컨데, GLEEVEC™ (이마티니브 메실레이트)), COX-2 억제제 (예컨데, 셀레콕시브), 인터페론, 사이토킨, 다음의 표적 ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-베타, BlyS, APRIL, BCMA 또는 VEGF 수용체(들), TRAIL/Apo2, 및 기타 생물활성 및 유기 화학 물질, 그리고 이와 유사한 것들중 하나 또는 그 이상에 결합하는 항진제(예컨데, 중화 항체)를 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 이들의 조합물도 본 발명에 포함된다.

[0165] 용어 "세포독성 물질(cytotoxic agent)"은 본 명세서에서 이용된 바와 같이, 세포의 기능을 저해 또는 막는 및/또는 세포 사멸 또는 파괴시키는 물질을 지칭한다. 세포독성 물질들은 방사능활성 동위원소 (가령, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² 및 Lu의 방사능활성 동위원소), 화학치료요법적 물질 또는 약물(가령, 메토티렉세이트, 아드리아마이신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 펠

파란, 미토마이신 C, 클로람부칠, 다우노루비친 또는 다른 삽입(intercalating) 물질); 정상 저해성 물질들; 효소 및 이의 단편들 이를 테면 핵산분해성 효소; 항생제; 독소, 이를 테면 세균, 곰팡이, 식물 또는 동물 기원의 작은 분자 독소 또는 효소적으로 활성 독소, 및 이의 단편들 및/또는 변이체; 그리고 하기에서 논의되는 다양한 항종양 또는 항암 물질을 포함하나, 이에 국한되지 않는다.

[0166] "화학치료요법적 물질(chemotherapeutic agent)"은 암 치료에 유용한 화학적 화합물을 말한다. 화학치료제의 예로는 암 치료에 유용한 화학적 화합물을 포함한다. 화학치료요법적 물질의 예로는 알킬화 물질 이를 테면 티오테파 및 CYTOXAN® 사이클로포스파미드; 알킬 술포네이트 이를 테면 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지르딘 이를 테면 벤조도파, 카르보퀴온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌벨라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 그리고 트리메틸로로멜라민이 포함된 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 아세토게닌 (구체적으로 블라타신 및 블라타시논); 캄포토테신 (합성 유사체 토포테칸); 비로스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (이의 아도젤레신, 카르젤레신 및비젤레신 합성 유사체들을 포함); 크립토펜신 (특히 크립토펜신 1 및 크립토펜신 8); 돌라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체들, KW-2189 및 CB1-TM1을 포함); 에루테로빈; 판크라티스테틴; 사르코디틴; 스펀기스테틴; 질소 머스타드 이를 테면 클로람부칠, 클로로나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메크로에타민, 메크로에타민 옥시드 하이드로클로리드, 멜파란, 노뎀비친, 페네스테린, 프레디니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로조우레아 이를 테면 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 그리고 라니무스틴; 항생제 이를 테면 에네디네 항생제 (가령, 칼케아미신, 구체적으로 칼케아미신 감마II 그리고 칼케아미신 오메가II (가령, Nicolaou et al., *Angew. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994))); 디네미신 A를 포함한 디네미신; 비스포스포네이트, 이를 테면 클로드르네이트; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오키리노스테틴 발색단 및 관련된 색단백질 에네디네 항생제 발색단), 아클라치노미신, 약티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비친, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모미치니스, 닥티노마이신, 다우노루비친, 데토루비친, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, ADRIAMYCIN® 독소루비신 (몰포르노-독소루비신, 시아노몰포르노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 및 테옥시독소루비신), 에피루비친, 에소루비친, 이다루비친, 마르셀로마이신, 미토마이신, 이를 테면 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피로마이신, 퓨로마이신, 퀘라마이신, 로도루비친, 스테렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르치딘, 우베니멕스, 지노스테틴, 조루비친; 항-대사물질 이를 테면 메토틱렉세이트, 그리고 5-플루오르우라실 (5-FU); 콤레타스타틴; 염산 유사체들, 이를 테면 데노프테린, 메토틱렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체들, 이를 테면 플루다라빈, 6-멀캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체들, 이를 테면 안씨타빈, 아자씨티딘, 6-아자우리딘, 카르모퓨르, 씨타라빈, 디테옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노씨타빈, 플옥스우리딘; 안드로젠, 이를 테면 카루스테론, 드로모스타노론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스트라톤; 항-아드레날, 이를 테면 아미노글루테티미드, 미토탄, 트리로스탄; 염산 보충물, 이를 테면 프로리닌산; 아세갈라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레블린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부칠; 비산트렌; 에다트라세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지퀼온; 엘포르미틴; 에립티니움 아세테이트; 에포틸온; 에토글루씨드; 갈리움 니트레이트; 히드록시우레아; 켈티난; 로니다닌; 메이탄시노이드, 이를 테면 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미토산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스테틴; 페나메트; 피라루비친; 로스옥산트론; 포도필린산; 프로카르바진; PSK® 폴리사카라이드 복합체 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 라조옥산; 리조신; 시조피란; 스피로게르마니움; 테누아조신; 트리아지퀼온; 2,2',2'-트리클로로트리에틸아민; ; 트리코테세네스 (구체적으로 T-2 독신, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 앙귀딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예로씨, TAXOL® 파클리탁셀(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ 크렘포르-프리, 파클리탁셀의 알부민-조작된 나노입자 제형 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), 및 TAXOTERE® 독세타셀 (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로로부칠; GEMZAR® 겐시타빈; 6-티오구아닌; 멀캅토피린; 메토틱렉세이트; 백금 유사체, 이를 테면, 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토산트론; 빈크리стин; NAVELBINE® 비노렐빈; 보반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 셀로다; 이반드로네이트; 이리노테칸 (Camptosar, CPT-11) (5-FU 및 루코보린과 함께 이리노테칸 치료 섭생 포함); 토포이소메라제 억제제 RFS 2000; 디플로로오메틸오르니딘 (DMFO); 레티노이드 이를 테면, 레티논산; 카페씨타빈; 콤레타스타틴; 류코보린 (LV); 옥살리플라틴 치료 섭생(FOLFOX)을 포함한, 옥살리플라틴; PKC-알파, Raf, H-Ras, EGFR (예컨데, 에르로티니브 (TARCEVA™)) 및 세포 증식을 감소시키는 VEGF-A의 억제제, 그리고 그리고 약학적으로 수용가능한 염, 상기 임의의 것의 산 또는 유사체들을 포함한다.

- [0167] 또한 상기 정의에는 중앙에서 호르몬 작용을 조절 또는 억제하는 항-호르몬 물질이 또한 포함되는데, 이를테면, 항-에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절물질 (SERMs), 예를 들면, 탐옥시펜 (NOLVADEX® 탐옥시펜을 포함), 탈옥시펜, 드롤옥시펜, 4-히드록시탐옥시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스트론, 그리고 FARESTON® 토레미펜; 부신에서 에스트로겐 생산을 조절하는 아로마타제 효소를 억제하는 아로마타제 억제제, 이를 테면, 예를 들면, 4(5)-이디마졸, 아미노글루테티미드, MEGASE® 메게스트롤 아세테이트, AROMASIN® 엑세메스탄, 포르메스타니에, 화프로졸, RIVISOR® 보로졸, FEMARA® 레트로졸, 그리고 ARIMIDEX® 아나스트로졸; 그리고 항-안드로겐 이를 테면, 플루타미드, 니루타미드, 비칼루타미드, 류프로리드, 및 고세렐린; 뿐만 아니라 트룩사시타빈 (1,3-디옥살란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 비정상적 세포 증식에 연루된 신호생성 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것들, 이를테면, 예를 들면, PKC-알파, Raf 및 H-Ras; 리보자임 이를 테면, VEGF 발현 억제제 (예컨데, ANGIOZYME® 리보자임) 및 HER2 발현 억제제; 백신 이를 테면, 유전자 요법 백신, 예를 들면, ALLOVECTIN® 백신, LEUVECTIN® 백신, 및 VAXID® 백신; PROLEUKIN® rIL-2; LURTOTECAN® 토포이소페라제 1 억제제; ABARELIX® rmRH; 비노렐빈 및 에스페라미신 (U.S. 특허 번호 4,675,187 참고), 그리고 약학적으로 수용가능한 염, 상기 임의의 것의 산 또는 유사체들을 또한 포함한다.
- [0168] 본원에서 사용된 용어 "프로드럭(prodrug)"이란 모 약물과 비교하여, 중앙 세포에 대해 세포 독성이 덜하고, 효소적으로 활성화되거나, 또는 활성이 더 큰 부모 형태로 전환될 수 있는 약학적 활성 물질의 전구체 또는 유도체 형태를 나타낸다. 예컨데, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) and Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985) 참고. 본 발명의 프로드럭은 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다:포스페이트-함유하는 프로드럭, 티오포스페이트-함유하는 프로드럭, 술페이트-함유하는 프로드럭, 펩티드-함유하는 프로드럭, D-아미노산-변형된 프로드럭, 당화된 프로드럭, β-락탐-함유하는 프로드럭, 임의선택적으로 치환된 펜옥시아세타미드-함유하는 프로드럭 또는 임의선택적으로 치환된 페닐아세타미드-함유하는 프로드럭, 5-플루오로시토신 및 기타 5-플루오로우리딘 프로드럭, 이들은 세포독성이 없는 더욱 활성이 있는 약물로 전환될 수 있다. 본 발명에 사용하기 위해 프로드럭 형태로 유도체화 될 수 있는 세포 독성 약물의 예로는 상기 화학치료요법 제제가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0169] 용어 "포장 삽입물(package insert)"은 이러한 치료요법적 산물의 사용과 관련된 지시, 용도, 투여량, 투여, 복합 요법, 금기 및/또는 경고에 대한 정보가 포함된 치료요법적 산물의 시판 포장에 관례적으로 포함되는 지침을 칭할 때 이용된다.
- [0170] "약학으로 수용가능한 운반체(pharmaceutically acceptable carrier)"는 활성 성분 이외에 약학 제형 안에 있는 성분을 말하며, 약학적으로 수용가능한 담체는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 방부제를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0171] 용어 "약학 제형(pharmaceutical formulation)"이란 이 조성물 안에 포함된 활성 성분(예컨데, 항-VEGF 항체, 항체 콘주게이트, 용합 단백질, 또는 중합체 제제)의 생물학적 활성이 효과가 있도록 하기 위한 형태의 조제물을 지칭하며, 제형이 투여되는 대상에게 수용불가능한 독성을 주는 추가 성분들은 포함하지 않는다.
- [0172] 본 명세서에서 이용된 바와 같이, "치료(treatment)" (및 이의 문법적 변이, 이를 테면 "치료하다(treat)" 또는 "치료하는(treating)")라는 것은 치료될 개인에서 자연 과정을 변경시키려는 시도로 임상적 증대과정을 말하며, 그리고 예방 또는 임상적 병리학의 과정 동안 실행될 수 있다. 치료의 바람직한 효과에는 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상의 완화, 상기 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이 방지, 질환 진행 속도 감소, 상기 질환 상태의 개선 또는 경감, 그리고 차도 또는 개선된 예후가 포함되나, 이에 국한되지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 항체 또는 본 발명의 항체를 포함하는 다른 조성물 (예컨데, 항체 콘주게이트, 용합 단백질, 또는 중합체 제제)은 질환 또는 장애의 발달을 지연 또는 질환의 진행을 느리게 하는데 이용된다.
- [0173] "단리된(isolated)" 핵산 분자는 핵산의 천연 공급원에서 통상적으로 결합되어있는 하나 이상의 오염 핵산 분자로부터 동정되고, 분리된 핵산 분자이다. 분리된 핵산 분자는 자연계에서 발견되는 형태 또는 환경 이외의 것이다. 따라서, 분리된 핵산 분자는 천연 세포에 존재하는 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 핵산 분자는 항체를 통상적으로 발현하는 세포에 포함된 핵산 분자를 포함하는데, 예를 들어 핵산 분자가 천연 세포에 있는 위치와는 상이한 염색체에 위치한 경우이다.
- [0174] "제어 서열(control sequences)"이라는 표현은 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에

필요한 DNA 서열을 의미한다. 원핵 생물에 적합한 제어 서열은 예를 들어, 프로모터, 선택적으로 오퍼레이터(operator) 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인헨서를 이용하는 것으로 알려져 있다.

[0175] 핵산은 또다른 핵산 서열과 기능적 관계에 있을 때, "작용가능하도록 연계된다(operably linked)". 예를 들면, 프레스열(presequence) 또는 분비 리더의 DNA는 폴리펩티드의 DNA가 이 폴리펩티드의 분비에 참여하는 프레단백질로 발현된다면, 이 DNA에 작용가능하도록 연계되고; 프로모터 또는 인헨서는 해당 서열의 전사에 영향을 주는 경우, 코딩 서열에 작용가능하도록 연계되고; 또는 리보솜 결합 부위는 해독이 용이하게 되도록 위치되는 경우 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일반적으로, 작용가능하도록 연계의 의미는 연계된 DNA 서열이 연결하고(contiguous), 분비 리더의 경우, 리딩 상(reading phase)에서 인접한다. 그러나, 인헨서는 인접할 필요는 없다. 연계(linking)는 통상적인 제한 부위에서 결찰(ligation)에 의해 이루어진다. 이러한 부위가 없다면, 합성 올리고뉴클레오티드 아답터(adaptors) 또는 링커가 통상적인 절차에 따라 이용된다.

[0176] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "세포", "세포 계통", 및 "세포 배양물"은 본 명세서에서 호환되며, 이러한 모든 용어는 후대를 포함한다. 따라서, "형질변환체(transformants)"와 "형질변환된(transformed) 세포들"은 계대의 수와 무관하게, 1차 형질변환된 세포와 이로부터 유도된 후대를 포함한다. 의도된 또는 우발적 돌연변이로 인해 모든 자손이 DNA 함량이 정확하게 동일하지 않을 수도 있음을 이해해야 한다. 원래 형질변환된 세포에 대하여 선별된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 보유한 돌연변이 후대가 포함된다. 명백한 명시가의 의도된 경우, 문맥에 따라 명확해질 것이다.

[0177] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "라이브러리(library)"는 복수의 항체 또는 항체 단편 서열 (예컨대, 본 발명의 항-VEGF 항체), 또는 이들 서열을 코딩하는 핵산을 지칭하며, 이 서열은 본 발명의 방법에 따라 이들 서열안으로 도입된 변형 아미노산의 조합에서 상이하다.

[0178] "돌연변이(mutation)"는 야생형 서열과 같은 기준 뉴클레오티드 서열에 대한 뉴클레오티드의 결실, 삽입 또는 치환이다.

[0179] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "코돈 세트(codon set)"는 원하는 변형 아미노산을 코딩하는데 사용되는 상이한 뉴클레오티드 삼중 항(triplet) 염기 서열의 세트를 지칭한다. 한 세트의 올리고뉴클레오티드는 예를 들어, 코돈 세트에 의해 제공되고, 원하는 아미노산 그룹을 코딩할 수 있는 뉴클레오티드 삼중 항의 모든 가능한 조합을 나타내는 서열을 포함하도록 고체상 합성에 의해 합성될 수 있다. 코돈 지정의 표준 형태는 당업계에 공지되어 있고, 본원에 기술된 IUB 코드의 표준 형태이다. 코돈 세트는 일반적으로 이태리체의 3개 대문자, 가령, *NNK*, *NNS*, *XYZ*, *DVK* 그리고 이와 유사하게 나타낸다. 특정 위치에서 선택된 뉴클레오티드 "축중(degeneracy)"을 갖는 올리고뉴클레오티드의 합성은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, TRIM 접근법에 의해 합성된다(Knappek et al., *J. Mol. Biol.* 296:57-86 (1999)); Garrard et al., *Gene* 128:103(1993)). 특정 코돈 세트를 갖는 올리고뉴클레오티드의 이러한 세트는 상업적 핵산 합성기 (예를 들어, Applied Biosystems, Foster City, CA로부터 입수 가능함)를 사용하여 합성되거나 또는 상업적으로 수득(예를 들면, Life Technologies, Rockville, MD)될 수 있다. 따라서, 특정 코돈 세트를 갖는 합성된 올리고뉴클레오티드 세트는 전형적으로 상이한 서열을 갖는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함할 것이며, 차이는 전체 서열 내 코돈 세트에 의해 확립된다. 본 발명에 따라 사용되는 올리고뉴클레오티드는 가변 도메인 핵산 주형과의 혼성화를 가능하게 하는 서열을 가지며, 또한 클로닝 목적 등에 유용한 제한 효소 부위를 포함할 수 있지만, 반드시 그런 것은 아니다.

[0180] "파아지 디스플레이(phage display)"는 변이체 폴리펩티드가 파아지, 예를 들어, 섬유성 파아지, 입자의 표면상의 코트 단백질의 적어도 일부에 융합된 단백질로 나타내는 기술이다. 파아지 디스플레이의 유용성은 무작위화된 단백질 변이체의 큰 라이브러리가 표적 항원에 높은 친화력으로 결합하는 서열에 대해 신속하고 효율적으로 분류될 수 있다는 사실에 있다. 파아지 상에서 펩티드 및 단백질 라이브러리를 표시하는 것은 특정 결합 특성을 가진 폴리펩티드를 수백만 가지 스크리닝하는데 사용되었다. 다가(polyvalent) 파아지 디스플레이 방법은 섬유상 파아지의 유전자 III 또는 유전자 VIII 중 어느 하나에 대한 융합을 통해 작은 랜덤 펩티드 및 작은 단백질을 디스플레이하는데 사용되어 왔다. Wells and Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3:355-362 (1992), 및 본원에서 언급된 참고자료. 단가(monovalent) 파아지 디스플레이에서, 단백질 또는 펩티드 라이브러리는 유전자 III 또는 그의 일부에 융합되고, 야생형 유전자 III 단백질의 존재하에 낮은 수준으로 발현되어 파아지 입자가 융합 단백질의 하나의 카피를 나타내거나 전혀 나타내지 않는다. 결합(avidity) 효과는 다가 파아지에 비해 감소하므로, 내재적인 리간드 친화력을 기준으로 분류가 이루어지며, DNA 조작을 단순화하는 파아지미드

(phagemid) 벡터가 사용된다. Lowman and Wells, *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, 3:205-0216 (1991).

- [0181] "파아지미드(phagemid)"는 박테리아 복제 기점과 박테리오파아지의 유전자 간 영역의 복사체를 갖는 플라스미드 벡터, 예를 들어, CoIE1이다. 파아지미드는 필라멘트형 박테리오파아지 및 람도이드(lambdoid) 박테리오파아지를 비롯한 임의의 공지된 박테리오파아지에서 사용될 수 있다. 플라스미드는 또한 일반적으로 항생제 내성을 위한 선택성 표지를 함유할 것이다. 이들 벡터에 클로닝된 DNA 세그먼트는 플라스미드로서 증식될 수 있다. 이들 벡터를 품고 있는 세포에 파아지 입자의 생성에 필요한 모든 유전자가 제공되면, 플라스미드의 복제 방식이 롤링 서클 복제(rolling circle replication)로 변경되어 플라스미드 DNA 및 패키징 파아지 입자의 한 가닥의 복사체가 생성된다. 파아지미드는 감염성 또는 비-감염성 파아지 입자들을 형성할 수 있다. 이 용어는 이형 폴리펩티드가 파아지 입자의 표면 상에 나타나도록 유전자 융합으로서 이형 폴리펩티드 유전자에 연결된 파아지 코트(coat) 단백질 유전자 또는 이의 단편을 함유하는 파아지미드를 포함한다.
- [0182] "파아지 벡터(phage vector)"는 헤테로유전자를 함유하고, 복제할 수 있는 박테리오파아지의 이중 가닥 복제 형태를 의미한다. 파아지 벡터는 파아지 복제 및 파아지 입자 형성을 허용하는 파아지 복제 원점을 갖는다. 상기 파아지는 바람직하게는 필라멘트성 박테리오파아지, 이를 테면, M13, f1, fd, Pf3 파아지 또는 이의 유도체들, 또는 람도이드 파아지, 이를 테면, 람다, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, 등등, 또는 이의 유도체다.
- [0183] 출발 또는 기준 폴리펩티드 (예컨데, 기준 항체 또는 이의 가변 도메인(들)/HVR(s))의 "변이체(variant)" 또는 "돌연변이체(mutant)"는 (1) 출발 또는 기준 폴리펩티드와는 상이한 아미노산 서열을 갖고, 그리고 (2) 출발 또는 기준 폴리펩티드로부터 자연적 또는 인위적(사람에 의해 만들어진) 돌연변이생성을 통하여 유래된 폴리펩티드다. 이러한 변이체들은 예를 들면, 본원에서 "아미노산 잔기 변경"으로 명명된, 관심 대상 폴리펩티드의 아미노산 서열 안에 잔기의 결손, 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 따라서, 변이체 HVR은 출발 또는 기준 폴리펩티드 서열 (이를 테면, 원천 항체 또는 항원 결합 단편의 서열)에 대하여 변이체 서열을 포함하는 HVR을 지칭한다. 이 내용에서 아미노산 잔기 변경은 출발 또는 기준 폴리펩티드 서열 (이를 테면, 기준 항체 또는 이의 단편의 서열)에서 대응하는 위치의 아미노산과는 상이한 아미노산을 지칭한다. 만일 최종 구조체가 바람직한 기능적 특징을 보유한다면, 최종 변이 또는 돌연변이 구조체에 결손, 삽입, 및 치환의 임의의 조합이 있을 수 있다. 아미노산 변화는 또한 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시키는 것과 같은, 폴리펩티드의 해독 후 과정을 변화시킬 수 있다.
- [0184] "야생형 (WT)" 또는 "기준" 서열 또는 "야생형(wild-type)" 또는 "기준(reference)" 단백질/폴리펩티드의 서열, 이를 테면, 기준 항체의 HVR 또는 가변 도메인은 돌연변이의 도입을 통하여 변이체 폴리펩티드가 유래된 기준 서열일 수 있다. 일반적으로, 주어진 단백질에 있어서 "야생형" 서열은 자연에서 가장 공통적인 서열이다. 유사하게, "야생형" 유전자 서열은 자연에서 발견되는 가장 공통적인 유전자의 서열이다. 돌연변이는 자연 과정을 통해 또는 사람이 유도하는 방법을 통해 "야생형" 유전자 (따라서 이를 인코딩하는 단백질)에 도입될 수 있다. 그러한 공정의 산물은 원래의 "야생형" 단백질 또는 유전자의 "변이형" 또는 "돌연변이" 형태이다.
- [0185] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "기준 항체(reference antibody)"는 그의 항원-결합 서열이 본원에 기재된 기준에 따른 다양화가 수행되는 주형 서열로서 작용하는 항체 또는 그의 단편을 말한다. 항원-결합 서열은 일반적으로 항체 가변 영역, 바람직하게는 틀구조 영역을 포함하는 최소한 하나의 HVR을 포함한다.
- [0186] "대량의 병행 서열화(massively parallel sequencing)" 또는 "대량 병행 서열화"는 당분야에서 "차-세대 서열화(next-generation sequencing)", 또는 "제 2 세대 서열화(second generation sequencing)"는 임의의 고처리량(high-throughput) 핵산 서열화 방법을 의미한다. 이러한 접근법은 전형적으로 많은 수 (예를 들어, 수천만 또는 수십억)의 공간적으로 분리된 클론적으로 증폭된 DNA 주형 또는 단일 DNA 분자의 병렬 서열화를 포함한다. 예를 들면, Metzker, *Nature Reviews Genetics* 11: 31-36, 2010 참고.
- [0187] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "농축된(enriched)"은 상응하는 기준 라이브러리 (예를 들어, 분류되지 않은 라이브러리, 또는 상이한 또는 비-관련 항원에 대하여 분류된 라이브러리)와 비교하여, 분류된 라이브러리에서 더 높은 빈도로 엔터티 (예컨데, 아미노산 잔기 변경)가 존재하는 것을 의미한다. 대조적으로, "결핍된(depleted)"이란 상응하는 기준 라이브러리 (예를 들어, 분류되지 않은 라이브러리, 또는 상이한 또는 비-관련 항원에 대하여 분류된 라이브러리)와 비교하여, 분류된 라이브러리에서 더 낮은 빈도로 엔터티 (예컨데, 아미노산 잔기 변경)가 존재하는 것을 의미한다. 아미노산 잔기 변이체들을 동정하는 방법에서 이용될 때, 용어 "중립(neutral)"은 농축되지도 않고, 결핍되지도 않은, 즉, 환언하면, 기준 라이브러리 (예를 들어, 분류되지 않은 라이브러리, 또는 상이한 또는 비-관련 항원에 대하여 분류된 라이브러리)와 대략적으로 동일한 빈도로 존재하

는 것을 의미한다.

- [0188] "등전점 (pI)"이란 당업계에서 "pH(I)" 또는 "IEP"로도 불리는데, 분자 (예컨대, 단백질, 이를 태면, 항체)가 네트 전하를 가지지 않는 pH를 의미한다.
- [0189] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "항체 콘주게이트(antibody conjugate)"란 하나 또는 그 이상의 중합체에 공유적으로 부착된 항체다. 임의의 적합한 중합체, 예를 들면, 친수성 중합체 (예컨대, 히알루론산 (HA) 또는 폴릴에틸렌 글리콜 (PEG)) 또는 소수성 중합체 (예컨대, 폴리(락트-co-글리콜산) (PLGA))는 항체에 콘주게이트될 수 있다.
- [0190] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "중합체(polymer)"는 선형, 원형, 분지형, 가교결합된 또는 덴드리머 방식 또는 이들의 조합으로 화학 결합에 의해 연결된 반복 구조 단위 (즉, 단량체)를 포함하는 분자를 의미한다. 중합체는 합성 또는 자연 발생 또는 이들의 조합일 수 있다. 용어 "중합체"는 공중 합체를 포함하는데, 이것은 2 종 또는 그 이상의 상이한 단량체를 포함한다. 중합체는 동중중합일 수 있는데, 이것은 단일 유형의 단량체만을 포함한다.
- [0191] 본 명세서에서 호환 사용되는 용어 "히알루론산(hyaluronic acid)", "히알루라논(hyaluronan)" 및 "HA"는 N-아세틸 글루코사민과 글루쿠론산이 반복된, 이당류 단위를 함유하는 중합체 글리코사미노글리칸 (GAG)을 지칭한다. HA는 예를 들어, 세포외 기질 (예를 들어, 눈의 유리체), 결합 조직, 상피 조직 및 신경 조직에서 발견될 수 있는 음이온성 비황 화물성 GAG이다.
- [0192] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "폴릴에틸렌 글리콜" 또는 "PEG"는 분자량에 따라, 폴릴에틸렌 옥시드 (PEO) 또는 폴리오시에틸렌 (POE)로도 알려진, 폴리에테르 화합물을 지칭한다. PEG는 H-(O-CH₂-CH₂)_n-OH의 구조를 가질 수 있는데, 이때 n은 임의의 적합한 정수다. 상기 PEG는 분기형 PEG, 별모양 PEG, 또는 콤보(comb) PEG일 수 있다. 상기 PEG는 예를 들면, PEG 테트라머, PEG 옥합체, 또는 PEG 옥타머일 수 있다.
- [0193] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "융합 단백질(fusion protein)"은 제 1의 펩티드, 단백질, 또는 폴리펩티드, 예컨대, 항체 (예컨대, 항-VEGF 항체 (예컨대, 본원에서 기술된 항-VEGF 항체, 예컨대, G6.31 AARR))가 제 2의 펩티드, 단백질, 또는 폴리펩티드, 예컨대, 안구 결합 도메인 (예컨대, HA 결합 도메인)에 직접 또는 간접적으로 연계된, 단백질을 말한다. 한 실시예에서, 제 1의 펩티드, 단백질, 또는 폴리펩티드(예컨대, 항체)는 제 2의 펩티드, 단백질, 또는 폴리펩티드 (예컨대, 안구 결합 도메인 (예컨대, HA 결합 도메인))에 링커에 의해 연계될 수 있다. 융합 단백질 내용에 있어서, 용어 "연계(links)" 및 "연계된(linked)" 및 이들의 문법적 변형은 용어 "공유적으로 부착된 (covalently attached)"과 호환 사용되고, 융합 단백질의 두 모이어티 사이의 직접 또는 간접 공유 결합 (예컨대, 펩티드 결합)을 지칭한다. 일반적으로, 상기 본 발명의 융합 단백질은 항체 융합 단백질이다. 상기 항체는 항체 단편, 예를 들면, Fab, Fab', 또는 Fab-C이다. 일부 경우에서, 상기 항체 단편은 Fab이다.
- [0194] 용어 "안구 결합 도메인(ocular binding domain)"은 눈에서 볼 수 있는 생물학적 물질(예컨대, 각막, 유리체, 망막, 망막 색소 상피, 또는 맥락막)에 결합하는 펩티드, 단백질, 폴리펩티드 또는 이의 단편을 지칭한다. 한 예로써, 일부 경우에서, 눈에서 볼 수 있는 생물학적 물질은 세포외 매트릭스 성분, 예를 들면, 탄수화물 (예컨대, 하전된 칸수화물 (예컨대, 글리코사미노글리칸)), 당단백질 (예컨대, 피브릴린 및 옵티신), 또는 단백질 (예컨대, 콜라겐 (예컨대, 콜라겐 유형 I-XXVII, 특히 콜라겐 II, 콜라겐 IX, 콜라겐 V, 콜라겐 VI, 콜라겐 XI, 및 이의 헤테로타입의 콜라겐 소섬유(fibrils)), 또는 세포외 매트릭스 구성요소들, 예를 들면, Le Goff et al., *Eye* 22:1214-1222, 2008에서 기술된 바와 같은 것들이다. 일부 경우에서, 세포외 매트릭스 성분은 글리코사미노글리칸, 예를 들면, HA 또는 프로테오글리칸 (예컨대, 콘드로이틴 술페이트 또는 헤파린 술페이트)이다. 한 실시예에서, 상기 시각 결합 도메인은 히알루론산 결합 도메인이다.
- [0195] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "히알루론산 결합 도메인(hyaluronic acid binding domain)" 또는 "HA 결합 도메인"은 HA에 결합하는 펩티드, 단백질, 폴리펩티드, 또는 이의 단편을 말한다. HA 결합 도메인은 예를 들면, 중앙 피사 인자-자극된 유전자 6 (TSG6), 림프관 내피 히알루로난 수용체 1 (LYVE-1), 히알루로난 및 프로테오글리칸 링크 단백질 (HAPLN) 1, HAPLN2, HAPLN3, HAPLN4, 아그레칸, 브레비칸, 뉴로칸, 포스포칸, 베르시칸, CAB61358, KIA0527, 스타빌린-1, 스타빌린-2, RHAMM, 박테리아 HA 신타제, 및 콜라겐 VI을 포함한, HA 결합 단백질 (당분야에서 "히알라드헤린(hyaladherin)"으로도 알려짐)로부터 유래될 수 있다. 기타 HA 결합 단백질은 당분야에 공지되어 있다. 예시적인 HA 결합 도메인은 링크 모듈, G1 도메인, 및 리신-풍부 올리고펩티드를 포함한다.

- [0196] "링크 모듈(link module)" (당업계에서는 또한 "링크 도메인"이라고도 함)은 HA에 결합하는 대략적으로 100개 아미노산의 구조 도메인이다 (예컨데, Yang et al. *EMBO J.*, 13(2): 286-296; Mahoney et al., *J. Biol. Chem.* 276(25): 22764-22771, 2001; 그리고 Blundell et al. *J. Biol. Chem.* 278(49): 49261-49270, 2003 참고). 예시적인, 비-제한적 링크 모듈은 TSG6, CD44, LYVE-1, HAPLN1, HAPLN2, HAPLN3, HAPLN4, 아그레칸, 브레비칸, 뉴로칸, 포스파칸, 베르시칸, CAB61358, KIA0527, 스타빌린-1, 및 스타빌린-2 링크 모듈, 또는 이의 변이체들을 포함한다. 한 예로써, HA 결합 단백질 TSG6의 링크 모듈은 인간 TSG6의 아미노산 잔기 36-128(UniProt 기탁 번호 P98066)을 함유할 수 있다. 변이체 링크 모듈은 HA에 결합하고, 그리고 야생형 또는 기준 링크 모듈에 대하여 예를 들면, 최소한 80% 아미노산 서열 동일성 (예컨데, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상의 서열 동일성)을 보유할 수 있고, 그리고 야생형 또는 기준 링크 모듈에 대하여 서열 변이 이를 테면, 삽입, 결손 및 치환 (예컨데, 보존 아미노산 치환)을 함유할 수 있다.
- [0197] 융합 단백질 내용에 있어서, "링커(linker)"는 제 1의 모이어티 (예컨데, 항체 (예컨데, 항-VEGF 항체 (예컨데, 본 명세서에서 기술하고 있는 임의의 항-VEGF 항체, 예컨데, G6.31 AARR)))를 제 2의 모이어티 (예컨데, 안구 결합 도메인 (예컨데, HA 결합 도메인))에 연계(예컨데, 공유적 연계)시키는 펩티드 또는 폴리펩티드일 수 있다. 링커는 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개, 또는 그 이상의 아미노산 잔기로 된 임의의 적합한 길이의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 링커는 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 또는 약 8개 잔기를 포함한다. 일부 경우에서, 링커는 상기 아미노산 서열 GGGGS (서열 번호: 61)을 포함한다.
- [0198] 본원에 사용된 "히드로겔(hydrogel)"은 공유 화학적 가교의 존재로 인해, 불용성인 동중폴리머 또는 공중합체로 구성된 친수성 또는 양친매성 폴리머 네트워크를 의미한다. 가교 결합은 네트워크 구조 및 물리적 완전성을 제공할 수 있다. 히드로겔은 물과의 열역학적 호환성을 나타낼 수 있고, 이로 인하여 수성 매체에서 팽창된다.
- [0199] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "가역적 프로드럭 링커(reversible prodrug linke)"는 가역성 결합을 통해 생물학적 활성 잔기 (예를 들어, 항-VEGF 항체와 같은 약물)에 일단 부가 부착된 잔기를 의미하고, 영구적인 결합을 통해 다른 말단을 담체(예를 들어, 히드로겔)에 결합되고, 이로 인하여 생물학적 활성 성분을 담체에 연결시킨다. 이러한 가역성 프로드럭 링커는 예를 들어 1 시간 내지 12 개월의 반감기를 갖는 생리학적 조건 (예를 들어, pH 7.4, 37°C에서 수성 완충액) 하에서 비효소적 분해가능한, 즉, 절단 가능하다. 가역적 링커지(linkages)는 예를 들면, 아코니틸(aconyls), 아세탈, 아마이드, 카르복실 무수물, 에스테르, 이민, 히드라존, 말레 아마민산 아마이드, 오르토 에스테르, 포스파미드, 포스포에스테르, 포스포실릴 에스테르, 실릴 에스테르, 술폰산 에스테르, 방향족 카르바메이트 및 이들의 조합을 포함한다. 대조적으로, 영구적 링커지는 12 개월 이상의 반감기를 갖고, 생리학적 조건 (예를 들어, pH 7.4, 37°C에서 수성 완충액) 하에서 비효소적 가수분해가 가능하다. 예시적인 가역적 프로드럭 링커는 예를 들어, 국제 특허 출원 공보 WO 2014/056923에 기재되어 있으며, 이는 본원에 참고자료에 편입된다.
- [0200] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "제거(clearance)"란 단위 시간당 격실(예컨데, 눈 (예컨데, 상기 유리체))로부터 제거되는 물질 (예컨데, 항-VEGF 항체, 항체 콘주게이트, 융합 단백질 (예컨데, Fab 융합 단백질), 또는 중합체 제제)의 용적을 말한다.
- [0201] 용어 "반감기(half-life)"란 생체 (예컨데, 눈 (예컨데, 상기 유리체)에서) 또는 시험관에서, 물질(예컨데, 항-VEGF 항체, 항체 콘주게이트, 융합 단백질 (예컨데, Fab 융합 단백질), 또는 중합체 제제)의 농도가 절반으로 감소되는데 요구되는 시간을 지칭한다.
- [0202] **II. 조성물 및 방법**
- [0203] 본 발명은 VEGF에 결합하는 신규 항체, 및 이를 제조 및 사용하는 방법, 예를 들어 진단 및 치료 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및 중합체 제제를 포함하는 항-VEGF 항체가 함유된 조성물(본원에서 기술된 임의의 항-VEGF 항체를 포함), 뿐만 아니라 예를 들면, 진단 및 치료 용도로 이를 만들고, 사용하는 방법을 제공한다. 본 발명은 개선된 성질, 예를 들면, 강화된 결합 친화력, 안정성, 및/또는 발현을 갖는 항체 변이체들을 동정하는 방법을 또한 제공한다.
- [0204] **A. 예시적인 항-VEGF 항체**
- [0205] 한 측면에서, 본 발명은 부분적으로 VEGF에 특이적으로 결합하는 항체에 근거한다. 본 발명의 항체는 예를 들면, 혈관신생을 감소시키고, 병리학적 혈관신생과 연관된 장애 (예컨데, 안구 장애 또는 세포 증식성 장애)를 치료 또는 진행을 지연시키는데 유용하다. 본 발명의 항체는 예를 들면, 맥관 투과성을 억제하고, 바람직하지

많은 맥관 투과성과 관련된 장애를 치료하는데 또한 유용하다.

[0206] 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음에서 선택된 최소한 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 HVRs, 또는 상기 하나 또는 그 이상의 HVRs과 서열 번호:1-6 중 임의의 하나에 대하여 최소한 약 80% 서열 동일성 (예컨데, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성) 을 갖는 하나 또는 그 이상의 변이체의 조합을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 $GX_1TPX_2GGX_3X_4X_5YX_6DSVX_7X_8$ (서열 번호: 2)를 포함하는 HVR-H2, 이때 X_1 은 Ile 또는 His이며, X_2 는 Ala 또는 Arg이며, X_3 은 Tyr 또는 Lys이며, X_4 는 Thr 또는 Glu이며, X_5 는 Arg, Tyr, Gln, 또는 Glu이며, X_6 은 Ala 또는 Glu이며, X_7 은 Lys 또는 Glu이며, 그리고 X_8 은 Gly 또는 Glu이며; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQX₁VSTAVA (서열 번호: 4)를 포함하는 HVR-L1, 이때 X_1 은 Asp 또는 Arg이고; (e) 아미노산 서열 $X_1ASFLYS$ (서열 번호: 5)를 포함하는 HVR-L2, 이때 X_1 은 Ser 또는 Met이며; 그리고 (f) 아미노산 서열 X_1QGYGX_2PFT (서열 번호: 6)를 포함하는 HVR-L3, 이때 X_1 은 Gln, Asn, 또는 Thr이며, 그리고 X_2 는 Ala, Asn, Gln, 또는 Arg이다.

[0207] 예로써, 상기 항-VEGF 항체는 다음에서 선택된 최소한 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 HVRs, 또는 하나 또는 그 이상의 상기 HVRs와 서열 번호: 1, 3, 7-10, 또는 21-23중 임의의 하나에 대하여 최소한 약 80% 서열 동일성 (예컨 데, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성)을 갖는 하나 또는 그 이상의 변이체들의 조합을 포함할 수 있다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)을 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYTRYADSVKG (서열 번호: 7), GITPAGGYEYYADSVKG (서열 번호: 21), 또는 GITPAGGYEYYADSVKG (서열 번호: 22)을 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)을 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)을 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)을 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10) 또는 QQGYGNPFT (서열 번호: 23)을 포함하는 HVR-L3.

[0208] 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음에서 선택된 최소한 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 HVRs, 또는 하나 또는 그 이상의 상기 HVRs와 서열 번호: 1, 3, 또는 7-10중 임의의 하나에 대하여 최소한 약 80% 서열 동 일성 (예컨데, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성)을 갖는 하나 또는 그 이상의 변이체들의 조합을 포함할 수 있다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)을 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYTRYADSVKG (서열 번호: 7)을 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)을 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)을 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)을 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10)을 포함하는 HVR-L3. 특정 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 항 -VEGF 항체는 다음의 6개 HVRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYTRYADSVKG (서열 번호: 7)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노 산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10) 를 포함하는 HVR-L3.

[0209] 일부 경우에서, 임의의 전술한 항-VEGF 항체는 1, 2, 3 또는 4개의 다음 중쇄 가변 도메인 틀구조 영역 (FRs)을 포함할 수 있다: (a) 아미노산 서열 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (서열 번호: 13)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQAPGKGLEWVA (서열 번호: 14)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 15)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGITLVTVSS (서열 번호: 16)를 포함하는 FR-H4.

[0210] 일부 경우에서, 임의의 전술한 항-VEGF 항체는 1, 2, 3 또는 4개의 다음 경쇄 가변 도메인 FRs을 포함할 수 있 다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC (서열 번호: 17)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFRSGSGTDFLTITSSLPEDAATYYC (서열 번호: 19)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR- L4.

[0211] 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음의 6개 HVRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYTRYADSVKG (서열 번호: 7)를 포함하는 HVR-H2; (c)

아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGNPFT (서열 번호: 10)를 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 중쇄 가변 도메인 FRs를 포함한다: (a) 아미노산 서열 EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTIS (서열 번호: 13)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQAPGKLEWVA (서열 번호: 14)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 15)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGLVTVSS (서열 번호: 16)를 포함하는 FR-H4. 추가 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 경쇄 가변 도메인 FRs를 포함한다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열 번호: 17)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDAATYYC (서열 번호: 19)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 (a) 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 그리고 (b) 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0212] 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음에서 선택된 최소한 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 HVRs, 또는 하나 또는 그 이상의 상기 HVRs와 서열 번호: 1, 3, 8, 9, 22, 또는 23중 임의의 하나에 대하여 최소한 약 80% 서열 동일성 (예컨대, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성)을 갖는 하나 또는 그 이상의 변이체들의 조합을 포함할 수 있다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)을 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYEYADSVEG (서열 번호: 22)을 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)을 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGNPFT (서열 번호: 23)을 포함하는 HVR-L3. 특정 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음의 6개 HVRs를 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYEYADSVEG (서열 번호: 22)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGNPFT (서열 번호: 23)를 포함하는 HVR-L3.

[0213] 일부 경우에서, 임의의 전술한 항-VEGF 항체는 1, 2, 3 또는 4개의 다음 중쇄 가변 도메인 틀구조 영역 (FRs)을 포함할 수 있다: (a) 아미노산 서열 EEQLVEEGGLVQPGESLELSCAASGFEIS (서열 번호: 29) 또는 EEQLVEEGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열 번호: 51)을 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQEPGEGLEWVA (서열 번호: 30)을 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 31)을 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGLVTVSS (서열 번호: 32)을 포함하는 FR-H4.

[0214] 일부 경우에서, 임의의 전술한 항-VEGF 항체는 1, 2, 3 또는 4개의 다음 경쇄 가변 도메인 FRs를 포함할 수 있다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열 번호: 17)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC (서열 번호: 24)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4.

[0215] 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음의 6개 HVRs를 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYEYADSVEG (서열 번호: 22)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGNPFT (서열 번호: 23)를 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 중쇄 가변 도메인 FRs를 포함한다: (a) 아미노산 서열 EEQLVEEGGLVQPGESLELSCAASGFEIS (서열 번호: 29)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQEPGEGLEWVA (서열 번호: 30)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 31)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGLVTVSS (서열 번호: 32)를 포함하는 FR-H4. 추가 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 경쇄 가변 도메인 FRs를 포함한다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열 번호: 17)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC (서열 번호: 24)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 (a) 서열 번호: 33의 아

미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 그리고 (b) 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0216] 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음의 6개 HVRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYEYADSVGE (서열 번호: 22)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGNPFT (서열 번호: 23)를 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 중쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 EEQLVEEGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열 번호: 51)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQEPGEGLEWVA (서열 번호: 30)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 31)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGELVTVSS (서열 번호: 32)를 포함하는 FR-H4. 추가 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 경쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열 번호: 17)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC (서열 번호: 24)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 (a) 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 그리고 (b) 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0217] 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음에서 선택된 최소한 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 HVRs, 또는 하나 또는 그 이상의 상기 HVRs와 서열 번호: 1, 3, 8-10, 또는 22중 임의의 하나에 대하여 최소한 약 80% 서열 동일성 (예컨대, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성)을 갖는 하나 또는 그 이상의 변이체들의 조합을 포함할 수 있다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYEYADSVGE (서열 번호: 22)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10)를 포함하는 HVR-L3. 특정 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음의 6개 HVRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYEYADSVGE (서열 번호: 22)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10)를 포함하는 HVR-L3.

[0218] 일부 경우에서, 임의의 전술한 항-VEGF 항체는 1, 2, 3 또는 4개의 다음 중쇄 가변 도메인 틀구조 영역 (FRs)을 포함할 수 있다: (a) 아미노산 서열 EEQLVEEGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열 번호: 29) 또는 EEQLVEEGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열 번호: 51)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQEPGEGLEWVA (서열 번호: 30)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 31)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGELVTVSS (서열 번호: 32)를 포함하는 FR-H4.

[0219] 일부 경우에서, 임의의 전술한 항-VEGF 항체는 1, 2, 3 또는 4개의 다음 경쇄 가변 도메인 FRs을 포함할 수 있다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열 번호: 17), DIQMTQSPESLSASVGDVETITC (서열 번호: 25), 또는 DIQMTQSPSSLSASVGDVETITC (서열 번호: 26)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18) 또는 WYQQKPGEAPKLLIY (서열 번호: 27)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDAATYYC (서열 번호: 19) 또는 GVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDAATYYC (서열 번호: 28)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4.

[0220] 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음의 6개 HVRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYEYADSVGE (서열 번호: 22)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10)를 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 중쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 EEQLVEEGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열 번호: 29)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQEPGEGLEWVA (서열 번호: 30)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 31)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열

WGQGELVTVSS (서열 번호: 32)를 포함하는 FR-H4. 추가 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 경쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPESLSASVGDEVTITC (서열 번호: 25)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (서열 번호: 19)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 (a) 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 그리고 (b) 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0221] 예를 들면, 다른 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음의 6개 HVRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYEYADSVGE (서열 번호: 22)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10)를 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 중쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 EEQLVEEGGLVQPGESLELSAASGFEIS (서열 번호: 29)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQEPGLEWVA (서열 번호: 30)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 31)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGELVTVSS (서열 번호: 32)를 포함하는 FR-H4. 추가 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 경쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (서열 번호: 26)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 27)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFSGSGSGTDFTLTIESLQPEDAATYYC (서열 번호: 28)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 (a) 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 그리고 (b) 서열 번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0222] 예를 들면, 다른 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음의 6개 HVRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYEYADSVGE (서열 번호: 22)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10)를 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 중쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 EEQLVEEGGLVQPGESLRLSASGFEIS (서열 번호: 51)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQEPGLEWVA (서열 번호: 30)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 31)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGELVTVSS (서열 번호: 32)를 포함하는 FR-H4. 추가 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 경쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (서열 번호: 26)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 27)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFSGSGSGTDFTLTIESLQPEDAATYYC (서열 번호: 28)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 (a) 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 그리고 (b) 서열 번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0223] 예를 들면, 여전히 다른 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음의 6개 HVRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYEYADSVGE (서열 번호: 22)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10)를 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 중쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 EEQLVEEGGLVQPGESLELSAASGFEIS (서열 번호: 29)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQEPGLEWVA (서열 번호: 30)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 31)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGELVTVSS (서열 번호: 32)를 포함하는 FR-H4. 추가 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 경쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPESLSASVGDEVTITC (서열 번호: 25)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 27)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (서열 번호: 19)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 (a) 서열 번호: 33의 아

미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 그리고 (b) 서열 번호: 36의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0224] 예를 들면, 여전히 추가 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음의 6개 HVRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYEYYADSVEG (서열 번호: 22)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10)를 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 중쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGF EIS (서열 번호: 29)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQEPGEGLEWVA (서열 번호: 30)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 31)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGELVTVSS (서열 번호: 32)를 포함하는 FR-H4. 추가 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 경쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDVITIC (서열 번호: 26)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDAATYYC (서열 번호: 19)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 (a) 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 그리고 (b) 서열 번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0225] 다른 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음의 6개 HVRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYEYYADSVEG (서열 번호: 22)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10)를 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 중쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 EEQLVEEGGGLVQPGESLRLS AASGF EIS (서열 번호: 51)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQEPGEGLEWVA (서열 번호: 30)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 31)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGELVTVSS (서열 번호: 32)를 포함하는 FR-H4. 추가 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 경쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDVITIC (서열 번호: 26)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDAATYYC (서열 번호: 19)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 (a) 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 그리고 (b) 서열 번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0226] 예를 들면, 다른 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음의 6개 HVRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYEYYADSVEG (서열 번호: 22)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10)를 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 중쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGF EIS (서열 번호: 29)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQEPGEGLEWVA (서열 번호: 30)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 31)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGELVTVSS (서열 번호: 32)를 포함하는 FR-H4. 추가 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 경쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDVITIC (서열 번호: 17)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDAATYYC (서열 번호: 19)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 (a) 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 그리고 (b) 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0227] 다른 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음의 6개 HVRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYEYYADSVEG (서열 번호: 22)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산

서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10)를 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 중쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 EEQLVEEGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열 번호: 51)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQEPGEGLEWVA (서열 번호: 30)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 31)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGLVTVSS (서열 번호: 32)를 포함하는 FR-H4. 추가 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음 4개의 경쇄 가변 도메인 FRs을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITC (서열 번호: 17)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDAATYYC (서열 번호: 19)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 (a) 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 그리고 (b) 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0228] 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 (a) 서열 번호: 11, 40, 또는 42의 서열 또는 이들 서열중 임의의 하나에 대하여 최소한 90% 서열 동일성 (예컨대, 최소한 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인 ; (b) 서열 번호: 12, 41, 또는 46의 서열, 또는 이들 서열중 임의의 하나에 대하여 최소한 90% 서열 (예컨대, 최소한 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인 ; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 도메인 그리고 (b)에서와 같은 VL 도메인을 포함한다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 40의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 서열 번호: 46의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0229] 일부 경우에서, 임의의 전술한 항-VEGF 항체는 1, 2, 3 또는 4개의 다음 중쇄 가변 도메인 틀구조 영역 (FRs)을 포함할 수 있다: (a) 아미노산 서열 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (서열 번호: 13)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQAPGKGLEWVA (서열 번호: 14) 또는 WVRQEPGKGLEWVA (서열 번호: 39)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 15)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGLVTVSS (서열 번호: 16)를 포함하는 FR-H4.

[0230] 일부 경우에서, 임의의 전술한 항-VEGF 항체는 1, 2, 3 또는 4개의 다음 경쇄 가변 도메인 FRs을 포함할 수 있다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITC (서열 번호: 17), 또는 DIQMTQSPSSLSASVGDVRTIDC (SEQ ID NO: 45)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18) 를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDAATYYC (서열 번호: 19), GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDSATYYC (서열 번호: 44) 또는 GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYC (서열 번호: 54)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20) 또는 FGQGTKVEVK (서열 번호: 55)를 포함하는 FR-L4.

[0231] 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 다음 아미노산 서열: DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDVSTAVAWYQKPGKAPKLLIYSASFLYSYGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (서열 번호: 59)을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0232] 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 다음 아미노산 서열: DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDVSTAVAWYQKPGKAPKLLIYSASFLYSYGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (서열 번호: 59)을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0233] 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 40의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 다음 아미노산 서열: DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDVSTAVAWYQKPGKAPKLLIYSASFLYSYGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (서열 번호: 59)을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0234] 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 다음 아미노산 서열: DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDVSTAVAWYQKPGKAPKLLIYSASFLYSYGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (서열 번호: 59)을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

KVEIK (서열 번호: 59)을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

- [0235] 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 다음 아미노산 서열: DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQQYGNPFTFGQGT KVEIK (서열 번호: 59)을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0236] 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 다음 아미노산 서열: DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQQYGNPFTFGQGT KVEIK (서열 번호: 60)을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0237] 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 다음 아미노산 서열: DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQQYGNPFTFGQGT KVEIK (서열 번호: 60)을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0238] 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 40의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 다음 아미노산 서열: DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQQYGNPFTFGQGT KVEIK (서열 번호: 60)을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0239] 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 다음 아미노산 서열: DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQQYGNPFTFGQGT KVEIK (서열 번호: 60)을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0240] 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 다음 아미노산 서열: DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQQYGNPFTFGQGT KVEIK (서열 번호: 60)을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 (a) 서열 번호: 11의 서열 또는 이 서열에 대하여 최소한 90% 서열 동일성 (예컨데, 최소한 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 ; (b) 서열 번호: 11의 서열, 또는 이 서열에 대하여 최소한 90% 서열 (예컨데, 최소한 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인 ; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 도메인 그리고 (b)에서와 같은 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 (a) 아미노산 서열 DYWIH (서열 번호: 1)를 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 GITPAGGYTRYADSVKG (서열 번호: 7)를 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 FVFFLPYAMDY (서열 번호: 3)를 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)를 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 SASFLYS (서열 번호: 9)를 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산 서열 QQGYGAPFT (서열 번호: 10)를 포함하는 HVR-L3을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음의 중쇄 틀구조 영역을 포함한다: (a) 아미노산 서열 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (서열 번호: 13)를 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQAPGKGLEWVA (서열 번호: 14)를 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 15)를 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGITLVTVSS (서열 번호: 16)를 포함하는 FR-H4. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 다음의 경쇄 틀구조 영역을 포함한다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC (서열 번호: 17)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (서열 번호: 19)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 (a) 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 그리고 (b) 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 결합 도메인을 함유한다. 일부 경우에서, 예시적인 항-VEGF는 N94A.F83A.N82aR.Y58R이다.
- [0241] 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 (a) 서열 번호: 33 또는 51의 서열 또는 이 서열에 대하여 최소한 90% 서열 동일성 (예컨데, 최소한 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 ; (b) 서열 번호: 12, 34, 35, 36, 37, 또는 38의 서열, 또는 이 서열중 임의의 하나에 대하여 최소한 90% 서열 (예컨데, 최소한 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인 ; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 도메인 그리고 (b)에서와 같은 VL 도메인을 포함한다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 서열 번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 33의 아미노산 서열

을 포함하는 VH 도메인과 서열 번호: 36의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 서열 번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 상기 항체는 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 서열 번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 상기 항체는 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 서열 번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인과 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0242] 일부 경우에서, 임의의 전술한 항-VEGF 항체는 1, 2, 3 또는 4개의 다음 중쇄 가변 도메인 틀구조 영역 (FRs)을 포함할 수 있다: (a) 아미노산 서열 EEQLVEEGGLVQPGESLELSAASGFEIS (서열 번호: 29) 또는 EEQLVEEGGLVQPGESLRLSCLASGFEIS (서열 번호: 52)을 포함하는 FR-H1; (b) 아미노산 서열 WVRQEPGEGLEWVA (서열 번호: 30) 또는 WVRQEPGKLEWVA (서열 번호: 39)을 포함하는 FR-H2; (c) 아미노산 서열 RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 31)을 포함하는 FR-H3; 그리고 (d) 아미노산 서열 WGQGLVTVSS (서열 번호: 32)을 포함하는 FR-H4.

[0243] 일부 경우에서, 임의의 전술한 항-VEGF 항체는 1, 2, 3 또는 4개의 다음 경쇄 가변 도메인 FRs을 포함할 수 있다: (a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열 번호: 17), DIQMTQSPESLSASVGDVTITC (서열 번호: 25), 또는 DIQMTQSPSSLSASVGDVTITC (서열 번호: 26)를 포함하는 FR-L1; (b) 아미노산 서열 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 18) 또는 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 27)를 포함하는 FR-L2; (c) 아미노산 서열 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (서열 번호: 19), GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (서열 번호: 24), 또는 GVPSRFSGSGSGTDFTLTIESLQPEDAATYYC (서열 번호: 28)를 포함하는 FR-L3; 그리고 (d) 아미노산 서열 FGQGTKVEIK (서열 번호: 20)를 포함하는 FR-L4.

[0244] 일부 경우에서, 본 발명은 (a) 서열 번호: 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 (b) 서열 번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 제공한다. 특정 구체예들에서, 상기 항체는 Fab 포맷에서 발견되는 G6.31 AARR이다.

[0245] 일부 경우에서, 본 발명은 (a) 서열 번호: 49의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 (b) 서열 번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 제공한다. 특정 구체예들에서, 상기 항체는 항-인간 IgG에 대한 반응성이 결여된 G6.31 AARR의 변이 형태다.

[0246] 추가 측면에서, 상기 구체예들중 임의의 것에 따른 항-VEGF 항체는 하기 단락 1-8에서 기술된 것과 같이 임의의 특징을 단독으로, 또는 조합하여 통합할 수 있다:

[0247] 1. 항체 친화력

[0248] 특정 구체예들에서, 본원에서 제공되는 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$, 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예컨데, 10^{-8} M 또는 그 미만, 예컨데, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예컨데, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (Kd)를 갖는다. 예를 들면, 일부 경우에서, 본원에서 제공되는 항체는 약 10 nM 또는 이보다 낮은 Kd로 인간 VEGF (hVEGF)에 결합한다. 일부 경우에서, 본원에서 제공되는 항체는 약 5 nM 또는 이보다 낮은 Kd로 hVEGF에 결합한다. 일부 경우에서, 본원에서 제공되는 항체는 약 2 nM 또는 이보다 낮은 Kd로 hVEGF에 결합한다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 항체는 약 25 pM 내지 약 2 nM (예컨데, 약 25 pM, 약 50 pM, 약 75 pM, 약 100 pM, 약 125 pM, 약 150 pM, 약 175 pM, 약 200 pM, 약 225 pM, 약 250 pM, 약 275 pM, 약 300 pM, 약 325 pM, 약 350 pM, 약 375 pM, 약 400 pM, 약 425 pM, 약 450 pM, 약 475 pM, 약 500 pM, 약 525 pM, 약 550 pM, 약 575 pM, 약 600 pM, 약 625 pM, 약 650 pM, 약 675 pM, 약 700 pM, 약 725 pM, 약 750 pM, 약 775 pM, 약 800 pM, 약 825 pM, 약 850 pM, 약 875 pM, 약 900 pM, 약 925 pM, 약 950 pM, 약 975 pM, 약 1 nM, 약 1.1 nM, 약 1.2 nM, 약 1.3 nM, 약 1.4 nM, 약 1.5 nM, 약 1.6 nM, 약 1.7 nM, 약 1.8 nM, 약 1.9 nM, 또는 약 2 nM) 범위의 Kd로 hVEGF에 결합한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 약 75 pM 내지 약 600 pM (예컨데, 약 75 pM, 약 100 pM, 약 125 pM, 약 150 pM, 약 175 pM, 약 200 pM, 약 225 pM, 약 250 pM, 약 275 pM, 약 300 pM, 약 325 pM, 약 350 pM, 약 375 pM, 약 400 pM, 약 425 pM, 약 450 pM, 약 475 pM, 약 500 pM, 약 525 pM, 약 550 pM, 약 575 pM, 약 600 pM) 사이의 Kd로 hVEGF에 결합한다. 일부 경우에서, 상기 항체

는 약 75 pM 내지 약 500 pM의 Kd로 hVEGF에 결합한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 약 75 pM 내지 약 400 pM의 Kd로 hVEGF에 결합한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 약 75 pM 내지 약 300 pM의 Kd로 hVEGF에 결합한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 약 75 pM 내지 약 200 pM의 Kd로 hVEGF에 결합한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 약 75 pM 내지 약 150 pM의 Kd로 hVEGF에 결합한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 약 75 pM 내지 약 125 pM의 Kd로 hVEGF에 결합한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 약 75 pM 내지 약 100 pM의 Kd로 hVEGF에 결합한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 약 80 pM의 Kd로 hVEGF에 결합한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 약 60 pM의 Kd로 hVEGF에 결합한다. 일부 경우에서, 상기 항체는 약 40 pM의 Kd로 hVEGF에 결합한다.

[0249] 한 구체예에서, Kd는 방사능라벨된 항원 결합 분석(RIA)에 의해 측정된다. 한 구체예에서, RIA는 관심있는 항체의 Fab 버전 및 이의 항원으로 수행된다. 예를 들면, 항원에 대한 Fabs의 용액 결합 친화력은 라벨안된 항원의 일련의 역가 존재하에 최소 농도의 (¹²⁵I)-라벨된 항원으로 Fab를 평형화시키고, 그 다음 항-Fab 항체-피복된 플레이트로 결합된 항원을 포집시킴으로써 측정된다 (예로써, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999) 참고). 분석을 위한 조건을 확립하기 위하여, MICROTITER[®] 다중-웰 플레이트(Thermo Scientific)는 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 안에 5 µg/ml의 포획 항-Fab 항체 (Cappel Labs)로 하룻밤 동안 피복되며, 그리고 후속적으로 2% (w/v) 소 혈청 알부민(BSA)/인산염 완충된 염수(PBS)로 2-5 시간 동안 실온 (대략적으로 23°C)에서 차단된다. 비-흡착성 플레이트 (Nunc #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [¹²⁵I]-항원은 관심대상의 Fab의 일련의 희석물과 혼합된다 (예로써, 상기 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일관된다, Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). 관심대상의 Fab는 그 다음 하룻밤 동안 항온처리되고; 그러나, 평형에 확실하게 이를 수 있도록 더 오랜 기간(예로써, 약 65 시간) 동안 항온처리가 지속될 수 있다. 그 이후, 상기 혼합물은 실온에서 항온처리(예로써, 1 시간 동안)를 위하여 포획 플레이트로 이전된다. 상기 용액은 그 다음 제거되며, 상기 플레이트는 0.1% 폴리소르베이트 20 (TWEEN-20[®])/PBS에서 8회 세척되었다. 상기 플레이트를 건조할 때, 150 µl/웰의 섬광물질 (MICROSCINT-20[™]; Packard)이 추가되며, 상기 플레이트는 10분 동안 TOPCOUNT[™] 감마 카운터 (Packard)상에서 카운트된다. 경쟁적 결합 분석에 사용하기 위하여 최대 결합의 20% 미만 또는 이에 대등한 각 Fab 농도가 선택된다.

[0250] 또다른 구체예에 따르면, Kd는 BIACORE[®] 표면 플라즈몬 공명 분석을 이용하여 측정된다. 예를 들면, 25°C에서 ~10 반응 유닛 (RU)에서 고정된 항원 CM5 칩과 함께, BIACORE[®]-2000 또는 BIACORE[®]-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)분석이 실행된다. 한 구체예에서, 카르복시메틸화된 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, BIAcore, Inc.)은 공급업자에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 염화수소산염 (EDC) 및 N-히드록시수시니미드 (NHS)로 활성화된다. 항원은 10 mM 나트륨 아세테이트, pH 4.8을 이용하여 5 µg/ml (~0.2 µM)으로 희석시킨 후, 5 µl/분의 유속으로 주사하여 결합된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)를 얻는다. 항원 주입 후, 1 M 에탄올아민을 주입하여 미-반응 그룹을 차단한다. 운동성 측정을 위하여, 2-배 연속 희석된 Fab (0.78 nM 내지 500 nM)는 25°C, 대략적으로 25 µl/분의 유속에서 0.05% 폴리소르베이트 20 (TWEEN-20[™]) 계면활성제 (PBST)와 함께 PBS에서 주사된다. 연합(association)과 해리(dissociation) 센서그램을 동시에 피팅함으로써, 단순 일대일 Langmuir 결합 모델 (BIACORE[®] Evaluation Software 버전 3.2)을 이용하여 연합 속도 (k_{on})와 해리 속도 (k_{off})가 산출된다. 평형 해리 상수 (Kd)는 비율 k_{on}/k_{off}로 산출된다. 예를 들면, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999) 참고. 상기 표면 플라즈몬 공명 분석에 의한 연합 속도(on-rate)가 10⁶M⁻¹s⁻¹를 초과한다면, 그 다음 분광계, 이를 테면 정지-유동(stop-flow) 장착된 분광광도계 (Aviv Instruments) 또는 교반 큐벳(stirred cuvette)이 있는 8000-일련의 SLM-AMINCO[™] 분광광도계 (ThermoSpectronic)에서 측정되었을 때, 항원 농도를 증가시킨 상태하에서, PBS, pH 7.2안에 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C 형광 방출 강도 (여기(excitation)= 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 밴드-대역)을 측정하는 형광 퀀칭 기술을 이용하여 연합이 결정될 수 있다.

[0251] 2. 항체 안정성

[0252] 본 발명은 항-VEGF 항체, 예로써, G6.31 (예컨데, U.S. 특허 7,758,859 및 국제 출원 공개 번호 WO 2005/012359, 이의 전문이 본 명세서에 편입됨)와 비교하였을 때, 강화된 안정성을 갖는 항체를 제공한다. 항체의 안정성은 당분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들면, 시차주사 형광측정계 (DSF), 원 편광 이색 (CD), 고유 단백질 형광, 시차 주사 열량, 분광기, 광 산란 (예를 들어, 동적 광산란 (DLS) 및 정적 광산란 (SLS), 자가-상호 작용 크로마토그래피 (SIC)를 이용하여 측정될 수 있다. 상기 항-VEGF 항체는 항-VEGF 항체, 예를 들면,

G6.31와 비교하였을 때, 예를 들면, 강화된 용융 온도 (T_m), 응집 온도 (T_{agg}), 또는 기타 안정성 매트릭스를 가질 수 있다.

[0253] 특정 구체예들에서, 본원에서 제공되는 항체는 약 80°C (예컨데, 약 81°C, 약 82°C, 약 83°C, 약 84°C, 약 85°C, 약 86°C, 약 87°C, 약 88°C, 약 89°C, 약 90°C, 약 91°C, 약 92°C, 또는 약 93°C)에 대등한 또는 이보다 큰 T_m 을 갖는다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 약 83.5°C (예컨데, 약 83.5°C, 약 84°C, 약 85°C, 약 86°C, 약 87°C, 약 88°C, 약 89°C, 약 90°C, 약 91°C, 약 92°C, 또는 약 93°C)에 대등한 또는 이보다 큰 T_m 을 갖는다. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 약 82°C 내지 약 92°C (예컨데, 약 82°C, 약 83°C, 약 84°C, 약 85°C, 약 86°C, 약 87°C, 약 88°C, 약 89°C, 약 90°C, 약 91°C, 또는 약 92°C)의 T_m 을 갖는다. 일부 경우에 있어서, 상기 항-VEGF 항체는 약 82°의 T_m 을 갖는다. 일부 경우에서, 항-VEGF 항체의 임의의 전술한 T_m 은 DSF를 이용하여 측정된다. 일부 구체예들에서, 항-VEGF 항체의 T_m 값은 본원 명세서에서 기술된, 예를 들면, 실시예 1에서와 같이 측정된다.

[0254] 3. 항체 단편

[0255] 특정 구체예들에서, 본원에서 제공되는 항체는 항체 단편이다. 항체 단편들은 Fab, Fab', Fab-C, Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, 및 scFv 단편들, 그리고 하기에서 설명된 다른 단편들을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 특정 항체 단편들에 대한 검토는 Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)을 참고한다. scFv 단편들의 검토는 예로써, **Pluckthün**, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); WO 93/16185; 그리고 U.S. 특허번호 5,571,894 및 5,587,458을 또한 참고한다. 구난(salvage) 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고, 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 F(ab')₂ 단편들의 논의는 U.S. 특허 번호 5,869,046을 참고한다.

[0256] 다이바디(Diabodies)는 이가 또는 이중특이적일 수 있는 2개의 항원-결합 부위를 가진 항체 단편들이다. 예를 들면, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); 그리고 Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)을 참고한다. 트리아바디(Triabodies) 및 테트라바디(tetrabodies) 또한 Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)에서 설명된다.

[0257] 단일-도메인 항체는 이 항체의 중쇄 가변적 도메인의 전부 또는 일부분 또는 경쇄 가변적 도메인의 전부 또는 일부분이 포함된 항체 단편들이다. 특정 구체예들에 있어서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체다 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 예로써, U.S. 특허번호. 6,248,516 B1).

[0258] 항체 단편은 다양한 기술에 의해 제조될 수 있으며, 손상되지 않은 항체의 단백질분해 절단뿐만 아니라, 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 재조합 숙주 세포(가령, 대장균(*E. coli*) 또는 파아지)에 의한 생산된 항체를 포함하나, 이에 국한되지 않는다.

[0259] 4. 키메라 및 인간화된 항체들

[0260] 특정 구체예들에서, 본원에서 제공되는 항체는 키메라 항체다. 특정 키메라 항체는 예로써, U.S. 특허번호 4,816,567; 그리고 Morrison et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)에서 설명된다. 한 실시예에서, 키메라 항체는 비-인간 가변적 도메인 (예로써, 마우스, 랫(rat), 햄스터, 토끼, 또는 비-인간 영장류, 이를 테면 원숭이로부터 유도된 가변적 영역)과 인간 불변 도메인을 포함한다. 추가 실시예에서, 키메라 항체는 "클래스 전환된(class switched)" 항체로써, 부모 항체의 것과는 다른 클래스 또는 하위클래스로 변화된 것이다. 키메라 항체는 이의 항원-결합 단편들을 함유한다.

[0261] 특정 구체예들에 있어서, 키메라 항체는 인간화된 항체다. 전형적으로, 비-인간 항체는 인간에 대한 면역원성이 감소되도록 인간화되지만, 부모계 비-인간 항체의 특이성 및 친화력은 유지된다. 일반적으로, 인간화된 항체는 하나 또는 그 이상의 가변적 도메인을 포함하는데, HVRs, 예로써, CDRs, (또는 이의 부분들)는 비-인간 항체로부터 유도되고, FRs (또는 이의 부분들)은 인간 항체 서열로부터 유도된다. 인간화된 항체는 임의선택적으로 인간 불변 영역의 최소한 일부분을 또한 포함할 것이다. 일부 구체예들에 있어서, 인간화된 항체에서 일부 FR 잔기는 비-인간 항체 (예로써, HVR 잔기가 유도된 항체)의 대응 잔기로 대체되어, 예로써, 항체 특이성 또는 친화력이 복원 또는 개선된다.

[0262] 인간화된 항체 및 이를 만드는 방법들은 예로써, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)

에서 볼 수 있고, 그리고 예로써, Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); US 특허번호 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321, 및 7,087,409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (특이적 결정 영역(SDR) 접목을 설명); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) ("재표면화(resurfacing)"을 설명); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) ("FR 셔플링(shuffling)"을 설명); 그리고 Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) 및 Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (FR 셔플링에 대한 "유도된 선별" 방법 설명)에서 추가 설명된다.

[0263] 인간화에 이용될 수 있는 인간 틀구조 영역은 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: "베스트-피트(best-fit)" 방법을 이용하여 선별된 틀구조 영역 (예로써, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993) 참고); 경쇄 또는 중쇄 가변적 영역의 특정 하위 집단의 인간항체의 콘센수스 서열로부터 유도된 틀구조영역 (예로써, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); 그리고 Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993) 참고); 인간 성숙 (체세포적으로 돌연변이된) 틀구조 영역 또는 인간 생식계열 틀구조 영역 (예로써, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) 참고); 그리고 FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유도된 틀구조 영역(예로써, Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996) 참고).

[0264] 5. 인간 항체

[0265] 특정 구체예들에서, 본원에서 제공되는 항체는 인간 항체다. 인간 항체는 당분야에 공지된 다양한 기술에 의해 만들어질 수 있다. 인간 항체는 전반적으로 van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) 및 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)에서 설명된다.

[0266] 항원 시험감염(challenge)에 반응하여, 무손상 인간 항체 또는 인간 가변적 영역을 가진 무손상 항체를 만들기 위하여 변형된 유전자삽입 동물에 면역원을 주사함으로써, 인간 항체를 만들 수 있다. 이러한 동물 전형적으로 상기 인간 면역글로블린 좌(loci)의 전부 또는 부분을 함유하며, 이 좌는 내생적 면역글로블린 좌를 대체하거나, 또는 염색체외적으로 존재하거나 또는 이 동물의 염색체 안에 무작위로 통합된다. 이러한 유전자 삽입 마우스에서 상기 내생적 면역글로블린 좌는 일반적으로 비활성화된다. 유전자삽입 동물로부터 인간 항체를 획득하는 방법은 Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)을 참고한다. 또한, 예로써, U.S. 특허번호 6,075,181 및 6,150,584에서는 XENOMOUSE™ 기술을 설명하고; U.S. 특허번호. 5,770,429에서는 HuMab® 기술을 설명하고; U.S. 특허번호. 7,041,870에서는 K-M MOUSE® 기술을 설명하고, 그리고 U.S. 특허 출원 공개 번호. US 2007/0061900에서는 VELOCIMOUSE® 기술을 설명한다). 그러한 동물에 의해 생성된 손상되지 않은 항체로부터 인간 가변 영역은 예를 들어 상이한 인간 불변 영역과 결합시킴으로써 추가로 변형될 수 있다.

[0267] 인간 항체는 또한 하이브리도마-기반의 방법들에 의해 만들어질 수 있다. 인간 단일클론 항체를 만들기 위하여 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포계가 설명되었다. (예로써, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 그리고 Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991) 참고.) 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통하여 생성된 인간 항체가 Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)에서 설명된다. 추가 방법들은 예를 들면, U.S. 특허 번호. 7,189,826 (하이브리도마 세포주로부터 단일 클론 인간 IgM 항체의 생산을 설명) 및 Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (인간-인간 하이브리도마를 설명)에서 설명된 것들을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (Trioma technology)은 Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)에서 또한 설명된다.

[0268] 인간 항체는 또한 인간-유도된 파아지 디스플레이 라이브러리로부터 선별된 Fv 클론 가변적 도메인 서열을 단리 시킴으로써 생성될 수 있다. 이러한 가변적 도메인 서열은 그 다음 바람직한 인간 불변 도메인과 복합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선별하기 위한 기술은 하기에서 설명된다.

[0269] 6. 라이브러리-유도된 항체들

[0270] 본 발명의 항체들은 바람직한 활성 또는 활성들을 가진 항체에 대한 복합 라이브러리를 스크리닝함으로써 단리 될 수 있다. 예를 들면, 파아지 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 바람직한 결합 특징들을 보유하는 항체에 대하여 이러한 라이브러리를 스크리닝하는 다양한 방법들이 당분야에 공지되어 있다. 이러한 방법들은 예로써, Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)에서 설명되며, 그리고 예로써, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature*

352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); 그리고 Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004)에서 추가 설명된다.

[0271] 특정 파아지 디스플레이 방법들에서 VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 별도로 클론되고, 파아지 라이브러리에서 무작위로 복합되며, 이는 그 다음 Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)에서 설명된 바와 같이, 항원-결합 파아지에 대해 스크리닝될 수 있다. 파아지는 전형적으로 단일-쇄 Fv (scFv) 단편들 또는 Fab 단편들로서 디스플레이 항체 단편들을 나타낸다. 면역화된 원천으로부터 라이브러리는 하이브리도마의 구축 요구없이 면역원에 대한 고-친화력 항체를 제공한다. 대안으로, Griffiths et al., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993)에서 설명된 바와 같이 임의의 면역화없이, 광역의 비-자가 및 자가 항원들에 대한 단일 원천 항체를 제공하기 위하여 자연그대로의(naive) 레퍼토리가 클론될 수 있다(예로써, 인간으로부터). 최종적으로, Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)에서 설명된 바와 같이, 자연그대로(naive)의 라이브러리는 줄기 세포들로부터 재배열안된 V-유전자 세그먼트를 클로닝하고, 그리고 초 가변적 CDR3 영역이 인코딩되고, 그리고 시험관내 재배열이 이루어지도록 PCR 프라이머를 이용하여 합성적으로 만들 수 있다. 인간 항체 파아지 라이브러리를 설명하는 특허 공개는 예를 들면: US 특허 번호. 5,750,373, 그리고 US 특허 공개 번호. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, 및 2009/0002360을 포함한다.

[0272] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체들 또는 항체 단편들은 본 명세서의 인간 항체 또는 인간 항체 단편들로 간주된다.

[0273] 7. 다중특이적 항체

[0274] 특정 구체예들에서, 본원에서 제공되는 항체는 다중특이적 항체, 예를 들면, 이중특이적 항체다. 다중특이적 항체는 최소한 2가지 상이한 부위에 대한 결합 특이성을 가지는 단일클론 항체다. 특정 구체예들에서, 결합 특이성중 하나는 VEGF에 대한 것이며, 다른 하나의 특이성은 임의의 다른 항원 (예컨데, 제 2의 생물학적 분자, 예컨데, 인터루킨-1 베타 (IL-1 β), 인터루킨-6 (IL-6); 인터루킨-6 수용체 (IL-6R); 인터루킨-13 (IL-13); IL-13 수용체 (IL-13R); PDGF (예컨데, PDGF-BB); 앙지오포이에틴; 앙지오포이에틴 2 (Ang2); Tie2; S1P; 인테그린 $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 5, 및 α 5 β 1; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트로포이에틴; 보체 인자 D; TNF α ; HtrA1; VEGF 수용체 (예컨데, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, 막-결합된 VEGF-수용체 (mbVEGFR), 또는 가용성 VEGF 수용체 (sVEGFR)); ST-2 수용체; 그리고 노인성 황반 변성 (AMD) 위험에 유전적으로 연계된 단백질, 이를 테면, 보체 경로 구성요소 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a, 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; 인터루킨-8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; 그리고 TNFRSF10A에 대한 것이다. 따라서, 상기 이중특이적 항체는 VEGF 및 IL-1 β ; VEGF 및 IL-6; VEGF 및 IL-6R; VEGF 및 IL-13; VEGF 및 IL-13R; VEGF 및 PDGF (예컨데, PDGF-BB); VEGF 및 앙지오포이에틴; VEGF 및 Ang2; VEGF 및 Tie2; VEGF 및 S1P; VEGF 및 인테그린 $\alpha\beta$ 3; VEGF 및 인테그린 $\alpha\beta$ 5; VEGF 및 인테그린 α 5 β 1; VEGF 및 베타셀룰린; VEGF 및 아펠린/APJ; VEGF 및 에리트로포이에틴; VEGF 및 보체 인자 D; VEGF 및 TNF α ; VEGF 및 HtrA1; VEGF 및 VEGF 수용체 (예컨데, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR, 또는 sVEGFR); VEGF 및 ST-2 수용체; VEGF 및 C2; VEGF 및 인자 B; VEGF 및 인자 H; VEGF 및 CFHR3; VEGF 및 C3b; VEGF 및 C5; VEGF 및 C5a; VEGF 및 C3a; VEGF 및 ARMS2; VEGF 및 TIMP3; VEGF 및 HLA; VEGF 및 IL-8; VEGF 및 CX3CR1; VEGF 및 TLR3; VEGF 및 TLR4; VEGF 및 CETP; VEGF 및 LIPC; VEGF 및 COL10A1; 또는 VEGF 및 TNFRSF10A에 대한 결합 특이성을 보유할 수 있다. 특정 구체예들에서, 이중특이적 항체는 VEGF의 2가지 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 VEGF를 발현하는 세포에 세포 독성 제제를 국소화시키는데 사용될 수 있다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예컨데, Fab, Fab', 또는 Fab-C 단편)으로 준비될 수 있다.

[0275] 일부 경우에서, 상기 이중특이적 항체는 U.S. 특허 출원 번호 US 2014/0017244(이는 전문이 본원 참고자료에 편입됨)에서 기술된 이중특이적 항-VEGF/항-앙지오포이에틴 2 (Ang2) 항체다. 예를 들면, 상기 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체는 VEGF (이를 테면, 본원에서 기술된 임의의 항-VEGF 항체)에 결합하는 제 1 결합 도메인과 Ang2에 결합하는 다음의 제 2의 결합 도메인을 함유할 수 있다: (a) 아미노산 서열 GYYMH (서열 번호: 62)을 포함하는 HVR-H1; (b) 아미노산 서열 WINPNSGGTNYAQKFQG (서열 번호: 63)을 포함하는 HVR-H2; (c) 아미노산 서열 SPNPYYDSSGGYYYPGAFDI (서열 번호: 64)을 포함하는 HVR-H3; (d) 아미노산 서열 GGNNGSKSVH (서열 번호: 65)을 포함하는 HVR-L1; (e) 아미노산 서열 DDSDRPS (서열 번호: 66)을 포함하는 HVR-L2; 그리고 (f) 아미노산

서열 QVWDSSSDHWV (서열 번호: 67)을 포함하는 HVR-L3, 또는 상기 하나 또는 그 이상의 HVRs과 서열 번호: 62-67중 임의의 하나에 대하여 최소한 약 80% 서열 동일성 (예컨데, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성)을 갖는 하나 또는 그 이상의 변이체들의 조합을 포함한다.

[0276] 일부 경우에서, 상기 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체는 VEGF (이를 테면, 본원에서 기술된 임의의 항-VEGF 항체)에 결합하는 제 1 결합 도메인과 Ang2에 결합하고, 다음을 포함하는 제 2의 결합 도메인을 함유할 수 있다: (a) 서열 번호: 68의 서열 또는 이 서열에 대하여 최소한 80% 서열 동일성 (예컨데, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; (b) 서열 번호: 69의 서열 또는 이 서열에 대하여 최소한 80% 서열 동일성 (예컨데, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 도메인 그리고 (b)에서와 같은 VL 도메인. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체는 VEGF (이를 테면, 본원에서 기술된 임의의 항-VEGF 항체)에 결합하는 제 1 결합 도메인과 Ang2에 결합하는 제 2의 결합 도메인을 함유할 수 있고, 이때 상기 제 2의 결합 도메인은 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2010/069532(이는 전문이 본원 참고자료에 편입됨)에 기술된 임의의 항체 결합 도메인, 또는 이의 변이체이다.

[0277] 다른 경우에 있어서, 상기 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2016/073157에 기술된 임의의 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체다.

[0278] 일부 경우에서, 상기 이중특이적 항체는 이중특이적 항-VEGF/항-IL-6 항체이다. 일부 경우에서, 항-VEGF/항-IL-6 이중특이적 항체는 VEGF (이를 테면, 본원에서 기술된 임의의 항-VEGF 항체)에 결합하는 제 1 결합 도메인과 IL-6에 결합하는 제 2의 결합 도메인을 함유할 수 있다. 상기 제 2의 결합 도메인은 당분야에 공지된 임의의 항-IL-6 항체의 결합 도메인, 예를 들면, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics; 예컨데, WO 2016/073890 참고 (이는 전문이 본원 참고자료에 편입됨)), 실투스마브(siltuximab) (SYLVANT®), 오로키주마브(olokizumab), 클라자키주마브(clazakizumab), 시루쿠마브(sirukumab), 엘시리모마브(elsilimomab), 게릴림주마브(gerilimzumab), OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921, 또는 이의 변이체일 수 있다.

[0279] 일부 경우에서, 상기 이중특이적 항체는 이중특이적 항-VEGF/항-IL-6R 항체다. 일부 경우에서, 항-VEGF/항-IL-6R 이중특이적 항체는 VEGF (이를 테면, 본원에서 기술된 임의의 항-VEGF 항체)에 결합하는 제 1 결합 도메인과 IL-6R에 결합하는 제 2의 결합 도메인을 함유할 수 있다. 상기 제 2의 결합 도메인은 당분야에 공지된 임의의 항-IL-6R 항체의 결합 도메인, 예를 들면, 토실리주마브(tocilizumab) (ACTEMRA®) (예컨데, WO 1992/019579 참고, 이는 전문이 본원 참고자료에 편입됨), 사리루마브(sarilumab), 보바릴리주마브(vobarilizumab) (ALX-0061), SA-237, 또는 이의 변이체일 수 있다.

[0280] 다중특이적 항체를 만드는 기술은 상이한 특이성을 보유한 2개의 면역글로블린 중쇄-경쇄 쌍의 제조합 공동-발현(Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, 및 Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991) 참고), 및 "구멍내 손잡이(knob-in-hole)" 조작기술 (예로써, U.S. 특허번호. 5,731,168 참고)을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 다중-특이적 항체는 항체 Fc-이종이량체 분자들 (WO 2009/089004A1)을 만들기 위한 정전기적 스티어링(electrostatic steering) 효과를 조작하고; 2개 또는 그 이상 항체 또는 단편들 (예로써, US 특허번호. 4,676,980, 및 Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) 참고)을 가교시키고; 류신 지퍼를 이용하여 이중-특이적 항체를 만들고 (예로써, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992) 참고); 이중특이적 항체 단편들을 만들기 위하여 "디아바디(diabody)" 기술을 이용하고 (예로써, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); 그리고 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체 (예로써 Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994) 참고)를 이용하고; 그리고 예로써, Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991)에서 설명된 바와 같이, 삼중특이적 항체를 제조함으로써, 또한 만들어질 수 있다.

[0281] "옥토푸스(Octopus) 항체"를 포함하는, 3개 또는 그 이상 기능성 항원 결합 부위들을 가진 조작체작된(engineered) 항체가 또한 본 명세서에 포함된다 (예로써 US 2006/0025576A1 참고).

[0282] 본원의 상기 항체 또는 단편은 VEGF 뿐만 아니라 또다른 상이한 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 "이중 작용 FAb" 또는 "DAF"를 또한 포함한다 (예로써, US 2008/0069820 참고).

[0283] 8. 항체 변이체들

[0284] 특정 구체예들에서, 상기 본원에서 제공되는 항체의 아미노산 서열 변이체들 (예컨데, 하나 또는 그 이상의 아

미노산 잔기 변경을 포함하는 항체 변이체들)이 고려된다. 예를 들면, 항체의 상기 결합 친화력 및/또는 다른 생물학적 성질들을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체들은 상기 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 안으로 적절한 변형을 도입시킴으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 만들어질 수 있다. 이러한 변형은 예를 들면, 상기 항체의 아미노산 서열로부터 결손, 및/또는 이들 아미노산 서열 안으로 삽입 및/또는 잔기의 치환을 포함한다. 만일 최종 구조체가 바람직한 특징, 예를 들면, 항원 결합을 보유한 다면, 최종 구조체에 결손, 삽입, 및 치환의 임의의 조합이 있을 수 있다.

[0285] a) 치환, 삽입, 및 결손 변이체

[0286] 특정 구체예들에 있어서, 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환들을 갖는 항체 변이체들이 제공된다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심 부위는 HVRs 및 FRs를 포함한다. 보존적 치환들은 표 1에서 "선호되는 치환들"이라는 제목 아래에 나타낸다. 더 많은 실질적인 변화는 표 1의 "예시적인 치환들"이라는 제목하에 제시되며, 이는 아미노산 측쇄 클래스를 참고하여 더 논의된다. 아미노산 치환들은 바람직한 활성, 예를 들면, 유지된/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대하여 스크린된 관심대상 항체 및 산물 안으로 도입될 수 있다.

표 1

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

[0287] 아미노산은 공통적인 측쇄 성질들에 따라 집단화될 수 있다:

[0289] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0290] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0291] (3) 산성: Asp, Glu;

- [0292] (4) 염기성: His, Lys, Arg;
- [0293] (5) 측쇄 방향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;
- [0294] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0295] 비-보존성 치환들은 한 클래스의 멤버를 또다른 클래스로 교환될 것이다.
- [0296] 치환성 변이체의 한 가지 유형은 부모 항체의 하나 또는 그 이상의 초가변적 영역 잔기 및/또는 FR 잔기의 치환 (예로써 인간화된 또는 인간 항체)과 관련된다. 일반적으로, 추가 연구를 위하여 선별된 생성된 변이체(들)은 부모 항체와 비교하였을 때, 특정 생물학적 성질들의 변형(예로써, 개선), (예로써, 증가된 친화력, 증가된 안정성, 증가된 발현, 변경된 pI, 및/또는 감소된 면역원성)을 가지거나 및/또는 부모 항체의 특정 생물학적 성질들을 실질적으로 유지할 것이다. 예시적인 치환성 변이체는 친화력 발달된 항체이며, 이는 예로써, 파아지 디스플레이-기반의 친화력 성숙 기술, 이를 테면 본 명세서에서 설명된 것과 같은 것들을 이용하여 편의적으로 만들어질 수 있다. 간략하게 설명하자면, 하나 또는 그 이상의 HVR 잔기는 돌연변이되며, 변이체 항체는 파아지 상에서 디스플레이되며, 그리고 특정 생물학적 활성 (예로써 결합 친화력)에 대하여 스크리닝된다.
- [0297] 예를 들면, 항체 친화력을 개선시키기 위하여 변경 (가령, 치환)은 HVRs에서 만들어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR에서 "핫스팟(hotspots)", 가령, 체세포 성숙 과정 동안 고빈도로 돌연변이를 겪는 코돈에 의해 인코딩되는 잔기에서 만들어질 수 있고[가령, Chowdhury *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)], 및/또는 항원에 접촉하는 잔기, 생성된 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화력에 대하여 테스트된다. 제 2 라이브러리를 구축하고, 재선별함으로써 친화력 성숙은 예로써, Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))에서 설명되었다 친화력 성숙의 일부 구체예들에 있어서, 다양성은 다양한 방법들 중 임의의 방법에 의해 성숙을 위해 선택된 가변 유전자들에 도입된다(가령, 오류-발생(error-prone) PCR, 쇠 서플링, 또는 올리고뉴클레오티드-지향된 돌연변이생성). 제 2 라이브러리가 생성된다. 이어서, 이 라이브러리를 스크리닝하여, 원하는 친화력을 갖는 임의의 항체 변이체를 동정한다. 다양성을 도입하는 또다른 방법은 HVR-지향된 접근법을 포함하는데, 이때 몇 개 HVR 잔기 (가령, 한번에 4-6개 잔기)가 무작위화된다. 항원 결합에 관여하는 HVR 잔기는 가령, 알려진 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 이용하여 특이적으로 동정될 수 있다. 구체적으로 CDR-H3 및 CDR-L3이 대개 표적이 된다.
- [0298] 특정 구체예들에 있어서, 치환들, 삽입, 또는 결손은 이러한 변이로 인하여 상기 항체가 항원에 결합하는 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 하나 또는 그 이상의 HVRs 안에서 발생될 수 있다. 예를 들면, 결합 친화력을 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경 (가령, 본 명세서에서 제공된 보존적 치환)이 HVRs에 만들어질 수 있다. 이러한 변경은 예를 들어, HVR의 항원 접촉 잔기의 외부에 있을 수 있다. 상기에서 제시된 변이체 VH 및 VL의 특정 구체예들에 있어서, 각 HVR은 변경되지 않거나, 또는 1, 2 또는 3개 이상의 아미노산 치환을 함유한다.
- [0299] 특정 구체예들에 있어서, 치환들, 삽입, 또는 결손은 이러한 변이로 인하여 상기 항체가 항원에 결합하는 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 하나 또는 그 이상의 FRs 안에서 발생될 수 있다. 이러한 변경은 예를 들어, 항체 친화력 및/또는 안정성을 증가시킬 수 있다 (예를 들어, 증가된 용융 온도에 의해 평가됨).
- [0300] 돌연변이유발의 표적이 될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역을 식별하기 위한 유용한 방법은 Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085에서 설명된 바와 같은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"이라고 불린다. 이 방법에서, 표적 잔기 또는 표적 잔기들의 집단 (예로써, 하전된 잔기, 이를 테면 Arg, Asp, His, Lys, 및 Glu)이 확인되고, 그리고 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (예로써, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어, 항원과 항체의 상호작용이 영향을 받았는지를 판단한다. 추가 치환이 상기 아미노산 위치에 도입되어, 초기 치환에 대한 기능적 민감성을 입증할 수 있다. 대안으로, 또는 추가로, 항원-항체 복합체의 결정(결정) 구조를 이용하여 항체와 항원 간의 접촉 점들을 동정한다. 이러한 접촉 잔기와 이웃 잔기는 치환의 후보로 표적화되거나, 또는 제거될 수 있다. 변이체들이 원하는 성질을 보유하는지를 판단하기 위하여 이 변이체들이 스크리닝될 수 있다.
- [0301] 아미노산 서열 삽입은 한 개 잔기에서 수백 또는 그 이상의 잔기가 함유된 폴리펩티드 범위, 뿐만 아니라 단일 또는 다수의 아미노산 잔기의 서열내 삽입이 포함된 아미노-및/또는 카르복실-말단 융합을 포함한다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 상기 항체 분자의 다른 삽입 변이체들은 효소 (예로써 ADEPT의 경우)에 항체의 N-또는 C-말단의 융합 또는 상기 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 항체의 N-또는 C-말단의 융합을 포함한다.

[0302] b) 당화 변이체들

[0303] 특정 구체예들에서, 본 명세서에서 제공된 항체는 이 항체가 당화되는 정도를 증가 또는 감소시키기 위하여 변경된다. 항체의 당화 부위의 추가 또는 결손은 하나 또는 그 이상의 당화 부위가 만들어지거나 또는 제거되도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편의적으로 실행될 수 있다.

[0304] 상기 항체가 Fc 영역을 포함할 때, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유류 세포들에 의해 만들어지는 고유 항체는 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에 N-링키지에 의해 일반적으로 부착된 분기화된, 바이안테너리 (biantennary) 올리고사카라이드를 전형적으로 포함한다. 가령, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997) 참고. 상기 올리고사카라이드는 다양한 탄수화물, 예로써, 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스, 및 시알산, 뿐만 아니라 상기 바이안테너리 올리고사카라이드 구조의 "줄기(stem)"에 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 발명의 항체의 올리고사카라이드의 변형은 특정 개선된 성질들을 가진 항체 변이체들을 만들기 위하여 만들어질 수 있다.

[0305] 한 구체예에서, Fc 영역에 부착된(직접 또는 간접적으로) 푸코스가 없는 탄수화물 구조를 가진 항체 변이체들이 제공된다. 예를 들면, 이러한 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%가 될 수 있다. 푸코스의 양은 예를 들면, WO 2008/077546에서 설명된 바와 같이 MALDI-TOF 질량 분광분석에 의해 측정된 바와 같이, Asn 297에 부착된 모든 당구조(가령, 복합체, 하이브리드 및 높은 만노스 구조)의 함과 비교하여 Asn297에서 슈가 채 안에 평균 푸코스 양을 산출함으로써, 결정된다. Asn297은 Fc 영역에서 대략 위치 297 (Fc 영역 잔기의 EU 번호매김)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하며; 그러나, Asn297은 항체에서 소수의 서열 변이로 인하여 위치 297의 상류 또는 하류 약 ± 3의 아미노산, 가령, 위치 294와 300에 또한 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화 변이체들은 개선된 ADCC 기능을 보유할 수 있다. 예를 들면, US 특허 공개 번호 US 2003/0157108; US 2004/0093621 참고. "테푸코실화된(defucosylated)" 또는 "푸코스-결핍(fucose-deficient)" 항체 변이체에 관련된 공개 예는 다음을 포함한다: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al., *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). 탈푸코실화된 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예로는 단백질 푸코실화 결핍 Lec13 CHO 세포들 (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); US 특허 출원 번호 2003/0157108 A1, Presta, L; 그리고 WO 2004/056312 A1, Adams et al., 특히 실시예 11), 그리고 녹아웃 세포주, 이를 테면 알파-1,6-푸코실전이효소 유전자, *FUT8*, 녹아웃 CHO 세포들 (예로써, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); 그리고 WO2003/085107 참고)을 포함한다.

[0306] 예를 들면, 양분된 올리고사카라이드를 가진 항체 변이체들이 더 제공되는데, 항체의 Fc 영역의 바이안테너리 올리고사카라이드는 GlcNAc에 의해 양분된다. 이러한 항체 변이체들은 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 보유할 수 있다. 이러한 변이체들의 예들은 예로써, WO 2003/011878; US 특허 번호 6,602,684; 그리고 US 2005/0123546에서 설명된다. Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드에서 최소한 한 개의 갈락토스 잔기를 가진 항체 변이체들이 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체들은 개선된 CDC 기능을 보유할 수 있다. 이러한 항체 변이체들은 예로써, WO 1997/30087; WO 1998/58964; 그리고 WO 1999/22764 (Raju, S.)에서 설명된다.

[0307] c) Fc 영역 변이체들

[0308] 특정 구체예들에 있어서, 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형이 본 발명의 항체의 Fc 영역 안으로 도입되고, 이로 인하여 Fc 영역 변이체가 만들어질 수 있다. 상기 Fc 영역 변이체는 하나 또는 그 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 잔기 변경(예로써, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예로써, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)를 포함할 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, 본 발명은 모든 효과인자 기능을 보유하는 것은 아니지만 일부 기능을 보유하는 항체 변이체를 고려하며, 이는 생체내 항체의 반감기가 중요한 응용분야에 바람직한 후보를 만들고, 특정 효과인자 기능 (이를 테면 보체 및 ADCC)은 불필요하거나 또는 유해하다. 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 분석을 실행하여 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인할 수 있다. 예를 들면, Fc 수용체 (FcR) 결합 분석을 실행하여 상기 항체가 Fc γ R 결합이 결여되지만 (그런 이유로 ADCC 활성이 결여될 수 있는), 그러나 FcRn 결합 능력은 유지된다는 것을 확인할 수 있다. ADCC를 조정하는 주요 세포, NK 세포들은 오직 Fc γ RIII만을 발현시키지만, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현시킨다. 조혈 세포들에서 FcR 발현은 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)의 페이지 464의 표 3에 요약되어 있다.

- [0309] 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 분석의 비제한적 실시예는 U.S. 특허번호. 5,500,362 (예로써 Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986) 및 Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); U.S. 특허 번호 5,821,337; 그리고 Bruggemann et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987) 참고)에서 설명되어 있다. 대안으로, 비-방사능활성 분석 방법들이 이용될 수 있다 (예를 들면, 유동 세포측정을 위한 ACTI™ 비-방사능활성 세포독성 분석 (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; 그리고 CYTOTOX 96® 비-방사능활성 세포독성 분석 (Promega, Madison, WI). 이러한 분석에 유용한 작동 세포들은 주변 혈액 단핵 세포들 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포들을 포함한다. 대안으로, 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 예로써, Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)에서 공개된 바와 같은 동물 모델에서 생체내에서 평가될 수 있다. 상기 항체가 C1q에 결합할 수 없고, 이로 인하여 CDC 활성이 결여된다는 것을 확인하기 위하여 C1q 결합 분석이 또한 실행될 수 있다. 예로써, WO 2006/029879 와 WO 2005/100402에서 C1q 및 C3c 결합 ELISA 참고. 보체 활성화를 평가하기 위하여, CDC 분석이 실행될 수 있다(예를 들면, Gazzano-Santoro et al. *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al. *Blood.* 101:1045-1052 (2003); 그리고 Cragg, et al., *Blood.* 103:2738-2743 (2004) 참고). FcRn 결합과 생체내 제거/반감기 결정은 당분야에 공지된 방법들을 이용하여 또한 실행될 수 있다 (예로써, Petkova et al. *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006) 참고).
- [0310] 감소된 효과인자 기능을 가진 항체들은 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329중 하나 또는 그 이상의 치환을 가진 것들을 포함한다(U.S. 특허 번호 6,737,056). 이러한 Fc 돌연변이체들은 잔기 265 및 297의 잔기가 알라닌으로 치환된 소위 "DANA" Fc 돌연변이체를 포함하는, 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327중 2개 또는 그 이상에서 치환을 가진 Fc 돌연변이체를 포함한다 (US 특허 번호 7,332,581 참고).
- [0311] FcRs에 대한 결합이 개선된 또는 감소된 특정 항체 변이체들이 설명된다. (가령, U.S. 특허 번호 6,737,056; WO 2004/056312, 및 Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001) 참고).
- [0312] 특정 구체예들에 있어서, 항체 변이체는 ADCC를 개선시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환들, 예로써, Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334 (잔기의 EU 번호매김)에서 치환을 가진 Fc 영역을 포함한다.
- [0313] 일부 구체예들에 있어서, Fc 영역 안에 예로써, US 특허번호 6,194,551, WO 99/51642, 및 Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)에서 설명된 바와 같이, 변경된 (가령, 개선된 또는 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존적 세포독성 (CDC)을 초래하는 변형이 만들어진다.
- [0314] 태아로 모계 IgGs의 전달을 담당하는, 증가된 반감기와 신생아의 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합이 개선된 항체들(Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) 그리고 Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994))은 US2005/0014934A1 (Hinton et al.)에서 설명된다. 이들 항체는 Fc 영역이 FcRn에로의 결합을 개선시키는 하나 또는 그 이상의 치환들을 가진 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체들은 Fc 영역 잔기의 하나 또는 그 이상에서 치환을 가진 것들을 포함한다: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434, 예로써, Fc 영역 잔기 434의 치환 (US 특허 번호. 7,371,826). Fc 영역 변이체들의 다른 예들에 관련된 Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); U.S. 특허 번호. 5,648,260; U.S. 특허 번호. 5,624,821; 그리고 WO 94/29351 참고.
- [0315] d) 시스템인 조작된 항체 변이체들
- [0316] 특정 구체예들에 있어서, 항체의 하나 또는 그 이상의 잔기가 시스템인 잔기로 대체된, 시스템인 조작된 항체, 가령, "thioMAbs"를 만드는 것이 바람직할 수 있다. 구체적으로 구체예에서, 상기 치환된 잔기는 항체의 접근가능한 부위에서 일어난다. 이들 잔기를 시스템인으로 치환함으로써, 반응활성 티올기는 이 상체의 접근가능한 부위에 위치하게 되고, 다른 모이어티, 이를 테면 하기에서 설명되는 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 이 항체가 접합되어 면역접합체가 생성될 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, 임의의 하나 또는 그 이상의 다음 잔기는 시스템인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205 (Kabat 번호매김); 중쇄의 A118 (EU 번호매김); 그리고 중쇄 Fc 영역의 S400 (EU 번호매김). 시스템인 조작된 항체는 예를 들면, U.S. 특허 번호 7,521,541에서 설명된 것과 같이 생성될 수 있다.
- [0317] e) 항체 유도체들
- [0318] 특정 구체예들에 있어서, 본원에서 제공된 항체는 당업계에 공지되어 있고, 쉽게 입수할 수 있는 추가의 비단백질성 잔기를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 상기 항체의 유도체형성에 적합한 모이어티들은 물 가용성 폴리머들을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 물 가용성 폴리머의 비-제한적인 예로는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG),

에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 코폴리머, 카르복시메틸셀룰로오스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1, 3-디옥소란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레 무수물 코폴리머, 폴리아미노산 (호모폴리머 또는 무작위 코폴리머), 그리고 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 호모폴리머, 프로리프로필렌 산화물/에틸렌 산화물 코-폴리머, 폴리옥시에틸화된 폴리올 (예로써, 글리세롤), 폴리비닐 알코올, 및 이의 혼합물을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 물에서의 안정성으로 인하여 제작에서 장점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량일 수 있고, 분지형 또는 비-분지형일 수 있다. 상기 항체에 부착된 폴리머의 수는 가변적일 수 있으며, 하나 이상의 폴리머가 부착된 경우, 이들은 동일하거나 또는 상이한 분자들일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 이용된 폴리머의 수 및/또는 유형은 개선되는 항체의 특정 성질들 또는 기능들, 상기 항체 유도체가 특정 조건하에서 치료에 이용되는지의 여부, 그리고 이와 유사한 것들을 포함하는 고려사항들에 근거하여 결정될 수 있다. 추가의 항체 콘주게이트는 예를 들어 하기 단락 K 및 실시예 13에 기재되어 있다.

[0319] 또다른 구체예에서, 방사선에 노출됨으로써 선별적으로 가열될 수 있는 항체와 비단백질성 모이어티의 접합체들이 제공된다. 한 구체예에서, 상기 비단백질성 모이어티는 탄소 나노튜브다 (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). 방사능은 임의의 과장일 수 있으며, 정상 세포들에게 해를 주지 않지만, 그러나 상기 항체-비단백질성 모이어티에 근접한 세포들은 사멸되는 온도에서 비단백질성 모이어티에 열을 가하는 과장이 포함되나, 이에 국한되지 않는다.

[0320] f) 등전점 변이체들

[0321] 본 발명은 변경된 등전점을 갖는 항체 변이체를 제공한다. 예를 들면, 본 발명은 항-VEGF 항체, 예로써, G6.31와 비교하였을 때, 감소된 등전점 (pI)을 갖는 항체 변이체들을 제공한다. 일부 경우에서, 표면 전하는 생리학적 pH에서 감소된다. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 약 8와 같거나, 또는 이 보다 낮은 (예컨데, 약 8, 약 7, 약 6, 약 5, 또는 약 4) pI를 갖는다. 일부 경우에서, 상기 항체는 약 4 내지 약 8 (예컨데, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 또는 약 8)의 pI를 갖는다. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 약 5 내지 약 7 (예컨데, 약 5, 약 6, 또는 약 7)의 pI를 갖는다. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 약 5 내지 약 6 (예컨데, 약 5.1, 약 5.2, 약 5.3, 약 5.4, 약 5.5, 약 5.6, 약 5.7, 약 5.8, 약 5.9, 또는 약 6)의 pI를 갖는다.

[0322] 본 발명의 항체는 예를 들어, 주어진 위치에서 야생형 아미노산 잔기 보다 낮은 pI를 갖는 아미노산으로 치환함으로써, 감소된 pI를 갖도록 조작될 수 있다. 아미노산의 pI는 당 업계에 공지된 아민 (-NH₂), 카르복실산 (-COOH) 및 아미노산의 측쇄의 pKa 값에 기초하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 표면-노출된 아미노산 잔기는 항체의 pI가 감소되도록 치환될 수 있다. 한 구체예에서, 표면-노출된 아미노산 잔기는 글루타메이트 (E)로 치환될 수 있다. 한 구체예에서, 표면-노출된 아미노산 잔기는 아스파르테이트 (D)로 치환될 수 있다.

[0323] B. 재조합 방법 및 조성물들

[0324] 본원에서 기술된 임의의 항체 (예컨데, 항-VEGF 항체)는 재조합 방법 및 조성물을 사용하여, 예를 들어 U.S. 특허 4,816,567에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 한 구체예에서, 본원 명세서에서 기술된 항-VEGF 항체가 인코딩된 단리된 핵산이 제공된다. 이러한 핵산은 상기 항체의 상기 VL이 포함된 아미노산 서열 및/또는 VH가 포함된 아미노산 서열(예로써, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)을 인코딩할 수 있다. 추가 구체예에 있어서, 이러한 핵산이 포함된 하나 또는 그 이상의 벡터 (예로써, 발현 벡터)가 제공된다. 추가 구체예에 있어서, 이러한 핵산이 포함된 숙주 세포가 제공된다. 이러한 하나의 구체예에서, 숙주 세포는 다음을 포함한다 (가령, 다음에 의해 형질변환된다): (1) 상기 항체의 VL이 포함된 아미노산 서열과 상기 항체의 VH가 포함된 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산이 포함된 벡터, 또는 (2) 상기 항체의 VL이 포함된 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산이 포함된 제 1 벡터와 상기 항체의 VH가 포함된 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산이 포함된 제 2 벡터. 한 구체예에서, 상기 숙주 세포는 진핵, 예로써 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 림프구 세포 (예로써, YO, NS0, Sp20 세포)다. 한 구체예에서, 항-VEGF 항체를 만드는 방법이 제공되는데, 이때 상기 방법은 상기에서 제공된 바와 같이, 상기 항체를 인코딩하는 핵산이 포함된 숙주 세포를 상기 항체의 발현에 적합한 조건하에서 배양하고, 그리고 임의선택적으로 상기 숙주 세포 (또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 상기 항체를 회수하는 것을 포함한다.

[0325] 항-VEGF 항체의 재조합 생산을 위하여, 예로써 상기에서 기술된 바와 같이 항체를 인코딩하는 핵산이 단리되고, 숙주 세포 안에서 추가 클로닝 및/또는 숙주 세포 안에서 발현을 위하여 하나 또는 그 이상의 벡터 안으로 삽입된다. 이러한 핵산은 통상적인 과정 (예로써, 상기 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결

합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용하여)을 이용하여 단리 및 서열화될 수 있다.

- [0326] 항체-인코딩된 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본 명세서에서 설명된 원핵 또는 진핵 세포들을 포함한다. 예를 들면, 특히 당화 및 Fc 효과인자 기능이 필요하지 않을 때, 박테리아 안에서 항체가 만들어질 수 있다. 박테리아 안에서 항체 단편들 및 폴리펩티드의 발현과 관련하여 예로써, U.S. 특허 번호 5,648,237, 5,789,199, 및 5,840,523 참고. (*대장균(E. coli)*에서 항체 단편들의 발현을 설명하는 Charlton, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254 또한 참고). 발현 후, 상기 항체는 박테리아 세포 페이스트로부터 가용성 분획으로 단리되며, 추가 정제될 수 있다.
- [0327] 원핵세포에 추가적으로, 진핵 미생물, 이를 테면 섬유성 곰팡이 또는 효모는 항체-인코딩된 벡터의 적절한 클로닝 또는 발현 숙주이며, 당화 경로가 "인간화되고", 결과적으로 부분적으로 또는 온전하게 인간 당화 패턴을 가진 항체가 생산되는 곰팡이 및 효모 균주가 포함된다. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), 및 Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006) 참고.
- [0328] 당화된 항체의 발현에 적합한 숙주 세포들은 다중세포 유기체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 또한 유도된다. 무척추동물 세포들의 예로는 식물 및 곤충 세포들이 포함된다. *스포도프테라 푸르기페르다(Spodoptera frugiperda)* 세포들의 형질감염을 위하여 곤충 세포들과 병용될 수 있는 많은 벡클로바이러스 균주들이 확인되었다.
- [0329] 식물 세포 배양 또한 숙주로 이용될 수 있다. 예로써, US 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, 및 6,417,429 참고 (유전자삽입 식물에서 항체를 생산하기 위한 PLANTIBODIES™ 을 설명).
- [0330] 척추동물 세포들 또한 숙주로 이용될 수 있다. 예를 들면, 현탁액에서 성장하도록 적응된 포유류 세포주들이 유용할 수 있다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 다른 예로는 SV40에 의해 형질변환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7); 인간 배아 신장 세포주 (예로써, Graham et al., *J. Gen Viro.* 36:59 (1977)에서 설명된 293 또는 293 세포들); 아기 햄스터 신장 세포들 (BHK); 마우스 세르톨리 세포들 (예로써, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)에서 설명된 TM4 세포들); 원숭이 신장 세포들 (CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포들 (VERO-76); 인간 경부 암종 세포들 (HELA); 갯과 신장 세포들 (MDCK); 버팔로 렛 간 세포들 (BRL 3A); 인간 폐 세포들 (W138); 인간 간 세포들 (Hep G2); 마우스 유방 종양 (MMT 060562); 예로써, Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)에서 설명된 TRI 세포들; MRC 5 세포들; 그리고 FS4 세포들이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포계통은 DHFR-CHO 세포 (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))를 포함하는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포(Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); 그리고 골수종 세포계통 이를 테면 YO, NSO 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유류 숙주 세포주의 검토는 예로써, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)를 참고한다.
- [0331] **C. 분석:**
- [0332] 항-VEGF 본원에서 제공되는 항체, 뿐만 아니라 항-VEGF 항체가 함유된 조성물 (예컨데, 본원에서 제공되는 임의의 항-VEGF 항체), 이를 테면, 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및 중합체 제제는 당업계에서 공지된 다양한 분석법에 의해 이의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성을 확인, 스크리닝 또는 특징화될 수 있다.
- [0333] 1. 결합 분석 및 기타 분석
- [0334] 한 측면에서, 본 발명의 항체, 또는 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 중합체 제제는 공지의 방법들, 이를 테면, ELISA, 웨스턴 블랏 등에 의해 이의 항원 결합 활성에 대하여 테스트된다.
- [0335] 또다른 측면에서, 경쟁 분석법을 사용하여, VEGF에 결합하기 위해 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 항체 콘주게이트, 융합 단백질 또는 이들의 중합체 제제와 경쟁하는 항체를 동정할 수 있다. 특정 구체예들에서, 그러한 경쟁 항체는 본원에 기재된 항체에 의해 결합된 동일한 에피토프 (예를 들어, 선형 또는 입체구조의 에피토프)에 결합한다. 항체가 결합하는 에피토프를 매핑하기 위한 상세한 예시적인 방법이 Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)에서 제시된다.
- [0336] 예시적인 경쟁 분석에서, 고정된 VEGF는 VEGF에 결합하는 제 1 라벨된 항체 및 VEGF에 대한 결합에 대해 제 1 항체와 경쟁하는 그의 능력에 대해 테스트되는 제 2의 라벨되지 않은 항체를 포함하는 용액에서 배양된다. 상기 제 2의 항체는 하이브리도마 상정액에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 고정된 VEGF는 제 1 라벨된 항체를

포함하지만, 제 2의 라벨되지 않은 항체를 포함하지 않은 용액에서 배양된다. VEGF에 대한 제 1 항체의 결합을 허용하는 조건 하에서 배양한 후, 과량의 비-결합된 항체를 제거하고, 고정된 VEGF와 관련된 라벨의 양을 측정한다. 고정된 VEGF와 관련된 라벨의 양이 대조군 시료에 비해 시험 샘플에서 실질적으로 감소되면, 이는 제 2 항체가 VEGF에 대한 결합에 대해 제 1 항체와 경쟁하고 있음을 나타낸다. Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) 참고.

[0337] 2. 활성 분석

[0338] 한 측면에서, 항-VEGF 항체, 또는 생물학적 활성을 갖는 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 이의 중합체 제제를 동정하는 분석이 제시된다. 생물학적 활성은 예를 들어, 생체내, 시험관내 또는 생체외에서 VEGF (예를 들어, 혈류 내 VEGF) 또는 이의 펩티드 단편에 대한 결합을 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, 생물학적 활성은 VEGF의 차단 또는 중화, 또는 VEGF가 리간드, 예를 들어 KDR 또는 Flt-1과 같은 수용체에 결합하는 것을 방지하는 것을 포함할 수 있다. 생체내 및/또는 시험관내에서 이러한 생물학적 활성을 갖는 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 중합체 제제를 또한 제공한다. 특정 구체예들에서, 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 중합체 제제는 이러한 생물학적 활성에 대하여 테스트된다.

[0339] 3. 안정성 분석

[0340] 한 측면에서, 항-VEGF 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 중합체 제제의 안정성 (예컨데, 열 안정성)을 결정하는 분석이 제공된다. 예를 들면, 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 중합체 제제의 안정성은 당분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들면, 시차주사 형광측정계 (DSF), 원 편광 이색 (CD), 고유 단백질 형광, 시차 주사 열량, 분광기, 광 산란 (예를 들어, 동적 광산란 (DLS) 및 정적 광산란 (SLS), 자가-상호 작용 크로마토그래피 (SIC)를 이용하여 측정될 수 있다. 분석의 안정성은 예를 들어, 실시예 1 및 2에 기재된 바와 같이 DSF를 사용하여 본원에 기술된 바와 같이 결정될 수 있다.

[0341] D. 면역콘주게이트

[0342] 본 발명은 하나 또는 그 이상의 세포독성 물질, 이를 테면, 화학치료제 또는 약물, 성장 억제제 물질, 독신 (예컨데, 단백질 독신, 박테리아, 진균성, 식물, 또는 동물 기원의 효소적으로 활성 독신, 또는 이의 단편), 또는 방사능활성 동위원소에 콘주게이트된 본원의 항-VEGF 항체를 포함하는 면역콘주게이트를 또한 제공한다.

[0343] 한 구체예에서, 면역콘주게이트는 항체-약물 콘주게이트 (ADC)이며, 이때 항체는 메이탄시노이드 (U.S. 특허 번호 5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1 참고); 아우리스테틴 이를 테면, 노노메틸아우리스테틴 약물 모이어티 DE 및 DF (MMAE 및 MMAF) (U.S. 특허 번호 5,635,483, 5,780,588, 및 7,498,298); 도라스테틴; 칼리체아미신 또는 이의 유도체 (U.S. 특허 번호 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 및 5,877,296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); 그리고 Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); 안트라사이클린 이를 테면, 다우노마이신 또는 독소루비친 (Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); 그리고 U.S. 특허 번호 6,630,579 참고); 메토티렉세이트; 빈데신; 탁산, 이를 테면, 도세탁셀, 파클리탁셀, 라로탁셀, 테세탁셀, 및 오르타탁셀; 트리코테센; 그리고 CC1065를 포함하나, 이에 국한되지 않는 하나 또는 그 이상의 약물에 콘주게이트된다.

[0344] 또다른 구체예에서, 면역콘주게이트는 디프테리아 A 쇄, 디프레테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 에어루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터), 리친 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데친 A 쇄, 알파-사르친, 알레우리테스 포르디(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르친, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(*sapaonaria officinalis*) 억제제, 게로닌, 니토켈린, 레스트릭토신, 페오마이신, 에노마이신, 그리고 트리코테센을 포함하나 이에 국한되지 않는, 효소적으로 활성 독소 또는 이의 단편에 콘주게이트된 본원에서 기술된 항체를 포함한다.

[0345] 또다른 구체예에서, 면역콘주게이트는 방사능콘주게이트를 만들기 위하여 방사능활성 원자에 콘주게이트된 본원에서 기술하는 바와 같은 항체를 포함한다. 다양한 방사능활성 동위원소는 방사능콘주게이트 생산에 이용가능하다. 실시예는 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² 및 Lu의 방사능활성 동위원소를 포함한다. 상기 방사능 콘주게이트가 탐지용으로 이용될 때, 이것은 신디그래피 연구를 위한 방사능활성 원자,

예를 들면 tc99m 또는 I123, 또는 핵 자기 공명 (NMR) 영상화 (또는 자기 공명 영상화, mri로도 공지됨)를 위한 회전 라벨, 이를 테면, 다시 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 또한 함유할 수 있다.

[0346] 항체와 세포독성 물질의 콘주게이트는 다양한 이중기능성 단백질 커플링 물질, 이를 테면, N-숙시니미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙시니미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이중기능성 유도체들 (이를 테면, 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (이를 테면, 디숙시니미딜 수베레이트), 알데히드 (이를 테면, 글루타알데히드), 비스-아지도 화합물 (이를 테면, 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체들 (이를 테면, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (이를 테면, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플로린 화합물 (이를 테면, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 이용하여 만들어질 수 있다. 예를 들면, 리친 면역독소는 Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987)에서 기술된 바와 같이 준비될 수 있다. 탄소-14-라벨된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 방사능핵종을 콘주게이션시키기 위한 예시적인 킬레이팅 물질이다. WO94/11026 참고. 상기 링커는 세포 안에서 세포독성 약물의 용이한 방출을 위한 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들면, 산-불안정 링커, 펩티다아제-민감성 링커, 광 불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 디설파이드-함유 링커 (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); U.S. 특허 번호 5,208,020)가 이용될 수 있다.

[0347] 본원에서 면역콘주게이트 또는 ADCs를 명시적으로 고려하는데, 이러한 콘주게이트는 상업적으로 이용가능한 (예컨대, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A) BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술폰-EMCS, 술폰-GMBS, 술폰-KMUS, 술폰-MBS, 술폰-SIAB, 술폰-SMCC, 및 술폰-SMPB, 그리고 SVSB (숙시니미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트)를 포함하나, 이에 국한되지 않은 가교 시약으로 준비된다.

[0348] **E. 친화력 정제, 진단, 및 탐지용 방법 및 조성물**

[0349] 상기 본 발명의 항체는 친화력 정제 물질로 이용될 수 있다. 이 공정에서, 항체는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 SEPHADEX® 수지 또는 여과지와 같은 고체 상에 고정화된다. 상기 고정된 항체를 정제하고자 하는 항원을 함유하는 시료에 접촉시킨 후, 그 다음 고정된 항체에 결합된 정제될 항원을 제외하고, 시료로부터 실질적으로 모든 물질을 제거하기 위하여 적절한 용매로 지지체를 세척한다. 끝으로, 이 지지체는 항체로부터 항원을 방출하는 글리신 완충액, pH 5.0과 같은 다른 적합한 용매로 세척한다.

[0350] 특정 구체예들에서, 본원에서 제공되는 임의의 항-VEGF 항체는 생물학적 시료 안에 VEGF의 존재를 탐지하는데 유용하다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "탐지하는(detecting)"이란 정량적 또는 정성적 탐지를 포괄한다. 특정 구체예들에서, 생물학적 시료는 세포 또는 조직, 이를 테면, 혈액 (예컨대, 전혈, 혈장, 및/또는 혈청), 조직 시료 (예컨대, 종양 시료), 그리고 이와 유사한 것들을 포함한다.

[0351] 한 구체예에서, 진단 또는 탐지 방법에서 사용되는 항-VEGF 항체가 제공된다. 추가 측면에서, 생물학적 시료 안에 VEGF의 존재를 탐지하는 방법에 제공된다. 특정 구체예들에서, 상기 방법은 상기 항-VEGF 항체가 VEGF에 결합하는 것을 허용하는 조건하에서 본원에서 기술된 항-VEGF 항체를 생물학적 시료에 접촉시키고, 상기 항-VEGF 항체와 VEGF 사이에 복합체가 형성되었는지를 탐지하는 것을 포함한다. 이러한 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 한 구체예에서, 항-VEGF 항체는 항-VEGF 항체를 이용한 요법에 맞는 대상을 선택하는데 이용되는데, 예를 들면, VEGF는 환자 선별을 위한 생물표지다.

[0352] 본 발명의 항체를 이용하여 진단할 수 있는 예시적인 장애는 혈관신생과 병리학적으로 관련된 장애 (예컨대, 안구 장애 및 세포 증식성 장애) 및/또는 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애 (예컨대, 뇌 종양과 연합된 부종, 악성과 연합된 복수, 메이그 증후군, 폐 염증, 신장 증후군, 위심(pericardial) 삼출, 늑막 삼출, 그리고 심혈관 질환과 연합된 투과성)을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 안구 장애는 AMD (예컨대, 습성 AMD, 건성 AMD, 중간 AMD, 진행된 AMD, 및 지도모양 망막위축 (GA)), 황반 변성, 황반 부종, DME (예컨대, 초점, 비-중심 DME 또는 확산, 중심-관련된 DME), 망막증, 당뇨병성 망막증 (DR) (예컨대, 증식성 DR (PDR), 비-증식성 DR (NPDR), 또는 높은-고도 DR), 기타 허혈-관련된 망막증, ROP, 망막 정맥 폐쇄 (RVO) (예컨대, 중심형 (CRVO) 및 분기형 (BRVO)), CNV (예컨대, 근시성 CNV), 각막 혈관신생, 각막 혈관신생, 망막 혈관신생과 연합된 질환, 망막 혈관신생, 망막/맥락막 혈관신생과 연합된 질환, 병적 근시, 본 히펠-린다우 질환, 눈의 히스토플라스마증, FEVR, 코우츠 질환, 노리 질환, OPPG, 결막막 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염 (RP), 고혈압 망막증, 망막 혈관종 확산, 황반 모세혈관확장증, 홍채 혈관신생, 안구

내 혈관신생, 망막 변성, 포낭성 황반 부종 (CME), 맥관염, 부종, 망막염, 결막염 (예컨데, 감염성 결막염 및 비-감염성 (가령, 알레르기성) 결막염), 레베르 선천성 흑내장 (또한 레베의 선천성 흑내장 또는 LCA로도 공지 됨), 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염 (예컨데, 다춧점 맥락막염), 눈 히스토플라스마증, 다래끼, 건성안, 외상에 의한 눈 손상, 또는 쇼그렌 질환이다. 일부 경우에서, 상기 안구 장애는 증식성 당뇨병성 망막증을 포함하는 망막증, 맥락막 혈관신생 (CNV), 노인성 황반 변성 (AMD), 당뇨병 및 기타 허혈-관련된 망막증, 당뇨병성 황반 부종 (DME), 병적 근시, 본 히펠-린다우 질환, 눈의 히스토플라스마증, 망막 정맥 폐쇄 (중심형 (CRVO) 및 분기형 (BRVO) 형 포함), 각막 혈관신생, 망막 혈관신생, 미숙아 망막증 (ROP), 가족성 삼출 유리체망막증 (FEVR), 코우츠 질환, 노리 질환, 골다공증-가성신경교종 증후군 (OPPG), 결막밑 출혈, 또는 고혈압 망막증이다. 일부 경우에서, 상기 세포 증식성 장애는 암이다. 일부 경우에서, 상기 암은 유방암, 결장직장암, 비-소(small) 세포 폐암, 비-호지킨 림프종 (NHL), 신장암, 전립선암, 간암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 중피종, 또는 다발성 골수종이다.

[0353] 특정 구체예들에서, 라벨된 항-VEGF 항체가 제공된다. 라벨은 직접적으로 탐지되는 라벨 또는 모이어티 (이를 테면, 형광, 색소생성, 전자-밀도, 화학적발광, 및 방사능활성 라벨), 뿐만 아니라 모이어티, 이를 테면, 효소적 반응 또는 분자 상호작용을 통하여 간접적으로 탐지되는 효소 또는 리간드다. 예시적인 라벨은 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: 방사능동위원소 ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, 및 ¹³¹I, 형광단 이를 테면, 희토 킬레이트 또는 플루오레세인 및 이의 유도체, 로다민 및 이의 유도체, 단질, 움벨리페론, 루시페라제, 예컨데, 반딧불이 루시페라제 및 박테리아 루시페라제 (U.S. 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 양고추냉이 과산화효소 (HRP), 알칼리 포스파타제, β-갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제, 예컨데, 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 탈수소효소, 염료 전구물질, 이를 테면, HRP를 산화하기 위하여 과산화수소를 이용하는 효소에 결합된 헤테로시클릭 옥시다제 이를 테면, 우리카제 및 산틴 옥시다제, 이를 테면, HRP, 락토퍼옥시다제, 또는 마이크로퍼옥시다제, 바이오틴/아비딘, 스핀 라벨, 박테리오파지 라벨, 안정적인 자유 라디칼, 그리고 이와 유사한 것들.

[0354] 본 발명의 또다른 구체예에서, 항체는 라벨될 필요가 없으며, 그의 존재는 항체에 결합하는 라벨된 항체를 사용하여 검출될 수 있다.

[0355] 본 발명의 항체는 경쟁적 결합 분석, 직접 및 간접 샌드위치 분석 및 면역침강 분석과 같은 임의의 공지된 분석 방법에 사용될 수 있다. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

[0356] 경쟁적 결합 분석은 제한된 양의 항체와의 결합에 대해 시험 시료 분석과 경쟁하는 라벨된 표준의 능력에 따라 달라진다. 시험 시료 안의 항원 양은 항체에 결합하게 되는 표준량에 반비례한다. 결합되는 표준 물질의 양을 결정하기 쉽도록 항체는 일반적으로 경쟁 전 또는 후에 불용화되고, 따라서 항체에 결합된 표준 및 분석은 결합하지 않고 남아있는 표준 및 분석으로부터 편리하게 분리할 수 있다.

[0357] 샌드위치 분석은 검출할 단백질의 상이한 면역원성 부분 또는 에피토프에 각각 결합할 수 있는 두 개의 항체의 사용과 관련되어 있다. 샌드위치 분석에서, 시험 시료 분석물(analyte)은 고체 지지체 상에 고정된 제 1 항체에 의해 결합되고, 그 후 제 2 항체는 분석물에 결합하여 불용성 3-부분 복합체를 형성한다 예를 들면, U.S. 특허 번호 4,376,110 참고. 상기 제 2의 항체는 탐지가능한 모이어티로 라벨될 수 있거나(직접 샌드위치 분석), 또는 탐지가능한 모이어티로 라벨된 항-면역글로블린 항체를 이용하여 측정될 수 있다 (간접 샌드위치 분석). 예를 들면, 한 가지 유형의 샌드위치 분석은 ELISA 분석이며, 이때 탐지가능한 모이어티는 효소다.

[0358] 면역조직화학에서, 종양 시료는 갓 떼어낸 것이거나, 냉동되거나, 또는 파라핀에 매립되고, 새로운 보존제 이를 테면, 포르말린으로 고정된 것일 수 있다.

[0359] 상기 항체는 또한 생체내 진단 분석에 이용될 수 있다. 일반적으로, 상기 항체는 면역신티오그래피 (immunoscintigraphy)를 이용하여 종양에 국소화될 수 있는 방사능핵종 (이를 테면, ¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ¹⁴C, ¹³¹I, ¹²⁵I, ³H, ³²P 또는 ³⁵S), 또는 염료로 라벨된다.

[0360] **F. 진단 키트**

[0361] 편리를 위하여, 본 발명의 항체는 키트, 정량의 시약과 진단 분석을 수행하기 위한 지시 사항의 포장된 조합으로 제공될 수 있다. 상기 항체는 효소로 라벨되며, 이 키트는 효소가 필요로 하는 기질 및 보조 인자 (예를 들어, 검출가능한 발색단 또는 발색단을 제공하는 기질 전구체)를 포함할 것이다. 또한, 이를 테면, 안정화제, 완

층액 (예컨데, 블록 완층액 또는 용해 완층액) 그리고 이와 유사한 것들이 포함된, 다른 추가물질을 포함할 수 있다. 다양한 시약의 상대적인 양은 분석의 민감도를 실질적으로 최적화하는 시약의 용액내 농도를 제공하기 위해 광범위하게 다양할 수 있다. 특히, 시약은 용해시 적절한 농도를 갖는 시약 용액을 제공하는 부형제를 포함하는 건조 분말로서 제공될 수 있다.

[0362] **G. 약학 제제**

[0363] 본원에서 기술된 항-VEGF 항체 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 중합체 제제의 약학 제제는 선택적으로 약학적으로 수용가능한 희석제, 담체, 부형제 또는 안정화제 (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16th edition, Osol, A. Ed.)와 혼합되어, 동결 건조된 제제 또는 수용액의 형태로 준비된다. 약학적으로 수용가능한 운반체는 이용되는 투여량 및 농도에서 수령체에 비독성이며, 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: 완층액, 이를 테면, 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제 (이를 테면, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토니움 클로라이드; 벤잘코니움 클로라이드; 벤제트늄 클로라이드; 페놀, 부탈 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤 이를 테면, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르치놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 그리고 m-크레졸); 낮은 분자량의 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 이를 테면, 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로블린; 친수성 중합체 이를 테면, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 이를 테면, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 그리고 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린을 포함하는 기타 탄수화물; 킬레이트 물질 이를 테면, EDTA; 당, 이를 테면, 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 카운터-이온, 이를 테면, 나트륨; 금속 복합체 (예컨데 Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제 이를 테면, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG). 본원에서 예시적인 약학적으로 수용가능한 운반체는 세포간(interstitial) 약물 분산 물질, 이를 테면, 가용성 중성-활성 히알루노니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들면, 인간 가용성 PH-20 히알루노니다제 당단백질, 이를 테면, rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.)을 포함한다. rHuPH20를 포함하는 특정 예시적인 sHASEGPs 및 이를 이용하는 방법은 US 특허 공개 번호 2005/0260186 및 2006/0104968에서 기술된다. 한 측면에서, sHASEGP는 하나 또는 그 이상의 추가 글리코사미노글리카나제 이를 테면, 콘드로이티나제와 복합된다.

[0364] 예시적인 동결건조된 항체 제제는 US 특허 번호 6,267,958에서 기술된다. 수용액 항체 제제는 US 특허 번호 6,171,586 및 WO2006/044908에서 기술된 것들을 포함하며, 후자 제제는 히스티딘-아세테이트 완층액을 포함한다.

[0365] 본 명세서의 제제는 치료될 특정 조직에 적합한 임의의 하나 이상의 활성 성분들, 바람직하게는 서로 부정적으로 영향을 주지 않는 상보적 활성을 갖는 것들을 포함할 수 있다. 예를 들면, 이것은 면역억제 물질을 더 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 분자들은 의도된 목적에 효과적인 양으로 복합물내에 적절하게 존재한다.

[0366] 활성 성분은 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐)에서 각각 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합, 예를 들어 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에 의해 준비된 마이크로캡슐 또는 마크로에멀전 (macroemulsions)안에 포집될 수 있다. 이러한 기술은 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)에 기술된다.

[0367] 생체내 투여에 사용되는 제제는 일반적으로 무균이다. 무균은 예를 들어 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성 될 수 있다.

[0368] 특정 구체예들에서, 상기 약학 제제는 하나 또는 그 이상의 추가 화합물을 함유한다. 특정 구체예들에서, 상기 추가 화합물은 IL-1 β , IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; 양지오포이에틴; 양지오포이에틴 2; Tie2; S1P; 인테그린 $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, 및 $\alpha 5 \beta 1$; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트로포이에틴; 보체 인자 D; TNF α ; HtrA1; VEGF 수용체; ST-2 수용체; 그리고 노인성 황반 변성 (AMD) 위험에 유전적으로 연계된 단백질, 이를 테면, 보체 경로 구성요소 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a, 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; 그리고 TNFRSF10A로 구성된 군에서 선택된 제 2의 생물학적 분자에 결합한다. 특정 구체예들에서, 상기 추가 화합물은 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

[0369] 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 이중특이적 항체 (예컨데, 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체, 이를 테면, RG-7716 또는 WO 2010/069532 또는 WO 2016/073157에서 기술된 임의의 이중특이적 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체이다.

[0370] 또다른 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 항-IL-6 항체, 예를 들면, EBI-031 (Eleven

Biotherapeutics; 예컨데, WO 2016/073890 참고), 실투시마브 (SYLVANT®), 오로키주마브, 클라자키주마브, 시루쿠마브, 엘시리도마브, 케틸립주마브, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921, 또는 이의 변이체다.

[0371] 여전히 추가 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 항-IL-6R 항체, 예를 들면, 토셀리주마브 (ACTEMRA®) (예컨데, WO 1992/019579 참고), 사리루마브, 보바틸리주마브 (ALX-0061), SA-237, 또는 이의 변이체다.

[0372] **H. 치료 방법 및 조성물**

[0373] 본원에서 제공되는 임의의 상기 항-VEGF 항체, 항체 콘주게이트 (예컨데, HA 콘주게이트, PEG 콘주게이트, 및 프로드럭 항체 콘주게이트), 용합 단백질, 그리고 중합체 제제는 치료 방법에 이용될 수 있다.

[0374] 한 측면에서, 약물로 이용되는 항-VEGF 항체가 제공된다. 또다른 측면에서, 약물로 이용되는 항체 콘주게이트가 제공된다. 여전히 또다른 측면에서, 약물로 이용되는 용합 단백질이 제공된다. 여전히 또다른 측면에서, 약물로 이용되는 중합체 제제가 제공된다. 추가 측면에서, 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애 치료에 이용되는 항-VEGF 항체를 제공한다. 또다른 측면에서, 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 치료하는데 이용되는 항체 콘주게이트를 제공한다. 여전히 다른 측면에서, 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 치료하는데 이용되는 용합 단백질을 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애 치료에 이용되는 중합체 제제를 제공한다. 일부 구체예들에서, 상기 병리학적 혈관신생과 연관된 장애는 안구 장애 또는 세포 증식성 장애다. 일부 경우에서, 상기 안구 장애는 AMD (예컨데, 습성 AMD, 건성 AMD, 중간 AMD, 진행된 AMD, 및 지도모양 망막위축 (GA)), 황반 변성, 황반 부종, DME (예컨데, 초점, 비-중심 DME 또는 확산, 중심-관련된 DME), 망막증, 당뇨병성 망막증 (DR) (예컨데, 증식성 DR (PDR), 비-증식성 DR (NPDR), 또는 높은-고도 DR), 기타 허혈-관련된 망막증, ROP, 망막 정맥 폐쇄 (RVO) (예컨데, 중심형 (CRVO) 및 분기형 (BRVO)), CNV (예컨데, 근시성 CNV), 각막 혈관신생, 각막 혈관신생, 망막 혈관신생과 연합된 질환, 망막 혈관신생, 망막/맥락막 혈관신생과 연합된 질환, 병적 근시, 본 히펠-린다우 질환, 눈의 히스토플라스마증, FEVR, 코우츠 질환, 노리 질환, OPPG, 결막밑 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염 (RP), 고혈압 망막증, 망막 혈관종 확산, 황반 모세혈관확장증, 홍채 혈관신생, 안구내 혈관신생, 망막 변성, 포낭성 황반 부종 (CME), 맥관염, 부종, 망막염, 결막염 (예컨데, 감염성 결막염 및 비-감염성 (가령, 알레르기성) 결막염), 레베르 선천성 흑내장, 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염 (예컨데, 다춧점 맥락막염), 눈 히스토플라스마증, 다래끼, 건성안, 외상에 의한 눈 손상, 또는 쇼그렌 질환이다. 일부 경우에서, 상기 세포 증식성 장애는 암이다. 일부 경우에서, 상기 암은 유방암, 결장직장암, 비-소(small) 세포 폐암, 비-호지킨 림프종 (NHL), 신장암, 전립선암, 간암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 중피종, 또는 다발성 골수종이다. 또다른 측면에서, 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애를 치료하는데 이용되는 항-VEGF 항체가 제공된다. 일부 경우에서, 상기 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애는 뇌 종양과 연합된 부종, 악성과 연합된 복수, 메이그 증후군, 폐 염증, 신장 증후군, 위심(pericardial) 삼출, 늑막 삼출, 또는 심혈관 질환과 연합된 투과성이다.

[0375] 또다른 측면에서, 치료 방법에 사용되는 항-VEGF 항체를 제공한다. 또다른 측면에서, 치료 방법에 사용되는 항체 콘주게이트를 제공한다. 여전히 또다른 측면에서, 치료 방법에 사용되는 용합 단백질을 제공한다. 여전히 추가 측면에서, 치료 방법에 사용되는 중합체 제제를 제공한다. 일부 경우에서, 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 가진 대상을 치료하는 방법에 사용되는 항-VEGF 항체를 제공하는데, 이 방법은 상기 개체에게 유효량의 상기 항-VEGF 항체를 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 가진 대상을 치료하는 방법에 사용되는 항체 콘주게이트를 제공하는데, 이 방법은 상기 개체에게 유효량의 상기 항체 콘주게이트를 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 가진 대상을 치료하는 방법에 사용되는 용합 단백질을 제공하는데, 이 방법은 상기 개체에게 유효량의 상기 용합 단백질을 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 가진 대상을 치료하는 방법에 사용되는 중합체 제제를 제공하는데, 이 방법은 상기 개체에게 유효량의 상기 중합체 제제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 안구 장애는 AMD (예컨데, 습성 AMD, 건성 AMD, 중간 AMD, 진행된 AMD, 및 지도모양 망막위축 (GA)), 황반 변성, 황반 부종, DME (예컨데, 초점, 비-중심 DME 또는 확산, 중심-관련된 DME), 망막증, 당뇨병성 망막증 (DR) (예컨데, 증식성 DR (PDR), 비-증식성 DR (NPDR), 또는 높은-고도 DR), 기타 허혈-관련된 망막증, ROP, 망막 정맥 폐쇄 (RVO) (예컨데, 중심형 (CRVO) 및 분기형 (BRVO)), CNV (예컨데, 근시성 CNV), 각막 혈관신생, 각막 혈관신생, 망막 혈관신생과 연합된 질환, 망막 혈관신생, 망막/맥락막 혈관신생과 연합된 질환, 병적 근시, 본 히펠-린다우 질환, 눈의 히스토플라스마증, FEVR, 코우츠 질환, 노리 질환, OPPG, 결막밑 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염 (RP), 고혈압 망막증, 망막 혈관

중 확산, 황반 모세혈관확장증, 홍채 혈관신생, 안구내 혈관신생, 망막 변성, 포낭성 황반 부종 (CME), 맥관염, 부종, 망막염, 결막염 (예컨데, 감염성 결막염 및 비-감염성 (가령, 알레르기성) 결막염), 레베르 선천성 흑내장, 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염 (예컨데, 다춧점 맥락막염), 눈 히스토플라스마증, 다래끼, 건성안, 외상에 의한 눈 손상, 또는 쇼그렌 질환이다. 일부 경우에서, 상기 세포 증식성 장애는 암이다. 일부 경우에서, 상기 암은 유방암, 결장직장암, 비-소(small) 세포 폐암, 비-호지킨 림프종 (NHL), 신장암, 전립선암, 간암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 중피종, 또는 다발성 골수종이다.

[0376] 다른 경우에 있어서, 본 발명은 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애를 갖는 개체를 치료하는 방법에 사용되는 항-VEGF 항체를 제공한다. 일부 경우에서, 상기 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애는 뇌 종양과 연관된 부종, 악성과 연관된 복수, 메이그 증후군, 폐 염증, 신장 증후군, 위심(pericardial) 삼출, 늑막 삼출, 또는 심혈관 질환과 연관된 투과성이다. 진술한 임의의 용도는 유효량의 최소한 하나의 추가 치료제, 예를 들면, 하기에서 기술된 것들을 상기 개체에 투여하는 것을 더 포함할 수 있다.

[0377] 일부 경우에서, 본 발명은 대상에게서 혈관신생을 감소 또는 억제하는데 사용하기 위한 항-VEGF 항체를 제공한다. 또다른 측면에서, 대상에서 혈관신생을 감소 또는 억제하는데 사용하기 위한 항체 콘주게이트를 제공한다. 여전히 또다른 측면에서, 대상에서 혈관신생을 감소 또는 억제하는데 사용하기 위한 용합 단백질질을 제공한다. 여전히 추가 측면에서, 대상에서 혈관신생을 감소 또는 억제하는데 사용하기 위한 중합체 제제를 제공한다. 특정 구체예들에서, 본 발명은 대상에게서 혈관신생을 감소 또는 억제하는 방법에 사용하기 위한 항-VEGF 항체를 제공하는데, 이 방법은 혈관신생을 감소 또는 억제시키기 위하여 유효량의 상기 항-VEGF 항체를 상기 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 대상에게서 혈관신생을 감소 또는 억제하는 방법에 사용하기 위한 항체 콘주게이트를 제공하는데, 이 방법은 혈관신생을 감소 또는 억제시키기 위하여 유효량의 상기 항체 콘주게이트를 상기 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한 대상에게서 혈관신생을 감소 또는 억제하는 방법에 사용하기 위한 용합 단백질질을 제공하는데, 이 방법은 혈관신생을 감소 또는 억제시키기 위하여 유효량의 상기 용합 단백질질을 상기 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한 대상에게서 혈관신생을 감소 또는 억제하는 방법에 사용하기 위한 중합체 제제를 제공하는데, 이 방법은 혈관신생을 감소 또는 억제시키기 위하여 유효량의 상기 중합체 제제를 상기 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 다른 경우에 있어서, 본 발명은 대상에게서 맥관 투과성을 감소 또는 억제하는데 사용하기 위한 항-VEGF 항체를 제공한다. 특정 구체예들에서, 본 발명은 대상에게서 맥관 투과성을 감소 또는 억제하는데 사용하기 위한 항-VEGF 항체를 제공하는데, 이 방법은 맥관 투과성을 감소 또는 억제시키기 위하여 유효량의 상기 항-VEGF 항체를 상기 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 상기 용도 중 하나에 따른 "대상"은 인간일 수 있다.

[0378] 일부 경우에서, 본 발명은 대상에게서 자가면역 질환을 치료하는데 사용하기 위한 항-VEGF 항체를 제공한다. 일부 경우에서, 상기 자가면역 장애는 류마티스 관절염, 강직성 척수염, 건선성 관절염 및 크론 질환이다. 진술한 임의의 용도는 유효량의 최소한 하나의 추가 치료제, 예를 들면, 하기에서 기술된 것들을 상기 개체에 투여하는 것을 더 포함할 수 있다.

[0379] 본 발명은 약물의 제조 또는 준비에 있어서 항-VEGF 항체의 용도를 제공한다. 본 발명은 약물의 제조 또는 준비에 있어서 항체 콘주게이트의 용도를 또한 제공한다. 추가로, 본 발명은 약물의 제조 또는 준비에 있어서 용합 단백질의 용도를 제공한다. 본 발명은 약물의 제조 또는 준비에 있어서 중합체 제제의 용도를 또한 제공한다. 예를 들면, 한 경우에 있어서, 상기 약물은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애의 치료용 약물이다. 추가 경우에서, 상기 약물은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 치료하는 방법에 사용되는 약물인데, 이 방법은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 가진 대상에게 상기 약물의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 안구 장애는 AMD (예컨데, 습성 AMD, 건성 AMD, 중간 AMD, 진행된 AMD, 및 지도모양 망막위축 (GA)), 황반 변성, 황반 부종, DME (예컨데, 초점, 비-중심 DME 또는 확산, 중심-관련된 DME), 망막증, 당뇨병성 망막증 (DR) (예컨데, 증식성 DR (PDR), 비-증식성 DR (NPDR), 또는 높은-고도 DR), 기타 허혈-관련된 망막증, ROP, 망막 정맥 폐쇄 (RVO) (예컨데, 중심형 (CRVO) 및 분기형 (BRVO)), CNV (예컨데, 근시성 CNV), 각막 혈관신생, 각막 혈관신생, 망막 혈관신생과 연관된 질환, 망막 혈관신생, 망막/맥락막 혈관신생과 연관된 질환, 병적 근시, 본 히펠-린다우 질환, 눈의 히스토플라스마증, FEVR, 코우츠 질환, 노리 질환, OPPG, 결막밑 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염 (RP), 고혈압 망막증, 망막 혈관종 확산, 황반 모세혈관확장증, 홍채 혈관신생, 안구내 혈관신생, 망막 변성, 포낭성 황반 부종 (CME), 맥관염, 부종, 망막염, 결막염 (예컨데, 감염성 결막염 및 비-감염성 (가령, 알레르기성) 결막염), 레베르 선천성 흑내장, 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염 (예컨데, 다춧점 맥락막염), 눈 히스토플라스마증, 다래끼, 건성안, 외상에 의한 눈 손상, 또는 쇼그렌 질환이다. 일부 경우에서, 상기 세포 증식성 장애는 암이다. 일부

경우에서, 상기 암은 유방암, 결장직장암, 비-소(small) 세포 폐암, 비-호지킨 림프종 (NHL), 신장암, 전립선암, 간암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 중피종, 또는 다발성 골수종이다. 추가의 예에서, 약제는 대상에서 혈관 신생을 감소 또는 억제하기 위한 것이다. 추가 경우에서, 상기 약물은 대상에게서 혈관신생을 감소 또는 억제하는 방법에 사용하기 위한 용도이며, 이 방법은 혈관신생을 감소 또는 억제시키기 위하여 유효량의 약물을 상기 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 전술한 임의의 약물의 용도에서, 상기 방법은 유효량의 최소한 하나의 추가 치료제, 예를 들면, 하기에서 기술된 것들을 상기 개체에 투여하는 것을 더 포함할 수 있다.

[0380] 또다른 경우에서, 상기 약물은 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애의 치료용 약물이다. 일부 경우에서, 상기 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애는 뇌 종양과 연합된 부종, 악성과 연합된 복수, 메이그 증후군, 폐 염증, 신장 증후군, 위심(pericardial) 삼출, 늑막 삼출, 또는 심혈관 질환과 연합된 투과성이다. 추가 경우에서, 상기 약물은 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애를 치료하는 방법에 사용되는 약물인데, 이 방법은 바람직하지 않은 맥관 투과성을 가진 대상에게 상기 약물의 유효량을 투여하는 것을 포함한다.

또다른 경우에서, 상기 약물은 대상에서 맥관 투과성을 감소 또는 억제하기 위한 것이다. 추가 경우에서, 상기 약물은 대상에게서 맥관 투과성을 감소 또는 억제하는 방법에 사용하기 위한 용도이며, 이 방법은 맥관 투과성을 감소 또는 억제시키기 위하여 유효량의 약물을 상기 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 전술한 임의의 약물의 용도에서, 상기 방법은 유효량의 최소한 하나의 추가 치료제, 예를 들면, 하기에서 기술된 것들을 상기 대상에게 투여하는 것을 더 포함할 수 있다. 상기 용도 중 하나에 따른 "대상"은 인간일 수 있다.

[0381] 또다른 경우에서, 상기 약물은 자가면역 장애 치료용 약물이다. 일부 경우에서, 상기 자가면역 장애는 류마티스 관절염, 강직성 척수염, 건선성 관절염 및 크론 질환이다. 추가 경우에서, 상기 약물은 자가면역 장애 치료 방법에 용도를 가지며, 이 방법은 자가면역 장애를 가진 대상에게 유효량의 상기 약물을 투여하는 것을 포함한다. 상기 용도 중 하나에 따른 "대상"은 인간일 수 있다.

[0382] 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 상기 방법은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 갖는 개체에 유효량의 항-VEGF 항체를 투여하는 것을 포함한다. 또다른 실시예에서, 상기 방법은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 갖는 대상에게 유효량의 항체 콘주게이트를 투여하는 것을 포함한다. 여전히 또다른 실시예에서, 상기 방법은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 갖는 대상에게 유효량의 용합 단백질을 투여하는 것을 포함한다. 여전히 또다른 실시예에서, 상기 방법은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 갖는 대상에게 유효량의 중합체 제제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 안구 장애는 AMD (예컨데, 습성 AMD, 건성 AMD, 중간 AMD, 진행된 AMD, 및 지도모양 망막위축 (GA)), 황반 변성, 황반 부종, DME (예컨데, 초점, 비-중심 DME 또는 확산, 중심-관련된 DME), 망막증, 당뇨병성 망막증 (DR) (예컨데, 증식성 DR (PDR), 비-증식성 DR (NPDR), 또는 높은-고도 DR), 기타 허혈-관련된 망막증, ROP, 망막 정맥 폐쇄 (RVO) (예컨데, 중심형 (CRVO) 및 분기형 (BRVO)), CNV (예컨데, 근시성 CNV), 각막 혈관신생, 각막 혈관신생, 망막 혈관신생과 연합된 질환, 망막 혈관신생, 망막/맥락막 혈관신생과 연합된 질환, 병적 근시, 본 히펠-런다우 질환, 눈의 히스토플라스마증, FEVR, 코우츠 질환, 노리 질환, OPPG, 결막출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염 (RP), 고혈압 망막증, 망막 혈관종 확산, 황반 모세혈관확장증, 홍채 혈관신생, 안구내 혈관신생, 망막 변성, 포낭성 황반 부종 (CME), 맥관염, 부종, 망막염, 결막염 (예컨데, 감염성 결막염 및 비-감염성 (가령, 알레르기성) 결막염), 레베르 선천성 흑내장, 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염 (예컨데, 다춧집 맥락막염), 눈 히스토플라스마증, 다래끼, 건성안, 외상에 의한 눈 손상, 또는 쇼그렌 질환이다. 일부 경우에서, 상기 세포 증식성 장애는 암이다. 일부 경우에서, 상기 암은 유방암, 결장직장암, 비-소(small) 세포 폐암, 비-호지킨 림프종 (NHL), 신장암, 전립선암, 간암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 중피종, 또는 다발성 골수종이다. 추가 경우에서, 상기 방법은 유효량의 최소한 하나의 추가 치료제, 예를 들면, 하기에서 기술된 것들을 상기 개체에 투여하는 것을 더 포함한다. 상기 방법 중 하나에 따른 "대상"은 인간일 수 있다.

[0383] 본 발명은 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 상기 방법은 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애를 갖는 개체에 유효량의 항-VEGF 항체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 바람직하지 않은 맥관 투과성과 관련된 장애는 뇌 종양과 연합된 부종, 악성과 연합된 복수, 메이그 증후군, 폐 염증, 신장 증후군, 위심(pericardial) 삼출, 늑막 삼출, 또는 심혈관 질환과 연합된 투과성이다. 추가 경우에서, 상기 방법은 유효량의 최소한 하나의 추가 치료제, 예를 들면, 하기에서 기술된 것들을 상기 개체에 투여하는 것을 더 포함한다. 상기 방법 중 하나에 따른 "대상"은 인간일 수 있다.

[0384] 상기 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 용합 단백질, 또는 중합체 제제는 포유류 치료에 이용될 수

있다는 것도 고려된다. 한 구체예에서, 상기 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 중합체 제제는 예를 들면, 전임상 데이터를 획득하는 목적으로 인간이 아닌 포유류에 투여된다. 치료 될 인간이 아닌 포유류의 예로는 비-인간 영장류, 개, 고양이, 설치류 (예: 마우스 및 랫) 및 전임상 연구가 수행되는 다른 포유류가 포함된다. 이러한 포유류는 항체로 치료할 질병에 대한 확립된 동물 모델일 수 있거나, 또는 관심 항체의 독성 또는 약물 동력학을 연구하는데 사용될 수 있다. 이들의 각 구체예에서, 포유류에서 용량 증가 연구를 수행할 수 있다. 항체는 예를 들어, 고품 종양 모델의 숙주 설치류에 투여될 수 있다. 상기 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 중합체 제제는 안구 약동학 연구를 위하여, 예를 들면, 유리체내 투여 (예컨대, 유리체내 주사) 또는 포트 운반 장치를 이용하여 숙주(예컨대, 설치류, 예컨대, 토끼)에게 투여될 수 있다.

[0385] 추가 측면에서, 본 발명은 전술한 임의의 치료 방법에 사용하기 위하여, 본원에서 제공되는 임의의 항-VEGF 항체, 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제가 포함된 약학 제제를 제공한다. 한 구체예에서, 약학 제제는 본원에서 제공되는 임의의 상기 항-VEGF 항체, 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제 그리고 약학적으로 수용가능한 운반체를 포함한다. 또다른 구체예에서, 약학 제제는 본원에서 제공되는 임의의 상기 항-VEGF 항체, 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제 그리고 예를 들면, 하기에서 설명되는 최소한 하나의 추가 치료제를 포함한다. 특정 구체예들에서, 상기 약학 제제는 하나 또는 그 이상의 추가 화합물을 포함한다. 특정 구체예들에서, 상기 추가 화합물은 다음으로 구성된 군에서 선택된 제 2의 생물학적 분자에 결합한다: IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; 양지오포이에틴; Ang2; Tie2; SIP; 인테그린 $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 5, 및 α 5 β 1; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트로포이에틴; 보체 인자 D; TNF α ; HtrA1; VEGF 수용체; ST-2 수용체; 그리고 노인성 황반 변성 (AMD) 위험에 유전적으로 연계된 단백질, 이를 테면, 보체 경로 구성요소 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a, 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; 인터루킨-8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1; 그리고 TNFRSF10A. 특정 구체예들에서, 상기 추가 화합물은 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 이중특이적 항체 (예컨대, 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체, 이를 테면, RG-7716 또는 WO 2010/069532 또는 WO 2016/073157에서 기술된 임의의 이중특이적 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체 또는 이의 변이체다. 또다른 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 항-IL-6 항체, 예를 들면, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics; 예컨대, WO 2016/073890 참고), 실투시마브 (SYLVANT®), 오로키주마브, 클라자키주마브, 시루쿠마브, 엘시리모마브, 케릴립주마브, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921, 또는 이의 변이체다. 여전히 추가 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 항-IL-6R 항체, 예를 들면, 토셀리주마브 (ACTEMRA®) (예컨대, WO 1992/019579 참고), 사리루마브, 보바릴리주마브 (ALX-0061), SA-237, 또는 이의 변이체다.

[0386] 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 중합체 제제는 치료법에서 단독으로 이용될 수 있고 또는 다른 물질과 복합되어 이용될 수 있다. 예로써, 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제는 최소한 하나의 추가 치료 물질과 공동-투여될 수 있다. 특정 구체예들에서, 추가 치료제는 또다른 항체, 화학치료제, 세포독성 물질, 항-혈관신생 물질, 면역억제 물질, 프로드럭, 사이토킨, 사이토킨 항진제, 세포독성 방사능요법, 코르티코스테로이드, 항-구토제, 암 백신, 진통제, 성장-억제 물질, 또는 이의 조합이다.

[0387] 예를 들면, 특정 구체예들에서, 임의의 전술한 방법은 하나 또는 그 이상의 추가 화합물을 투여하는 것을 더 포함한다. 특정 구체예들에서, 상기 항-VEGF 항체, 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 중합체 제제는 상기 추가 화합물(들)과 동시에 투여된다. 특정 구체예들에서, 상기 항-VEGF 항체, 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 중합체 제제는 상기 추가 화합물(들) 투여 전 또는 후에 투여된다. 특정 구체예들에서, 상기 추가 화합물은 다음으로 구성된 군에서 선택된 제 2의 생물학적 분자에 결합한다: IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; 양지오포이에틴; Ang2; Tie2; SIP; 인테그린 $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 5, 및 α 5 β 1; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트로포이에틴; 보체 인자 D; TNF α ; HtrA1; VEGF 수용체; ST-2 수용체; 그리고 AMD 위험에 유전적으로 연계된 단백질, 이를 테면, 보체 경로 구성요소 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a, 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; 인터루킨-8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; 그리고 TNFRSF10A. 특정 구체예들에서, 상기 추가 화합물은 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 상기 구체예에 따른(또는 이에 적용되는) 특정 구체예들에서, 상기 안구 장애는 증식성 망막증, 맥락막 혈관신생 (CNV), 노인성 황반 변성 (AMD), 당뇨병 및 기타 허혈-관련된 망막증, 당뇨병성 황반 부종, 병리학적인 근시, 본 허펠-린다우 질환, 눈의 히스토플라스마증, CRVO 및 BRVO를 포함하는 망막 정맥 폐쇄 (RVO), 각막 혈관신생, 망막 혈관신생, 그리고 미숙아 망막증 (ROP)으로 구성된 군에서 선택된 안구내 신생혈관 질환이다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 이중특이적 항체 (예컨대, 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체, 이를 테면, RG-7716 또는 WO 2010/069532 또는

WO 2016/073157에서 기술된 임의의 이중특이적 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체 또는 이의 변이체다. 또다른 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 항-IL-6 항체, 예를 들면, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics; 예컨대, WO 2016/073890 참고), 실투시마브 (SYLVANT®), 오로키주마브, 클라자키주마브, 시루쿠마브, 엘시리모 마브, 케틸림주마브, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921, 또는 이의 변이체다. 여전히 추가 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 항-IL-6R 항체, 예를 들면, 토셀리주마브 (ACTEMRA®) (예컨대, WO 1992/019579 참고), 사리루마브, 보바릴리주마브 (ALX-0061), SA-237, 또는 이의 변이체다.

[0388] 일부 경우에서, 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제는 안구 장애, 예를 들면, 본원에서 기술된 안구 장애 (예컨대, AMD (예컨대, 습성 AMD), DME, DR, 또는 RVO) 치료를 위한 최소한 하나의 추가 치료제와 복합 투여될 수 있다. 안구 장애 치료용 복합 요법의 예시적인 추가 치료제는 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: 항-혈관신생 물질, 이를 테면, 예를 들면, 항-VEGF 항체 (예컨대, 상기 항-VEGF Fab LUCENTIS® (라니비주마브))를 포함하는 VEGF 항진제, 가용성 수용체 융합 단백질 (예컨대, 재조합 가용성 수용체 융합 단백질 EYLEA® (아플리베르셉트, VEGF Trap Eye으로도 공지됨; Regeneron/Aventis)), 압타머 (예컨대, 상기 항-VEGF 폐길화된 압타머 MACUGEN® (폐갑타니브 나트륨; NeXstar Pharmaceuticals/OSI Pharmaceuticals)), 그리고 VEGFR 티로신 키나제 억제제 (예컨대, 4-(4-브로모-2-플루오로아닐로)-6-메톡시-7-(1-메틸피페리딘-4-일메톡시)퀴나졸린 (ZD6474), 4-(4-플루오로-2-메틸인돌-5-일옥시)-6-메톡시-7-(3-피롤리딘-1-일프로폭시)퀴나졸린 (AZD2171), 바탈라니브 (PTK787), 세막스아미니브 (SU5416; SUGEN), 그리고 SUTENT® (수니티니브)); 트립토판닐-tRNA 합성효소 (TrpRS); 스쿠알라민; RETAANE® (테포우 현탁액을 위한 아네코르타브 (anecortave) 아세테이트; Alcon, Inc.); 콤브레스타틴 (Combretastatin) A4 프로드럭 (CA4P); MIFEPREX® (미페프리스톤-ru486); 수브테논 트리암씨놀론 아세토니드; 유리체내 결정 트리암씨놀론 아세토니드; 매트릭스 메탈로프로테아제 억제제 (예컨대, 프리노마스타트 (Prinomastat) (AG3340; Pfizer)); 플루씨놀론 아세토니드 (플루씨놀론 안구내 임플란트 포함; Bausch & Lomb/Control Delivery Systems); 리노미드; 인테그린 β3 기능 억제제; 양지오스테틴, 및 이의 조합. 본 발명의 항체와 조합하여 투여되는 이들 치료제 및 기타 치료제들은 예를 들면, U.S. 특허 출원 번호 US 2014/0017244, (이는 전문이 본원 참고자료에 편입됨)에서 기술된다.

[0389] 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제와 조합하여 안구 장애 (예컨대, AMD, DME, DR, 또는 RVO) 치료에 이용될 수 있는 추가 치료제의 추가 예로는 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: VISUDYNE® (베르테포르핀; 비-열 레이저와 함께 광역학 치료에 전형적으로 병용되는 광-활성 화 약물), PKC412, Endovion (NS 3728; NeuroSearch A/S), 신경영양성 인자 (예컨대, 신경교 유래된 신경영양성 인자 (GDNF) 및 섬모의 신경영양성 인자 (CNTF)), 딜티아젠프, 도르코라미드, PHOTOTROP®, 9-cis-망막, 눈 약물 (예컨대, 포스포린 요오드화물, 에초티오페이트, 또는 카르보닉 안하이드라제 억제제), 베오바스테트 (AE-941; AEterna Laboratories, Inc.), Sirna-027 (AGF-745; Sima Therapeutics, Inc.), 뉴로트로핀 (실시예에서는 오직, NT-4/5, Genentech을 포함), Cand5 (Acuity Pharmaceuticals), INS-37217 (Inspire Pharmaceuticals), 인테그린 항진제 (Jerini AG 및 Abbott Laboratories의 것들 포함), EG-3306 (Ark Therapeutics Ltd.), BDM-E (BioDiem Ltd.), 탈리도미드 (예를 들면, EntreMed, Inc.에서 이용된 바와 같이), 카르디오토로핀-1 (Genentech), 2-메톡시에스트라디올 (Allergan/Oculex), DL-8234 (Toray Industries), NTC-200 (Neurotech), 테트라티오몰리데이트 (University of Michigan), LYN-002 (Lynkeus Biotech), 마이크로알갈 화합물 (Aquasearch/Albany, Mera Pharmaceuticals), D-9120 (Celltech 그룹 plc), ATX-S10 (Hamamatsu Photonics), TGF-베타 2 (Genzyme/Celtrix), 티로신 키나제 억제제 (예컨대, Allergan, SUGEN, 또는 Pfizer의 것들), NX-278-L (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), Opt-24 (OPTIS France SA), 망막 세포 강글리온 신경보호제 (Cogent Neurosciences), N-니트로피라졸 유도체들 (Texas A&M University System), KP-102 (Krenitsky Pharmaceuticals), 사이클로스포린 A, 광역학 치료에 이용된 치료제 (예컨대, VISUDYNE®; 수용체-표적화된 PDT, Bristol-Myers Squibb, Co.; PDT와 함께 주사를 위한 폴리히머 나트륨; 베르테포르핀, QLT Inc.; PDT와 함께 로스타포르핀, Miravent Medical Technologies; PDT와 함께 탈라포르핀 나트륨, Nippon Petroleum; 그리고 모텍사핀 루테티움, Pharmacyclics, Inc.), 안티센스 올리고뉴클레오티드 (실시예로써, Novagali Pharma SA and ISIS-13650, Isis Pharmaceuticals에서 테스트된 산물들), 및 이들의 조합.

[0390] 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제는 예를 들면, 레이저 광응고술 (가령, 범망막 광응고술 (PRP)), 드루젠 레이저 수술, 황반 공 수술, 황반 변위 수술, 이식가능한 소형 망원경, PHI-운동 혈관 조영술 (마이크로-레이저 치료 및 피더 (feeder) 혈관 치료라고도 함), 양성자 빔 요법, 미세자극 치료, 망막 박리 및 유리체 수술, 공막죄임술 (scleral buckle), 황반하 (submacular) 수술, 동공통과 열치료, 광계 (photosystem) I 치료법, RNA 간섭 (RNAi) 이용, 체외 레오프레시스 (extracorporeal rheopheresis) (차등 여과 및 레오테라피 (rheotherapy)로도 알려져 있음), 마이크로칩 이식, 줄기 세포 요법, 유전자 대체 요법, 리보

자임 유전자 요법(저산소 반응 요소에 대한 유전자 치료 포함, Oxford Biomedica, Lentipak, Genetix, PDEF 유전자 치료, GenVec), 광 수용체/망막 세포 이식(이식가능한 망막 상피 세포 포함, Diacrin, Inc.; 망막 세포 이식, Cell Genesys, Inc.), 침술 및 이들의 조합을 포함하는, 안구 장애(예컨데, AMD, DME, DR, 또는 RVO)의 치료를 위한 요법 또는 외과술 과정에 복합되어 투여될 수 있다.

[0391] 일부 경우에서, 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제는 안구 장애(예컨데, AMD, DME, DR, 또는 RVO) 치료를 위한 항-혈관신생 물질과 조합되어 투여될 수 있다. Carmeliet et al. *Nature* 407:249-257, 2000.에 열거된 것들을 포함하나, 이에 국한되지 않는 임의의 적합한 항-혈관신생 물질이 본 발명의 항체와 조합되어 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 항-혈관신생 물질은 항-VEGF 항체(예컨데, 상기 항-VEGF Fab LUCENTIS®(라니비주마브), RTH-258(기존에 ESBA-1008, 항-VEGF 단일-쇄 항체 단편; Novartis), 또는 이중특이적 항-VEGF 항체(예컨데, 항-VEGF/항-앙지오포에틴 2 이중특이적 항체 이를 테면, RG-7716; Roche)), 가용성 재조합 수용체 융합 단백질(예컨데, EYLEA®(아플리베르셉트)), VEGF 변이체, 가용성 VEGFR 단편, VEGF(예컨데, 페갑타니브) 또는 VEGFR를 차단할 수 있는 압타머, 중화 항-VEGFR 항체, VEGFR의 소분자 억제제, 티로신 키나제, 항-VEGF DARPin®(예컨데, 아비시파르 페골), VEGF 또는 VEGFR의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNAs, VEGFR 티로신 키나제 억제제(예컨데, 4-(4-브로모-2-플루오로아닐로)-6-메톡시-7-(1-메틸피페리딘-4-일메톡시)퀴나졸린(ZD6474), 4-(4-플루오로-2-메틸인돌-5-일옥시)-6-메톡시-7-(3-피롤리딘-1-일프로폭시)퀴나졸린(AZD2171), 바탈라니브(PTK787), 세막스아미니브(SU5416; SUGEN), 및 SUTENT®(수니티니브)), 및 이의 조합을 포함하나, 이에 국한되지 않는 VEGF 항진제이다. 일부 경우에서, 상기 이중특이적 항-VEGF 항체는 IL-1β; IL-6; IL-6R; PDGF(예컨데, PDGF-BB); 앙지오포이에틴; 앙지오포이에틴 2; Tie2; S1P; 인테그린 αvβ3, αvβ5, 및 α5β1; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트로포이에틴; 보체 인자 D; TNF α; HtrA1; VEGF 수용체(예컨데, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR, 또는 sVEGFR); ST-2 수용체; 그리고 노인성 황반 변성(AMD) 위험에 유전적으로 연계된 단백질, 이를 테면, 보체 경로 구성요소 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a, 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; 그리고 TNFRSF10A를 포함하나, 이에 국한되지 않는 제 2의 생물학적 분자에 결합한다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 이중특이적 항체(예컨데, 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체, 이를 테면, RG-7716 또는 WO 2010/069532 또는 WO 2016/073157에서 기술된 임의의 이중특이적 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체 또는 이의 변이체).

[0392] 안구 장애(예컨데, AMD, DME, DR, 또는 RVO) 치료를 위하여 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제와 복합되어 투여될 수 있는 적합한 항-혈관신생 물질은 코르티코스테로이드, 혈관신생억제제 스테로이드, 아네코르타브 아세테이트, 앙지오스테틴, 엔도스테틴, 티로신 키나제 억제제, 매트릭스 메탈로프로테나제(MMP) 억제제, 인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 3(IGFBP3), 기질 유래된 인자(SDF-1) 항진제(예컨데, 항-SDF-1 항체), 색소 상피-유래된 인자(PEDF), 감마-세크레타제, 델타-유사 리간드 4, 인테그린 항진제, 저산소증-유도성 인자(HIF)-1α 항진제, 단백질 키나제 CK2 항진제, 혈관신생 부위로 귀화하는 줄기세포(예컨데, 내피 전구 세포)를 억제하는 물질(예컨데, 항-맥관 내피 캐드헤린(CD-144) 항체 및/또는 항-SDF-1 항체), 및 이의 조합을 포함한다.

[0393] 추가 실시예에서, 일부 경우에서, 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제는 안구 장애(예컨데, AMD, DME, DR, 또는 RVO) 치료를 위하여 혈관 신생에 저항 활성을 갖는 물질, 이를 테면, 항-염증성 약물, 포유류 표적의 라파마이신(mTOR) 억제제(예컨데, 라파마이신, AFINITOR®(에베로리무스), 그리고 TORISEL®(탐시로리무스)), 사이클로스포린, 종양 괴사 인자(TNF) 항진제(예컨데, 항-TNF α 항체 또는 이의 항원-결합 단편(예컨데, 인플리시마브, 아달리우마브, 쉐르토리주마브 페골, 및 골리우마브) 또는 가용성 수용체 융합 단백질(예컨데, 에타네르셉트)), 항-보체 물질, 비스테로이드성 항염증성 물질(NSAID), 또는 이의 조합과 복합되어 투여될 수 있다.

[0394] 추가 실시예에서, 일부 경우에서, 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제는 건성 AMD에서 습성 AMD로 진행을 잠재적으로 감소시킬 수 있고, 신경보호성인 물질, 이를 테면, 소위 "뉴로스테로이드(neurosteroids)"라고 불리는 약물 부류, 이를 테면, 데히드로에피안드로스테론(DHEA)(상표명: PRASTERA™ 및 FIDELIN®), 데히드로에피안드로스테론 술페이트, 및 프레그네노론 술페이트과 함께 복합 투여될 수 있다.

[0395] 임의의 적합한 AMD 치료제는 안구 장애(예컨데, AMD, DME, DR, 또는 RVO) 치료를 위하여 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제와 복합되어, 추가 치료제로 투여될 수 있는데, 이들은 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: VEGF 항진제, 예를 들면, 항-VEGF 항체(예컨데, LUCENTIS®(라니

비주마브), RTH-258 (기존에 ESBA-1008, 항-VEGF 단일-쇄 항체 단편; Novartis), 또는 이중특이적 항-VEGF 항체 (예컨데, 항-VEGF/항-양지오포에틴 2 이중특이적 항체 이를 테면, RG-7716; Roche), 가용성 VEGF 수용체 융합 단백질 (예컨데, EYLEA® (아플리베르셉트)), 항-VEGF DARPin® (예컨데, 아비시파르 페골; Molecular Partners AG/Allergan), 또는 항-VEGF 압타머 (가령, MACUGEN® (폐갑타니브 나트륨)); 혈소판-유래된 성장 인자 (PDGF) 항진제, 예를 들면, 항-PDGF 항체, 항-PDGFR 항체 (예컨데, REGN2176-3), 항-PDGF-BB 폐길화된 압타머 (예컨데, FOVISTA®; Ophthotech/Novartis), 가용성 PDGFR 수용체 융합 단백질, 또는 이중 PDGF/VEGF 항진제 (예컨데, 소 분자 억제제 (예컨데, DE-120 (Santen) 또는 X-82 (TyrogeneX)) 또는 이중특이적 항-PDGF/항-VEGF 항체)); 광역학 요법과 조합하여 VISUDYNE® (베르테포르핀); 항산화제; 보체계 항진제, 예를 들면, 보체 인자 C5 항진제 (예컨데, 소 분자 억제제 (예컨데, ARC-1905; Ophthotech) 또는 항-C5 항체 (예컨데, LFG-316; Novartis), 프로페르딘 항진제 (예컨데, 항-프로페르딘 항체, 예컨데, CLG-561; Alcon), 또는 보체 인자 D 항진제 (예컨데, 항-보체 인자 D 항체, 가령, 람팔리주마브; Roche)); 시각 주시 변형제(visual cycle modifier) (예컨데, 에미수스타트 히드로클로라이드); 스쿠알라민 (예컨데, OHR-102; Ohr Pharmaceutical); 비타민 및 미네랄 보충제 (예컨데, 노화-관련된 안과 질환 연구 1에서 기술된 것들 (AREDS1; 아연 및/또는 항산화제) 및 연구 2 (AREDS2; 아연, 항산화제, 루테인, 제약사틴, 및/또는 오메가-3 지방산)); 세포-기반의 요법, 예를 들면, NT-501 (Renexus); PH-05206388 (Pfizer), huCNS-SC 세포 이식 (StemCells), CNTO-2476 (Janssen), OpRegen (Cell Cure Neurosciences), 또는 MA09-hRPE 세포 이식 (Ocata Therapeutics); 조직 인자 항진제 (예컨데, hIcon1; Iconic Therapeutics); 알파-안드레날린 수용체 항진제 (가령, 브리모니딘 타르트레이트); 켈티드 백신 (예컨데, S-646240; Shionogi); 아밀로이드 베타 항진제 (예컨데, 항-베타 아밀로이드 단일클론 항체, 예컨데, GSK-933776); S1P 항진제 (예컨데, 항-S1P 항체, 예컨데, iSONEP™; Lpath Inc); ROBO4 항진제 (예컨데, 항-ROBO4 항체, 예컨데, DS-7080a; Daiichi Sankyo); 엔도스테틴 및 양지오스테틴 (예컨데, RetinoStat)을 발현시키는 렌티바이러스 벡터; 그리고 임의의 이들의 조합. 일부 경우에서, AMD 치료제 (임의의 전술한 AMD 치료제 포함)는 공동-제형화될 수 있다. 예를 들면, 상기 항-PDGFR 항체 REGN2176-3은 아플리베르셉트 (EYLEA®)와 공동-제형화될 수 있다. 일부 경우에서, 이러한 공동-제제는 본 발명의 항체와 조합하여 투여될 수 있다. 일부 경우에서, 상기 안구 장애는 AMD (예컨데, 습성 AMD)이다.

[0396] 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제는 안구 장애 (예컨데, AMD, DME, DR, 또는 RVO)의 치료를 위하여 LUCENTIS® (라니비주마브)와 조합하여 투여될 수 있다. LUCENTIS® (라니비주마브)는 예를 들면, 매달 0.3 mg/눈 또는 0.5 mg/눈의 수준에서 유리체내 주사를 투여하여 투여될 수 있다. 일부 경우에서, 상기 안구 장애는 AMD (예컨데, 습성 AMD)이다.

[0397] 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제는 안구 장애 (예컨데, AMD, DME, DR, 또는 RVO)의 치료를 위하여 EYLEA® (아플리베르셉트)와 조합하여 투여될 수 있다. EYLEA® (아플리베르셉트)는 예를 들면, 2 mg/눈의 수준으로 예를 들면, 매 4 주 (Q4W), 또는 첫 3개월 동안 Q4W, 이어서 유지를 위하여 2달에 한번씩 주사에 의해, 유리체내 주사에 의해 투여될 수 있다. 일부 경우에서, 상기 안구 장애는 AMD (예컨데, 습성 AMD)이다.

[0398] 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제는 안구 장애 (예컨데, AMD, DME, DR, 또는 RVO)의 치료를 위하여 MACUGEN® (폐갑타니브 나트륨)와 조합하여 투여될 수 있다. MACUGEN® (폐갑타니브 나트륨)는 예를 들면, 0.3 mg/눈의 수준으로 유리체내 주사에 의해 6주 마다 투여될 수 있다. 일부 경우에서, 상기 안구 장애는 AMD (예컨데, 습성 AMD)이다.

[0399] 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제는 안구 장애 (예컨데, AMD, DME, DR, 또는 RVO)의 치료를 위하여 VISUDYNE® (베르테포르핀)와 조합하여 투여될 수 있다. VISUDYNE®는 임의의 적합한 투여분량(dose) (예컨데, 신체 표면적 당 6 mg/m²)으로 주입에 의해 정맥내로, 그리고 3개월 마다 1회씩 (예컨데, 10 분에 걸쳐 주입) 투여될 수 있다. 일부 경우에서, 상기 안구 장애는 AMD (예컨데, 습성 AMD)이다.

[0400] 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제는 안구 장애 (예컨데, AMD, DME, DR, 또는 RVO)의 치료를 위하여 PDGF 항진제와 조합하여 투여될 수 있다. 본 발명의 항체와 조합되어 이용될 수 있는 예시적인 PDGF 항진제는 항-PDGF 항체, 항-PDGFR 항체, 소 분자 억제제 (예컨데, 스쿠알라민), 항-PDGF-B 폐길화된 압타머 이를 테면, FOVISTA® (E10030; Ophthotech/Novartis), 또는 이중 PDGF/VEGF 항진제 (예컨데, 소 분자 억제제 (예컨데, DE-120 (Santen) 또는 X-82 (TyrogeneX)) 또는 이중특이적 항-PDGF/항-VEGF 항체)를 포함한다. 예를 들면, FOVISTA®는 본 발명의 항체에 보완 요법(adjunct therapy)으로 투여될 수

있다. FOVISTA®는 임의의 적합한 투여분량, 예를 들면, 0.1 mg/눈 내지 2.5 mg/눈, 예컨대, 0.3 mg/눈 또는 1.5 mg/눈의 수준이 예를 들면, 유리체내 주사에 의해, 예를 들면 4주 마다 (Q4W) 투여될 수 있다. OHR-102 (스쿠알라민 락테이트 안과 용액, 0.2%)은 안약으로, 예를 들면, 매일 2회 투여될 수 있다. OHR-102는 VEGF 항진제 이틀 테면, LUCENTIS® 또는 EYLEA®와 조합하여 투여될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 항체는 OHR-102, LUCENTIS®, 및/또는 EYLEA®와 조합하여 투여될 수 있다. 일부 경우에서, 상기 안구 장애는 AMD (예컨대, 습성 AMD)이다.

[0401] 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제, 안구 장애 (예컨대, AMD, DME, DR, 또는 RVO)의 치료를 위하여 RTH-258 와 조합하여 투여될 수 있다. RTH-258는 예를 들면, 유리체내 주사에 의해 또는 눈 주입에 의해 투여될 수 있다. 유리체내 주사의 경우, RTH-258은 임의의 적합한 투여분량 (예컨대, 3 mg/눈 또는 6 mg/눈)을 예를 들면, 로딩으로 첫 3개월 동안 4주 마다 1회 (Q4W), 그리고 이어서 유지를 위하여 12주 마다 (Q12W) 또는 8주 마다 (Q8W) 주사에 의해 투여될 수 있다. 일부 경우에서, 상기 안구 장애는 AMD (예컨대, 습성 AMD)이다.

[0402] 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제, 안구 장애 (예컨대, AMD, DME, DR, 또는 RVO)의 치료를 위하여 아비시파르 페골과 조합하여 투여될 수 있다. 아비시파르 페골은 유리체내 주사에 의해 투여될 수 있다. 아비시파르 페골은 예를 들면, 로딩으로써 첫 3개월 동안 4주 마다 1회 (Q4W) 씩 적합한 투여분량 (예컨대, 1 mg/눈, 2 mg/눈, 3 mg/눈, 4 mg/눈, 또는 4.2 mg/눈)으로, 그리고 이어서 유지를 위하여 12주 마다 (Q12W) 또는 8주 마다 (Q8W) 주사에 의해 투여된다. 일부 경우에서, 상기 안구 장애는 AMD (예컨대, 습성 AMD)이다.

[0403] 안구 장애 (예컨대, AMD, DME, DR, 또는 RVO)를 위하여 임의의 적합한 DME 및/또는 DR 치료제는 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제와 복합되어 투여될 수 있는데, 여기에는 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: VEGF 항진제 (예컨대, LUCENTIS® or EYLEA®), 코르티코스테로이드 (예컨대, 코르티코스테로이드 임플란트 (예컨대, OZURDEX® (텍사메타손 유리체내 임플란트) 또는 ILUVIEN® (플루오시놀론 아세토니드 유리체내 임플란트)) 또는 투여 유리체내 주사용으로 제형화된 코르티코스테로이드 (예컨대, 트리암시놀론 아세토니드)), 또는 이의 조합. 일부 경우에서, 상기 안구 장애는 DME 및/또는 DR이다.

[0404] 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제는 DME 및/또는 DR (예컨대, NPDR 또는 PDR)의 치료를 위하여 LUCENTIS® (라니비주마브) 와 조합하여 투여될 수 있다. LUCENTIS® (라니비주마브)는 0.3 mg/눈 또는 0.5 mg/눈의 수준으로 유리체내 주사에 의해, 예를 들면, 4주 마다 (Q4W) 투여될 수 있다.

[0405] 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제는 DME 및/또는 DR (예컨대, NPDR 또는 PDR)의 치료를 위하여 EYLEA® (아플리베르셉트) 와 조합하여 투여될 수 있다. EYLEA® (아플리베르셉트)는 예를 들면, 2 mg/눈의 수준으로 예를 들면, 매 4 주 (Q4W), 또는 첫 5개월 동안 Q4W, 이어서 유지를 위하여 8주 마다 한번씩(Q8W) 주사에 의해, 유리체내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0406] 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제는 DME 및/또는 DR의 치료를 위하여 OZURDEX® (텍사메타손 유리체내 임플란트)와 조합하여 투여될 수 있다. OZURDEX®는 0.7 mg 텍사메타손 유리체내 임플란트로 투여될 수 있는데, 이것은 최대 6개월 까지 투여될 수 있다.

[0407] 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제는 DME 및/또는 DR의 치료를 위하여 ILUVIEN® (텍사메타손 유리체내 임플란트)와 조합하여 투여될 수 있다. OZURDEX®는 0.19 mg의 플루오시놀론 아세토니드 유리체내 임플란트로 투여될 수 있는데, 이는 0.25 µg/일의 속도로 용리될 수 있고, 최대 약 36 개월 까지 지속될 수 있다.

[0408] 일부 경우에서, TAO/PRN 치료 섭생 또는 TAE 치료 섭생은 본 발명의 항체, 또는 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및/또는 중합체 제제와 조합되어, AMD 치료제 (예컨대, 라니비주마브 또는 아플리베르셉트)을 투여하는데 이용될 수 있다. TAO/PRN 섭생의 경우, 4주 마다 (Q4W) 초기 유리체내 주사 (전형적으로 약 3 개월 동안) 후, 이 대상은 매월 또는 격월 (또는 더 긴 간격으로)로 모니터링하고, 질환 활성의 증가가 있는 경우 (예컨대, 광간섭 단층 촬영(OCT)에서 시력이나 체액 감소) 주사 투여와 함께 이 대상은 매월 또는 격월 (또는 더 긴 간격으로)로 모니터링한다. TAE 섭생의 경우, 대상은 4주 마다 (Q4W) 치료받을 수 있으며, 이어서 정해진 주별 간격 (예컨대, +2 주)으로 연장될 수 있고, 매번 후속적인 방문을 하거나 최대 간격 (예컨대, 매 6 주, 매 8 주, 매 10 주, 또는 12주)으로 방문한다. 눈을 관찰할 수 있고, 비록 질환 활성 증가가 없더라도 각 방문시 치료를

받을 수 있다. 황반이 젖은 것으로 나타날 때 (예컨데, OCT를 통하여), 황반이 다시 건조한 것으로 보일 때까지 주사 간격을 단축시킬 수 있다 (예컨데, -2 주). 일부 경우에서, 상기 안구 장애는 AMD (예컨데, 습성 AMD)이다.

[0409] 상기의 이러한 복합 치료요법은 복합된 투여(두 가지 또는 그 이상의 치료요법적 물질이 동일한 또는 별도 제제 안에 함유됨), 및 별도 투여를 포함하고, 이 경우, 상기 본 발명의 항체 투여는 추가적인 치료요법적 물질 및/또는 물질의 투여 전, 동시 및/또는 다음에 일어난다. 한 구체예에서, 상기 항-VEGF 항체, 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 중합체 제제의 투여 및 추가 치료제의 투여는 각각에 대하여 서로 약 1, 2, 3, 4, 또는 5 개월 이내, 또는 약 1, 2, 또는 3 주 이내, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6일 이내에 실행된다. 본 발명의 항체, 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 그리고 중합체 제제는 방사능요법과 복합되어 또한 이용될 수 있다.

[0410] 안구 질환 또는 상태의 예방 또는 치료용으로 항체, 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 본 발명의 중합체 제제 (그리고 임의의 추가 치료제)는 예를 들면, 안구, 안구내, 및/또는 유리체내 주사, 및/또는 주타스클레라 (juxtасcleral) 주사, 및/또는 테논아래(subtenon) 주사, 및/또는 맥락막위(superchoroidal) 주사, 및/또는 안약 및/또는 연고 형태의 국소 투여를 포함하나, 이에 국한되지 않는 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있다. 이러한 항체, 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 본 발명의 중합체 제제는 이를 테면, Intraocular Drug Delivery, Jaffe, Jaffe, Ashton, and Pearson, editors, Taylor & Francis (March 2006)와 같은 참고자료에 기술된 것을 포함하는, 상기 화합물을 유리체 안으로 서서히 방출시키는 장치 및/또는 데포우 형태로 유리체강내로 다양한 방법으로 전달될 수 있다. 한 실시예에서, 장치는 연장된 기간 동안 화합물을 방출시키는 미니 펌프 및/또는 매트릭스 및/또는 수동확산계 및/또는 세포 안에 포집된 형태일 수 있다 (Intraocular Drug Delivery, Jaffe, Jaffe, Ashton, and Pearson, editors, Taylor & Francis (March 2006)). 이용될 수 있는 추가 방법들은 하기 단락 K에서 기술된다.

[0411] 안구, 안구내, 또는 유리체내 투여용 제제는 당분야에 공지된 방법 및 부형제를 이용하여 만들 수 있다. 효과적인 치료를 위한 중요한 특징은 눈을 통한 적절하게 침투되는 것이다. 약물이 국소적으로 전달될 수 있는 눈의 전면의 질환과 달리, 망막 질환의 경우는 좀더 부위-특이적 접근 방식이 더 좋은 결과를 얻는다. 점안액과 연고는 눈 뒤쪽으로 거의 침투하지 않으며, 혈액-안구 장벽은 전신 투여 약물이 안구 조직으로 침투하는 것을 방해한다. 따라서, 망막 질환, 이를 테면, AMD 및 CNV을 치료하기 위한 약물 운반으로 선택된 방법은 전형적으로 직접적인 유리체내 주사법이다. 유리체강내 주사는 대개 환자의 상태, 전달되는 약물의 특성 및 반감기에 따라 주기적으로 반복된다. 이용될 수 있는 추가 방법들은 하기 단락 K에서 기술된다.

[0412] 특정 안구 장애 또는 상태의 치료에 효과적일 수 있는 항체, 이의 항체 변이체, 이의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 중합체 제제의 양은 장애 또는 상태의 성질에 따라 달라지며, 이는 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다. 가능하다면, 시험관 내에서 먼저 용량-반응 곡선 및 본 발명의 약학 조성물을 결정한 다음, 인간에서 시험하기 전에 유용한 동물 모델 시스템에서 결정하는 것이 바람직하다.

[0413] 장관외, 폐내, 그리고 비강내 그리고 국소 치료가 바람직한 경우 병소내 투여를 포함한 추가적인 적절한 수단에 의해 투여될 수 있다. 장관외 주입은 근육내, 정맥, 동맥내, 복막내, 또는 피부아래 투여를 포함한다. 투여 (dosing)는 부분적으로 투여가 잠시 동안인지 또는 만성적인지에 따라, 예를 들면, 주사, 이를 테면 정맥 또는 피부아래 주사에 의한 것일 수 있다. 다양한 시점에 걸쳐 단일 또는 다중 투여, 볼투스(bolus) 투여, 그리고 펄스 주입을 포함하는 다양한 투여 일정이 고려된다. 일부 경우에서, 항-VEGF 항체, 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 본 발명의 중합체 제제는 정맥내로, 근육내로, 피내로(intradermally), 경피로, 동맥내로, 복강내로, 병소내로, 두개내로, 관절내로, 전립선내로, 늑막내로, 기관내로, 경막내로, 비강내로, 질내로, 직장내로, 국소적으로, 종양안으로, 복강내로, 복막으로, 심실내로, 피하로, 결막밑으로, 내부 소포로, 점막으로, 위심으로, 배꼽밑으로, 안와내로, 구강으로, 국소적으로, 경피로, 흡입에 의해, 주사에 의해, 이식에 의해, 주입에 의해, 연속 주입에 의해, 직접적으로 담겨있는 표적 세포의 국소화된 관류에 의해, 카테테르에 의해, 세척에 의해, 크림 안에, 또는 액체 조성물 안에서 투여될 수 있다.

[0414] 질환의 방지 또는 치료를 위하여, 본 발명의 본 발명의 항체, 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 중합체 제제(단독으로 이용되거나 또는 하나 또는 그 이상의 다른 추가 치료 물질들과 복합되어)의 적절한 투여량은 치료될 질환의 유형, 항체 또는 면역콘주게이트의 유형, 질환의 심각성 및 과정, 상기 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 기존 치료, 환자의 임상적 병력 그리고 상기 항체에 대한 반응, 그리고 주치의의 판단에 따라 달라질 것이다. 상기 항체, 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 중합체 제제는 한 번에 또는 일련의 치료 일정에 걸쳐 환자에게 적절하게 투여된다. 상기 질환의 유형 및 중증도에 따라, 약 1 µg/kg 내지 15

mg/kg (예컨대, 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.8 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 또는 10 mg/kg)의 항체가 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 별도의 투여, 또는 연속 주입에 의해, 환자에게 투여하기 위한 초기 추천(candidate) 투여량이 될 수 있다. 일부 구체예들에서, 이용되는 항체는 약 0.01 mg/kg 내지 약 45 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 40 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 35 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 25 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 15 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 또는 약 0.01 mg/kg 내지 약 1 mg/kg이다. 언급된 인자들에 따라, 하나의 전형적인 일일 투여량의 범위는 약 1 µg/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 이상이 될 수 있다. 수일 동안 또는 더 긴 시간에 걸쳐 반복된 투여를 위하여, 상태에 따라, 치료는 일반적으로 질환의 증세의 바람직한 억제에 일어날 때 까지 지속될 것이다.

[0415] 일부 구체예들에서, 상기 방법은 추가 요법을 더 포함할 수 있다. 추가적인 치료요법은 방사선 요법, 수술, 화학요법, 유전자 요법, DNA 요법, 바이러스 요법, RNA 요법, 면역 요법, 골수 이식, 나노 요법, 단일클론 항체 요법 또는 상기의 조합일 수 있다. 추가 요법은 보완 요법 또는 신보완 요법의 형태일 수 있다. 일부 구체예들에서, 추가 요법은 소분자 효소 억제제 또는 항-전이 물질의 투여가 된다. 일부 구체예들에서, 추가 요법은 부작용 제한적 물질 (치료의 부작용의 발생 및/또는 중증도를 줄이기 위한 제제, 예로써 항 메스꺼움 제제 등)의 투여가 된다. 일부 구체예들에서, 상기 추가 요법은 방사능 요법이다. 일부 구체예들에서, 상기 추가 요법은 수술이다. 일부 구체예들에서, 상기 추가 요법은 방사능 요법과 수술의 조합이다. 일부 구체예들에서, 상기 추가 요법은 감마 조사(irradiation)다. 일부 구체예들에서, 상기 추가 요법은 전술한 하나 또는 그 이상의 치료제의 별도 투여가 될 수 있다.

[0416] 상기 처방 또는 치료 방법 중 임의의 것은 항-VEGF 항체 대신하여, 또는 추가로 본 발명의 면역콘주게이트를 사용하여 수행될 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[0417] 상기 제제 또는 치료 방법 중 임의의 것은 항-VEGF 항체 대신하여, 또는 추가로 본 발명의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 중합체 제제 (예컨대, 본원에서 기술하는 임의의 것, 예컨대, 하기 단락 K에서 기술된 것)를 사용하여 수행될 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[0418] **I. 제조 물품**

[0419] 발명의 또다른 측면에서, 상기 설명된 장애의 치료, 방지 및/또는 진단에 유용한 물질이 포함된 제조 물품이 제공된다. 상기 제조 물품은 용기와 용기 위에 또는 용기에 연합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들면, 병, 바이알, 주사기, IV 용액 주머니, 등등을 포함한다. 상기 용기는 다양한 물질, 이를 테면 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 상기 용기는 자체가 조성물을 보유하거나 상태의 치료, 방지 및/또는 진단에 효과적인 또다른 조성물과 복합된 조성물을 보유하며, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들면, 상기 용기는 피하 주사 바늘이 뚫을 수 있는 마개를 가진 정맥 용액 주머니 또는 바이알일 수 있다). 상기 조성물 안에 최소한 하나의 활성 물질은 본 발명의 항체다. 상기 라벨 또는 포장 삽입물에는 상기 조성물이 선택된 상태를 치료하기 위하여 이용된다는 것이 표시된다. 더욱이, 상기 제조 물품은 (a) 조성물이 포함된 제 1 용기, 여기에서 상기 조성물은 본 명세서에서 설명된 항체를 포함하고; 그리고 (b) 조성물이 포함된 제 2 용기, 여기에서 상기 조성물은 추가적인 세포독성이거나 또는 다른 치료요법적 물질을 포함한다. 본 발명의 이 구체예에서 상기 제조 물품은 상기 조성물이 특정 상태를 치료하는데 이용될 수 있음이 표시된 포장 삽입물을 더 포함할 수 있다. 대안으로, 또는 추가적으로, 상기 제조 물품은 약학적으로-수용가능한 완충액, 이를 테면 주사(BWFI)용 정균수, 포스페이트-완충된 염수, Ringer 용액 및 텍스트로즈 용액이 포함된 제 2 (또는 제3)의 용기를 더 포함할 수 있다. 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기가 포함된 상업적 그리고 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질들을 더 포함할 수 있다.

[0420] 상기 임의의 제조 물품은 항-VEGF 항체 대신하여, 또는 추가로 본 발명의 면역콘주게이트를 포함할 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[0421] 상기 임의의 제조 물품은 항-VEGF 항체 대신하여, 또는 추가로 본 발명의 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 또는 중합체 제제를 포함할 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[0422] **J. 항체 변이체들을 동정해내고, 항체를 개량하는 방법**

[0423] 본 발명은 항체를 개선하고, 항체 변이체를 동정하는 방법을 제공한다. 일부 경우에서, 상기 방법은 표적 분자에 대한 항체의 강화된 결합을 부여하는 하나 이상의 아미노산 잔기 변경을 확인하는 것을 포함한다. 일부 경

우에서, 상기 방법은 향상된 안정성 (예를 들어, 열 안정성), 기능적 발현 및/또는 항체의 단백질 폴딩을 부여하는 하나 이상의 아미노산 잔기 변경을 확인하는 것을 포함한다. 일부 경우에서, 본 발명은 표적 분자에 대한 항체의 결합 친화력을 개선시키는 방법을 제공한다. 일부 경우에서, 본 발명은 향상된 안정성 (예를 들어, 열 안정성), 기능적 발현 및/또는 항체의 단백질 폴딩을 개선하는 방법을 제공한다. 일부 경우에서, 본 발명은 표적 분자에 대한 항체의 결합 친화력을 개선시키고, 항체의 안정성 (예를 들어, 열 안정성)을 개선시키는 방법을 제공한다.

[0424] 예를 들면, 본 발명은 다음의 하나 또는 그 이상의 (예컨대, 1, 2, 또는 3) 단계가 관련된 표적 분자에 항체의 강화된 결합을 부여하는 아미노산 잔기 변경을 동정하는 방법을 제공한다: (a) 후보 항체 변이체들을 인코딩하는 핵산이 포함된 디스플레이 라이브러리를 제공하고, 이때 각각의 후보 항체 변이체는 기준 항체와 비교하였을 때, VH 또는 VL에 아미노산 잔기 변경을 포함하며, 이때 상기 VH 또는 VL의 모든 위치에서 아미노산 잔기 변경이 상기 디스플레이 라이브러리에 존재하며; (b) 분급된 라이브러리를 만들기 위하여 상기 표적 분자에 대한 후보 항체 변이체들의 결합에 근거하여, 디스플레이 라이브러리를 분류하고, 이때 상기 분급된 라이브러리는 상기 기준 항체와 비교하였을 때, 표적 분자에 대한 강화된 결합을 갖는 후보 항체 변이체들을 포함하며; 그리고 (c) 대량의 병행 서열화를 통하여 상기 디스플레이 라이브러리와 상기 분급된 라이브러리에 존재하는 각각의 아미노산 잔기 변경을 비교하고, 이에 의해 상기 디스플레이 라이브러리와 비교하였을 때, 분급된 라이브러리에 풍부한 아미노산 변경이 결정되고, 이로 인하여 상기 아미노산 잔기 변경이 상기 디스플레이 라이브러리와 비교하였을 때, 분급된 라이브러리에 이 아미노산 변경이 풍부할 경우, 표적 분자에 대한 강화된 결합을 부여하는 것으로 동정된다. 일부 경우에서, 상기 방법은 예를 들어, 하기 기술된 바와 같이 항체에 대한 향상된 안정성을 부여하는 아미노산 잔기를 동정하는 것을 추가로 포함한다.

[0425] 또다른 실시예에서, 본 발명은 다음의 하나 또는 그 이상의 (예컨대, 1, 2, 또는 3) 단계가 관련된 항체의 강화된 안정성을 부여하는 아미노산 잔기 변경을 동정하는 방법을 제공한다: (a) 후보 항체 변이체들을 인코딩하는 핵산이 포함된 디스플레이 라이브러리를 제공하고, 이때 각각의 후보 항체 변이체는 기준 항체와 비교하였을 때, VH 또는 VL에 아미노산 잔기 변경을 포함하며, 이때 상기 VH 또는 VL의 모든 위치에서 아미노산 잔기 변경이 상기 디스플레이 라이브러리에 존재하며; (b) 분급된 라이브러리를 만들기 위하여 상기 표적 분자에 대한 후보 항체 변이체들의 결합에 근거하여, 디스플레이 라이브러리를 분류하고, 이때 상기 분급된 라이브러리는 상기 기준 항체와 비교하였을 때, 강화된 안정성을 갖는 후보 항체 변이체들을 포함하며; 그리고 (c) 대량의 병행 서열화를 통하여 상기 디스플레이 라이브러리와 상기 분급된 라이브러리에 존재하는 각각의 아미노산 잔기 변경을 비교하고, 이에 의해 상기 디스플레이 라이브러리와 비교하였을 때, 분급된 라이브러리에 풍부한 아미노산 변경이 결정되고, 이로 인하여 상기 아미노산 잔기 변경이 상기 디스플레이 라이브러리와 비교하였을 때, 분급된 라이브러리에 이 아미노산 변경이 풍부할 경우, 항체에게 강화된 안정성을 부여하는 것으로 동정된다. 일부 경우에서, 상기 방법은 예를 들어, 하기 기술된 바와 같이 항체에 대한 향상된 안정성을 부여하는 아미노산 잔기를 동정하는 것을 추가로 포함한다.

[0426] 상기 임의의 선행 방법은 (b) 단계 다음에 대량의 병행 서열화를 통하여 상기 디스플레이 라이브러리와 상기 분급된 라이브러리에 각 아미노산 변경이 존재하는 빈도를 결정하는 것을 더 포함한다.

[0427] 일부 경우에서, 상기 아미노산 잔기 변경은 상기 디스플레이 라이브러리와 비교하였을 때, 상기 분급된 라이브러리에 최소한 2-배 더 많다. 예를 들면, 아미노산 잔기 변경은 디스플레이 라이브러리와 비교하였을 때, 상기 분급된 라이브러리에 1.25-배, 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배, 10-배, 11-배, 12-배, 14-배, 16-배, 또는 그 이상으로 풍부할 수 있다.

[0428] 디스플레이 라이브러리는 임의의 적합한 수의 항체 변이체들, 예를 들면, 약 1×10^3 내지 약 1×10^{12} 또는 그 이상 (예컨대, 약 1×10^3 , 약 1×10^4 , 약 1×10^5 , 약 1×10^6 , 약 1×10^7 , 약 1.5×10^7 , 약 2.5×10^7 , 약 1×10^8 , 약 5×10^8 , 약 1×10^9 , 약 5×10^9 , 약 1×10^{10} , 약 1×10^{11} , 약 1×10^{12} 또는 그 이상) 항체 변이체들을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 디스플레이 라이브러리는 약 $3 \times 10^{9\text{th}}$ 항체 변이체들을 포함할 수 있다. 다른 구체예들에서, 상기 디스플레이 라이브러리는 약 $8 \times 10^{8\text{th}}$ 항체 변이체들을 포함할 수 있다.

[0429] 임의의 전술한 방법에서, 아미노산 잔기 변경은 임의의 적합한 코돈 세트에 의해 인코딩될 수 있다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 아미노산 잔기 변경은 축퇴(degenerate) 코돈 세트에 의해 인코딩된다. 선택된 아미노산을 주형 핵산으로 치환시키는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 그 중 일부는 본원에 기술되어 있다.

U.S. 특허 번호 7,985,840을 참고, 이는 전문이 본원 참고자료에 편입된다. 예를 들면, 상기 또는 실시예 섹션에서 기술된 바와 같은 라이브러리는 Kunkel 방법을 사용하여 아미노산 치환 아미노산으로 생성될 수 있다. 예를 들면, Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154:367-382, 1987 참고.

- [0430] 아미노산 잔기 변경은 임의의 적합한 코돈 세트에 의해 인코딩될 수 있다. "코돈 세트(codon set)"는 원하는 변형 아미노산을 코딩하는데 사용되는 상이한 뉴클레오티드 삼중 항(triplet) 염기 서열의 세트를 지칭한다. 코돈 세트는 아래의 IUB 코드에 따라 특정 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드의 등물 혼합물을 나타내는 기호를 사용하여 나타낼 수 있다.
- [0431] *IUB 코드*
- [0432] *G* 구아닌
- [0433] *A* 아데닌
- [0434] *T* 티민
- [0435] *C* 시토신
- [0436] *R* (A 또는 G)
- [0437] *Y* (C 또는 T)
- [0438] *M* (A 또는 C)
- [0439] *K* (G 또는 T)
- [0440] *S* (C 또는 G)
- [0441] *W* (A 또는 T)
- [0442] *H* (A 또는 C 또는 T)
- [0443] *B* (C 또는 G 또는 T)
- [0444] *V* (A 또는 C 또는 G)
- [0445] *D* (A 또는 G 또는 T)
- [0446] *N* (A 또는 C 또는 G 또는 T)
- [0447] 예시적으로, 코돈 세트 *DVK*에서 *D*는뉴클레오티드 A 또는 G 또는 T일 수 있고; *V*는A 또는 G 또는 C일 수 있고; 그리고 *K*는G 또는 T일 수 있다. 이 코돈 세트는18개의 상이한 코돈을 제시할 수 있고, 아미노산 Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly, 및 Cys을 인코딩할 수 있다.
- [0448] 올리고뉴클레오티드 또는 프라이머 세트는 표준 방법을 이용하여 합성될 수 있다. 한 세트의 올리고뉴클레오티드는 예를 들어, 코돈 세트에 의해 제공되고, 원하는 아미노산 그룹을 코딩할 수 있는 뉴클레오티드 삼중 항의 모든 가능한 조합을 나타내는 서열을 포함하도록 고체상 합성에 의해 합성될 수 있다. 특정 위치에서 선택된 뉴클레오티드 "축중(degeneracy)"을 갖는 올리고뉴클레오티드의 합성은 당업계에 잘 알려져 있다. 특정 코돈 세트를 갖는 뉴클레오티드의 이러한 세트는 상업적 핵산 합성기(예를 들어, Applied Biosystems, Foster City, Calif.로부터 입수 가능함)를 사용하여 합성되거나 또는 상업적으로 수득(예를 들면, Life Technologies, Rockville, Md.)될 수 있다. 따라서, 특정 코돈 세트를 갖는 합성된 올리고뉴클레오티드 세트는 전형적으로 상이한 서열을 갖는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함할 것이며, 차이는 전체 서열 내 코돈 세트에 의해 확립된다. 본 발명에 따라 사용되는 올리고뉴클레오티드는 가변 도메인 핵산 주형과의 혼성화를 가능하게 하는 서열을 가지며, 또한 클로닝 목적 등에 유용한 제한 효소 부위를 포함할 수 있다.
- [0449] 임의의 전술한 방법에서, 축퇴 코돈 세트를 이용하여 아미노산 잔기 변경을 인코딩할 수 있다. 일부 경우에서, 상기 축퇴 코돈 세트는 *NNK* 또는 *NNS* 코돈 세트이며, 이때 *N*은 A, C, G, 또는 T이며; *K*는G 또는 T이며; 그리고 *S*는C 또는 G이다. 특정 경우에, 상기 축퇴 코돈 세트는 *NNK* 코돈 세트이다.
- [0450] 당분야에 공지된 또는 본원에 기술된 임의의 적합한 디스플레이 방법은 전술한 임의의 방법과 병용될 수 있다. 예를 들면, 상기 방법은 파아지 디스플레이, 박테리아 디스플레이, 효모 디스플레이, 포유류 디스플레이, 리보솜 디스플레이, 및/또는 mRNA 디스플레이와 관련될 수 있다. 임의의 전술한 방법에 있어서, 임의의 적합한 디

스플레이 라이브러리가 이용될 수 있다. 예를 들면, 상기 디스플레이 라이브러리는 파아지 디스플레이 라이브러리, 박테리아 디스플레이 라이브러리, 효모 디스플레이 라이브러리, 포유류 디스플레이 라이브러리, 리보솜 디스플레이 라이브러리, 및 mRNA 디스플레이 라이브러리로부터 선택될 수 있다. 특히 구체예에서, 상기 디스플레이 라이브러리는 파아지 디스플레이 라이브러리이다.

[0451] 항체 가변 도메인의 융합 폴리펩티드는 세포, 바이러스, 파아지미드, 또는 다양한 형태의 기타 입자들의 표면에 디스플레이될 수 있다. 이들 포맷은 예를 들면, 이들 단편의 scFv, Fab, 및 다가(multivalent) 형태를 포함한다. 다가형태는 ScFv, Fab, 또는 Fab'의 이합체일 수 있는데, 본원에서 차례로 (ScFv)₂, Fab₂ 및 F(ab')₂로 지칭된다. 박테리오파아지 표면에 항체 단편을 포함하는 융합 폴리펩티드를 디스플레이하는 방법은 당 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면 특허 공개 번호 WO 92/01047 및 본원에서 기술되고 있다. 기타 특허 공개, 예를 들면, WO 92/20791; WO 93/06213; WO 93/11236, 및 WO 93/19172는 관련된 방법들을 기술한다. 기타 공개는 파아지 표면에 디스플레이된 다양한 항원에 대해 인위적으로 재배치된 V 유전자 레퍼토리를 갖는 항체의 동정을 보여주었다(예컨데, Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.* 227: 381-388, 1992 참고; 그리고 WO 93/06213 및 WO 93/11236에서 기술된 것과 같음).

[0452] 임의의 전술한 방법에 있어서, 상기 디스플레이 라이브러리는 예를 들면, 항원에 고-친화력 결합자를 확인하기 위하여 분급된(선택된) 및/또는 스크리닝될 수 있다. 분급(sorting)은 본원에서 기술된 바와 같이, 또는 당 분야에 공지된 다른 방법에 의해 실행될 수 있다. 예를 들면, U.S. 특허 7,985,840 참고. 일부 구체예들에서, 분급은 상기 디스플레이 라이브러리에 고정된 항원(예컨데, 표적 분자 또는 이의 에피토프)를 접촉시키는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, 분급은 상기 디스플레이 라이브러리에 가용성 항원을 접촉시키는 것과 관련될 수 있다. 선택된 항체 변이체들은 결합 친화력(예컨데, SPR), 안정성, 폴딩, 구조(예컨데, X-선 결정학), 또는 기타 속성에 대하여 상기 항체 변이체를 특징화시키기 위하여 추가로 더 스크리닝될 수 있다.

[0453] 임의의 전술한 방법은 분급안된 라이브러리에서 아미노산 잔기 변경이 출현되는 빈도와 비교하였을 때, 분급 후(분급된 라이브러리로 지칭됨) 이 라이브러리에 출현되는 상기 아미노산 잔기 변경의 빈도를 결정하기 위한, 예를 들면, 대량의 병행 서열화와 관련될 수 있다. 대량의 병행 서열화를 위한 다양한 광범위한 접근방법은 당업계에서 공지되어 있으며, 임의의 적합한 방법이 본 발명의 상기 방법에서 이용될 수 있다. 예를 들면, Metzker, *Nature Reviews Genetics* 11: 31-36, 2010 참고, 이 문헌은 전문이 본 명세서의 참고자료에 편입된다. 예시적인 접근 방법은 대량의 병행 시그너처(signature) 서열화(MPSS), 폴로니(polony) 서열화, 파이로(pyro)서열화(454/Roche Diagnostics), 이온 반도체 서열화, 단일-분자 실시간 서열화, 합성에 의한 서열화, 결정학에 의한 서열화를 포함한다. 상업적으로-이용가능한 대량의 병행 서열화는 Roche Diagnostics 및 다른 회사의 것을 이용할 수 있다. 상기 서열화는 심도(deep) 서열화, 울트라(ultra)-심도 서열화, 및/또는 차-세대 서열화일 수 있다.

[0454] 임의의 전술한 방법에 있어서, 상기 방법은 최소한 약 100,000개 관독(reads) 또는 그 이상(예컨데, 100,000개 관독; 200,000개 관독; 300,000개 관독; 400,000개 관독; 500,000개 관독; 600,000개 관독; 700,000개 관독; 800,000개 관독; 900,000개 관독; 1,000,000개 관독; 2x10⁶개 관독; 3x10⁶개 관독; 4x10⁶개 관독; 5x10⁶개 관독; 6x10⁶개 관독; 7x10⁶개 관독; 8x10⁶개 관독; 9x10⁶개 관독; 10⁷개 관독; 10⁸개 관독; 10⁹개 관독; 또는 10¹⁰개 관독 또는 그 이상)의 서열을 결정하는 것과 관련될 수 있다. 상기 방법은 임의의 적합한 심도에서 서열화하는 것과 관련될 수 있다.

[0455] 임의의 전술한 방법에 있어서, 상기 항체는 단일클론 항체일 수 있다. 임의의 전술한 방법에 있어서, 상기 항체는 IgG 항체일 수 있다. 임의의 전술한 방법에 있어서, 상기 항체는 항체 단편일 수 있다. 상기 항체 단편은 Fab, scFv, Fv, Fab', Fab-C, Fab'-SH, F(ab')₂, 및 디아바디로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 특정 경우에서, 상기 항체 단편은 Fab이다.

[0456] 임의의 전술한 방법에 있어서, 이중(dual)-특이적 항체는 단일클론 항체일 수 있다. 임의의 전술한 방법에 있어서, 상기 이중-특이적 항체는 IgG 항체일 수 있다. 임의의 전술한 방법에 있어서, 상기 이중-특이적 항체는 항체 단편일 수 있다. 상기 항체 단편은 Fab, scFv, Fv, Fab-C, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, 및 디아바디로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 특정 경우에서, 상기 항체 단편은 Fab이다.

[0457] 선행 방법 중 임의의 방법은 상기 방법의 단계에 의해 동정된 항체를 생성하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 상기 기술된 방법은 본원에 기재된 임의의 항체와 함께 사용될 수 있다.

[0458] **K. 항-VEGF 항체를 위한 안구 장기-작용 운반 방법**

[0459] 본 발명은 눈으로 항-VEGF 항체 (본원에서 기술된 임의의 항-VEGF 항체 포함, 이를 테면, G6.31 AARR)의 장기-작용 운반에 이용될 수 있는, 안구 장애 치료용 조성물을 제공한다. 예를 들면, 본 발명은 본원에서 기술된 항-VEGF 항체 (예컨데, Fab 또는 Fab-C 항체 콘주게이트)를 포함하는, 항체 콘주게이트를 제공한다. 본 발명은 또한 용합 단백질 (예컨데, Fab 용합 단백질)을 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 본원에서 기술된 항-VEGF 항체를 포함하는 제제 (예컨데, 중합체 제제)를 제공한다. 본 발명은 본원에서 기술된 항-VEGF 항체의 안구 투여에 이용될 수 있는 장치를 또한 제공한다. 본 발명은 본원에서 기술하고 있는 항체 콘주게이트, 용합 단백질, 및/또는 제제 (예컨데, 중합체 제제)를 포함하는 약학 조성물을 더 제공한다. 이들 조성물은 본원에서 기술하는 임의의 치료 방법, 예를 들면, 안구 장애 (예컨데, AMD (예컨데, 습성 AMD), DME, DR (예컨데, NPDR 또는 PDR), 또는 RVO (예컨데, CRVO 또는 BRVO))를 치료하는 방법에 이용될 수 있다.

[0460] 1. 항체 콘주게이트

[0461] 본 발명은 상기 항체에 공유적으로 결합된 항-VEGF 항체 및 중합체를 함유하는 항체 콘주게이트를 제공한다. 상기 항-VEGF 항체는 비가역적 방식 또는 가역적 방식으로 상기 중합체에 공유적으로 부착될 수 있다. 본원에서 기술된 또는 당분야에 공지된 다른 것들을 포함하는, 임의의 적합한 중합체가 이용될 수 있다. 상기 중합체는 친수성 중합체 또는 소수성 중합체일 수 있다. 친수성 중합체는 물-가용성 중합체일 수 있다. 임의의 적합한 친수성 중합체, 예를 들면, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2011/066417 및/또는 Pelegri-O'Day et al. *J. Am. Chem. Soc.* 136:14323-14332, 2014(이들은 전문이 참고자료에 통합됨)에서 기술된 예를 들면, 친수성 중합체가 이용될 수 있다. 이용될 수 있는 예시적인, 비-제한적 친수성 중합체는 히알루론산 (HA), 폴리에틸렌 글리콜 (PEG; 폴리(에틸렌 글리콜)) (예컨데, 직쇄 PEG, 분기형 PEG, 빗 모양의 PEG, 및 가지돌기(dendritic) PEG), 폴리[에틸렌 옥시드]-*co*-(메틸렌 에틸렌 옥시드)], 폴리(폴리(에틸렌 글리콜) 메틸 에테르 메타아크릴레이트) (pPEGMA), 아가로스, 알기네이트, 카라기난, 카르복시메틸셀룰로오스, 셀룰로오스, 셀룰로오스 유도체들, 키토산, 콘드로이틴 술페이트, 콜라겐, 데르마탄 술페이트, 텍스트란, 텍스트란 술페이트, 피브린, 피브리노젠, 피브로넥틴, 푸코이단, 젤라틴, 글리코사미노글리칸 (GAGs), 당공중합체, 헤파린, 헤파린 술페이트, 고도로-분기형 폴리사카라이드 (예컨데, 갈락토스 덴드라이머), 케라탄 술페이트, 메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스 (HPMC), 폴리(*N*-(2-히드록시프로필)메타아크릴아미드) (pHPMA), 펙틴, 펙틴 유도체들, 펜토산 폴리술페이트, 전분, 히드록실에틸 전분 (HES), 스티렌, 비트로넥틴, 폴리(아크릴산), 폴리(메타아크릴산), 폴리(아크릴아미드), 폴리(아크릴산), 폴리(아민), 폴리(아미노산), 폴리(카르복시베타인) (PCB), 고분자전해질, 폴리(글루탐산) (PGA), 폴리(글리세롤) (PG) (예컨데, 선형, 중간기능성(midfunctional), 과분기형, 또는 선형 과분기형 PG), 폴리(말레산), 폴리(2-옥사졸린) (POZ), 폴리(2-에틸-2-옥사졸린, 폴리시알산 (PSA), 폴리스티렌, 폴리스티렌 유도체들 (예컨데, 하전된 폴리스티렌 유도체들), 폴리(스티렌술포네이트-*co*-PEGMA), 폴리비닐피롤리돈 (PVP), 폴리(*N*-아크릴로일모르폴린) (pNACM), 및 이의 공중합체를 포함한다. 일부 경우에서, 상기 중합체는 소수성 중합체, 예를 들면, 폴리(락트-*co*-글리콜산) (PLGA), 폴리락티드 (PLA), 및 폴리글리콜리드 (PGA)이다. 상기 중합체는 생분해가능하거나 및/또는 생물적합성일 수 있다.

[0462] 실시예로써, 상기 중합체는 임의의 적합한 수의 단량체, 예를 들면, 2 내지 약 1×10^4 개의 단량체 (예컨데, 약 10개, 약 50개, 100개, 약 200개, 약 300개, 약 400개, 약 500개, 약 600개, 약 700개, 약 800개, 약 900개, 약 1000개, 약 2000개, 약 3000개, 약 4000개, 약 5000개, 약 6000개, 약 7000개, 약 8000개, 약 9000개, 또는 약 1×10^4 개의 단량체), 또는 그 이상을 함유할 수 있다. 예를 들면, 상기 중합체는 약 50 내지 약 250개의 단량체, 약 50 내지 약 500개의 단량체, 약 50 내지 약 1000개의 단량체, 약 50 내지 약 2000개의 단량체, 약 50 내지 약 3000개의 단량체, 약 50 내지 약 4000개의 단량체, 약 50 내지 약 5000개의 단량체, 약 50 내지 약 6000개의 단량체, 약 50 내지 약 7000개의 단량체, 약 50 내지 약 8000개의 단량체, 약 50 내지 약 9000개의 단량체, 약 50 내지 약 10000개의 단량체, 약 100 내지 약 250개의 단량체, 약 100 내지 약 500개의 단량체, 약 100 내지 약 1000개의 단량체, 약 100 내지 약 2000개의 단량체, 약 100 내지 약 3000개의 단량체, 약 100 내지 약 4000개의 단량체, 약 100 내지 약 5000개의 단량체, 약 100 내지 약 6000개의 단량체, 약 100 내지 약 7000개의 단량체, 약 100 내지 약 8000개의 단량체, 약 100 내지 약 9000개의 단량체, 약 100 내지 약 10000개의 단량체, 약 250 내지 약 500개의 단량체, 약 250 내지 약 1000개의 단량체, 약 250 내지 약 2000개의 단량체, 약 250 내지 약 3000개의 단량체, 약 250 내지 약 4000개의 단량체, 약 250 내지 약 5000개의 단량체, 약 250 내지 약 6000개의 단량체, 약 250 내지 약 7000개의 단량체, 약 250 내지 약 8000개의 단량체, 약 250 내지 약 9000개의 단량체, 약 250 내지 약 10000개의 단량체. 약 500 내지 약 1000개의 단량체, 약 500 내지 약

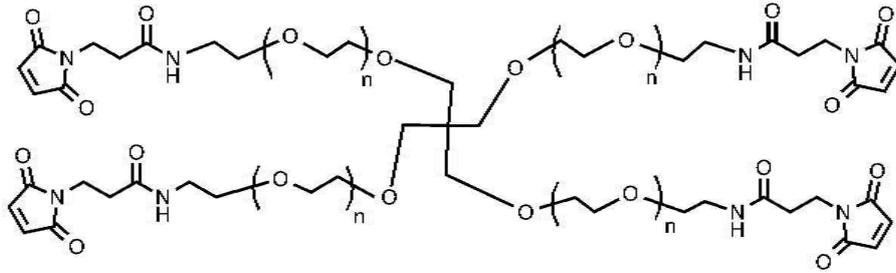
2000개의 단량체, 약 500 내지 약 3000개의 단량체, 약 500 내지 약 4000개의 단량체, 약 500 내지 약 5000개의 단량체, 약 500 내지 약 6000개의 단량체, 약 500 내지 약 7000개의 단량체, 약 500 내지 약 8000개의 단량체, 약 500 내지 약 9000개의 단량체, 또는 약 500 내지 약 10000개의 단량체를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 상기 중합체는 약 500개의 단량체를 포함할 수 있다.

[0463] 본 발명은 HA 중합체에 공유적으로 부착된 항-VEGF 항체 (예컨데, 본원에서 기술된 항-VEGF 항체, 이를 테면, G6.31 AARR)를 함유하는 항체 콘주게이트를 제공한다. 이러한 항체 콘주게이트는 본원에서 "HA 콘주게이트"로 때로 지칭된다. 일부 경우에서, 상기 HA 중합체는 약 2.5 메가달톤 (MDa) 또는 그 미만의 (예컨데, 약 2.5 MDa 또는 이보다 낮은, 약 2.4 MDa 또는 이보다 낮은, 약 2.3 MDa 또는 이보다 낮은, 약 2.2 MDa 또는 이보다 낮은, 약 2.1 MDa 또는 이보다 낮은, 약 2.0 MDa 또는 이보다 낮은, 약 1.9 MDa 또는 이보다 낮은, 약 1.8 MDa 또는 이보다 낮은, 약 1.7 MDa 또는 이보다 낮은, 약 1.6 MDa 또는 이보다 낮은, 약 1.5 MDa 또는 이보다 낮은, 약 1.4 MDa 또는 이보다 낮은, 약 1.3 MDa 또는 이보다 낮은, 약 1.2 MDa 또는 이보다 낮은, 약 1.1 MDa 또는 이보다 낮은, 약 1.0 MDa 또는 이보다 낮은, 약 900 kDa 또는 이보다 낮은, 약 800 kDa 또는 이보다 낮은, 약 700 kDa 또는 이보다 낮은, 약 600 kDa 또는 이보다 낮은, 약 500 kDa 또는 이보다 낮은, 약 400 kDa 또는 이보다 낮은, 약 300 kDa 또는 이보다 낮은, 약 200 kDa 또는 이보다 낮은, 또는 약 100 kDa 또는 이보다 낮은)의 분자량을 보유한다. 일부 경우에서, 상기 HA 중합체는 약 1 MDa 또는 이보다 낮은 (예컨데, 약 1.0 MDa 또는 이보다 낮은, 약 900 kDa 또는 이보다 낮은, 약 800 kDa 또는 이보다 낮은, 약 700 kDa 또는 이보다 낮은, 약 600 kDa 또는 이보다 낮은, 약 500 kDa 또는 이보다 낮은, 약 400 kDa 또는 이보다 낮은, 약 300 kDa 또는 이보다 낮은, 약 200 kDa 또는 이보다 낮은, 또는 약 100 kDa 또는 이보다 낮은)의 분자량을 보유한다. 일부 경우에서, 상기 HA 중합체는 약 25 kDa 내지 약 2.5 MDa (예컨데, 약 25 kDa 내지 약 2.5 mDa, 약 25 kDa 내지 약 2 MDa, 약 25 kDa 내지 약 1.5 MDa, 약 25 kDa 내지 약 1 MDa, 약 25 kDa 내지 약 900 kDa, 약 25 kDa 내지 약 800 kDa, 약 25 kDa 내지 약 700 kDa, 약 25 kDa 내지 약 600 kDa, 약 25 kDa 내지 약 500 kDa, 약 100 kDa 내지 약 2.5 mDa, 약 100 kDa 내지 약 2 MDa, 약 100 kDa 내지 약 1.5 MDa, 약 100 kDa 내지 약 1 MDa, 약 100 kDa 내지 약 900 kDa, 약 100 kDa 내지 약 800 kDa, 약 100 kDa 내지 약 700 kDa, 약 100 kDa 내지 약 600 kDa, 약 100 kDa 내지 약 500 kDa, 약 250 kDa 내지 약 2.5 MDa, 약 250 kDa 내지 약 2 MDa, 약 250 kDa 내지 약 1.5 MDa, 약 250 kDa 내지 약 900 kDa, 약 250 kDa 내지 약 800 kDa, 약 250 kDa 내지 약 700 kDa, 약 250 kDa 내지 약 600 kDa, 약 250 kDa 내지 약 500 kDa, 약 500 kDa 내지 약 2.5 MDa, 약 500 kDa 내지 약 2 MDa, 약 500 kDa 내지 약 1.5 MDa, 약 500 kDa 내지 약 1 MDa, 약 500 kDa 내지 약 900 kDa, 약 500 kDa 내지 약 800 kDa, 약 500 kDa 내지 약 700 kDa, 약 500 kDa 내지 약 600 kDa, 약 1 MDa 내지 약 2.5 MDa, 약 1 MDa 내지 약 2 MDa, 약 1 MDa 내지 약 1.5 MDa, 약 1 MDa 내지 약 1.25 MDa, 약 1.25 MDa 내지 약 2.5 MDa, 약 1.25 MDa 내지 약 2 MDa, 약 1.25 MDa 내지 약 1.5 MDa, 약 1.5 MDa 내지 약 2.5 MDa, 약 1.5 MDa 내지 약 2 MDa, 약 1.5 MDa 내지 약 1.75 MDa, 또는 1.75 MDa 내지 약 2.5 MDa)의 분자량을 보유한다.

[0464] 일부 경우에서, 상기 HA 중합체는 약 25 kDa 내지 약 500 kDa (예컨데, 약 25 kDa 내지 약 500 kDa, 약 25 kDa 내지 약 450 kDa, 약 25 kDa 내지 약 400 kDa, 약 25 kDa 내지 약 350 kDa, 약 25 kDa 내지 약 300 kDa, 약 25 kDa 내지 약 300 kDa, 약 25 kDa 내지 약 250 kDa, 약 25 kDa 내지 약 200 kDa, 약 25 kDa 내지 약 150 kDa, 약 25 kDa 내지 약 100 kDa, 약 25 kDa 내지 약 50 kDa, 약 40 kDa 내지 약 500 kDa, 약 40 kDa 내지 약 450 kDa, 약 40 kDa 내지 약 400 kDa, 약 40 kDa 내지 약 350 kDa, 약 40 kDa 내지 약 300 kDa, 약 40 kDa 내지 약 300 kDa, 약 40 kDa 내지 약 250 kDa, 약 40 kDa 내지 약 200 kDa, 약 40 kDa 내지 약 150 kDa, 약 40 kDa 내지 약 100 kDa, 약 40 kDa 내지 약 50 kDa, 약 50 kDa 내지 약 500 kDa, 약 50 kDa 내지 약 450 kDa, 약 50 kDa 내지 약 400 kDa, 약 50 kDa 내지 약 350 kDa, 약 50 kDa 내지 약 300 kDa, 약 50 kDa 내지 약 300 kDa, 약 50 kDa 내지 약 250 kDa, 약 50 kDa 내지 약 200 kDa, 약 50 kDa 내지 약 150 kDa, 약 50 kDa 내지 약 100 kDa, 약 50 kDa 내지 약 75 kDa, 약 100 kDa 내지 약 500 kDa, 약 100 kDa 내지 약 450 kDa, 약 100 kDa 내지 약 400 kDa, 약 100 kDa 내지 약 350 kDa, 약 100 kDa 내지 약 300 kDa, 약 100 kDa 내지 약 300 kDa, 약 100 kDa 내지 약 250 kDa, 약 100 kDa 내지 약 200 kDa, 약 100 kDa 내지 약 150 kDa, 약 150 kDa 내지 약 500 kDa, 약 150 kDa 내지 약 450 kDa, 약 150 kDa 내지 약 400 kDa, 약 150 kDa 내지 약 350 kDa, 약 150 kDa 내지 약 300 kDa, 약 150 kDa 내지 약 300 kDa, 약 150 kDa 내지 약 250 kDa, 약 150 kDa 내지 약 200 kDa, 약 175 kDa 내지 약 500 kDa, 약 175 kDa 내지 약 450 kDa, 약 175 kDa 내지 약 400 kDa, 약 175 kDa 내지 약 350 kDa, 약 175 kDa 내지 약 300 kDa, 약 175 kDa 내지 약 300 kDa, 175 200 kDa 내지 약 250 kDa, 약 175 kDa 내지 약 225 kDa, 약 200 kDa 내지 약 500 kDa, 약 200 kDa 내지 약 450 kDa, 약 200 kDa 내지 약 400 kDa, 약 200 kDa 내지 약 350 kDa, 약 200 kDa 내지 약 300 kDa, 약 200 kDa 내지 약 300 kDa, 약 200 kDa 내지 약 250

kDa, 또는 약 200 kDa 내지 약 225 kDa)의 분자량을 보유한다.

- [0465] 일부 경우에서, 상기 HA 중합체는 약 100 kDa 내지 약 250 kDa (예컨데, 약 100 kDa, 약 110 kDa, 약 120 kDa, 약 130 kDa, 약 140 kDa, 약 150 kDa, 약 160 kDa, 약 170 kDa, 약 180 kDa, 약 190 kDa, 약 200 kDa, 약 210 kDa, 약 220 kDa, 약 230 kDa, 약 240 kDa, 또는 약 250 kDa)의 분자량을 보유한다. 특정 경우에, 상기 HA 중합체는 약 200 kDa의 분자량을 보유한다.
- [0466] 임의의 전술한 분자량은 중량-평균 분자량 (또한 중량-평균 몰 질량으로도 공지됨)일 수 있다.
- [0467] 일부 경우에서, 임의의 전술한 HA 중합체는 선형으로, 가령, 가교-결합되지 않는다.
- [0468] 다른 경우에 있어서, 본 발명은 PEG 중합체에 공유적으로 부착된 항-VEGF 항체 (예컨데, 본원에서 기술된 항-VEGF 항체)를 함유하는 항체 콘주게이트를 제공한다. 이러한 항체 콘주게이트는 본원에서 "PEG 콘주게이트"로 때로 지칭된다. 임의의 적합한 PEG 중합체가 이용될 수 있다. 상기 PEG는 분기형 PEG, 별모양 PEG, 또는 빗모양(comb) PEG일 수 있다. 상기 PEG 중합체는 예를 들면, PEG 테트라머, PEG 육합체, 또는 PEG 옥타머일 수 있다. 일부 경우에서, 상기 항체 콘주게이트는 PEG 덴드라이머에 공유적으로 부착된 항-VEGF 항체 (예컨데, 본원에서 기술된 항-VEGF 항체, 이를 테면, G6.31 AARR)를 함유한다. PEG 중합체는 예를 들면, JenKem Technology, Quanta BioDesign, NOF America Corporation, 및 다른 업체로부터 시판되는 것을 이용할 수 있다.
- [0469] 일부 경우에서, 상기 PEG 중합체는 약 1 kDa 내지 약 500 kDa (예컨데, 약 1 kDa 내지 약 500 kDa, 약 1 kDa 내지 약 450 kDa, 약 1 kDa 내지 약 400 kDa, 약 1 kDa 내지 약 350 kDa, 약 1 kDa 내지 약 300 kDa, 약 1 kDa 내지 약 250 kDa, 약 1 kDa 내지 약 200 kDa, 약 1 kDa 내지 약 150 kDa, 약 1 kDa 내지 약 100 kDa, 약 1 kDa 내지 약 50 kDa, 약 10 kDa 내지 약 500 kDa, 약 10 kDa 내지 약 450 kDa, 약 10 kDa 내지 약 400 kDa, 약 10 kDa 내지 약 350 kDa, 약 10 kDa 내지 약 300 kDa, 약 10 kDa 내지 약 250 kDa, 약 10 kDa 내지 약 200 kDa, 약 10 kDa 내지 약 150 kDa, 약 10 kDa 내지 약 100 kDa, 약 10 kDa 내지 약 50 kDa, 약 20 kDa 내지 약 500 kDa, 약 20 kDa 내지 약 450 kDa, 약 20 kDa 내지 약 400 kDa, 약 20 kDa 내지 약 350 kDa, 약 20 kDa 내지 약 300 kDa, 약 20 kDa 내지 약 250 kDa, 약 20 kDa 내지 약 200 kDa, 약 20 kDa 내지 약 150 kDa, 약 20 kDa 내지 약 100 kDa, 약 20 kDa 내지 약 75 kDa, 약 30 kDa 내지 약 500 kDa, 약 30 kDa 내지 약 450 kDa, 약 30 kDa 내지 약 400 kDa, 약 30 kDa 내지 약 350 kDa, 약 30 kDa 내지 약 300 kDa, 약 30 kDa 내지 약 250 kDa, 약 30 kDa 내지 약 200 kDa, 약 30 kDa 내지 약 150 kDa, 약 40 kDa 내지 약 500 kDa, 약 40 kDa 내지 약 450 kDa, 약 40 kDa 내지 약 400 kDa, 약 40 kDa 내지 약 350 kDa, 약 40 kDa 내지 약 300 kDa, 약 40 kDa 내지 약 250 kDa, 약 40 kDa 내지 약 200 kDa, 약 40 kDa 내지 약 150 kDa, 약 40 kDa 내지 약 100 kDa, 약 40 kDa 내지 약 50 kDa, 약 50 kDa 내지 약 500 kDa, 약 50 kDa 내지 약 450 kDa, 약 50 kDa 내지 약 400 kDa, 약 50 kDa 내지 약 350 kDa, 약 50 kDa 내지 약 300 kDa, 약 50 kDa 내지 약 250 kDa, 약 50 kDa 내지 약 200 kDa, 또는 약 50 kDa 내지 약 225 kDa)의 분자량을 갖는다.
- [0470] 일부 경우에서, 상기 PEG 중합체는 약 5 kDa 내지 약 250 kDa (예컨데, 약 1 kDa, 약 5 kDa, 약 10 kDa, 약 15 kDa, 약 20 kDa, 약 25 kDa, 약 30 kDa, 약 35 kDa, 약 40 kDa, 약 50 kDa, 약 60 kDa, 약 70 kDa, 약 80 kDa, 약 90 kDa, 100 kDa, 약 110 kDa, 약 120 kDa, 약 130 kDa, 약 140 kDa, 약 150 kDa, 약 160 kDa, 약 170 kDa, 약 180 kDa, 약 190 kDa, 약 200 kDa, 약 210 kDa, 약 220 kDa, 약 230 kDa, 약 240 kDa, 또는 약 250 kDa)의 분자량을 보유한다. 특정 경우에, 상기 PEG 중합체는 약 20 kDa의 분자량을 보유한다. 다른 경우에 있어서, 상기 PEG 중합체는 약 40 kDa의 분자량을 보유한다.
- [0471] 임의의 전술한 분자량은 중량-평균 분자량 (또한 중량-평균 몰 질량으로도 공지됨)일 수 있다.
- [0472] 일부 경우에서, 상기 PEG 중합체는 PEG 사합체(tetramer)다. PEG 사합체는 예를 들면, NOF America SUNBRIGHT® PTE-400MA, PTE-200MA, PTE-100MA, 및 JenKem Technology USA 4개 팔(arm) PEG 말레이미드 (카탈로그 번호 4ARM-MAL)를 이용할 수 있다. 일부 경우에서, 상기 PEG 사합체는 펜타에리트리톨 코어를 갖는다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 PEG 사합체는 구조식 (I)의 구조를 함유하며, 이때 n은 독립적으로 임의의 적합한 정수다:
- [0473] 구조식 I:



[0474]

[0475]

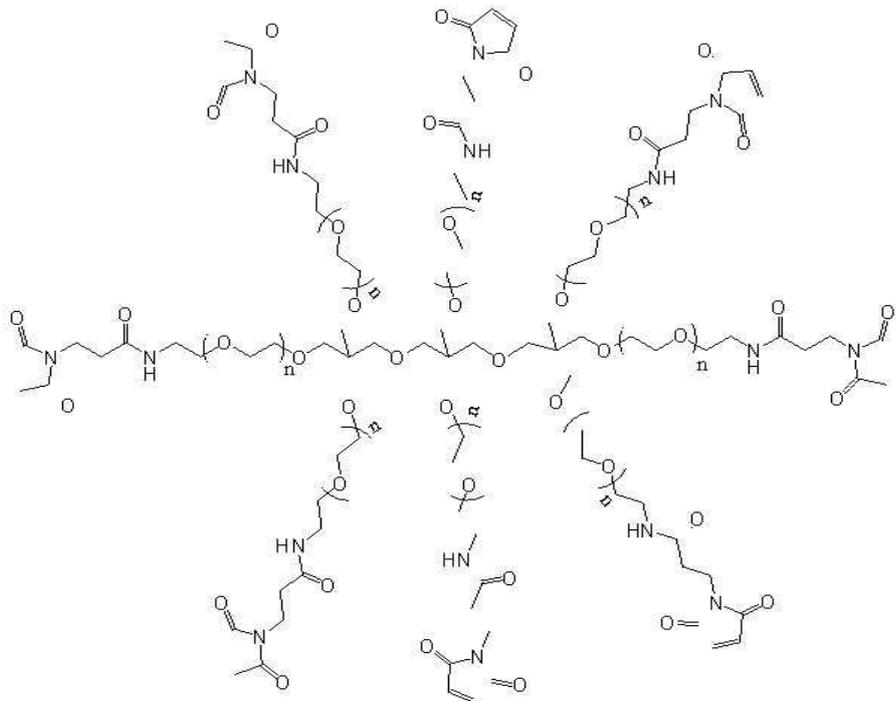
또다른 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 PEG 중합체는 PEG 육합체(hexamer)다. PEG 육합체는 예를 들면, JenKem Technology USA 6개 팔(arm) PEG 아민 (카탈로그 번호 6ARM(DP)-NH₂HCl), 또는 Quanta BioDesign의 PEG 육합체를 이용할 수 있다. 일부 경우에서, 상기 PEG 육합체는 디펜틸에리트리톨 코어를 함유한다.

[0476]

일부 경우에서, 상기 PEG 중합체는 PEG 십합체(octamer)다. PEG 십합체는 예를 들면, NOF America SUNBRIGHT® HGEO 시리즈 또는 JenKem Technology USA 8개 팔(arm) PEG 말레이미드 (카탈로그 번호 8ARM(TP)-MAL)를 이용할 수 있다. 일부 경우에서, 상기 PEG 십합체는 트리펜타에리트리톨 코어를 함유할 수 있다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 PEG 십합체는 구조식 (II)의 구조를 함유하며, 이때 n은 독립적으로 임의의 적합한 정수다:

[0477]

구조식 II:



[0478]

[0479]

여전히 또다른 실시예, 일부 경우에서, 상기 PEG 십합체는 트리펜타에리트리톨 코어를 함유한다.

[0480]

본원에서 기술된, 그리고 당분야에 공지된 것을 포함하는 임의의 적합한 콘쥬게이션 방법을 이용하여 본 발명의 항-VEGF 항체를 중합체에 콘쥬게이트할 수 있음을 이해해야 한다. 예를 들면, 상기 중합체는 일차 아민기, 카르복실기, 술폰히드릴기, 또는 카르보닐기를 포함하는, 임의의 적합한 단백질 기능기에 콘쥬게이션될 수 있다. 임의의 적합한 화학 반응기는 단백질 기능기, 예를 들면, 카르보이미드 (예컨데, EDC), NHS 에스테르, 이미도에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르, 히드록시메틸 포스포네, 말레이미드, 할로아세틸 (예컨데, 브로모아세틸 또는 요오드아세틸), 피리디디술폰, 티오술폰에이트, 비닐술폰, 히드라진, 알콕시아민, 디아지린, 아릴 아지드, 이소시아네이트, 또는 당분야에 공지된 기타 것들을 표적화하는데 이용할 수 있다. 예를 들면, Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 3rd Edition, 2013 참고.

[0481]

임의의 전술한 항체 콘쥬게이트는 약 5 nm 내지 약 200 nm (예컨데, 약 5 nm, 약 10 nm, 약 20 nm, 약 30 nm, 약 40 nm, 약 50 nm, 약 60 nm, 약 70 nm, 약 80 nm, 약 90 nm, 약 100 nm, 약 110 nm, 약 120 nm, 약 130 nm, 약 140 nm, 약 150 nm, 약 160 nm, 약 170 nm, 약 180 nm, 약 190 nm, 또는 약 200 nm)의 유체역학적 반경을 가질 수 있다. 일부 경우에서, 상기 항체 콘쥬게이트는 약 5 nm 내지 약 150 nm (예컨데, 약 5 nm, 약 10

nm, 약 20 nm, 약 30 nm, 약 40 nm, 약 50 nm, 약 60 nm, 약 70 nm, 약 80 nm, 약 90 nm, 약 100 nm, 약 110 nm, 약 120 nm, 약 130 nm, 약 140 nm, 또는 약 150 nm)의 유체역학적 반경을 가질 수 있다. 일부 경우에서, 상기 항체 콘주게이트는 유체역학적 반경 약 5 nm 내지 약 100 nm (예컨대, 약 5 nm, 약 10 nm, 약 20 nm, 약 30 nm, 약 40 nm, 약 50 nm, 약 60 nm, 약 70 nm, 약 80 nm, 약 90 nm, 또는 약 100 nm)의 유체역학적 반경을 가질 수 있다. 일부 경우에서, 상기 항체 콘주게이트는 약 5 nm 내지 약 60 nm (예컨대, 약 5 nm, 약 10 nm, 약 20 nm, 약 30 nm, 약 40 nm, 약 50 nm, 또는 약 60 nm)의 유체역학적 반경을 가질 수 있다. 일부 경우에서, 상기 항체 콘주게이트는 약 25 nm 내지 약 35 nm (예컨대, 약 25 nm, 약 26 nm, 약 27 nm, 약 28 nm, 약 29 nm, 약 30 nm, 약 31 nm, 약 32 nm, 약 33 nm, 약 34 nm, 또는 약 35 nm)의 유체역학적 반경을 가질 수 있다. 일부 경우에서, 상기 유체역학적 반경은 약 28 nm이다.

[0482] 일부 경우에서, 상기 항체 콘주게이트는 약 10 nm 내지 약 200 nm, 약 10 nm 내지 약 180 nm, 약 10 nm 내지 약 160 nm, 약 10 nm 내지 약 140 nm, 약 10 nm 내지 약 120 nm, 약 10 nm 내지 약 100 nm, 약 10 nm 내지 약 80 nm, 약 10 nm 내지 약 60 nm, 약 10 nm 내지 약 50 nm, 약 10 nm 내지 약 40 nm, 약 10 nm 내지 약 30 nm, 약 20 nm 내지 약 200 nm, 약 20 nm 내지 약 180 nm, 약 20 nm 내지 약 160 nm, 약 20 nm 내지 약 140 nm, 약 20 nm 내지 약 120 nm, 약 20 nm 내지 약 100 nm, 약 20 nm 내지 약 80 nm, 약 20 nm 내지 약 60 nm, 약 20 nm 내지 약 50 nm, 약 20 nm 내지 약 40 nm, 약 20 nm 내지 약 30 nm, 약 30 nm 내지 약 200 nm, 약 30 nm 내지 약 180 nm, 약 30 nm 내지 약 160 nm, 약 30 nm 내지 약 140 nm, 약 30 nm 내지 약 120 nm, 약 30 nm 내지 약 100 nm, 약 30 nm 내지 약 80 nm, 약 30 nm 내지 약 60 nm, 약 30 nm 내지 약 50 nm, 약 30 nm 내지 약 40 nm, 약 40 nm 내지 약 200 nm, 약 40 nm 내지 약 180 nm, 약 40 nm 내지 약 160 nm, 약 40 nm 내지 약 140 nm, 약 40 nm 내지 약 120 nm, 약 40 nm 내지 약 100 nm, 약 40 nm 내지 약 80 nm, 약 40 nm 내지 약 60 nm, 약 40 nm 내지 약 50 nm, 약 50 nm 내지 약 200 nm, 약 50 nm 내지 약 180 nm, 약 50 nm 내지 약 160 nm, 약 50 nm 내지 약 140 nm, 약 50 nm 내지 약 120 nm, 약 50 nm 내지 약 100 nm, 약 50 nm 내지 약 80 nm, 약 50 nm 내지 약 60 nm, 약 60 nm 내지 약 200 nm, 약 60 nm 내지 약 180 nm, 약 60 nm 내지 약 160 nm, 약 60 nm 내지 약 140 nm, 약 60 nm 내지 약 120 nm, 약 60 nm 내지 약 100 nm, 또는 약 60 nm 내지 약 80 nm의 유체역학적 반경을 가질 수 있다.

[0483] 일부 경우에서, 상기 항체 콘주게이트는 프로드럭 항체 콘주게이트 (운반체-연계된 프로드럭으로 또한 지칭된다)이며, 이때 항-VEGF 항체 (예컨대, 본원에서 기술된 항-VEGF 항체, 예컨대, G6.31 AARR)는 예를 들면, 링커 (예컨대, 가역적 프로드럭 링커)를 통하여 운반체 (예컨대, 히드로겔)에 가역적으로 콘주게이트된다. 이 방법은 예를 들면, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2006/003014, WO 2009/095479, WO 2011/012715, WO 2013/053856, 및 WO 2014/056923에서 더 기술되며, 이들은 전문이 본 명세서의 참고자료에 편입된다. 이러한 프로드럭 항체 콘주게이트는 Ascendis Pharma (예컨대, TransCon technology platform)에서 상업적으로 이용 가능하다. 상기 링커는 타고난 자가-절단 성질 (예컨대, 상기 링커는 눈에 투여될 때 비-효소적 가수분해될 수 있고)을 보유할 수 있고, 이로 인하여 눈(예컨대, 유리체)에서 항-VEGF 항체의 시간-조절된 방출이 가능하다.

[0484] 예를 들면, 일부 경우에서, 본 발명은 링커에 의해 운반체에 공유적으로 부착된 항-VEGF 항체 (예컨대, 본원에서 기술된 항-VEGF 항체, 이를 테면, G6.31 AARR)를 함유하는 프로드럭 항체 콘주게이트를 제공한다. 특정 경우에, 상기 링커는 가역적 프로드럭 링커이다. 일부 경우에서, 상기 운반체는 중합체, 예를 들면, PEG를 함유한다. 상기 PEG는 예를 들면, 선형, 분기형, 다중-팔(multi-arm), 또는 가지돌기 PEG이다. 일부 경우에서, 상기 운반체는 생분해가능한 히드로겔을 비롯한 히드로겔이다. 임의의 적합한 히드로겔, 예를 들면, PEG-기반의 히드로겔이 이용될 수 있다. PEG-기반의 히드로겔은 예를 들면, 최소한 10% PEG, 최소한 20% PEG, 최소한 30% PEG, 또는 그 이상을 함유할 수 있다. 상기 히드로겔은 미세미립자 비드 형태일 수 있다. 이러한 미세미립자 비드는 약 1 μm 내지 약 1000 μm, 예컨대, 약 5 μm 내지 약 500 μm, 약 10 μm 내지 약 100 μm, 약 20 μm 내지 약 100 μm, 또는 약 20 μm 내지 약 80 μm의 직경을 보유할 수 있다. 비드 직경은 상기 미세미립자 비드가 등장성 수용액 완충액에 현탁될 때, 측정될 수 있다. 일부 경우에서, 상기 히드로겔은 WO 2006/003014 또는 WO 2011/012715에서 기술된 임의의 히드로겔일 수 있다.

[0485] 전술한 임의의 항체 콘주게이트에서, 상기 항체는 VEGF에 결합하는 항체 단편, 예를 들면, VEGF에 결합하는 본원에서 기술된 항-VEGF 항체의 항체 단편일 수 있다. 일부 경우에서, 상기 항체 단편은 Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv, 그리고 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군에서 선택된다. 단편. 특정 경우에, 상기 항체 단편은 Fab, Fab', 또는 Fab-C이다. 일부 경우에서, 상기 항체 단편은 Fab-C이다.

- [0486] 임의의 전술한 항체 콘주게이트는 중합체 (예컨데, 상기 친수성 중합체)에 공유적으로 부착되어 있지 않은 기준 항체와 비교하여 증가된 안구 반감기를 가질 수 있다. 일부 경우에서, 상기 안구 반감기는 상기 기준 항체와 비교하였을 때 최소한 약 2-배 (예컨데, 약 2-배, 약 3-배, 약 4-배, 약 5-배, 약 6-배, 약 7-배, 약 8-배, 약 9-배, 약 10-배, 약 12-배, 약 14-배, 약 16-배, 약 18-배, 약 20-배, 또는 그 이상) 증가된다. 일부 경우에서, 상기 시각 반감기는 기준 항체와 비교하여 최소한 약 4-배 증가된다. 일부 경우에서, 상기 안구 반감기는 유리체 반감기이다. 일부 경우에서, 상기 기준 항체는 상기 항체 콘주게이트의 항체와 동일하다. 다른 경우에서, 상기 기준 항체는 상기 항체 콘주게이트의 항체와 동일하지 않다.
- [0487] 임의의 전술한 항체 콘주게이트는 중합체 (예컨데, 상기 친수성 중합체)에 공유적으로 부착되어 있지 않은 기준 항체와 비교하여 감소된 안구 제거(ocular clearance)를 가질 수 있다. 일부 경우에서, 상기 제거는 기준 항체와 비교하였을 때, 최소한 약 2-배 (예컨데, 약 2-배, 약 3-배, 약 4-배, 약 5-배, 약 6-배, 약 7-배, 약 8-배, 약 9-배, 약 10-배, 약 12-배, 약 14-배, 약 16-배, 약 18-배, 약 20-배, 또는 그 이상) 감소된다. 일부 경우에서, 상기 제거는 기준 항체와 비교하여 최소한 약 4-배 감소된다. 일부 경우에서, 상기 제거는 유리체로부터의 제거다. 일부 경우에서, 상기 기준 항체는 상기 항체 콘주게이트의 항체와 동일하다. 다른 경우에서, 상기 기준 항체는 상기 항체 콘주게이트의 항체와 동일하지 않다.
- [0488] 일부 경우에서, 임의의 전술한 항체 콘주게이트 (예컨데, HA 콘주게이트, PEG 콘주게이트, 및 프로드럭 항체 콘주게이트)의 안구내 2번 투여(예컨데, 유리체내 주사에 의해) 사이의 시격은 최소한 1 개월, 예컨데, 최소한 1 개월, 최소한 5 주, 최소한 6 주, 최소한 7 주, 최소한 8 주, 최소한 9 주, 최소한 10 주, 최소한 11 주, 최소한 12 주, 최소한 13 주, 최소한 14 주, 최소한 15 주, 최소한 16 주, 최소한 20 주, 최소한 24 주, 최소한 28 주, 최소한 32 주, 최소한 36 주, 최소한 40 주, 최소한 44 주, 최소한 48 주, 최소한 52 주 또는 그 이상이다. 일부 경우에서, 안구내 2차례 투여 간의 최대 시격은 4년을 넘지 않는데, 예컨데, 3년을 넘지 않고, 2년을 넘지 않거나, 또는 1년을 넘지 않는다. 상기 항체 콘주게이트는 예를 들면, 매 2개월 내지 12 개월, 예컨데, 매 4 개월 내지 10 개월에 투여될 수 있다. 일부 경우에서, 상기 항체 콘주게이트는 매 6 개월에 투여된다.
- [0489] 본 발명은 상기에서 기술된 임의의 항체 콘주게이트 (예컨데, HA 콘주게이트, PEG 콘주게이트, 및 프로드럭 항체 콘주게이트)를 포함하는 조성물 (예컨데, 약학 조성물)을 또한 제공한다. 특정 구체예들에서, 상기 조성물은 하나 또는 그 이상의 추가 화합물을 포함한다. 특정 구체예들에서, 상기 추가 화합물은 IL-1 β ; IL-6; IL-6R; PDGF; 앙지오포이에틴; 앙지오포이에틴 2; Tie2; S1P; 인테그린 $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, 및 $\alpha 5 \beta 1$; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트로포이에틴; 보체 인자 D; TNF α ; HtrA1; VEGF 수용체; ST-2 수용체; 그리고 노인성 황반 변성 (AMD) 위험에 유전적으로 연계된 단백질, 이를 테면, 보체 경로 구성요소 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a, 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; 인터루킨-8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LPC; COL10A1; 그리고 TNFRSF10A로 구성된 군에서 선택된 제 2의 생물학적 분자에 결합한다. 특정 구체예들에서, 상기 추가 화합물은 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 이중특이적 항체 (예컨데, 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체, 이를 테면, RG-7716 또는 WO 2010/069532 또는 WO 2016/073157 에서 기술된 임의의 이중특이적 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체 또는 이의 변이체다. 또다른 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 항-IL-6 항체, 예를 들면, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics; 예컨데, WO 2016/073890 참고), 실투시마브 (SYLVANT®), 오로키주마브, 클라자키주마브, 시루쿠마브, 엘시리모마브, 게릴림주마브, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921, 또는 이의 변이체다. 여전히 추가 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 항-IL-6R 항체, 예를 들면, 토셀리주마브 (ACTEMRA®) (예컨데, WO 1992/019579 참고), 사리루마브, 보바틸리주마브 (ALX-0061), SA-237, 또는 이의 변이체다.
- [0490] 본 발명은 상기에서 기술된 임의의 항체 콘주게이트 (예컨데, HA 콘주게이트, PEG 콘주게이트, 및 프로드럭 항체 콘주게이트)를 포함하는 조성물 (예컨데, 약학 조성물)을 더 제공한다.
- [0491] 2. 융합 단백질
- [0492] 본 발명은 항-VEGF 항체 (예컨데, 본원에서 기술된 임의의 항-VEGF 항체, 예컨데, G6.31 AARR) 및 안구 결합 도메인을 함유하는 융합 단백질을 제공한다. 상기 시각 결합 도메인은 예를 들면, 눈(예컨데, 각막, 유리체, 망막, 망막 색소 상피, 또는 맥락막)에서 볼 수 있는 생물학적 물질에 결합할 수 있고, 이들은 상기 항체의 안구 (예컨데, 유리체) 잔류 시간 (예를 들면, 상기 반감기를 증가시키거나 및/또는 제거를 감소시킴으로써)를 증가시킬 수 있다. 상기 시각 결합 도메인은 예를 들면, 세포외 매트릭스 성분을 비롯한 임의의 적합한 생물학적으로 결합할 수 있다. 예를 들면, 눈(예컨데, 상기 유리체)에서 적합한 생물학적 물질은 세포외 매트릭스 성분 이를 테면, 탄수화물 (예컨데, 하전된 탄수화물 (예컨데, 글리코사미노글리칸)), 당단백질 (예컨데, 피브릴린 및 읍

티센), 그리고 단백질 (예컨대, 콜라겐 (예컨대, 콜라겐 유형 I-XXVII, 특히 콜라겐 II, 콜라겐 IX, 콜라겐 V, 콜라겐 VI, 콜라겐 XI, 및 이의 이형태 콜라겐 피브릴), 또는 예를 들면, Le Goff et al., *Eye* 22:1214-1222, 2008에서 기술된 기타 세포외 매트릭스 구성요소를 함유할 수 있다. 일부 경우에서, 상기 세포외 매트릭스 성분은 글리코사미노글리칸, 예를 들면, 히알루론산 (HA) 또는 프로테오글리칸 (예컨대, 콘드로이틴 술페이트 또는 헤파린 술페이트)이다. 특정 경우에, 상기 글리코사미노글리칸은 HA이다. HA 결합 도메인, 뿐만 아니라 HA 결합 도메인을 함유하는 융합 단백질은 예를 들면, Park et al., *Molecular Pharmaceutics* 6(3):801-812, 2009; U.S. 특허 번호 5,986,052, 7,183,377, 7,723,472, 및 8,846,034; U.S. 특허 출원 공개 번호 2004/005277; 그리고 국제 특허 출원 공개 번호 WO 1998/052590, WO 2010/045506, WO 2014/099997, WO 2015/198243, WO 2015/110809에서 기술되며, 이들은 전문이 본 명세서의 참고자료에 편입된다. 상기 시각 결합 도메인은 상기 항체에 공유적으로 부착될 수 있는데, 예를 들면, 상기 항-VEGF 항체에 재조합에 의해 융합됨으로써 부착될 수 있다. 다른 경우에 있어서, 상기 시각 결합 도메인은 항-VEGF 항체에 공유적으로 콘주게이트되거나 또는 비-공유적으로 콘주게이트된다 (예컨대, 바이오틴-스트렙타비딘 링키지에 의해).

[0493] 예를 들면, 본 발명은 HA 결합 도메인에 공유적으로 부착된 항-VEGF 항체 (예컨대, 본원에서 기술된 항-VEGF 항체, 이를 테면, G6.31 AARR)를 함유하는 융합 단백질을 제공한다. 일부 경우에서, 상기 HA 결합 도메인은 항체의 중쇄 또는 경쇄에 공유적으로 부착된다. 예를 들면, 상기 HA 결합 도메인은 중쇄에 공유적으로 부착된다. 또다른 실시예에서, 상기 HA 결합 도메인은 경쇄에 공유적으로 부착된다. 상기 HA 결합 도메인은 임의의 적합한 부위, 예를 들면, N-말단, C-말단, 또는 내부 부위 (예컨대, 삽입)에서 상기 항-VEGF 항체에 공유적으로 부착될 수 있다. 상기 HA 결합 도메인은 중쇄의 C-말단 또는 경쇄의 C-말단에 공유적으로 부착될 수 있다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 HA 결합 도메인은 중쇄의 C-말단에 공유적으로 부착될 수 있다. 다른 경우에 있어서, 상기 HA 결합 도메인은 경쇄의 C-말단에 공유적으로 부착될 수 있다.

[0494] 임의의 전술한 융합 단백질에서, 상기 융합 단백질은 링커를 더 포함할 수 있는데, 상기 링커는 상기 항체와 상기 HA 결합 도메인 사이에 위치한다. 임의의 적합한 링커, 예를 들면, $(\text{Gly}_n\text{-Ser}_n)_n$ 또는 $(\text{Ser}_n\text{-Gly}_n)_n$ 링커가 이용될 수 있으며, 이때 n은 독립적으로 1 또는 그 이상의 정수 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 그 이상)이다. WO 2014/099997은 다수의 링커를 설명하는데, 이중 임의의 것이 상기 본 발명의 융합 단백질에 이용될 수 있다. 일부 경우에서, 링커는 아미노산 서열 GGGGS (서열 번호: 61)를 함유할 수 있다. 일부 경우에서, 링커는 아미노산 서열 GGGGS (서열 번호: 61)로 구성될 수 있다. 기타 적합한 링커는 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$, $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$, 그리고 이와 유사한 것들을 함유한다. 일부 경우에서, 세린은 알라닌 (예컨대, (Gly_4Ala) 또는 (Gly_3Ala))으로 대체될 수 있다.

[0495] 임의의 전술한 융합 단백질에서, 상기 항체는 VEGF에 결합하는 항체 단편일 수 있다. 일부 경우에서, 상기 항체 단편은 Fab, Fab', Fab'-C, Fab'-SH, Fv, scFv, 그리고 $(\text{Fab}')_2$ 단편으로 구성된 군에서 선택된다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 항체 단편은 Fab, Fab', 또는 Fab'-C이다. 일부 경우에서, 상기 HA 결합 도메인은 Fab의 CH1 도메인의 C-말단에 공유적으로 부착된다. 다른 경우에 있어서, 상기 HA 결합 단백질은 Fab의 CL 도메인의 C-말단에 공유적으로 부착된다.

[0496] 임의의 전술한 융합 단백질에서, 상기 HA 결합 도메인은 링크 모듈, G1 도메인, 리신-풍부 올리고펩티드, 그리고 당분야에 공지된 기타 HA 결합 도메인으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 예를 들면, 상기 HA 결합 도메인은 Park et al., *Molecular Pharmaceutics* 6(3):801-812, 2009; U.S. 특허 번호 5,986,052, 7,183,377, 7,723,472, 및 8,846,034; U.S. 특허 출원 공개 번호 2004/005277; 및/또는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 1998/052590, WO 2010/045506, WO 2014/099997, WO 2015/198243, WO 2015/110809에서 기술된 임의의 HA 결합 도메인일 수 있다. 예를 들면, WO 2014/099997에서 기술된 바와 같이, 상기 HA 결합 도메인은 HA10, HA10.1, HA10.2, HA11, 또는 HA11.1일 수 있다.

[0497] 일부 경우에서, 상기 HA 결합 도메인은 링크 모듈이다. 임의의 적합한 링크 모듈이 이용될 수 있다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 링크 모듈은 TSG6, CD44, 림프관 내피 히알루로난 수용체 1 (LYVE-1), 히알루로난 및 프로테오글리칸 링크 단백질 (HAPLN) 1, HAPLN2, HAPLN3, HAPLN4, 아그레칸, 브레비칸, 뉴로칸, 포스파칸, 베르시칸, CAB61358, KIA0527, 스타빌린-1, 및 스타빌린-2 링크 모듈, 또는 이의 변이체들로 구성된 군에서 선택된다. 일부 경우에서, 상기 링크 모듈은 TSG6 링크 모듈, 예를 들면, 인간 TSG6 링크 모듈이다. 일부 경우에서, HA 결합 단백질 TSG6의 상기 링크 모듈은 인간 TSG6 (UniProt 기탁 번호 P98066)의 아미노산 잔기 36-128를 포함할 수 있다.

- [0498] 임의의 전술한 융합 단백질은 최소한 하나의 추가 HA 결합 도메인을 더 함유할 수 있다. 예를 들면, 상기 융합 단백질은 최소한 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개의 추가 HA 결합 도메인(들)을 더 함유할 수 있다. 일부 경우에서, 상기 최소한 하나의 추가 HA 결합 도메인은 이 항체의 중쇄 또는 경쇄에 공유적으로 부착된다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 최소한 하나의 추가 HA 결합 도메인은 이 항체의 중쇄에 공유적으로 부착된다. 다른 경우에 있어서, 상기 최소한 하나의 추가 HA 결합 도메인은 이 항체의 경쇄에 공유적으로 부착된다. 일부 경우에서, 상기 최소한 하나의 추가 HA 결합 단백질은 링커를 통하여 상기 항체에 연계된다. 임의의 적합한 링커, 이를 테면, 상기에서 기술된 링커를 이용할 수 있다. 일부 경우에서, 링커는 상기 아미노산 서열 GGGGS (서열 번호: 61)을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 링커는 아미노산 서열 GGGGS (서열 번호: 61)로 구성된다. 일부 경우에서, 제 1의 HA 결합 도메인은 중쇄에 공유적으로 부착되고, 제 2의 HA 결합 도메인은 경쇄에 공유적으로 부착된다. 상기 최소한 하나의 추가 HA 결합 도메인은 임의의 적합한 부위, 예를 들면, N-말단, C-말단, 또는 내부 부위 (예컨대, 삽입)에서 상기 항-VEGF 항체에 공유적으로 부착될 수 있다. 항체가 항체에서 하나 이상의 부가적인 HA 결합 도메인을 포함하는 경우, 삽입은 항체의 단일 부위 또는 항체의 다중 별개 부위에 있을 수 있다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 제 1의 HA 결합 도메인은 중쇄의 C-말단에 공유적으로 부착되고, 상기 제 2의 HA 결합 도메인은 경쇄의 C-말단에 공유적으로 부착된다. 일부 경우에서, 상기 최소한 하나의 추가 HA 결합 단백질은 링크 모듈, G1 도메인, 그리고 리신-풍부 올리고펩티드로 구성된 군에서 선택된다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 최소한 하나의 추가 HA 결합 단백질은 링크 모듈이다. 상기 링크 모듈은 본원에서 기술된 임의의 또는 당분야에 공지된 임의의 링크 모듈일 수 있다. 일부 경우에서, 상기 링크 모듈은 TSG6 링크 모듈, 예를 들면, 인간 TSG6 링크 모듈이다. 일부 경우에서, HA 결합 단백질 TSG6의 상기 링크 모듈은 인간 TSG6 (UniProt 기탁 번호 P98066)의 아미노산 잔기 36-128를 포함할 수 있다.
- [0499] 임의의 전술한 융합 단백질은 VEGF 및 HA에 특이적으로 결합한다. 일부 경우에서, 상기 융합 단백질은 약 10 μM 또는 이보다 낮은 Kd로 HA에 결합한다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 융합 단백질은 약 10 μM 또는 이보다 낮은, 8 μM 또는 이보다 낮은, 6 μM 또는 이보다 낮은, 4 μM 또는 이보다 낮은, 2 μM 또는 이보다 낮은, 1 μM 또는 이보다 낮은, 750 nM 또는 이보다 낮은, 500 nM 또는 이보다 낮은, 250 nM 또는 이보다 낮은, 100 nM 또는 이보다 낮은, 50 nM 또는 이보다 낮은, 10 nM 또는 이보다 낮은, 또는 1 nM 또는 이보다 낮은 Kd로 HA에 결합한다. 일부 경우에서, 상기 융합 단백질은 약 2 nM 또는 이보다 낮은 Kd로 HA에 결합한다. 일부 경우에서, 상기 융합 단백질은 약 1 nM 내지 약 2 μM , 예를 들면, 약 1 nM 내지 약 1.8 μM , 약 1 nM 내지 약 1.6 μM , 약 1 nM 내지 약 1.4 μM , 약 1 nM 내지 약 1.2 μM , 약 1 nM 내지 약 1.0 μM , 약 1 nM 내지 약 900 nM, 약 1 nM 내지 약 800 nM, 약 1 nM 내지 약 700 nM, 약 1 nM 내지 약 600 nM, 약 1 nM 내지 약 500 nM, 약 1 nM 내지 약 400 nM, 약 1 nM 내지 약 300 nM, 약 1 nM 내지 약 200 nM, 약 1 nM 내지 약 100 nM, 약 1 nM 내지 약 50 nM, 약 1 nM 내지 약 40 nM, 약 1 nM 내지 약 30 nM, 약 1 nM 내지 약 20 nM, 약 1 nM 내지 약 10 nM, 약 5 nM 내지 약 100 nM, 약 5 nM 내지 약 50 nM, 약 5 nM 내지 약 25 nM, 약 5 nM 내지 약 15 nM, 또는 약 5 nM 내지 약 10 nM의 Kd로 HA에 결합한다. 일부 경우에서, 상기 융합 단백질은 약 10 nM의 Kd로 HA에 결합한다.
- [0500] 임의의 전술한 상기 융합 단백질은 HA 결합 도메인에 공유적으로 부착되어 있지 않은 기준 항체에 비교하여 증가된 안구 반감기를 갖는다. 일부 경우에서, 상기 안구 반감기는 상기 기준 항체와 비교하였을 때 최소한 약 2-배 (예컨대, 약 2-배, 약 3-배, 약 4-배, 약 5-배, 약 6-배, 약 7-배, 약 8-배, 약 9-배, 약 10-배, 약 12-배, 약 14-배, 약 16-배, 약 18-배, 약 20-배, 또는 그 이상) 증가된다. 일부 경우에서, 상기 시각 반감기는 기준 항체와 비교하여 최소한 약 4-배 증가된다. 일부 경우에서, 상기 안구 반감기는 유리체 반감기이다. 일부 경우에서, 상기 기준 항체는 상기 융합 단백질의 항체와 동일하다. 다른 경우에서, 상기 기준 항체는 상기 융합 단백질의 항체와 동일하지 않다.
- [0501] 임의의 전술한 융합 단백질은 HA 결합 도메인에 공유적으로 부착되어 있지 않은 기준 항체에 비교하여 감소된 안구 제거를 가질 수 있다. 일부 경우에서, 상기 제거는 기준 항체와 비교하였을 때, 최소한 약 2-배 (예컨대, 약 2-배, 약 3-배, 약 4-배, 약 5-배, 약 6-배, 약 7-배, 약 8-배, 약 9-배, 약 10-배, 약 12-배, 약 14-배, 약 16-배, 약 18-배, 약 20-배, 또는 그 이상) 감소된다. 일부 경우에서, 상기 제거는 기준 항체와 비교하여 최소한 약 4-배 감소된다. 일부 경우에서, 상기 제거는 유리체로부터의 제거다. 일부 경우에서, 상기 기준 항체는 상기 융합 단백질의 항체와 동일하다. 다른 경우에서, 상기 기준 항체는 상기 융합 단백질의 항체와 동일하지 않다.
- [0502] 일부 경우에서, 임의의 전술한 융합 단백질의 안구내 2차례 투여 (예컨대, 유리체내 주사에 의해)의 시격은 최소한 1 개월, 예컨대, 최소한 1 개월, 최소한 5 주, 최소한 6 주, 최소한 7 주, 최소한 8 주, 최소한 9 주, 최

소한 10 주, 최소한 11 주, 최소한 12 주, 최소한 13 주, 최소한 14 주, 최소한 15 주, 최소한 16 주, 최소한 20 주, 최소한 24 주, 최소한 28 주, 최소한 32 주, 최소한 36 주, 최소한 40 주, 최소한 44 주, 최소한 48 주, 최소한 52 주 또는 그 이상이다. 일부 경우에서, 안구내 2차례 투여 간의 최대 시격은 4년을 넘지 않는데, 예컨대, 3년을 넘지 않고, 2년을 넘지 않거나, 또는 1년을 넘지 않는다. 상기 융합 단백질은 예를 들면, 매 2 개월 내지 12 개월, 예컨대, 매 4개월 내지 10 개월에 투여될 수 있다. 일부 경우에서, 상기 융합 단백질은 매 6 개월에 투여된다.

[0503] 본 발명은 전술한 임의의 상기 융합 단백질을 포함하는 조성물 (예컨대, 약학 조성물)을 또한 제공한다. 특정 구체예들에서, 상기 조성물은 하나 또는 그 이상의 추가 화합물을 포함한다. 특정 구체예들에서, 상기 추가 화합물은 IL-1 β ; IL-6; IL-6R; PDGF; 양지오포이에틴; 양지오포이에틴 2; Tie2; S1P; 인테그린 $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, 및 $\alpha 5\beta 1$; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트로포이에틴; 보체 인자 D; TNF α ; HtrA1; VEGF 수용체; ST-2 수용체; 그리고 AMD 위험에 유전적으로 연계된 단백질, 이를 테면, 보체 경로 구성요소 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a, 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LPC; COL10A1; 그리고 TNFRSF10A로 구성된 군에서 선택된 제 2의 생물학적 분자에 결합한다. 특정 구체예들에서, 상기 추가 화합물은 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 이중특이적 항체 (예컨대, 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체, 이를 테면, RG-7716 또는 WO 2010/069532 또는 WO 2016/073157 에서 기술된 임의의 이중특이적 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체 또는 이의 변이체다. 또다른 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 항-IL-6 항체, 예를 들면, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics; 예컨대, WO 2016/073890 참고), 실투시마브 (SYLVANT®), 오로키주마브, 클라자키주마브, 시루쿠마브, 엘시리모마브, 게릴 립주마브, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921, 또는 이의 변이체다. 여전히 추가 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 항-IL-6R 항체, 예를 들면, 토셀리주마브 (ACTEMRA®) (예컨대, WO 1992/019579 참고), 사 리루마브, 보바릴리주마브 (ALX-0061), SA-237, 또는 이의 변이체다.

[0504] 본 발명은 상기 임의의 융합 단백질과 추가 VEGF 항진제를 포함하는 조성물 (예컨대, 약학 조성물)을 또한 제공한다.

[0505] 3. 중합체 제제

[0506] 본 발명은 본 발명의 항-VEGF 항체 및 중합체를 함유하는 제제를 제공한다. 상기 중합체 제제는 예를 들면, 미 소구(microsphere), 임플란트, 히드로겔, 오르가노겔(organogel), 나노-어셈블리(nano-assembly), 미셀, 제자리 형성(in situ forming) 데포우, 또는 당분야에 공지된 또다른 유형의 중합체 제제일 수 있다. 임의의 적합한 중합체는 상기 본 발명의 중합체 제제에 이용될 수 있다. 예를 들면, 상기 중합체는 친수성 중합체 또는 소수성 중합체일 수 있다. 친수성 중합체는 물-가용성 중합체일 수 있다. 임의의 적합한 친수성 중합체는 예를 들면, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2011/066417 또는 Pelegri-O'Day et al. *J. Am. Chem. Soc.* 136:14323-14332, 2014에서 기술된 친수성 중합체일 수 있다. 다른 경우에 있어서, 예를 들면, 소수성 중합체가 이용될 수 있다. 상기 중합체는 생분해가능하거나 및/또는 생물적합성일 수 있다.

[0507] 이용될 수 있는 예시적인, 비-제한적 친수성 중합체는 히알루론산 (HA), 폴리에틸렌 글리콜 (PEG; 폴리(에틸렌 글리콜)) (예컨대, 직쇄 PEG, 분기형 PEG, 빗 모양의 PEG, 및 가지돌기 PEG), 폴리[에틸렌 옥시드]-co-(메틸렌 에틸렌 옥시드)], 폴리(폴리(에틸렌 글리콜) 메틸 에테르 메타아크릴레이트) (pPEGMA), 아가로스, 알기네이트, 카라기난, 카르복시메틸셀룰로오스, 셀룰로오스, 셀룰로오스 유도체들, 키토산, 콘드로이틴 술페이트, 콜라겐, 데르마탄 술페이트, 텍스트란, 텍스트란 술페이트, 피브린, 피브리노겐, 피브로넥틴, 푸코이단, 젤라틴, 글리코 사미노글리칸 (GAGs), 당중합체, 헤파린, 헤파린 술페이트, 고도로-분기형 폴리사카라이드 (예컨대, 갈락토스 텐드라이머), 케라탄 술페이트, 메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스 (HPMC), 폴리(N-(2-히드록시프로필)메타아크릴아미드) (pHPMA), 펙틴, 펙틴 유도체들, 펜토산 폴리술페이트, 전분, 히드록시에틸 전분 (HES), 스티렌, 비트로넥틴, 폴리(아크릴산), 폴리(메타아크릴산), 폴리(아크릴아미드), 폴리(아크릴산), 폴리(아민), 폴리(아미노산), 폴리(카르복시베타인) (PCB), 고분자전해질, 폴리(글루탐산) (PGA), 폴리(글리세롤) (PG) (예컨대, 선형, 중간기능성, 과분기형, 또는 선형 과분기형 PG), 폴리(말레산), 폴리(2-옥사졸린) (POZ), 폴리(2-에틸-2-옥사졸린, 폴리시알산 (PSA), 폴리스티렌, 폴리스티렌 유도체들 (예컨대, 하전된 폴리스티렌 유도체들), 폴리(스티렌술포네이트-co-PEGMA), 폴리비닐피롤리돈 (PVP), 폴리(N-아크릴로일모르폴린) (pNACM), 및 이의 중합체를 포함한다. 다른 경우에 있어서, 예를 들면, 폴리(락트-co-글리콜산) (PLGA), 폴리락티드 (PLA), 및 폴리글리콜리드 (PGA)을 포함하는, 임의의 적합한 소수성 중합체가 이용될 수 있다.

[0508] 본 발명은 중합체 용매 데포우 (또한 제자리 형성 임플란트로도 공지됨)로써 제형화된 항-VEGF 항체를

제공한다. 예를 들면, 중합체 용매 데포우는 중합체 (예컨데, 본원에서 기술된 임의의 중합체, 예컨데, 소수성 중합체 이를 테면, PLGA), 용매 (예컨데, 유기 용매), 및 항-VEGF 항체 (예컨데, 본원에서 기술된 임의의 항-VEGF 항체)를 함유할 수 있다. 상기 용매는 낮은 물-혼화성을 가질 수 있다. 이용될 수 있는 예시적인 유기 용매는 트리아세틴 (글리세롤 아세테이트), N-메틸-2-피롤리돈, 폴리(에틸렌 글리콜) 디메틸 에테르, 및 에틸벤조에이트를 함유한다. 하나의 작업 실시예에서, 중합체 용매 데포우는 항-VEGF 항체 (예컨데, 본원에서 기술된 임의의 항-VEGF 항체, 예컨데, G6.31 AARR)의 분부-건조된 분말을 PLGA-트리아세틴 용액 안에 분산시킴으로써 만들어질 수 있다(예컨데, Chang et al. *J. Pharm. Sci.* 104(10):3404-17, 2015 참고, 이는 전문이 본원 참고 자료에 편입됨). PLGA는 예를 들면, 약 10 kDa, 약 41 kDa, 또는 약 56 kDa의 분자량을 보유할 수 있다. PLGA 중합체는 예컨데, RG 752S, RG755S, 및 RG 756S (Evonik Industries, Darmstadt, Germany)를 상업적으로 이용할 수 있다. PLGA 농도는 약 7.5%, 약 10%, 약 12.5%, 약 15%, 약 20%, 또는 그 이상 (% wt)일 수 있다. 상기 항체 농도는 약 1%, 약 1.5%, 약 2%, 약 2.5%, 약 3%, 약 4%, 약 5%, 또는 그 이상 (% wt)일 수 있다. 일부 경우에서, 상기 항체 농도는 약 1.5% (% wt)이다. 임의의 상기 중합체 용매 데포우 제제는 예를 들면, 27가우지 (27G) 바늘을 통하여 주사가가능할 수 있다. 투여할 때(예컨데, 주사에 의해 (예컨데, 유리체내 주사)), 이러한 중합체 용매 데포우 제제는 눈에서 겔 또는 고형 데포우로 변형될 수 있다. 상기 겔 또는 고형 데포우는 수용액 및 비수용액 단계의 분리 결과로 형성될 수 있다. 수성상으로의 용매 이동 속도에 부분적으로 의존하여, 주사되는 데포우는 중합체 침전으로 인하여 고형 또는 겔 물질로 일시적으로 전환될 수 있고, 상기 항-VEGF 항체 (및 임의의 추가 치료제 또는 화학물)을 포획할 수 있다. 다른 경우에 있어서, 겔 또는 고형 데포우를 형성하기 위하여, 예를 들면, 제자리 가교 또는 제자리-고형화 오르가노겔이 이용될 수 있다. 상기 중합체 용매 데포우는 장기간 운반, 예를 들면, 약 30 일 또는 그 이상, 예컨데, 약 30 일, 약 40 일, 약 50 일, 약 60 일, 약 70 일, 약 80 일, 약 90 일, 약 100 일, 약 110 일, 약 120 일, 약 130 일, 또는 그 이상의 운반을 허용할 수 있다. 일부 경우에서, 상기 중합체 용매 데포우는 눈에서 약 80 일 동안 장기 운반을 허용할 수 있다.

[0509] 본 발명은 중합체 미셀로 제형화된 항-VEGF 항체 (예컨데, 본원에서 기술된 임의의 항-VEGF 항체)를 또한 제공한다. 중합체 미셀은 예를 들면, 중합체 (예컨데, 양쪽성 블럭 (예컨데, 이중블럭 또는 다중블럭) 공중합체)가 소수성 코어 및 친수성 셸을 갖는 나노입자로 자가-어셈블리됨으로써 형성될 수 있다. 중합체 미셀은 임의의 적합한 직경 (예컨데, 평균 직경), 예를 들면, 약 1 nm 내지 약 1000 nm (예컨데, 약 1 nm, 약 10 nm, 약 100 nm, 약 200 nm, 약 300 nm, 약 400 nm, 약 500 nm, 약 600 nm, 약 700 nm, 약 800 nm, 약 900 nm, 약 1000 nm), 또는 큰 직경을 보유할 수 있다. 일부 경우에서, 중합체 미셀은 약 5 nm 내지 약 100 nm (예컨데, 약 5, 약 10, 약 20, 약 30, 약 40, 약 50, 약 60, 약 70, 약 80, 약 90, 또는 약 100 nm)의 직경 (예컨데, 평균 직경)을 보유할 수 있다. 예를 들면, 양쪽성 블럭 공중합체, 이를 테면, 폴리(프로필렌 옥사이드) (PPO), 폴리(D,L-락트산) (PDLLA), 폴리(ϵ -카프로락톤) (PCL), 폴리(L-아스파르트레이트), 및 폴옥사머 (예컨데, 폴리(에틸렌 옥사이드)-블럭-폴리(프로필렌 옥사이드)-블럭-폴리(에틸렌 옥사이드) 공중합체(예컨데, PLURONICS®))를 비롯한, 임의의 적합한 중합체가 이용될 수 있다. 기타 양쪽성 블럭 공중합체는 당분야에 공지되어 있다. 일부 경우에서, 상기 항-VEGF 항체는 상기 중합체 미셀의 친수성 셸에 부착될 수 있는데, 예를 들면, 상기 중합체에 공유 부착에 의해 부착될 수 있다. 따라서, 일부 경우에서, 상기 기술된 항체 콘주게이트는 항-VEGF 항체를 함유하는 중합체 미셀을 준비하는데 이용될 수 있다.

[0510] 본 발명은 중합체 임플란트로 제형화된 항-VEGF 항체 (예컨데, 본원에서 기술된 임의의 항-VEGF 항체, 가령, G6.31 AARR)를 또한 제공한다. 중합체 임플란트는 강체(rigid object)이며, 이때 고형 약물 제제 (예컨데, 항체)는 소수성 중합체 (예컨데, PLGA)에 고르게 분포되어 있다. 중합체 임플란트는 전형적으로 밀리미터-크기 (예컨데, 0.1 mm, 0.2 mm, 0.3 mm, 0.4 mm, 0.5 mm, 0.6 mm, 0.7 mm, 0.8 mm, 0.9 mm, 1 mm, 1.1 mm, 1.2 mm, 1.3 mm, 1.4 mm, 1.5 mm, 1.6 mm, 1.7 mm, 1.8 mm, 1.9 mm, 2 mm, 2.1 mm, 2.2 mm, 2.3 mm, 2.5 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 10 mm, 11 mm, 12 mm, 13 mm, 14 mm, 15 mm, 16 mm, 17 mm, 18 mm, 19 mm, 20 mm, 또는 더 큰)이다. 중합체 임플란트는 예를 들면, 외과 수술 (예컨데, 미세수술) 또는 적합한 장치를 이용한 주사에 의해 (예컨데, 유리체내 주사에 의해), 눈으로 투여될 수 있다. 상기 중합체 이식물은 눈의 임의의 적절한 부위, 예를 들어, 눈의 유리체, 전방 또는 후방 챔버, 또는 망막내, 망막 아래, 맥락막내, 맥락막상, 경공막내, 결막아래, 각막내, 또는 눈의 각막외(epicorneal)로 투여를 위하여 제형화될 수 있다. 특정 경우에, 상기 중합체 임플란트는 상기 유리체로 투여하기 위하여 제형화될 수 있다.

[0511] 항-VEGF 항체 (예컨데, 본원에서 기술된 임의의 항-VEGF 항체, 예컨데, G6.31 AARR)를 함유하는 중합체 임플란트는 뜨거운-용융 압출(HME) 공정을 이용하여 준비될 수 있다. 중합체를 용융 (유동화)시키기 위해 열을 가한 다음, 유체 중합체 상 내에서 고형 약물 제제를 블렌드하고, 마이크로컴파운드(microcompound)하기 위해 기계적

전단을 가할 수 있다. 이어서, 약물-중합체 혼합물은 밀리미터 크기의 다이 (예를 들어, 원형 다이)를 통해 압출될 수 있다. 압출물을 냉각시키면 (예를 들어, 실온으로), 임의의 원하는 길이로 절단될 수 있는 막대 (예를 들어, 신드리카칼 로드(cydrilical rods))를 형성한다. 일부 경우에서, 상기 중합체 임플란트는 항-VEGF 항체 및 PLGA를 함유하는 PLGA 로드일 수 있다. 본 발명에서 이용될 수 있는 중합체 임플란트는 예를 들면, Rajagopal et al. *J. Pharmaceutical Sciences* 102(8):2655-2666, 2013 및 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2006/093758에 기재되어 있으며, 이는 본원에 참고자료에 편입된다.

[0512] 하나의 작업 실시예에서, 항-VEGF 항체 (예컨대, 본원에서 기술된 임의의 항-VEGF 항체)는 분무-건조된 제제로 준비될 수 있는데, 이들은 상승된 온도에서 안정성을 위하여 트레할로스 및 히스티딘-HCl 완충액을 함유할 수 있고, 그 다음 이들은 소수성 중합체 이를 테면, PLGA에 추가되어, HME를 거쳐 중합체 임플란트가 형성될 수 있다 (예컨대, Rajagopal et al. *supra* 참고). 예를 들면, 상기 분무-건조된 제제는 임의의 적합한 농도 (예컨대, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL, 10 mg/mL, 11 mg/mL, 12 mg/mL, 13 mg/mL, 14 mg/mL, 15 mg/mL, 16 mg/mL, 20 mg/mL, 25 mg/mL, 30 mg/mL)의 항체, 임의의 적합한 농도 (예컨대, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 3.3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 10 mg/mL)의 트레할로스, 및/또는 완충액 (예컨대, 10 mM 히스티딘 HCl)을 함유할 수 있다. 상기 분무-건조된 제제는 임의의 적합한 pH, 예를 들면, pH 약 5 내지 약 8 (예컨대, 약 5, 약 6, 약 7, 또는 약 8)을 가질 수 있다. 일부 경우에서, 상기 분무-건조된 제제의 pH는 약 6 또는 약 6.2일 수 있다. 특정 경우에, 상기 분무 건조된 제제는 항-VEGF 항체, 3.3 mg/mL 트레할로스, 및 10 mM 히스티딘-HCl, pH 6.2를 포함한다. 상기 중합체 임플란트는 소수성 중합체 이를 테면, PLGA와 상기 분무-건조된 제제의 HME에 의해 준비될 수 있다. 예를 들면, 고휘형 PLGA 펠렛 및 상기 분무-건조된 제제는 실온에서 사전혼합되고, 원뿔형, 반대-회전하는 이중 나선 압출기 안으로 공급될 수 있다. 이 조합은 마이크로컴파운드되고, 그 다음 100°C에서 0.5 mm 원형 다이에서 압출될 수 있다. 일부 경우에서, 상기 분무-건조된 제제는 100°C에 30 분 미만으로 노출될 수 있다.

[0513] 상기 중합체 임플란트는 예를 들면, 약 1% 내지 약 90 중량%의 항-VEGF 항체 (예컨대, 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 또는 약 90중량%)를 함유할 수 있다 일부 경우에서, 상기 중합체 임플란트는 약 10중량% 항-VEGF 항체를 포함한다. 상기 중합체 임플란트는 임의의 적합한 크기를 가질 수 있는데, 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 임플란트의 직경은 약 0.1 내지 약 1 mm (예컨대, 약 0.5 mm)이며, 길이는 약 1 내지 약 30 mm (예컨대, 약 14 mm)이다. PLGA 임플란트 (예컨대, PLGA 로드)의 경우, PLGA 공중합체 안에 폴리락티드산의 백분율은 0-100%, 예를 들면, 약 15-85%, 약 35-65%, 또는 50%일 수 있다. 일부 경우에서, PLGA 임플란트 (예컨대, PLGA 로드)는 하나 또는 그 이상의 추가 중합체, 예를 들면, 히드록시프로필메틸셀룰로오스 (HPMC)를 더 포함할 수 있다.

[0514] 임의의 전술한 중합체 제제 (예컨대, 중합체 용매 데포우, 중합체 미셀, 및 중합체 임플란트)의 경우, 상기 항체는 VEGF에 결합하는 항체 단편일 수 있다. 일부 경우에서, 상기 항체 단편은 Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv, 그리고 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군에서 선택된다. 단편. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 항체 단편은 Fab, Fab', 또는 Fab-C이다.

[0515] 임의의 전술한 중합체 제제 (예컨대, 중합체 용매 데포우, 중합체 미셀, 및 중합체 임플란트)는 중합체 제제로 제형화되지 않는 기준 항체와 비교하여 증가된 안구 반감기를 갖는다. 일부 경우에서, 상기 안구 반감기는 상기 기준 항체와 비교하였을 때 최소한 약 2-배 (예컨대, 약 2-배, 약 3-배, 약 4-배, 약 5-배, 약 6-배, 약 7-배, 약 8-배, 약 9-배, 약 10-배, 약 12-배, 약 14-배, 약 16-배, 약 18-배, 약 20-배, 또는 그 이상) 증가된다. 일부 경우에서, 상기 시각 반감기는 기준 항체와 비교하여 최소한 약 4-배 증가된다. 일부 경우에서, 상기 안구 반감기는 유리체 반감기다. 일부 경우에서, 상기 기준 항체는 상기 중합체 제제의 항체와 동일하다. 다른 경우에서, 상기 기준 항체는 상기 중합체 제제의 항체와 동일하지 않다.

[0516] 임의의 전술한 중합체 제제 (예컨대, 중합체 용매 데포우, 중합체 미셀, 및 중합체 임플란트)는 중합체 제제로 제형화되지 않는 기준 항체와 비교하여 감소된 안구 제거를 갖는다. 일부 경우에서, 상기 제거는 기준 항체와 비교하였을 때, 최소한 약 2-배 (예컨대, 약 2-배, 약 3-배, 약 4-배, 약 5-배, 약 6-배, 약 7-배, 약 8-배, 약 9-배, 약 10-배, 약 12-배, 약 14-배, 약 16-배, 약 18-배, 약 20-배, 또는 그 이상) 감소된다. 일부 경우에서, 상기 제거는 기준 항체와 비교하여 최소한 약 4-배 감소된다. 일부 경우에서, 상기 제거는 유리체로부터의 제거다. 일부 경우에서, 상기 기준 항체는 상기 중합체 제제의 항체와 동일하다. 다른 경우에서, 상기 기준 항체는 상기 중합체 제제의 항체와 동일하지 않다.

[0517] 일부 경우에서, 임의의 전술한 중합체 제제의 안구내 2차래 투여 (예컨대, 유리체내 주사에 의해)의 시격은 최

소한 1 개월, 예컨대, 최소한 1 개월, 최소한 5 주, 최소한 6 주, 최소한 7 주, 최소한 8 주, 최소한 9 주, 최소한 10 주, 최소한 11 주, 최소한 12 주, 최소한 13 주, 최소한 14 주, 최소한 15 주, 최소한 16 주, 최소한 20 주, 최소한 24 주, 최소한 28 주, 최소한 32 주, 최소한 36 주, 최소한 40 주, 최소한 44 주, 최소한 48 주, 최소한 52 주 또는 그 이상이다. 일부 경우에서, 안구내 2차례 투여 간의 최대 시격은 4년을 넘지 않는데, 예컨대, 3년을 넘지 않고, 2년을 넘지 않거나, 또는 1년을 넘지 않는다. 상기 중합체 제제는 예를 들면, 매 2 개월 내지 12 개월, 예컨대, 매 4개월 내지 10 개월에 투여될 수 있다. 일부 경우에서, 상기 중합체 제제는 매 6 개월에 투여된다.

[0518] 본 발명은 상기에서 기술된 임의의 중합체 제제 (예컨대, 중합체 용매 데포우, 중합체 미셀, 및 중합체 임플란트)를 포함하는 조성물 (예컨대, 약학 조성물)을 또한 제공한다. 특정 구체예들에서, 상기 조성물은 하나 또는 그 이상의 추가 화합물을 포함한다. 특정 구체예들에서, 상기 추가 화합물은 IL-1 β , IL-6; IL-6R; PDGF; 양지오포이에틴; 양지오포이에틴 2; Tie2; S1P; 인테그린 $\alpha\text{v}\beta 3$, $\alpha\text{v}\beta 5$, 및 $\alpha 5\beta 1$; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트로포이에틴; 보체 인자 D; TNF α ; HtrA1; VEGF 수용체; ST-2 수용체; 그리고 AMD 위험에 유전적으로 연계된 단백질, 이를 테면, 보체 경로 구성요소 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a, 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LPC; COL10A1; 그리고 TNFRSF10A로 구성된 군에서 선택된 제 2의 생물학적 분자에 결합한다. 특정 구체예들에서, 상기 추가 화합물은 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 이중특이적 항체 (예컨대, 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체, 이를 테면, RG-7716 또는 WO 2010/069532 또는 WO 2016/073157에서 기술된 임의의 이중특이적 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체 또는 이의 변이체다. 또다른 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 항-IL-6 항체, 예를 들면, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics; 예컨대, WO 2016/073890 참고), 실투시마브 (SYLVANT®), 오로키주마브, 클라자키주마브, 시루쿠마브, 엘시리모마브, 게틸림주마브, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921, 또는 이의 변이체다. 여전히 추가 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 항-IL-6R 항체, 예를 들면, 토셀리주마브 (ACTEMRA®) (예컨대, WO 1992/019579 참고), 사리루마브, 보바릴리주마브 (ALX-0061), SA-237, 또는 이의 변이체다.

[0519] 본 발명은 상기에서 기술된 임의의 중합체 제제 (예컨대, 중합체 용매 데포우, 중합체 미셀, 및 중합체 임플란트) 및 추가 VEGF 항진제를 포함하는 조성물 (예컨대, 약학 조성물)을 또한 제공한다.

[0520] 4. 장치

[0521] 본원에서 기술된 임의의 조성물 (예컨대, 항-VEGF 항체, 항체 콘쥬게이트, 융합 단백질, 및 중합체 제제)은 포트 운반 장치를 이용하여 눈에 투여될 수 있다. 포트 운반 장치는 몇 개월 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 그 이상 개월)에 걸쳐 치료제 (예컨대, 항-VEGF 항체)를 방출하는 이식가능한, 재충전가능한 장치다. 이용될 수 있는 예시적인 포트 운반 장치는 예를 들면, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2010/088548, WO2015/085234, WO 2013/116061, WO 2012/019176, WO 2013/040247, 및 WO 2012/019047에서 기술된 바와 같이, ForSight Labs, LLC 및/또는 ForSight VISION4를 포함하며, 이들은 전문이 본 명세서의 참고 자료에 편입된다.

[0522] 예를 들면, 본 발명은 본원에서 기술된 임의의 조성물 (예컨대, 항-VEGF 항체, 항체 콘쥬게이트, 융합 단백질, 및 중합체 제제)이 함유된 저장기를 포함하는 포트 운반 장치를 제공한다. 상기 포트 운반 장치는 근위 영역, 저장기와 유체 연통하는 근위 영역에 결합된 관형 몸체, 그리고 저장기와 유체 연통하고 조성물을 눈에 방출하도록 구성된 하나 이상의 출구를 포함한다. 상기 관형 본체는 눈에서 약 0.5 mm 또는 이 이하의 절개 또는 개구를 통해 삽입되도록 구성된 외경을 가질 수 있다. 상기 장치는 길이가 약 1 mm 내지 약 15 mm (예컨대, 길이가 약 1 mm, 약 2 mm, 약 4 mm, 약 5 mm, 약 6 mm, 약 7 mm, 약 9 mm, 약 11 mm, 약 13 mm, 또는 약 15 mm)일 수 있다. 저장기는 임의의 적합한 용적을 가질 수 있다. 일부 경우에서, 상기 저장기는 약 1 μl 내지 약 100 μl (예컨대, 약 1 μl , 약 5 μl , 약 10 μl , 약 20 μl , 약 50 μl , 약 75 μl , 또는 약 100 μl)의 용적을 가진다. 상기 장치 또는 이의 구성부는 임의의 적합한 물질, 예를 들면, 폴리이미드로 만들어질 수 있다.

[0523] 일부 경우에서, 상기 포트 운반 장치는 본원에서 기술된 임의의 조성물 (예컨대, 항-VEGF 항체, 항체 콘쥬게이트, 융합 단백질, 및 중합체 제제) 그리고 하나 또는 그 이상의 추가 화합물이 함유된 저장기를 포함한다. 특정 구체예들에서, 상기 추가 화합물은 IL-1 β ; IL-6; IL-6R; PDGF; 양지오포이에틴; 양지오포이에틴 2; Tie2; S1P; 인테그린 $\alpha\text{v}\beta 3$, $\alpha\text{v}\beta 5$, 및 $\alpha 5\beta 1$; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트로포이에틴; 보체 인자 D; TNF α ; HtrA1; VEGF 수용체; ST-2 수용체; 그리고 AMD 위험에 유전적으로 연계된 단백질, 이를 테면, 보체 경로 구성요

소 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a, 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; 그리고 TNFRSF10A로 구성된 군에서 선택된 제 2의 생물학적 분자에 결합한다. 특정 구체예들에서, 상기 추가 화합물은 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 예를 들면, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 이중특이적 항체 (예컨데, 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체, 이를 테면, RG-7716 또는 WO 2010/069532 또는 WO 2016/073157에서 기술된 임의의 이중특이적 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체 또는 이의 변이체다. 또다른 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 항-IL-6 항체, 예를 들면, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics; 예컨데, WO 2016/073890 참고), 실투시마브 (SYLVANT®), 오로키주마브, 클라자키주마브, 시루쿠마브, 엘시리도마브, 케릴립주마브, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921, 또는 이의 변이체다. 여전히 추가 실시예에서, 일부 경우에서, 상기 추가 화합물은 항-IL-6R 항체, 예를 들면, 토셀리주마브 (ACTEMRA®) (예컨데, WO 1992/019579 참고), 사리루마브, 보바릴리주마브 (ALX-0061), SA-237, 또는 이의 변이체다.

[0524] 일부 경우에서, 상기 포트 운반 장치는 본원에서 기술된 임의의 조성물 (예컨데, 항-VEGF 항체, 항체 콘주게이트, 융합 단백질, 및 중합체 제제) 그리고 추가 VEGF 항진제를 포함한다.

[0525] **III. 실시예**

[0526] 다음은 본 발명의 방법 및 조성물의 실시예들이다. 다양한 다른 실시예가 전술한 일반적인 설명에 따라 실시될 수 있는 것으로 이해된다.

[0527] **실시예 1: G6.31의 심도 스캐닝(Deep scanning) 돌연변이 유발은 안정하게 어셈블리된 Fab의 어셈블리에 중요한 위치를 확인한다**

[0528] G6.31은 고 친화력 항-VEGF 항체다 (Fuh et al., *J. Biol. Chem.* 281(10):6625-6631 (2006); Liang et al., *J. Biol. Chem.* 281(2):951-961 (2006). G6.31은 이것의 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 인간 생식 세포선 IGHV3-23 및 IGKV1-39 기원으로 빈번하게 사용되기 때문에, 인간 항체의 대표적인 것으로 간주된다.

[0529] G6.31의 VH 및 VL 도메인에서 단일 돌연변이의 효과를 체계적으로 평가하기 위해, 각각의 가변 도메인(Kabat 번호매김 계획에 따라 VL 위치 2-107 및 VH 위치 2-113)에 대한 포화된 단일 부위 돌연변이생성 라이브러리가 생성되었다. 이들 라이브러리는 차례로 VH 및 VL MMK 워크 라이브러리로 지칭된다. 돌연변이성 심도 스캐닝 실험에서 이들 라이브러리를 이용하면 선별 동안 이들 두 라이브러리에서 각각의 돌연변이의 풍도 비율(ER)이 산출되며, 이것은 상기 분자 피트니스(fitness)에 있어서 돌연변이의 영향 평가로 삼는다. 특정 돌연변이의 ER은 기능 발현에서 이 돌연변이의 영향, 폴드 안정성에서 이 돌연변이의 영향, 그리고 선별 단백질(예컨데, 항-gD (경쇄의 C-말단에 융합된 태그 tag), 단백질 A, 단백질 L, 또는 VEGF)에 결합함에 있어서 이 돌연변이의 영향을 포함하는 다양한 효과를 합산한다.

[0530] 기능 발현에서 그리고 Fab의 폴드 안정성에 있어서 각각의 돌연변이 영향을 평가하기 위하여, 상기 VH와 VL 라이브러리는 항-gD, 단백질 A, 또는 단백질 L에 대하여 별도로 펼쳐놓았다. 이러한 패닝(panning) 전략으로 Fab 분자가 파아지 상에 디스플레이되는지, 그리고 적절하게 폴드되고, 어셈블리되었는지를 어느 정도 탐지한다. 중쇄 라이브러리 및 경쇄 라이브러리의 주어진 위치에서 2331 및 2226 아미노산 치환 (중단 포함) 및 각각의 야생형 아미노산의 ERs는 이들 3개 패닝 각각에 대하여 결정되었다(도 1a-1f). 이들 3개 중쇄 패닝 전략 또는 3개 경쇄 패닝의 비교에서 매우 유사한 결과가 획득되었음을 나타낸다 (도 2a-2b). 예를 들면, ERs은 항-gD와 단백질 L 패닝 사이에 양호한 선형 상관관계($r^2=0.98$)를 보여준다 (도 2a). 단백질 A 패닝 데이터 세트와 단백질 L 패닝 데이터 세트 사이의 비교는 더 낮은 선형 상관관계 ($r^2 = 0.611$)를 나타내는데, 이것은 단백질 A 결합에서 직접적 영향을 갖고, 따라서 두 선별에서 차등적 풍도를 갖는 돌연변이 하위세트 때문이다. 경쇄의 경우에도 유사한 패턴이 관찰되었다 (도 2b).

[0531] Fab의 기능 발현 및 안정성에 영향을 주는 위치를 동정하기 위한 한 가지 방법에서, 선별 동안 보존되고, 돌연변이를 용인하지 않는 위치들이 결정되었다. 대표 스캔으로써 항-gD 패닝으로부터 획득된 데이터를 이용하여, 주어진 위치에서 모든 돌연변이의 평균 풍도 비율(ER_{pos})은 보존의 측도로써 각각의 위치에 대하여 산출되었다 (도 3a-3b). 상기 VH 및 상기 VL 도메인 모두에서, β -스트랜드 B와 F 사이에 시스테인 쌍 (HC-C22, HC-C93; LC-C23, LC-88), 뿐만 아니라 인접 트립토판 잔기 (HC-W36, LC-W35)로 구성된 중심형 코어 잔기는 상당히 보존되었다(도 3a-3d). 면역글로블린 폴드의 소수성 코어는 예를 들면, Halaby et al. *Protein Engineering* 12(7): 563-571, 1999에 기술된다. 상기 중심형 코어에 인접하여 상기 분자(상기 Fab는 HVRs가 위쪽으로 향하도록 방향을 하고 있음)의 하위 절반에는 몇몇 소수성 잔기가 있는데, 이는 연장된 소수성 코어의 일부분이 된

다. 이들은 보존되어 있지만, 중심형 코어 잔기보다는 더 작은 ER_{pos} 값을 나타내었다. 이들 잔기중 티로신 (HC-Y90, HC-86)이 있는데, 이것은 Ig-폴드의 안정성에 중요하다는 것을 이미 보여주었다 (예컨데, Hamill et al., *J. Mol. Biol.* 295(3):641-649 (2000) 참고. 보존된 잔기중 제 3 그룹은 VH/VL 인터페이스 (HC-L45, HC-Y91, HC-W103, LC-P44, LC-Y36, LC-Y96)에 있다. VH/VL 인터페이스 잔기는 간접 선별 (예컨데, 단백질 L 패닝으로부터 VH 데이터)을 한 패닝에서 뿐만 아니라, 직접 선별 (예컨데, 단백질 A 패닝으로부터 VH 데이터)에서도 보존되었으며, 이것은 명시된 인터페이스 위치에서 돌연변이는 안정성이 감소된 어셈블리된 Fab를 만든다는 것을 나타낸다. 보존된 잔기 (HC-E46, HC-R38, HC-D86, LC-R61, LC-D82)의 제 4 그룹에는 안정성에 중요한 Fab의 하위 절반에서 수소 결합 네트워크의 잔기들이 포함된다. 특히, α1-헬릭스에 있는 아스파르트레이트 잔기는 이들 위치에 속하는데, 상기 데이터 세트에서 최대 보존된 것중 하나를 나타낸다. 위치 LC-R61 및 LC-D82에서 돌연변이는 경쇄에서 피브릴 형성 및 응집을 유도한다는 것이 이미 설명되었다 (Helms et al., *J. Mol. Biol.* 257(1):77-86 (1996)참고). 끝으로, HVR-H3에서 다음의 4개 위치는 고도로 보존된 것으로 확인되었다: HC-A93, HC-R94, HC-P100, HC-D101. 이들 패닝 전략은 항원 결합에 대하여 선택성이 아니기 때문에, 이들 결과는 HVR3 루프 입체구조가 Fab의 안정성에 관여한다는 것을 나타낸다.

[0532] 요약하면, 가변 도메인의 몇몇 위치가 고도로 보존되어 있다는 것을 제외하고, 많은 위치는 이러한 선택에서 Fab 분자의 전반적인 안정성 및 발현에 영향을 주지 않으면서 돌연변이를 용인할 수 있다. 더욱이, 작은 ER_{pos} 값을 갖는 일부 위치는 보존된 아미노산 치환을 용인할 수 있다. 예를 들면, 돌연변이생성 데이터는 하부 코어의 소수성 잔기가 Fab의 안정성에 영향을 주지 않으면서, 유사한 소수성 잔기로 치환될 수 있음을 암시하였다 (도. 1a-1f). 단일 치환에 대한 VH/VL 안정성의 내성은 인간 IgG1의 CH3 도메인의 심도 돌연변이생성 스캔으로부터 수득된 결과를 대조되고, 이때 대부분의 잔기는 임의의 돌연변이를 용인하지 않았다 (Traxylmayr et al., *J. Mol. Biol.* 423(3):397-412 (2012) 참고).

[0533] 재료 및 방법

[0534] A. 온전한 가변 도메인 NNK 워크 라이브러리 기획 및 생성.

[0535] G6.31의 온전한 VH (잔기 2-113) 및 VL (잔기 2-107)은 무작위화(randomization)되었다. 10-12개의 후속 잔기는 서브-라이브러리로 무작위화되었다. 상기 서브-라이브러리 안에서, TAA 코돈은 Kunkel 돌연변이생성에 의해 각각의 무작위화된 위치로 도입되었다 (Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83(2):488-492 (1985)). 10개의 VL 서브-라이브러리와 12개의 VH 서브-라이브러리 중단 주형(stop templates)이 생성되었다. 라이브러리 기획을 위하여, 각각의 위치는 NNK 코돈과 함께, 올리고뉴클레오티드-지향된 돌연변이생성에 의해 무작위화되었고, 여기에서 N 은 임의의 4개의 천연 뉴클레오티드이며, K는50% T (티민)과 50% G (구아닌)이다. 상기 NNK 코돈은 임의의 20개의 천연 아미노산을 인코딩할 수 있다. 경쇄와 중쇄를 위한 서브-라이브러리가 별도로 만들어졌고, 그 다음 각 쇠의 각 라이브러리가 복합되어, VL 라이브러리와 VH 라이브러리가 형성되었다. 복합된 라이브러리는 또한 VH 또는 VL NNK 워크 라이브러리로 지칭된다. 파아지 Fab 단편 디스플레이 벡터에서 라이브러리가 만들어졌다. 상기 VH NNK 워크 라이브러리는 3x10⁹ 구성원 크기를 갖고, 한편 상기 VL NNK 워크 라이브러리는 8x10⁸ 구성원 크기를 갖는다.

[0536] B. 항-gD, 단백질 L, 또는 단백질 A 상에서 파아지 패닝 선별

[0537] 연속 선별 라운드에서 상기 VH 또는 VL NNK 워크 파아지 디스플레이 라이브러리를 5, 0.5, 0.1 nM 바이오티닐화된 VEGF에서 배양하고, 그 다음 실온 또는 37°C에서 100 nM 비-바이오티닐화된 VEGF와 경쟁시켜, 낮은 친화력 클론이 VEGF에 결합하는 것을 감소시킴으로써, 결합 클론이 선택되었다. 결합된 클론은 뉴크라비딘으로 피복된 ELISA 플레이트 상에 포획되고, 세척되고, 그리고 실온에서 20분간 100 mM HCl에서 용리되었다. 상기 용리된 파아지는 1/10 용적의 1 M Tris pH 8.0로 중화되고, 그 다음 라운드 선별을 위한 증폭용으로 대장균(*E. coli*)을 감염시키는데 이용되었다.

[0538] 항-gD, 단백질 L, 또는 단백질 A을 이용한 선별의 경우, 항-gD, 단백질 L, 또는 단백질 A로 피복된 ELISA 플레이트 상에 상기 VH 또는 VL NNK 워크 파아지 디스플레이 라이브러리를 배양하고, 세척되고, 그리고 실온에서 20분간 100 mM HCl에서 용리되어, 결합 클론이 선택되었다. 상기 용리된 파아지는 1/10 용적의 1 M Tris pH 8.0로 중화되고, 그 다음 라운드 선별을 위한 증폭용으로 대장균(*E. coli*)을 감염시키는데 이용되었다.

[0539] C. G6.31 심도 돌연변이 스캐닝 라이브러리 Illumina 서열화

[0540] 심도 서열화의 경우, 파아지미드 DNA는 선택안된 또는 선택된 VH 또는 VL NNK 워크 라이브러리로부터 파아지미

드 백터를 나르는 대장균(*E. coli*) XL1 세포로부터 단리되었다. 정제된 DNA는 VL 및 VH 영역의 제한된 주기의 PCR-기반의 증폭을 위한 주형으로 이용되었다. PCR 산물은 아가로스 겔 추출 및 클린-업(clean-up) (Qiagen Gel Extraction Kit)에 의해 정제되었다. 용리된 앰플리콘(amplicon) DNA는 TRUSEQ™ DNA Sample Prep (Illumina)을 이용하여 표준 Illumina 라이브러리 준비 방법으로 심도 서열화 라이브러리 준비를 위한 기반으로 이용되었다. 어댑터-결찰된 라이브러리는 단일 주기의 PCR을 거치고, Illumina MISEQ®상에서 서열화되고, 전체 길이의 앰플리콘을 커버하기 위하여 300bp-단부 쌍(paired-end)을 형성하였다.

[0541] D. 심도 스캐닝 돌연변이생성 데이터 분석

[0542] 서열화된 단부 쌍(paired end) 판독은 FLASH를 이용하여 병합되었다 (Magoc et al., *Bioinformatics* 27(21):2957-2963 (2011)). 추가 서열화 데이터 분석은 통계학적 프로그래밍 언어 (Team RC "R: A language and environment for statistical computing" *R Foundation for Statistical Computing* (2014)) 및 ShortRead (Morgan et al., *Bioinformatics* 25(19):2607-2608 (2009)) 패키지를 이용하여 실행되었다. 품질 관리에서 제 1의 단계는 각각의 HC 및 LC 바코드를 가지는 서열을 필터링하는 것이었다. 제 2의 단계에서, 각 병합된 판독에 대하여 VH와 VL 도메인의 측면 영역이 동정되었고, 삽입 또는 결손 돌연변이 (indels)를 갖는 방대한 판독을 제거하기 위하여, 정확한 길이에 대하여 점검되었다. 서열화 오류를 더 교정하기 위하여, 비-MNK 돌연변이를 다시 야생형 기반으로 전환시키고, 2개 이상의 MNK 돌연변이를 함유하는 판독은 걸러내었다. 모든 무작위화된 위치의 모든 돌연변이의 빈도를 산출함으로써, 위치 가중 매트릭스(weight matrices)가 생성되었다. 이미 설명된 바와 같이(Fowler et al., *Nature Methods* 7(9):7412-746 (2010)), 모든 돌연변이에 대한 풍도 비율은 상기 분급된 시료에서 주어진 위치에 주어진 돌연변이의 빈도를 분급안된 시료에서 정확하게 동일한 돌연변이의 빈도로 나눔으로써 산출되었다(Fowler et al., *Nature Methods* 7(9):7412-746 (2010)).

[0543] **실시예 2: G6.31의 심도 스캐닝 돌연변이생성 스크린은 강화된 안정성을 갖고 및/또는 VEGF에 대한 개선된 결합 친화력을 갖는 아미노산 잔기 변이체들을 동정한다.**

[0544] 항원 결합에서 G6.31의 단일 치환 영향의 포괄적 검토를 하기 위하여, 실시예 1에서 기술된 VH와 VL MNK 워크 라이브러리는 VEGF에 대하여 펼쳤다(도 4a-4b). 획득된 풍도 비율 (ER) 값은 이중점(bimodal) 분포를 나타내었다(도 5a-5b). 돌연변이의 부분 집합은 결합 기능에 부정적으로 크게 영향을 미쳤고, 대다수의 돌연변이는 중립적이었고, 약간의 돌연변이가 적합도(fitness)에 긍정적인 영향을 미쳤다. 결합에 부정적인 영향을 미친 돌연변이는 HC-HVRs에 위치한 대부분의 경우 또는 항-gD 패닝에서 동정된 틀구조의 보존된 잔기에 위치한 대부분의 경우에 해당되는데, 그 이유는 이들 루프가 G6.31의 결합 기능의 대부분을 제공하기 때문이다(실시예 1 참조). 상당히 집중된 돌연변이는 대부분 틀구조 영역과 HC-HVRs의 덜 보존된 부분에 위치했다. 이러한 결과는 상기 한 gD 패닝 (실시예 1 참조)으로부터의 관찰에서 가변 도메인이 견고하고, Fab의 항원-결합 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않으면서 많은 단일 돌연변이를 용인할 수 있다는 것을 확인한다.

[0545] 심도 돌연변이생성 스캐닝으로부터 획득된 결과를 확인하기 위하여, 선택된 돌연변이가 발견되고, 정제되며, 이들의 VEGF를 향한 친화력은 BIACORE® 표면 플라즈몬 공명 (SPR)을 이용하여 측정되며, 이들의 열안정성 (용융 온도, T_m 로 평가됨)은 시차주사 형광측정계 (DSF)를 이용하여 측정되었다. 항원 결합 및 폴딩에 대한 강하게 집중된 선택 돌연변이의 효과를 평가하였다. 추가로, 높은 풍도를 가진 돌연변이는 AYSIS 데이터베이스에 따라 인간 항체의 주어진 위치에서 이들의 발생에 근거하여 선택되었다. 또한, 심하게 고갈된 일부 돌연변이도 음성 대조군으로 시험 하였다. 표시된 G6.31 변이체들의 K_d 및 T_m 은 표 2에 나타낸다. 표 2에 열거된 K_d 값은 BIACORE® T200 장치를 이용하여 단일 주기 약학 분석에 의해 측정되었다.

표 2: 심도 스캐닝 돌연변이생성에 의해 동정된 G6.31 변이체들의 특징

클론	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)	Kd (nM)	폴드 차이(G6.31와 비교하여)	용융 온도 (°C)
G6.31 WT	4.45E+05	6.86E-04	1.54	--	83.4
LC-Q3A	3.89E+05	3.59E-04	0.92	1.7	82.8
LC-M4Q	5.93E+05	6.57E-04	1.11	1.4	72.8
LC-S7Q	7.31E+05	6.71E-04	0.92	1.7	83.2
LC-S9Q	1.47E+06	6.55E-04	0.44	3.5	83.2
LC-S12M	8.94E+05	6.79E-04	0.76	2.0	82.9
LC-G16K	3.67E+05	3.56E-04	0.97	1.6	79.1
LC-T22D	4.87E+05	3.48E-04	0.72	2.1	81.8
LC-D28R	1.17E+06	6.55E-04	0.56	2.8	80.6
LC-Y36G	2.25E+05	5.58E-04	2.47	0.6	66.8
LC-Q37A	6.03E+05	5.15E-04	0.85	1.8	81.6
LC-S50M	4.67E+05	6.11E-04	1.31	1.2	84.5
LC-L73G	5.89E+05	6.44E-04	1.09	1.4	68.8
LC-F83A	8.55E+05	4.33E-04	0.50	3.1	88.8
LC-Q89N	9.91E+05	4.35E-04	0.44	3.5	79.6
LC-Q89T	1.17E+06	4.93E-04	0.42	3.7	79.1
LC-T97N	4.32E+05	8.02E-04	1.86	0.8	81
LC-N94A	3.34E+05	1.31E-03	3.93	0.4	85.8
LC-N94Q	2.78E+05	1.33E-03	4.78	0.3	84.6
HC-V2R	4.64E+05	3.41E-04	0.73	2.1	81.6
HC-S7L	7.36E+05	5.68E-04	0.77	2.0	83
HC-Q13M	1.26E+06	5.19E-04	0.41	3.8	83.1
HC-A40E	1.13E+06	4.66E-04	0.41	3.8	83
HC-I51H	2.48E+06	1.52E-03	0.62	2.5	83.1
HC-A53R	8.29E+05	3.50E-04	0.42	3.7	84.3
HC-T57E	1.93E+06	4.02E-04	0.2	7.7	84.4
HC-Y58R	1.48E+06	2.55E-04	0.17	9.1	83.2
HC-Y58Q	3.52E+05	3.58E-04	1.02	1.5	84.2
HC-Y59T	3.60E+05	9.74E-04	2.71	0.6	82.9
HC-A60M	3.86E+05	7.29E-04	1.89	0.8	82.8
HC-S70H	6.58E+05	6.60E-04	1	1.5	83
HC-T73N	6.78E+05	5.75E-04	0.85	1.8	83.1
HC-Q81S	1.07E+06	4.87E-04	0.45	3.4	83
HC-Q81W	1.20E+06	5.42E-04	0.45	3.4	83.2
HC-N82aR	1.39E+06	3.22E-04	0.23	6.7	83.1

[0546]

[0547]

34개의 돌연변이 (VH에 16개 및 VL에 18개)를 이용하여, 친화력 또는 안정성에서 획득된 증가와 풍도 비율 사이에 선형 상관관계는 관찰되지 않았다 (도 5c-5d). 이론에 결부되는 것을 바라지 않지만, ER은 대장균에서의 기능적 발현, 파아지 입자에서의 Fab의 안정성, 그리고 선별 단백질에 대한 결합을 포함하는 다양한 인자에 의해 영향을 받는다는 사실을 반영할 수 있다. 이를 설명하는 하나의 실시예는 돌연변이 LC-L73G이며, 이것은 경쇄의 소수성 코어의 일부분이다. 이 위치에서 소수성 류신을 글리신으로 대체시키면, 코어에서 패킹(packing)이 감소되며, 덜-안정적인 경쇄가 된다. LC-L73G 돌연변이 T_m은 야생형 G6.31 Fab의 것보다 더 낮은 14.4°C이었다. BIACORE® SPR에 의해 측정되었을 때 항원 결합 친화력에 있어서 눈에 띄는 효과는 없었지만 (야생형 G6.31과 비교하였을 때, 대략적으로 1.6-배 증가 (가령, 더 낮은 K_d)), LC-L73G 돌연변이는 상기 VEGF 패닝 실험에서는 결손되었다. G6.31LC_{L73G}의 결손은 파아지 상에 돌연변이의 감소된 디스플레이의 효과일 것이며, 이 효과는 실제 항원 선별보다 이 돌연변이 선별에서 더 우세하였다. 더욱이, 이 반대 또한 적용된다: 실제 항원 결합 기능이 손상되거나 또는 야생형과 비교하여 변화가 없다 (거짓 양성 생성)하더라도, 상기 디스플레이 (예를 들면, 발현 및/또는 안정성의 강화에 의해)를 증가시키는 돌연변이가 풍부할 수 있다. 따라서, 풍도에 의해 확인된 변이체들은 결합 친화력, 안정성, 발현, 및/또는 다른 성질에서 개선될 수 있다.

[0548]

HVR-H2에서 심도 스캐닝 돌연변이생성 방법에 의해 동정된 2개의 돌연변이, HC-T57E 및 HC-Y58R는 야생형 G6.31과 비교하였을 때, 친화력이 최대 증가(8-내지 9-배)되었다 (도 5e). 틀구조 영역 돌연변이, HC-N82aR는 야생

형 G6.31과 비교하였을 때, 친화력이 대략 6.6-배 증가되었다 (도 5e). 몇 가지 다른 틀구조 영역 돌연변이는 야생형 G6.31과 비교하였을 때, 2-내지 4-배의 친화력이 증가되었음을 보여주었다(도 5e-5f). 경쇄 돌연변이 LC-F83A에서 열안정성에서 최대 증가 (+5.4°C) 를 얻었다(도 5f). 용융 온도에서 증가에 추가적으로, LC-F83A는 VEGF에 대한 G6.31의 친화력을 3-배 증가시켰다. 놀랍게도, 친화력 증가를 초래한 많은 돌연변이는 상기 항원-결합 부위의 원위(distal)에 위치하였다(도 5e-5f). 이들 중, 헬릭스 $\alpha 1$ 와 스트랜드 βE 사이 루프 안에 상기 항원-결합 부위로부터 22Å 이상 떨어져 있는 HC-N82aR, 그리고 상기 VL과 경쇄 불변 도메인 (CL)의 인터페이스에서 HVRs로부터 25Å 떨어져 있는 LC-F83A가 있었다.

[0549] 요약하면, VH와 VL MMK 워크 라이브러리 및 차-세대 서열화를 이용하여 G6.31의 심도 스캐닝 돌연변이생성으로 Fab의 VEGF에 대한 결합 친화력과 안정성을 증가시킨 아미노산 잔기 변경이 확인되었다.

[0550] 재료 및 방법

[0551] A. VEGF 상에서 파아지 페닝 선별

[0552] 연속 선별 라운드에서 상기 VH 또는 VL MMK 워크 파아지 디스플레이 라이브러리(실시예 1에서 기술된)를 5, 0.5, 0.1 nM 바이오틴화된 VEGF에서 배양하고, 그 다음 실온 또는 37°C에서 100 nM 비-바이오틴화된 VEGF와 경쟁시켜, 낮은 친화력 클론이 VEGF에 결합하는 것을 감소시킴으로써, 결합 클론이 선택되었다. 결합된 클론은 뉴클라비딘으로 피복된 ELISA 플레이트 상에 포획되고, 세척되고, 그리고 실온에서 20분간 100 mM HCl에서 용리되었다. 상기 용리된 파아지는 1/10 용적의 1 M Tris pH 8.0로 중화되고, 그 다음 라운드 선별을 위한 증폭용으로 대장균(*E. coli*)을 감염시키는데 이용되었다.

[0553] B. G6.31 심도 돌연변이 스캐닝 라이브러리 Illumina 서열화 및 데이터 분석

[0554] 심도 서열화의 경우, 파아지미드 DNA는 VEGF에 대하여 펼쳐진 선택안된 또는 선택된 VH 및 VL MMK 워크 라이브러리로부터 파아지미드 벡터를 나르는 대장균(*E. coli*) XL1 세포로부터 단리되었다. 정제된 DNA는 VL 및 VH 영역의 제한된 주기의 PCR-기반의 증폭을 위한 주형으로 이용되었다. PCR 산물은 아가로스 겔 추출 및 클린업(Qiagen Gel Extraction Kit)에 의해 정제되었다. 용리된 앰플리콘(amplicon) DNA는 TRUSEQ™ DNA Sample Prep (Illumina)을 이용하여 표준 Illumina 라이브러리 준비 방법으로 심도 서열화 라이브러리 준비를 위한 기반으로 이용되었다. 어댑터-결찰된 라이브러리는 단일 주기의 PCR을 거치고, Illumina MISEQ®상에서 서열화되고, 전체 길이의 앰플리콘을 커버하기 위하여 300bp-단부 쌍(paired-end)을 형성하였다. 데이터 분석을 실시예 1에서와 같이 수행하여 위치 가중 매트릭스 및 풍도 비율을 계산하였다.

[0555] C. 항체 발현

[0556] 선택된 변이체들의 VH와 VL 서열은 발현을 위하여 포유류 Fab 벡터에 클론되었다. 중쇄 및 경쇄 모두를 위한 플라스미드는 7일 동안 30 ml 293T 세포에 형질감염되었다(15 µg). 상청액을 수거하여, 단백질 G 컬럼을 이용하여 정제시켰다.

[0557] D. BIACORE® SPR에 의한 항체 친화력 결정

[0558] 선택된 Fab 변이체들의 결합 친화력을 결정하기 위하여, BIACORE® T200 기구와 함께 SPR 측정이 이용되었다. 간략하게 설명하자면, 시리즈 S 센서 칩 CM5는 공급업자의 지시에 따라 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보이미드 (EDC) 및 N-히드록시숙시니미드 (NHS) 시약으로 활성화되었고, 인간 VEGF (hVEGF)가 결합되어, 50-80 개의 반응 유닛 (RU)을 획득하고, 그 다음 1M 에탄올아민으로 반응안된 기들을 차단시켰다.

[0559] 낮은 것에서 부터(0.02 nM) 높은 것 (50 nM)으로, HBS-P 완충액 (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% 계면활성제 P20)에서 Fab의 3-배 연속 희석물을 주사하였다(유속: 30 µl/분). hVEGF에서 결합 반응은 빈 (blank) 플로우 셀로부터 RU를 차감하여 교정되었다. 센서그램(sensorgram)을 기록하고 BIACORE® T200 평가 소프트웨어 (버전 2.0)로 평가하기 전에 기준 및 완충액 차감을 실시했다. 결합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})는 단순한 일대일 Langmuir 결합 모델을 사용하여 계산되었다. 평형 해리 상수 (K_d)는 비율 k_{on}/k_{off} 로 산출되었다.

[0560] E. 시차주사 형광측정계에 의한 용융 온도 (T_m) 결정

[0561] 형광 염료 존재 하에서 시차주사 형광측정계 (DSF)는 단백질의 열적 언폴딩(unfolding)을 모니터하고, 이는 실시간 PCR 기구 (예컨데, Bio-Rad CFX)를 이용하여 전형적으로 실행된다. SYPRO® 오렌지 염료 (Invitrogen, Cat. No. S6650)는 포스페이트 완충된 염수 (PBS)에 1:20으로 희석되었다. 1 µl의 희석된 염료는 웰당 24 µl

의 Fab 단백질 (대략적으로 100 µg/ml)에 추가되었다. 실시간 PCR 기구(Bio-Rad CFX)를 이용하여 온도를 20 °C에서 100°C로 증가시켰고, 형광 강도를 플롯팅하고, 전이 곡선(T_m)의 반곡점은 이를 테면, Boltzmann 식을 이용하여 산출하였다 (예컨데, Niesen et al., *Nature Protocols* 2(9):2212-2221 (2007) 참고).

[0562] **실시예 3: LC-F83의 입체구조 변화는 G6 구조에서 Fab 엘보우 입체구조와 관련있다**

[0563] 항원 결합 부위로부터 공간적으로 멀리 떨어져 있는 돌연변이가 어떻게 항원 결합과 안정성에 강력한 영향을 미칠 수 있는지 이해하기 위해, LC-F83A 돌연변이의 구조적 효과를 보다 자세히 조사했다. G6.31, G6의 부모계 항체는 상기 VEGF-결합된 형태와 VEGF-없는 형태로 이미 결정화되었다 (Fuh et al., *supra*). G6.31은 G6과 비교하였을 때, HVR-L3에서 오직 4개 치환만을 휴대한다. 따라서, G6의 결정 구조는 G6.31의 모델로 이용되었다. G6의 VEGF-없는 형태의 결정 구조는 비대칭 유닛으로 12개 Fab 분자를 함유한다. 상기 Fab 구조는 가변 도메인 (V-C 인터페이스)에 대한 불변 도메인의 방향에 기초하여 2 개의 상이한 그룹으로 클러스터링될 수 있고(도 6a), 이는 Fab 엘보우 영역에서 상이한 입체구조를 초래하며, Fab 엘보우 각을 측정함으로써 정량화될 수 있다 (예컨데, Stanfield et al., *J. Mol. Biol.* 357(5):1566-1574 (2006) 참고).

[0564] Fab 엘보우 각(elbow angle)의 유연성은 중쇄에서 볼-소켓 조인트에 의해 영향을 받고 (예컨데, Lesk et al., *Nature* 335(6186):188-190 (1988) 참고), 또한 경쇄 부류에 의해 더욱 중요하게 지배된다. 카과 경쇄 항체는 엘보우 각에서 전형적으로 제한되어, 이들은 대략 140 ° 및 대략 175 °, 드물게는 180 °를 초과하여 이점점 분포 피킹을 보여줄 수 있고, 람다 경쇄 항체는 더 넓은 각을 채택할 수 있다(예컨데, Stanfield et al., *supra* 참고). 결정 구조에서 6개의 G6 분자는 작은 엘보우 각(143-155 °)과 VL의 α1에 대하여 CL 도메인의 DE-루프의 단단한 패키징을 보유하지만, 한편 다른 6개 분자는 큰 엘보우 각(170-187 °)과 느슨하게 패키징된 VL-CL 인터페이스를 갖는다 (도 6b-6c). 도 7c에서는 느슨하게 패키징된 또는 조밀하게 패키징된 VL-CL 인터페이스를 갖는 상이한 Fab 분자의 인터페이스 영역 분포를 나타낸다. 조밀하게 패키징된 인터페이스 영역은 평균, 대략 600 Å이며, 느슨하게 패키징된 인터페이스 영역은 대략 450 Å이다. 더욱 상세한 분석에서 6개의 G6_{자유} 분자는 작은 엘보우 각 (143-155 °)을 갖고, 이는 조밀하게 패키징된 VL-CL 인터페이스 (VL의 α1에 대하여 패키징된 CL 도메인의 DE-루프를 포함; 304 ± 48 Å²)와 연관되며, 한편 다른 6개는 큰 엘보우 각 (170-187 °)을 갖고, 이는 덜 조밀하게 패키징된 VL-CL 인터페이스 (234 ± 29 Å² 인터페이스 영역)와 연관된다. 따라서, G6 결정 구조에서 G6는 180 ° 이하의 엘보우 각을 갖는 전형적인 인간 카과 경쇄 항체와 유사하게 거동한다 (도 6a-6c).

[0565] LC-F83의 측쇄 입체 구조는 Fab 엘보우 각에서 변화와 관련된다. 큰 엘보우 각 구조에서, LC-F83은 VL 도메인의 단부 캐핑 영역에서 소수성 포켓("인(in)" 입체구조로 지칭됨) 안에 단단하게 결합된다 (도 6c). 작은 엘보우 구조에서, LC-F83은 소수성 포켓으로부터 뒤집어지고("아웃(out)" 입체구조로 지칭됨), 부분적으로 용매-노출된다 (도 6b). Fab 엘보우 영역과 공간적으로 가까운 위치에 있지만, LC-F83은 엘보우의 부분이 아니다. 그러나, LC-F83의 입체구조 변화는 엘보우 잔기 LC-I106의 측쇄 위치의 변화로 모니터링된다. LC-F83이 "아웃(out)" 입체구조인 경우, LC-F106I의 측쇄는 "위(up)"로 이동하고, 소수성 포켓을 점령한다. 대조적으로, LC-F83이 "인(in)" 입체구조인 경우, LC-I106의 측쇄는 "아래(down)"로 이동한다 (주석: "위(up)"와 "아래(down)" 방향은 "위(up)"에 있는 HVRs와 "아래(down)"으로된 불변 도메인을 참고하여 기술됨). LC-F83과 대조적으로, LC-I106의 움직임은 측쇄에 제한되지 않고, 그 결과 단백질 기본골격에 입체구조적 변화를 초래하고(LC-105 φ-각, LC-106 ψ-각), 상이한 엘보우 각이 관찰되게 된다. 요약하면, G6의 결정 구조는 G6에서 엘보우 각의 변화가 위치 LC-I106 및 LC-F83에서 입체구조적 변화를 요구한다는 것을 암시하였다.

[0566] **실시예 4: LC-83F의 입체 구조에 LC-106I의 결합은 인간 항체 구조에서 공통적인 특징이다**

[0567] G6/G6.31은 파아지 라이브러리로부터 유래되었고, 이는 중쇄 및 경쇄의 공통 틀구조 영역을 구축한다(Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004)). 경쇄를 위한 가장 근접한 생식계 유전자는 IGKV1-39 및 IGKJ1이다. IMGT 데이터베이스에 따라 가장 흔히 이용된 인간 IGKV 서브그룹 (Lefranc et al., *In Silico Biology* 5(1):45-60 (2005)), IGKV1 및 IGKV3은 위치 LC-83에 페닐알라닌을 휴대하고, 한편 생식선으로 덜 빈번하게 이용된 것들은 전형적으로 위치 83에서 발린 (IGKV2 및 IGKV4) 또는 알라닌(IGKV5 및 IGKV6)을 휴대한다. 위치 LC-106에서 이소류신은 5개의 모든 인간 IGKJ 생식계 유전자에서 보존된다.

[0568] 위치 F83의 측쇄 입체구조와 Fab 엘보우 입체구조의 커플 링이 인간 항체의 공통적인 특징인지 여부를 결정하기 위해, LC-F83의 입체구조는 Protein Data Bank(PDB)의 319 개의 인간 Fab 결정 구조에서 결정되었다. 상기 구조는 "인(in)" 입체구조의 LC-F83를 가진 구조 (이면각 chi1 -50 ° 내지-100 °)와 "아웃(out)" 입체구조 (chi1 각 대부분 50 ° 내지 180 °)의 구조로 그룹화되었다 (도 7a). LC-F83 입체구조는 대다수의 구조에서 위

치 LC-106에서 Fab 엘보우 영역에서의 변화와 관련된다 (도 7b). 더욱이, 상기 두 그룹은 엘보우 각 (도 7c), 뿐만 아니라 V-C 인터페이스의 영역에서 유의적인 차이를 나타내었으며, 큰 엘보우 각을 갖는 구조는 더 작고, 덜 조밀하게 패킹된 V-C 인터페이스를 가지며, 한편 큰 엘보우 각을 갖는 구조는 큰 V-C 인터페이스를 갖는다는 것이 실증된다 (도 7c).

[0569] LC-F83A 돌연변이는 항원에 대하여 더 높은 열안정성과 더 높은 친화력을 나타내며, LC-83A 및 LC-106I를 휴대하는 PDB에서 이용가능한 20개 인간 Fab 구조의 엘보우 각이 측정되었다. 이들 구조는 LC-83F "아웃(out)" 배위의 성질을 반영하였고: 이들은 작은 엘보우 각과 큰 V-C 인터페이스를 나타내었다 (도 7c).

[0570] 요약하면, 이들 결과에서 이미 관찰된 바와 같이(Stanfield et al., *supra*), 인간 카파 경쇄 항체의 Fab 엘보우 각에서 이정점 분포는 주로 위치 LC-83에서 페닐알라닌 측쇄의 상이한 입체 구조의 결과임이 설명되었다. 이 데이터는 위치 LC-83에 존재하는 아미노산의 유형이 Fab 엘보우 각에 큰 영향을 갖는다는 것을 보여주었다.

[0571] **재료 및 방법**

[0572] 인간 항체 구조는 구조적 항체 데이터베이스 (SAbDab, Dunbar et al., *Nucleic Acids Research* 42:D1140-1146 (2014))로부터 획득하였다. 추가 구조 필터링 및 구조 핸들링 (아미노산 다시 번호매김, 이면각 측정, 구조 정렬)은 Bio3D (Grant et al., *Bioinformatics* 22(21):2695-2696 (2006))를 이용하여 실행되었다. 불변 도메인과 가변 도메인 사이의 인터페이스 영역은 CCP4-Pisa의 로컬 인스턴스(local instance)를 이용하여 산출되었다 (Krissinel et al., *J. Mol. Biol.* 372(3):774-797 (2007)). ABangle (Dunbar et al., *Protein Eng. Des. Sel.* 26(10):611-620 (2013))를 이용하여 VH-VL 상호작용을 특징화하였다. Pymol 및 공적으로-이용가능한 스크립트를 사용하여 엘보우 각을 산출하였다.

[0573] **실시예 5: 분자 역학 시뮬레이션으로 위치 LC-83은 큰 Fab 엘보우 입체구조와 작은 입체구조 간의 전이하는 스위치와 같은 역할을 하는 것을 확인한다**

[0574] 분자 역학은 실시예 4에서 기술된 구조적 메타-분석에서 확인된 LC-F83A 돌연변이의 효과에 대한 더 깊은 통찰력을 얻기 위해 사용되었다. LC-F83A 돌연변이의 효과는 두 가지 다른 구조적 배경에서 시뮬레이션되었다. 큰 엘보우 각 (G6 쇄 VU, "VU.F83")을 갖는 G6 Fab 결정구조와 작은 엘보우 각을 갖는 결정 구조 (G6 쇄 BA, "BA.F83")가 이용되었다. 돌연변이된 구조 (VU.F83A 및 BA.F83A)에 추가하여 이들 두 구조는 모두 물에서 100 ns 동안 시뮬레이션되었다. 시뮬레이션 시간 동안, F83의 입체구조에서 변화가 관찰되지는 않았다: VU.F83의 경우, LC-F83은 "인(in)" 입체구조를 유지하였고, BA.F83의 경우, 잔기는 "아웃(out)" 입체구조를 유지하였다 (도 8a). 시뮬레이션 동안 시간이 경과함에 따라 엘보우 각에서 변화 비교에서 4개 분자 모두의 엘보우 각은 약 25ns의 초기 평형 단계 이후 시뮬레이션 동안 상당히 안정적으로 유지되었다(도 8b). BA.F83 및 BA.F83A의 엘보우 각 분포에서 통계학적으로 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 두 분자의 경우, 엘보우 각은 135° 주변에서 변동되었다. 그러나, 시뮬레이션 동안 VU.F83 및 VU.F83A의 엘보우 각 사이에 유의적인 차이가 있었다. 시뮬레이션의 첫 25ns 동안, VU.F83A의 엘보우 각은 붕괴되고, 대략 140° 주변에서 변동된 반면, VU.F83의 엘보우 각은 161°의 큰 각에서 안정적으로 유지된다 (도 9a).

[0575] 상기에서 제시된 결과는 Fab의 큰 엘보우 각이 안정화되는데 LC-F83 "인(in)" 입체구조의 중요성을 실증한다. LC-F83A 돌연변이는 상기 분자 역학 시뮬레이션에서 작은 엘보우 각과 더 큰 VL-CL 인터페이스의 즉각적인 전이를 초래하였다. LC-F83 측쇄가 "인(in)"에서 "아웃(out)"로의 입체구조 전환이 없기 때문에, 그리고 이 역이 관찰될 수 있기 때문에, 이들 결과는 상기 분자의 엘보우 각에서의 변화에 유의적인 에너지 장벽을 부과하는 것을 암시한다.

[0576] 이를 함께 고려하면, G6.31과 비교하여 G6.31_{LC-F83A}의 열안정성 증가는 V-C 인터페이스 상호작용 영역에서 증가에 의해 설명될 수 있으며, 이것은 Fab의 4개 도메인의 폴드를 더 안정화시킨다. 더욱이, 상기 V-C 인터페이스에서 더 조밀한 패킹은 LC-1106과 같이 소수성 잔기의 용매 노출을 감소시킨다.

[0577] **재료 및 방법**

[0578] 분자 역학 시뮬레이션은 amber12 (Case et al., *J. Comput. Chem.* 26(16):1668-1688 (2005))를 이용하여 실행하였다. 별도의 언급이 없는 한, 100 ns는 일정한 압력과 300 K에서 시뮬레이션되었다. 시뮬레이션 전, 누락된 전자 밀도로 인해 해리되지 않은 G6 구조의 불변 도메인의 절편은 PDB 엔트리 4hh9를 사용하여 보완되었다. 수득된 시뮬레이션된 구조는 VMD (Humphrey et al., *Journal of Molecular Graphics* 14(1):33-38, 27-38 (1996)), Bio3d, CCP4-Pisa, Pymol 및 ABangle를 이용하여 분석되었다.

- [0579] 실시예 6: G6 Fab의 엘보우 각 역학은 VH-VL 뒤틀림 각을 조정함으로써 상기 항원-결합 인터페이스에 영향을 준다
- [0580] Fab 엘보우 각에서 변화는 LC-F83A 변이체의 용융 온도의 증가를 설명하며, 항원 결합에서 이 돌연변이의 효과는 Fab 엘보우 역학에서 변화에 의해 직접적으로 설명되지 않았다. 이론에 결부되지 않고, LC-F83A 돌연변이는 Fab 엘보우 각에서 변화를 통하여 항원 결합에 간접적으로 영향을 줄 수 있거나, 또는 LC-F83A가 VH-VL 계면에 가깝게 위치하여 VH 및 VL 도메인의 방향에 서로에 대하여 영향을 줄 수 있으므로 직접 항원 결합에 영향을 줄 수 있다. 상기 항원과의 직접적인 접촉은 아니지만, VH-VL 인터페이스는 항원 결합 친화력에 강력한 영향을 보유할 수 있다 (예컨대, Masuda et al., *FEBS J.* 273(10):2184-2194 (2006); Khalifa et al., *Journal of Molecular Recognition* 13(3):127-139 (2000) 참고). 더욱이, 자유-항원 상태에서, Fab의 VH-VL 인터페이스는 전형적으로 가연성이며, 항원 결합으로 강직성(rigidity)이 증가된다(Dunbar et al., *Prot. Eng. Des. Sel.* 26(10):611-620 (2013)). 또한, 상기 VH-VL 방향은 리간드-자유 형과 항원-결합된 형태에서 실질적으로 가변적이다 (예컨대, Stanfield et al., *Structure* 1(2):83-93 (1993) 참고).
- [0581] 게다가 G6의 결정 구조는 상이한 G6 자유-항원 구조 (G6_{결합안된}) 와 VEGF-결합된 구조 (G6_{결합된}) 사이에 VH/VL 뒤틀림 각 (HL 뒤틀림 각)에서 유연성 및 유의적인 차이를 보였다. 큰 엘보우 각을 갖는 6개의 G6_{자유} 분자의 평균 VH/VL 뒤틀림 각 (HL 뒤틀림 각)은 대략 60°이며, 한편 작은 엘보우를 가진 6개 분자의 경우 대략 58°이다. 이것은 G6_{VEGF}의 평균 HL 뒤틀림 각인 55°에 실질적으로 더 근접한다 (도 9b).
- [0582] 분자 역학 시뮬레이션은 이러한 뒤틀림 각도의 변화가 결정화의 인공물이었을 가능성을 배제하기 위해 사용되었다. VU.F83의 정중 HL 뒤틀림 각은 대략 62°이며, BA.F83의 경우 대략 59°이고, 이것은 G6_{결합안된} 결정 구조에서 발견된 결과를 확인시킨다. 더욱이, 2개 돌연변이 Fabs (BA.F83A 및 VU.F83A)는 훨씬 더 작은 뒤틀림 각 (차례로 대략 57° 및 대략 57°)을 나타내는데, 이것은 G6_{결합된} 구조에서 관찰되는 뒤틀림 각에 훨씬 더 근접한다 (도 9c). 더욱이, LC-F83A에서 돌연변이는 VH-VL 인터페이스 상에 돌연변이의 추가 효과를 암시하였는데, BA.F83A의 HL-각이 BA.F83보다 유의적으로 더 작았기 때문이다 (p<0.0001)
- [0583] 이들 결과는 LC-F83A 돌연변이가 상이한 두 기전에 의해 HL 뒤틀림 각에 영향을 주고, 이는 다시 항원 결합에 영향을 주었음을 나타내었다. 첫째, LC-F83A 돌연변이는 Fab 엘보우 각을 변경시킴으로써 이를 간접적으로 조정한다. 구조적 μ 미터 및 분자 역학 시뮬레이션에서 엘보우 각과 HL-각 사이에 상관관계가 있음을 보여주었다 (도 8a-8c 및 9a-9d). 둘째, LC-83은 VH-VL 인터페이스에 직접적으로 영향을 준다. LC-F83A가 도입될 때(도 9a-9d, 분자 BA.F83 및 BA.F83A를 비교), HL 뒤틀림 각에 추가적으로 유의적인 증가가 있었다. 이 결과는 G6.31_{LC-F83A}의 자유 항원에서 항원 결합 부위 배위이며, 이것은 G6_{VEGF} 구조에서 관찰된 것에 더 근접하다. 이론에 결부되는 것을 원하지 않지만, G6.31_{LC-F83A} 재배열된 항원 결합 인터페이스는 VEGF 결합에 있어서 낮은 에너지 값을 초래할 수 있고, 따라서 G6.31_{LC-F83A}의 친화력은 증가된 것(감소된 Kd)이 관찰되었다. 추가적으로, G6.31_{LC-F83A}에서 VH-VL 인터페이스의 예상되는 더 나은 패키징은 T_m의 관찰된 증가를 설명하기 위한 대안 또는 추가 폴드 안정화 기전을 제공할 수 있다(예컨대, Rothlisberger et al., *J. Mol. Biol.* 347(4):773-789 (2005) 참고) .
- [0584] 재료 및 방법
- [0585] 구조적 분석 및 분자 역학 시뮬레이션은 실시예 3-5에서 기술된 바와 같이 실행되었다.
- [0586] 실시예 7: 수소-중수소 교환 질량 분광분석법 (HDX-MS)으로 G6.31과 비교하여, G6.31_{F83A}에서 불변 가변 인터페이스 뿐만 아니라 항원 결합 영역에서 입체구조적 변화를 확인한다.
- [0587] HDX-MS를 사용하여 실시예 3-6에서 기술된 LC-F83A 돌연변이로 인한 Fab 분자의 도메인-간 역학의 변화가 용액에서 관찰될 수 있음을 입증하였다. HDX-MS는 중수소 원자와 기본 골격 아미드 수소 원자의 교환률을 측정한다. 기본골격 아미드 수소 원자는 일반적으로 용매에 노출되어 있고, 수소 결합의 형성에 관여하지 않는 경우, 원자가 묻혀있거나 및/또는 수소 결합의 형성에 관여하는 경우와 비교하였을 때, 더 빠르게 교환된다. G6.31의 수소-중수소 교환 패턴은 G6.31_{LC-F83A}와 비교하였을 때, 몇 개 영역에서 차이를 나타낸다 (도 9d). VL-CL 인터페이스를 형성하고, LC-F83A 돌연변이에 근접하는 CL 도메인의 DE-루프는 G6.31과 비교하였을 때, G6.31_{LC-F83A}에서 더 느리게 교환되었다. HVR 루프 및 이웃 영역에서 교환율의 변화 또한 관찰되었다. HVR 루프 H1 및 L2는 G6.31과 비교하여 G6.31_{LC-F83A}에서 더 느리게 교환되지만, VH-VL 인터페이스에 있는 HVR-H3 루프

의 인접 영역은 더 빠르게 교환되었다. HVR-L2 및 HVR-H3 루프는 VH-VL 인터페이스의 일부이다(예컨대, Vargas-Madrazo et al., *Journal of Molecular Recognition* 16(3):113-120 (2003); Aburatani et al., *J. Biochem.* 132(5):775-782 (2002); Padlan, *Molecular Immunology* 31(3):169-217 (1994) 참고). 따라서, G6.31과 G6.31_{LC-F83A} 사이에서 HDX-MS에서 HVRs 및 VL-CL 인터페이스에서 관찰된 교환 패턴에서 변화는 독립적으로 구조 분석 및 분자 역학 시뮬레이션에서 획득된 결과를 확인시켰다.

[0588]

재료 및 방법

[0589]

G6.31 WT 및 F83A 돌연변이 시료 (45 μM)는 20 °C에서 라벨링 반응을 시작하기 위하여 >90% D₂O 함량을 갖고, pD 7.0 및 50 mM NaCl에서 20 mM 히스티딘-

[0590]

아세테이트 완충액에 15-배 희석되었다. 30 초 내지 1000 분까지 펼쳐지는 6개의 대수적으로-간격을 둔 시간에서 pH 감소 (pH 2.5) 및 2M 구아니디늄 클로라이드 (GdmCl) 및 0.25 M 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 (TCEP)를 냉각 온라인 시스템 상에서 주사하기 전, 추가함으로써 라벨링 반응은 소거되었다(예컨대, Mayne et al. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22(11):1898-1905, 2011 참고).

[0591]

간략하게 설명하자면, 소거된(quenched) 시료는 단백질분해를 위하여 0°C에서 우선 고정된 펩신 컬럼 (2.1x30mm, Applied Biosystems)을 통과시키고, 그 다음 탈염을 위하여 트랩(trap) 컬럼(ACQUITY VANGUARD™ C8)에 결합시킨 후, 역상 크로마토그래피 (ACQUITY UPLC® BEH C18, 1.7 μm 입자 크기, 1.0x50mm)에 의해 분리되고, 그리고 중수소 함량을 측정하기 위하여 질량 분석계 (Thermo ORBITRAP ELITE™, m/z 400에서 120k Hz 해리) 안으로 도입되었다. 크로마토그래피 이동상은 중수소 회수를 최대화시키기 위하여 pH 2.25로 기준 (Walters et al. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 23(12):2132-2139, 2012)에 설명된 바와 같이 준비되는데, 중수소 회수는 완전하게 중수소화된 대조의 측정에 의해 평균적으로 82%이다. 돌연변이 및 야생형 실험을 끼워 넣었고, 무작위화된 시점이 3중으로 수집되었다; 전체 공정은 모든 시료 취급 단계를 실행한 LEAPv1 로봇 플랫폼 (Leap Technologies, Carrboro, NC)에 의해 자동화되었다. 이 공정은 152개의 독특한 펩티드를 만들었고, 이는 대개 95%의 서열 범위를 제공하는 야생형 시료 및 돌연변이 시료 모두에 대하여 ExMS 프로그램(Kan et al. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22(11):1906-1915, 2011)에 의해 동정된 것과 일치한다. 중수소 함량 분석은 기존에 기술된 맞춤 파이썬(python) 스트립트를 이용하는 것과 관련되며(Kan et al. *supra*; Walters et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110(47):18898-18903, 2013; 그리고 Hu et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110(19):7684-7689, 2013), 그리고 HDX-MS 실험에서 이미 기술된 바와 같이, p-값 < 0.05을 갖는 스튜던트 t-테스트(Student's t-test)에 의해 야생형 및 돌연변이 간에 중수소 취입 수준에서 유의적인 차이가 동정되었다 (Leurs et al. *Anal. Chem.* 86(23):11734-11741, 2014).

[0592]

실시예 8: 인간 항체에서 체세포 초돌연변이 표적 LC-83 및 LC-106

[0593]

IGKV1-39 생식계 경쇄 유전자에서 위치 LC-83은 AID 핫스팟 모티프 (RGYW, 여기에서 R은 퓨린, Y는 피리미딘, 그리고 W는 A 또는 T임)에 근접하게 위치한다. LC-F83A 돌연변이에 의해 야기되는 열안정성의 증가는 G6.31와 동일한 생식선으로부터 유래된 다른 항체로 이전가능하였다. 따라서, 인간 항체의 위치 LC-83에서 체세포 돌연변이 빈도가 평가되었다. 또한, 이 분석에는 LC-106이 또한 포함되었다.

[0594]

IGKV1 생식선으로부터 유래된 경쇄 서열에서 체세포 초돌연변이(SHM)의 분포를 검사하는데 2가지 방법이 이용되었다. 첫 번째는 몇 가지 공적으로 이용가능한 여러 데이터베이스에서 이용 가능한 4623개의 독특한 인간 IGKV1 경쇄 서열의 체세포 돌연변이를 대조하는 것이었다 (도 10a, 상위 패널). 두 번째는 1000 개 이상의 개별 인간 림프 조직에서 유래된 RNA에서 IGKV1 서열을 증폭한 후, 고-충실도 단일 분자 실시간 서열화(SMRT) 및 SHM 대조(collating)를 수행한 것이다. 2개의 μ 이터세트의 상이한 기원에도 불구하고, 매우 유사한 체세포 돌연변이 분포가 관찰되었다 (도 10a-10c). LC-83은 VL 세그먼트에서 가장 빈번하게 변이된 위치 중 하나이고; 모든 IGKV1 서열의 7 % 및 19 %는 차례로 두 개의 데이터 세트에서 LC-83에서 돌연변이를 갖는다. 흥미롭게도, 위치 LC-106은 IGKV1 서열 (차례로 9% 및 20%)에서 빈번하게 돌연변이되었으며, 그리고 가장 흔한 돌연변이는 발린이다. G6 VL의 가장 근접한 생식계 유전자 세그먼트는 IGKV1-39 및 IGJ1이다. 따라서, IGKV1.39 생식계 원천의 항체가 검사되었고, 이것으로 LC-F83에서 체세포 돌연변이는 더 작은 측쇄(세린, 발린 및 류신 포함)의 대체로 초래된다는 것이 드러났다(도 10a-10c). IGKV1.39의 항체에서 알려진 치환이 관찰되지 않았는데, 알려진 돌연변이는 거의 발생되지 않는 LC-F83에서 코돈에 2-염기 치환을 요구하기 때문일 것이다.

[0595]

그 다음, 위치 LC-83 및 LC-106의 경우 가장 빈번한 체세포 돌연변이를 휴대하는 G6.31 Fab 변이체들이 생성되었고, 항원 결합 및 열안정성에서 이들의 효과가 결정되었다 (도 10d). 추측컨데, Fab 엘보우 각을

감소시키고, VL-CL 인터페이스 영역을 증가시킴으로써 모든 단일 돌연변이 변이체들은 T_m 을 4.8°C에서 6°C로 증가시켰다. 일관되게, 이중 돌연변이 LC-F83A/LC-I106V는 T_m 의 유의적인 증가를 초래하지 않았다. 이론에 결부되는 것을 원하지 않지만, 양쪽 측쇄의 크기를 동시에 감소시키면 LC-F83 또는 LC-I106에 의해 전형적으로 점령되는 소수성 공동이 비어있고, CL에 대하여 안정적인 패키징을 하는 VL의 능력을 감소시킬 것이다. VEGF 친화력에서 LC-83 돌연변이의 효과가 혼합된다. LC-F83V는 LC-F83A와 유사하게 친화력에서 3-배 증가를 유도하고, 반면에 돌연변이 LC-F83S 및 LC-I106V는 친화력에서 거의 증가를 나타내지 않았다. 항원 친화력에서 LC-83 돌연변이의 효과는 상황 의존적일 수 있다. LC-F83A 돌연변이는 G6.31와 동일한 생식선으로부터 유래된 또다른 항체로 도입되었고, 열안정성 및 친화력에서 유사한 증가가 관찰되었다. 추가적으로, LC-F83S 돌연변이는 항-에스트라디올 항체의 친화력을 증가시키는 것으로 보고되었다.

[0596] 요약하면, LC-83 및 LC-106은 인간 항체에서 빈번하게 돌연변이된다. 상기 친화력 및 안정성에서 이들 두 위치의 영향을 고려하면, 전체 Fab 도메인 역학의 최적화는 생체내 항체 친화성 성숙 시에 고도로 활용될 수 있는 분자 기전이다.

[0597] 재료 및 방법

[0598] 인간 경쇄 서열은 공개적으로 이용가능한 다양한 공급원으로부터 획득되었다: Abysis (Available at the bioinf.org.uk/abysis website), Kabat 데이터베이스 (Martin, *Proteins* 25(1):130-133 (1996)), IMGT 데이터베이스 (Lefranc, *Molecular Biotechnology* 40(1):101-111 (2008)), GenBank (Benson et al., *Nucleic Acids Research* 43:D30-35 (2015)), 및 단백질 데이터뱅크 (Berman et al., *Nucleic Acids Research* 28(1):235-242 (2000)). 중복된 서열은 제거되었고, IGBlast를 이용하여 각각의 V-세그먼트에 대하여 가장 근접한 생식계 유전자가 할당되었다(Ye et al., *Nucleic Acids Research* 41:W34-40 (2013)). 마우스 또는 랫 생식계가 할당된 서열은 데이터 세트로부터 제거되었다. 서열은 Kabat 번호매김되었고 (예컨대, Wu et al., *J. Exp. Med.* 132(2):211-250 (1970) 참고), 상기 V-세그먼트의 틀구조의 체세포 돌연변이가 확인되었다. HVR 영역 (Kabat 번호매김 체계에 의해 확인된 바와 같이)에서 돌연변이는 이 분석에서 고려되지 않았다.

[0599] 인간 항체 서열의 두 번째 원천은 1088개의 개체로부터 유래된 인간 비장, 편도선, 골수 및 주변 혈구 림프구의 상업적으로 이용 가능한 RNA로부터 유래된 것이었다(Clonetech and Amsbio). RNA는 SMARTER® RACE cDNA 증폭 키트(Clonetech)를 이용하여 cDNA로 우선 전사되었다. IGKV-특이적 DNA는 IGKC 영역의 5' 영역의 맞춤 프라이머 어닐링으로 5' RACE (Advantage 2 PCR Kit, Clonetech)을 이용하여 증폭되었고, 한편(5'-CATCAGATGGCGGAAGATGAAGACAGATGGTGC-3' (서열 번호: 56)), IGKV1 세그먼트는 프라이머: 포워드: 5'-GCCATCCAGATGACCCAGTCTCC-3' (서열 번호: 57) 및 리버스: 5'-GGCTGCACCATCTGTCTTC-3' (서열 번호: 58)를 이용하여 제 2 PCR 단계에서 농축되었다. PCR 산물은 Pacific Bioscience RSII (EA Genomic Services)을 이용하여 겔 정제되고, 서열화되었다. 총 994.8 Mbp이 획득되었다. Pacific Bioscience's SMRT 분석 2.3 소프트웨어 패키지를 이용하여 각각의 판독의 콘센수스 서열을 만들었다. 콘센수스 서열의 생식선 주석달기(annotation)는 VDJFasta (Glanville et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(48):20216-20221)를 이용하였다. 서열은 Kabat 번호매김되었고, 상기 V-세그먼트의 틀구조의 체세포 돌연변이가 확인되었다. 총 19034개의 서열이 IGKV1로 표시되고, 이중 3796개는 최소한 3개의 틀구조 영역 및 2개의 HVRs를 함유하며, SHM 분포를 만드는 데 포함되었다.

[0600] 실시예 9: G6.31의 표면 전하 변이체들의 동정

[0601] G6.31의 pI를 낮추기 위하여 이용될 수 있는 돌연변이를 단리하기 위하여, G6 결정 구조의 구조 정보를 이용하여 가변 도메인 안에서 표면-노출된 위치들이 확인되었다. 글루타메이트로의 치환이 NNK 워크의 VH 및 VL 라이브리 (실시예 2)의 VEGF 패닝에 근거하여 1 또는 그 이상의 풍도 비율을 나타내는 위치는 BIACORE® T200 시스템 및 열안정성 (DSF)을 사용하는 단일주기 역학 분석에 의한 VEGF 결합 친화력에 대한 이들의 영향을 시험하기 위해 선택되었다(표 3A). 글루타메이트 및 다른 하전된 잔기 (예를 들어, 아르기닌, 리신)에 대한 치환체를 함유하는 돌연변이 변이체를 상기 한 바와 같이 생성, 발현 및 정제하였다(실시예 2, 물질 및 방법 참고). 일부 경우에서, 일부 변이체들에 대해 표 3A에 열거된 전체 Kd는 단일주기 동역학 분석 (표 3A)과 다중주기 역학 분석 (표 3A) 간의 피팅 차이로 인해 표 4의 결과에 비교하여 약하다. 표 3B는 표시된 변이체의 수율, 단량체 백분율 (단량체 %) 및 용리 시간을 나타낸다.

표 3A: 표면-노출된 하전 변이체들의 특징

변이체	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	Kd (M)	배수 변화 (G6.31과 비교하여)	T_m
G6.31 (WT)	3.01E+05	5.13E-04	1.7E-09	--	83.8
LC-S7E	3.56E+05	4.43E-04	1.24E-09	1.4	85.8
LC-S9E	1.24E+06	4.57E-04	3.68E-10	4.6	85.4
LC-S10E	2.63E+05	4.29E-04	1.63E-09	1.0	86
LC-S12E	2.01E+05	4.58E-04	2.27E-09	0.7	84
LC-A13E	4.83E+05	3.94E-04	8.17E-10	2.1	79.2
LC-T20E	2.46E+05	4.57E-04	1.86E-09	0.9	84.6
LC-Q27E	2.30E+05	4.50E-04	1.96E-09	0.9	84.6
LC-P40E	3.03E+04	5.41E-04	1.79E-08	0.1	83
LC-A51E	1.72E+05	4.62E-04	2.68E-09	0.6	76.8
LC-Y55E	4.53E+04	5.31E-04	1.17E-08	0.1	80.8
LC-G57E	4.29E+05	4.18E-04	9.74E-10	1.7	83
LC-P59E	2.84E+05	4.44E-04	1.56E-09	1.1	82.8
LC-S77E	7.11E+05	3.99E-04	5.62E-10	3.0	84.6
LC-Y92E	4.97E+05	1.03E-03	2.07E-09	0.8	80
LC-G93E	2.48E+05	1.49E-03	5.98E-09	0.3	76.2
LC-A13R	3.25E+05	4.58E-04	1.41E-09	1.2	81.6
LC-G16K	3.11E+05	4.46E-04	1.43E-09	1.2	79.6
LC-S50R	2.45E+05	4.64E-04	1.89E-09	0.9	84
LC-T31R	2.71E+05	4.89E-04	1.80E-09	0.9	84
LC-T72R	2.92E+05	4.46E-04	1.53E-09	1.1	84.4
HC-V2E	3.00E+05	3.95E-04	1.32E-09	1.3	83.4
HC-S5E	7.88E+05	4.54E-04	5.76E-10	3.0	84
HC-S7E	7.61E+05	3.81E-04	5.01E-10	3.4	85.2
HC-G8E	6.57E+05	4.55E-04	6.93E-10	2.5	83.4
HC-L11E	5.63E+05	5.07E-04	9.01E-10	1.9	82
HC-G16E	7.30E+05	4.54E-04	6.22E-10	2.7	83.2
HC-T28E	6.21E+05	3.52E-04	5.66E-10	3.0	85.2
HC-S30E	7.85E+04	5.58E-04	7.1E-09	0.2	84
HC-A40E	1.97E+05	5.17E-04	2.63E-09	0.6	83.8
HC-P41E	1.52E+05	5.48E-04	3.6E-09	0.5	84.4
HC-K43E	3.80E+05	4.82E-04	1.27E-09	1.3	84.2
HC-Y58E	8.20E+05	5.08E-04	6.2E-10	2.7	84

[0602]

면이체	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_d (M)	배수 변화 (G6.31과 비교하여)	T_m
HC-A60E	5.24E+05	5.65E-04	1.08E-09	1.6	83.2
HC-K64E	5.52E+05	3.95E-04	7.15E-10	2.4	84
HC-G65E	3.02E+05	4.72E-04	1.56E-09	1.1	84.2
HC-T68E	2.15E+05	4.40E-04	2.05E-09	0.8	84.8
HC-A71E	2.57E+05	3.79E-04	1.48E-09	1.1	84.8
HC-T73E	5.50E+05	4.34E-04	7.88E-10	2.2	84.6
HC-S74E	2.36E+05	4.99E-04	2.11E-09	0.8	84.4
HC-K75E	2.17E+05	4.44E-04	2.04E-09	0.8	84.2
HC-N76E	2.71E+05	4.67E-04	1.72E-09	1.0	81.4
HC-T77E	2.48E+05	4.77E-04	1.93E-09	0.9	84.8
HC-Q81E	2.25E+05	4.95E-04	2.2E-09	0.8	85
HC-S82bE	4.37E+05	4.33E-04	9.91E-10	1.7	84.2
HC-Q105E	1.09E+05	4.63E-04	4.24E-09	0.4	84.6
HC-T107E	4.16E+05	5.94E-04	1.43E-09	1.2	85.8
HC-L11R	8.90E+05	4.35E-04	4.88E-10	3.5	81.4
HC-T28K	9.75E+05	4.10E-04	4.20E-10	4.0	85.4
HC-P41R	5.71E+05	5.54E-04	9.70E-10	1.8	84.6
HC-Y56K	7.24E+05	6.99E-04	9.65E-10	1.8	84.8
HC-T68K	3.97E+05	5.13E-04	1.29E-09	1.3	84.6
HC-T77K	2.03E+06	4.50E-04	2.22E-10	7.7	84

[0603]

표 3B: 표면-노출된 하전 변이체들의 정제 매개변수

변이체	수율 (mg)	단량체 %	용리 시간 (분)
G6.31 (WT)	0.57	97.86	12.74
LC-S7E	0.24	77.02	12.39
LC-S9E	0.32	77.19	12.43
LC-S10E	0.05	54.64	12.44
LC-S12E	0.28	74.57	12.41
LC-A13E	0.31	67.58	12.4
LC-T20E	0.32	73.31	12.36
LC-Q27E	0.26	78.98	12.19
LC-P40E	0.34	67.56	12.43
LC-A51E	0.31	67.73	12.28
LC-Y55E	0.3	68.83	12.42
LC-G57E	0.3	67.9	12.28
LC-P59E	0.35	71.85	12.41
LC-S77E	0.36	73.49	12.37
LC-Y92E	0.31	100	12.2
LC-G93E	0.3	100	12.55
LC-A13R	0.35	70.15	12.41
LC-G16K	0.32	72.84	12.36
LC-S50R	0.33	100	12.13
LC-T31R	0.34	74.87	12.49
LC-T72R	0.28	72.31	12.41
HC-V2E	0.3	97.45	12.32
HC-S5E	0.36	97.14	12.44
HC-S7E	0.32	100	12.5
HC-G8E	0.33	100	12.36
HC-L11E	0.33	100	12.48
HC-G16E	0.36	100	12.46
HC-T28E	0.29	97.52	12.08
HC-S30E	0.36	94.81	11.9
HC-A40E	0.34	95.91	12.41
HC-P41E	0.38	100	12.62
HC-K43E	0.36	100	12.54
HC-Y58E	0.37	100	11.97
HC-A60E	0.27	97.58	12.39
HC-K64E	0.31	97.83	12.36

[0604]

변이체	수율 (mg)	단량체 %	용리 시간 (분)
HC-G65E	0.32	98.01	12.41
HC-T68E	0.35	100	12.41
HC-A71E	0.42	100	12.53
HC-T73E	0.37	100	12.14
HC-S74E	0.36	100	12.36
HC-K75E	0.27	94.47	12.38
HC-N76E	0.37	95.68	12.02
HC-T77E	0.41	97.5	12.51
HC-Q81E	0.33	97.72	12.49
HC-S82bE	0.4	93.54	12.47
HC-Q105E	0.37	98.41	12.55
HC-T107E	0.32	98.04	12.23
HC-L11R	0.37	99.81	12.53
HC-T28K	0.39	97.98	12.43
HC-P41R	0.34	100	12.6
HC-Y56K	0.39	100	12.13
HC-T68K	0.42	100	12.39
HC-T77K	0.33	94.64	12.51

[0605]

[0606]

표 3A에 나타낸 바와 같이, G6.31과 비교하여 VEGF와 동등하거나 또는 개선된 결합 친화력을 갖는 여러 표면 노출된 전하 변화가 확인되었다.

[0607]

실시예 10: 개선된 VEGF에 대하여 개선된 결합 친화력 및 개선된 안정성을 갖는 변이체 조합의 생성 및 특징화

[0608]

A. VEGF에 대하여 개선된 결합 친화력 및 개선된 안정성을 갖는 변이체들의 생성

[0609]

G6.31에는 이의 안정성에 영향을 줄 수 있는 HVR-L3 (N94-P95)에 자가절단 부위가 있다. 증가된 결합 친화력 및 증가된 안정성을 갖는 클론을 확인하기 위해, 실시예 2 (표 2 참조)에 기재된 단일 변이체들의 조합을 복합하였다. 특히 다음의 4 개의 돌연변이에 집중하였다: LC-F83A (개선된 열안정성 및 친화력 제공), LC-N94A (자가절단 부위 제거), HC-Y58R (친화력 개선) 및 HC-N82aR (친화력 개선). 자가절단 부위를 제거하기 위한 위치 LC-N94에서의 몇몇 다른 치환은 또한 다중 주기 약학적 측정에 의해 VEGF에 대한 결합 친화력에서 이들의 효과를 테스트하였고, 뿐만 아니라 DSF에 의한 안정성에서의 효과에 대하여 시험하였다(표 4). 자가절단 부위의 제거는 비-환원 모세관 전기 영동 도데실 술페이트 나트륨(CE-SDS)을 사용하여 측정된 저분자량 물질의 백분율에 의해 평가된 바와 같이, 단편화를 지속적으로 감소시켰다 (도 12).

표 4: 자가-절단 부위 변이체들의 친화력 및 열안정성

변이체	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	Kd (nM)	T_m (°C)	T_m 증가 (WT와 비교하였을 때)
G6.31 WT	7.54E+05	3.95E-04	0.525	84	--
LC-N94A	1.59E+06	1.69E-03	1.06	85.6	1.6°C
LC-N94Q	3.18E+05	3.62E-04	1.14	84.6	0.6°C
LC-N94R	1.94E+05	4.07E-04	2.09	85.2	1.2°C

[0610]

[0611]

단일 클론에 LC-F83A, LC-N94A, HC-Y58R 및 HC-N82aR 변이체를 조합하면("Y58R.N94A.N82aR.F83A", "G6.31 AARR"이라고도 함) 결과적으로 G6.31에 비해 6.6 배의 개선된, VEGF에 대한 증가된 결합 친화력 ($K_d = 80$ pM)을 초래하였다. Y58R.N94A.N82aR.F83A는 또한 G6.31과 비교하여 상당히 개선된 열안정성, 4.8°C의 T_m 증가를 갖는다. (표 5). Y58R.N94A.N82aR.F83A의 VH 도메인 아미노산 서열은 서열 번호: 11에 나타내며, VL 도메인의 아미노산 서열은 서열 번호: 12에 나타낸다.

표 5: 조합 변이체 Y58R.N94A.N82aR.F83A 는 G6.31 과 비교하여 개선된 VEGF 에 대하여 개선된 결합 친화력 및 개선된 안정성을 갖는다

변이체	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	Kd (nM)	개선 배수 (WT와 비교하였을 때)	T_m (°C)	T_m 증가 (WT와 비교하였을 때)
G6.31 WT	7.54E+05	3.95E-04	0.525	--	84.0	--
LC-F83A	1.65E+06	2.18E-04	0.132	4.0	89.0	5.0°C
LC-N94A	1.59E+06	1.69E-03	1.06	0.5	85.6	1.6°C
HC-Y58R	2.42E+06	1.84E-04	0.076	6.9	83.2	0.8°C
HC-N82aR	1.62E+06	1.24E-04	0.077	6.8	84.0	0.0°C
Y58R.N94A.N82aR.F83A	4.00E+06	3.20E-04	0.080	6.6	88.8	4.8°C
Y58R.N94A.F83A	2.22E+06	3.01E-04	0.135	3.9	89.2	5.2°C

[0612]

[0613]

[0614]

B. 변경된 pI를 갖는 표면-노출된 하전된 변이체들의 생성

더 낮은 pI를 갖는 변이체를 생성하기 위해, 몇 개의 글루타메이트 치환을 G6.31 서열에 도입하였다. 추가 공학적 조작을 위하여, 단일 표면에 노출된 하전 돌연변이 변이 데이터 (표 3A ~ 3B)에 기초하여 VEGF 결합에 부정적인 큰 영향을 미치지 않는 변이체들이 선택되었다. 돌연변이를 선별할 때, 발현 수준 (수율로 평가)과 감소된 응집 (높은 단량체 %로 평가)을 고려하였다. G6.31의 등전위 표면은 APBS를 이용하여 산출되었다 (Baker et al. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 98(18):10037-10041 (2001)). 선택된 글루타메이트 돌연변이를 정전기 표면에 매핑하고, (i) 공간적으로 가까이 위치한 돌연변이를 피하고, 그리고 (ii) 강력한 양전하를 띤 패치 내에 위치한 돌연변이를 선호하는 글루타메이트 돌연변이의 조합을 선택하였다. 추가 특성 분석을 위해 (표 6), 2 개의 중쇄 조합 변이체 (R19E를 가진, 그리고 없는)와 5 개의 경쇄 조합 변이체가 생성되었다. 모든 경쇄 조합 변이체는 자가-절단 부위를 제거하기 위한 LC-N94A 돌연변이와 항체의 열 안정성을 향상시키기 위한 LC-F83A 돌연변이를 함유하였다. 이들 몇몇 변이체들은 VEGF에 대한 개선된 친화력을 나타내었다(표 6, 표 7, 및 표 9 참고). 예를 들면, HCLC2 및 HCLC5는 G6.31와 비교하였을 때, 개선된 친화력과 상당히 감소된 pI(G6.31의 pI 8.9와 비교하였을 때, 차례로 pI 5.3 및 5.6) (표 7 및 표 9 참고).

표 6: 표면-노출된 전하 변이체들 조합

변이체	유형	서열 번호:	돌연변이
HCcombo	VH	33	V2E, S7E, R19E, T28E, A40E, G16E, K43E, T57E, K64E, K75E, S82BE, T107E
R19HCcombo	VH	51	V2E, S7E, T28E, A40E, G16E, K43E, T57E, K64E, K75E, S82BE, T107E
LCcombo1	VL	34	S9E, R18E, F83A, N94A
LCcombo2	VL	35	R18E, K42E, S76E, F83A, N94A
LCcombo3	VL	36	S9E, R18E, K42E, F83A, N94A
LCcombo4	VL	37	R18E, F83A, N94A
LCcombo5	VL	12	F83A, N94A

[0615]

표 7: 표면-노출된 전하 변이체들 조합의 VEGF에 대한 결합 역학

항체 이름	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	Kd (M)	VH	VL
HCcombo	2.05E+06	2.74E-04	1.34E-10	HCcombo	G6.31 WT
HCLC2	2.12E+06	6.23E-04	2.93E-10	HCcombo	LCcombo2
HCLC4	2.03E+06	6.08E-04	2.99E-10	HCcombo	LCcombo4
HCLC5	1.81E+06	5.73E-04	3.16E-10	HCcombo	LCcombo5
HCLC3	1.84E+06	6.08E-04	3.30E-10	HCcombo	LCcombo3
HCLC1	1.37E+06	6.07E-04	4.42E-10	HCcombo	LCcombo1
G6.31 WT	9.99E+05	5.99E-04	5.99E-10	G6.31 WT	G6.31 WT
LCcombo2	5.99E+05	6.67E-04	1.11E-09	G6.31 WT	LCcombo2
LCcombo3	5.74E+05	7.68E-04	1.34E-09	G6.31 WT	LCcombo3
LCcombo5	5.37E+05	7.66E-04	1.43E-09	G6.31 WT	LCcombo5
LCcombo4	4.63E+05	8.08E-04	1.75E-09	G6.31 WT	LCcombo4
LCcombo1	4.47E+05	1.01E-03	2.27E-09	G6.31 WT	LCcombo1
R19HCLC2	8.89E+05	4.67E-05	9.49E-11	R19HCcombo	LCcombo2
R19HCLC4	2.84E+05	4.79E-05	1.69E-10	R19HCcombo	LCcombo4
R19HCLC5	7.07E+05	4.41E-05	6.24E-11	R19HCcombo	LCcombo5

[0616]

[0617]

또한, 선택된 표면 노출된 글루타메이트 치환 및 친화력 및/또는 안정성을 개선시킨 단일 변이체를 포함하는 몇몇 다른 조합 변형체가 생성되었다 (표 8).

표 8: 추가 조합 변이체들의 결합 역학

변이체들	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	Kd (M)
HC-A40E, HC-T57E	2.96E+06	8.04E-04	2.72E-10
LC-F83A, LC-N94A	6.48E+05	1.11E-03	1.71E-9
LC-F83A, LC-N94A, LC-T22D	1.33E+06	7.44E-04	5.58E-10
HC-A40E, HC-T57E, LC-F83A, LC-N94A	1.27E+06	7.41E-04	5.84E-10
HC-A40E, HC-T57E, LC-F83A, LC-N94A, LC-T22D	1.20E+06	7.18E-04	5.97E-10

[0618]

[0619]

표 9는 선택된 조합 변이체들에 대한 결합 친화력, 안정성 및 pI 데이터를 요약한 것이다. 항체 pI는 사내 프로그래밍을 사용하고, 표준 pI 대조를 갖는 등전점 전기 포커싱(IEF) 겔을 사용하여 계산하였다. 표 10은 이들 항체의 대응하는 VH와 VL 아미노산 서열을 나타낸다. 표 11은 이들 항체의 VL HVR 아미노산 서열을 나타낸다. 표 12는 이들 항체의 VH HVR 아미노산 서열을 나타낸다.

표 9: 선택된 조합 변이체들의 요약

항체 이름	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_d (nM)	Fab Tm (°C)	pI
G6.31	7.54E+05	3.95E-04	0.525	83.8	8.9
LC-N94A	1.56E+06	1.69E-03	1.060	85.8	8.9
LC-N94A.LC-F83A	6.48E+05	1.11E-03	1.710	88	8.9
LC-N94A.LC-F83A. HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	1.27E+06	7.41E-04	0.580	88	8.5
N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)	2.22E+06	3.01E-04	0.135	88.2	9.3
HCcombo	2.05E+06	2.74E-04	0.134	71.2	5.6
HCLC2	2.12E+06	6.23E-04	0.293	72.6	5.3
HCLC4	2.03E+06	6.08E-04	0.299	73.4	5.4
HCLC5	1.81E+06	5.73E-04	0.316	73.8	5.6
HCLC3	1.84E+06	6.08E-04	0.330	73.8	5.3
HCLC1	1.37E+06	6.07E-04	0.442	73.6	5.4
R19HCLC2	8.89E+05	4.67E-05	0.095	74.8	5.7
R19HCLC4	2.84E+05	4.79E-05	0.169	76.2	5.8
R19HCLC5	7.07E+05	4.41E-05	0.062	76.2	6

표 10: 표 9의 항체의 VH와 VL 아미노산 서열

항체 이름	변이체 VH (서열 번호)	변이체 VL (서열 번호)
G6.31 WT	G6.31 WT (서열 번호: 42)	G6.31 WT (서열 번호: 38)
LC-N94A	G6.31 WT (서열 번호: 42)	N94A (서열 번호: 41)
LC-N94A.LC-F83A	G6.31 WT (서열 번호: 42)	N94A.F83A (서열 번호: 12)
LC-N94A.LC-F83A. HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	A40E.T57E (서열 번호: 40)	N94A.F83A (서열 번호: 12)
N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)	N82aR.Y58R (서열 번호: 11)	N94A.F83A (서열 번호: 12)
HCcombo	HCcombo (서열 번호: 33)	G6.31 WT (서열 번호: 38)
HCLC2	HCcombo (서열 번호: 33)	LCcombo2 (서열 번호: 35)
HCLC4	HCcombo (서열 번호: 33)	LCcombo4 (서열 번호: 37)
HCLC5	HCcombo (서열 번호: 33)	N94A.F83A (서열 번호: 12)
HCLC3	HCcombo (서열 번호: 33)	LCcombo3 (서열 번호: 36)
HCLC1	HCcombo (서열 번호: 33)	LCcombo1 (서열 번호: 34)
R19HCcombo	R19HCcombo (서열 번호: 51)	G6.31 WT (서열 번호: 38)
R19HCLC2	R19HCcombo (서열 번호: 51)	LCcombo2 (서열 번호: 35)
R19HCLC4	R19HCcombo (서열 번호: 51)	LCcombo4 (서열 번호: 37)
R19HCLC5	R19HCcombo (서열 번호: 51)	N94A.F83A (서열 번호: 12)

표 11: 표 9의 항체의 VL HVR 서열

항체 이름	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
G6.31 WT	RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)	SASFLYS (서열 번호:9)	QQGYGNPFT (서열 번호: 23)
LC-N94A	RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)	SASFLYS (서열 번호:9)	QQYGAPFT (서열 번호: 10)
LC-N94A.LC-F83A	RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)	SASFLYS (서열 번호:9)	QQYGAPFT (서열 번호: 10)
LC-N94A.LC-F83A. HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)	SASFLYS (서열 번호:9)	QQYGAPFT (서열 번호: 10)
N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)	RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)	SASFLYS (서열 번호:9)	QQYGAPFT (서열 번호: 10)
HCcombo	RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)	SASFLYS (서열 번호:9)	QQGYGNPFT (서열 번호: 23)
HCLC2	RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)	SASFLYS (서열 번호:9)	QQYGAPFT (서열 번호: 10)
HCLC4	RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)	SASFLYS (서열 번호:9)	QQYGAPFT (서열 번호: 10)
HCLC5	RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)	SASFLYS (서열 번호:9)	QQYGAPFT (서열 번호: 10)
HCLC3	RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)	SASFLYS (서열 번호:9)	QQYGAPFT (서열 번호: 10)
HCLC1	RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)	SASFLYS (서열 번호:9)	QQYGAPFT (서열 번호: 10)
R19HCcombo	RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)	SASFLYS (서열 번호:9)	QQGYGNPFT (서열 번호: 23)
R19HCLC2	RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)	SASFLYS (서열 번호:9)	QQYGAPFT (서열 번호: 10)
R19HCLC4	RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)	SASFLYS (서열 번호:9)	QQYGAPFT (서열 번호: 10)
R19HCLC5	RASQDVSTAVA (서열 번호: 8)	SASFLYS (서열 번호:9)	QQYGAPFT (서열 번호: 10)

[0622]

표 12: 표 9의 항체의 VH HVR 서열

항체 이름	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3
G6.31 WT	DYWIH (서열 번호:1)	GITPAGGYTYADSVKG (서열 번호: 53)	FVFFLPYAMDY (서열 번호:3)
LC-N94A	DYWIH (서열 번호:1)	GITPAGGYTYADSVKG (서열 번호: 53)	FVFFLPYAMDY (서열 번호:3)
LC-N94A.LC-F83A	DYWIH (서열 번호:1)	GITPAGGYTYADSVKG (서열 번호: 53)	FVFFLPYAMDY (서열 번호:3)
LC-N94A.LC-F83A. HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	DYWIH (서열 번호:1)	GITPAGGYEYADSVKG (서열 번호: 21)	FVFFLPYAMDY (서열 번호:3)
N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)	DYWIH (서열 번호:1)	GITPAGGYTRYADSVKG (서열 번호: 7)	FVFFLPYAMDY (서열 번호:3)
HCcombo	DYWIH (서열 번호:1)	GITPAGGYEYADSVKG (서열 번호: 22)	FVFFLPYAMDY (서열 번호:3)
HCLC2	DYWIH (서열 번호:1)	GITPAGGYEYADSVKG (서열 번호: 22)	FVFFLPYAMDY (서열 번호:3)
HCLC4	DYWIH (서열 번호:1)	GITPAGGYEYADSVKG (서열 번호: 22)	FVFFLPYAMDY (서열 번호:3)
HCLC5	DYWIH (서열 번호:1)	GITPAGGYEYADSVKG (서열 번호: 22)	FVFFLPYAMDY (서열 번호:3)
HCLC3	DYWIH (서열 번호:1)	GITPAGGYEYADSVKG (서열 번호: 22)	FVFFLPYAMDY (서열 번호:3)
HCLC1	DYWIH (서열 번호:1)	GITPAGGYEYADSVKG (서열 번호: 22)	FVFFLPYAMDY (서열 번호:3)
R19HCcombo	DYWIH (서열 번호:1)	GITPAGGYEYADSVKG (서열 번호: 22)	FVFFLPYAMDY (서열 번호:3)
R19HCLC2	DYWIH (서열 번호:1)	GITPAGGYEYADSVKG (서열 번호: 22)	FVFFLPYAMDY (서열 번호:3)
R19HCLC4	DYWIH (서열 번호:1)	GITPAGGYEYADSVKG (서열 번호: 22)	FVFFLPYAMDY (서열 번호:3)
R19HCLC5	DYWIH (서열 번호:1)	GITPAGGYEYADSVKG (서열 번호: 22)	FVFFLPYAMDY (서열 번호:3)

[0623]

[0624]

예를 들어, 상기 나열된 임의의 항체, 예를 들면, G6.31 AARR의 Fab 중쇄의 상부 힌지 영역은 문헌에 보고된 항

-IgG1 힌지 자기항체에 대한 반응성을 제거할 수 있도록 돌연변이화되었다. 예컨대, Brezski et al., *J. Immunol.* 181:3183-3192, 2008 및 Brezski et al., *mAbs* 2:3, 212-220, 2010 참고. 따라서, G6.31 AARR 중쇄의 C-말단 아미노산은 T (야생형 (WT) 버전) 또는 L (항 인간 IgG Fab에 대한 반응성이 결여된 변형 버전) 일 수 있다. 야생형 G6.31 AARR의 전장 중쇄 아미노산 서열은 서열 번호: 48이다. 항-인간 IgG Fab에 대한 반응성이 결여된 변이체 형태의 전장 중쇄 아미노산 서열은 서열 번호: 49이다. G6.31 AARR과 항-인간 IgG Fab에 대한 반응성이 결여된 변이체 형태의 전장 경쇄 아미노산 서열은 서열 번호: 50이다.

[0625] 요약하면, 심도 스캔 돌연변이 유발에 의해 확인된 변이체의 조합은 향상된 특성을 갖는 항체를 만들었다. 일부 경우에서, 상기 항체는 G6.31과 비교하였을 때, VEGF에 대한 개선된 결합 친화력, 뿐만 아니라 개선된 안정성 (상당히 증가된 T_m 으로 판단하였을 때)을 보유하였다. 일부 변이체들 (예컨대, 상기 항체 HCcombo, HCLC1, HCLC2, HCLC3, HCLC4, 및 HCLC5)는 VEGF에 대한 개선된 결합 친화력 및 상당히 감소된 pI를 모두 보유하였다. 감소된 pI를 갖는 변이체들의 경우, (예컨대, R19HCcombo, R19HCLC2, R19HCLC4, 및 R19HCLC5의 경우) 중쇄에서 위치 19에서 R19E 돌연변이를 원래 아르기닌으로 되돌리면, 친화력의 추가 개선 및 증가된 T_m (약 2.2-2.8°C)을 갖는 변이체들이 초래되었다.

[0626] **실시예 11: 토끼의 유리체내 투여 후 G6.31 변이체들의 안구 및 전신 약동학**

[0627] G6.31 변이체들의 약동학 (PK) 성질을 평가하기 위하여, 다음의 생체내 실험은 뉴질랜드 흰 토끼(NZW)를 이용하여 실행되었다. 상이한 2개의 G6.31 변이체들, G6.31 AAEE (LC-N94A.LC-F83A.HC-A40E.HC-T57E) 및 G6.31 AARR (Y58R.N94A.N82aR.F83A), 뿐만 아니라 부모계 G6.31 WT에 있어서 안구 반감기가 측정되었다. 각각의 경우에 있어서, 항체의 각 Fabs는 PBS 안에서 10 mg/mL의 농도로 제형화되었다. 마취된 토끼의 유리체강내로 50 μ L (0.5 mg)를 주사하였다. 토끼 (10개 그룹)에게 한 눈에 한번(once/eye) 투여되었다. 그룹 1 에는 G6.31 AAEE가 투여되었고, 그룹 2에는 G6.31 WT가 투여되었고, 그룹 3에는 G6.31 AARR이 투여되었다. 조직 (상기 유리체 체액, 수용액 체액, 및 혈청)은 투여-전, 그리고 투여-후 2 시간, 6 시간, 1 일, 2 일, 4 일, 8 일, 15 일 및 21 일에 수집되었다. 샘플은 하기 기술된 Total Fab ELISA를 사용하여 항-VEGF의 수준에 대해 분석되었다.

[0628] 각각의 상기 유리체 체액 및 수용액 체액에서 각 변이체와 WT의 약동학 분석 결과는 도 11a에 제시된다. 상기 유리체 체액 및 수용액 체액 모두에서 G6.31 AAEE 및 G6.31 AARR의 PK는 WT G6.31의 PK와 기본적으로 동일하다는 것을 결과에서 알 수 있다. 유리체 및 수용액 반감기를 계산하고, 그 결과를 하기 표 13에 나타낸다. 변이체 G6.31 Fab의 반감기는 WT와 유사하고, 또한 문헌에서 보고된 Fab의 안구 반감기와 일치한다.

표 13: G6.31 변이체들 및 G6.31 WT의 반감기

항체	유리체 반감기 (일)	수용액 반감기 (일)
G6.31 AAEE	3.13	3.02
G6.31 WT	3.23	3.03
G6.31 AARR	3.1	2.81

[0629] 유리체강내 주사 후 Fab에 대한 전신 노출은 혈청 내 항-VEGF 수치를 측정하여 평가하였다. 항-VEGF에 대하여 혈청 시료가 분석되었다. 결과는 도 11b에 나타낸다. 상기 제거 (ml/kg/일)가 산출되었고, 그 결과는 표 14에 나타낸다. 항-치료요법적 항체 (ATA)에 대한 혈청이 또한 분석되었다. ATA는 14 일째부터 모든 동물에 준제했다.

표 14. G6.31 변이체들 및 G6.31 WT의 제거

항체	제거 (ml/kg/일)
G6.31 AAEE	733
G6.31 WT	1238
G6.31 AARR	2133

[0631] 표 14에 나타난 결과에서 알 수 있듯이, 세 가지 Fab 모두가 동일한 생체 이용률을 갖는 경우, G6.31 AARR이 가장 빠른 제거율을 보였으며, 이것은 G6.31 WT 및 G6.31 AAEE에 비해 전신 노출이 낮음을 나타낸다. 그러한 낮은 전신 노출은 G6.31 WT 및 G6.31 AAEE와 비교하여 G6.31 AARR에 대한 더 나은 안전성 프로파일을 가져올 수 있다.

[0633] 재료 및 방법

[0634] A. 전체 Fab ELISA

[0635] ELISA 플레이트는 4°C에서 하룻밤 동안 AffiniPure F(ab')₂ 단편 염소 항-인간 IgG로 피복되었다. 그 다음 플레이트를 차단 완충액 (PBS pH 7.4, 0.5% BSA, 및 15 ppm PROCLIN™)과 함께 항온처리되기 전 3시간 시점에 이 플레이트를 세척하였다. 3회 세척 후, WT G6.31, G6.31 AARR, 또는 G6.31 AAEE가 투여된 NZW 토끼로부터 수거된 수용액 및 유리체 시료는 약한 교반하에 실온에서 2시간 동안 플레이트에서 배양되었다. 상기 코팅 항체에 결합된 G6.31 분자는 그 다음 실온에서 1시간 동안 F(ab')₂ 퍼옥시다제 콘주게이트된 염소 항-인간 IgG로 탐지되었다. 3회 세척 후, TMBE-1000 기질 용액은 30분 동안 플레이트에 추가하였고, 반응은 1M H₃PO₄를 이용하여 중단시켰다. 신호는 450/620 nm에서 기록되었다.

[0636] G6.31 분자의 농도는 표준 곡선을 이용하여 결정되었다.

[0637] 실시예 12: VEGF-유도된 HUVEC 이동 분석

[0638] VEGF-유도된 HUVEC 이동을 억제하는 능력에 대하여 G6.31 변이체들을 테스트하였다. 표 15에 나타난 변이체들의 HUVEC 이동 분석은 Falcon 24-다중웰 삽입 시스템(BD Biosciences cat. 351184)을 이용하여 실행되었다. 삽입물은 하룻밤 동안 8 mg/ml 마우스 라미닌(laminin) (LifeTechnologies 23017-015)으로 사전-피복되었다. HUVECs를 하룻밤 동안 차단하였고, 수확하고, 분석 배지(EBM-2, 0.1% BSA)에 재현탁시켰다. 16 h 동안 다양한 투여량 수준의 차단 항체 존재하에 또는 부재하에 이동을 자극시키기 위하여, 세포 (5x10⁴)를 상부 챔버에 추가하였고, 20 ng/mL의 VEGF를 하부 챔버에 추가하였다. 고정 후, 윗면으로부터 긁어낸 후, 아래 면의 세포를 메탄올로 고정시키고 SYTOX® 그린 (LifeTechnologies S7020)로 염색하였다. 역상 형광 현미경을 사용하여 이미지를 획득하고, 세포 수는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0639] 도 13은 Fab 농도를 변화시키면서, 부모계 G6.31과 비교하였을 때, G6.31 LC-N94A의 이동 억제를 보여준다. 도 13에서 볼 수 있듯이, 단일 LC-N94A 돌연변이는 WT G6.31 부모계와 비교하여, VEGF-유도된 HUVEC 이동 분석에서 효과가 약 5 배로 현저히 적었다. 표 15에 나타난 바와 같이, 이중 돌연변이체인 LC-N94A.LC-F83A도 WT G6.31 부모계와 비교하여, 이 분석에서 효능이 약 5 배 약했다. 4중 돌연변이, LC-N94A.LC-F83A.HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)가 복원되었고, 역가는 약간 개선되었다 (표 15). 놀라운 것은, 4중 돌연변이, N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)는 WT G6.31 부모계와 비교하여 약 2배의 유의적으로 개선된 역가를 보유했다 (표 15).

표 15. HUVEC 이동 분석에서 IC50에 의해 측정된 G6.31 변이체들의 세포 역가

Fab	G6.31에 비교하여 IC50
G6.31	1
LC-N94A	5.2
LC-N94A.LC-F83A (AA)	5.1
LC-N94A.LC-F83A. HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	0.9
N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)	0.5
라니비주마브	0.9

[0640]

[0641] 실시예 13: G6.31 AARR 및 기타 항체에 히알루론산 (HA) 콘주게이션

[0642] 병리학적 혈관신생 (예컨데, AMD (예컨데, 습성 AMD), DME, DR, 또는 RVO)과 관련된 안구 장애 치료를 위한 현재 방법은 전형적으로 VEGF 항진제 (예컨데, 상기 항-VEGF Fab 라니비주마브)의 유리체내 주사와 관련된이다. 항-VEGF Fabs의 작용 부위는 눈의 후면 망막에 있기 때문에, 그리고 Fabs는 눈에서 상대적으로 짧은 잔류 시간을 갖기 때문에, 항-VEGF Fab로 인한 최대 환자 이익은 전형적으로 유리체강 내 주사에 의한 비교적 빈번한 투약 (예 : Q4W)에 의해 얻어진다. 안구 장애를 위하여 항-VEGF 항체 또는 항체 단편 (예컨데, Fabs)의 장기-활성 운반은 투여 빈도를 감소시키는데 최소한 부분적으로 바람직할 수 있고, 이로 인하여 환자의 편의성 및 적응성이 개선된다. 이 실시예에서, 선형의, 가교안된 히알루론산 (HA)을 G6.31 변이체 G6.31 AARR에 콘주게이션시키는 효과가 평가되었다. 콘주게이트의 분자적 성질, 약동학 매개변수 (예컨데, 유리체 반감기 및 제거), 열

역학 안정성, 및 VEGF 억제 역가들이 분석되었다.

[0643] 이 분석의 일부분으로 모델 토끼 Fab (rabFab; Shatz et al. *Mol. Pharmaceutics* 2016; PubMed identifier (PMID) 27244474)가 이용되었다. 단백질 치료제의 전달 기술 개발은 일반적으로 생체내 유용성을 입증하기 위해 관련 동물 모델에서 시험하는 것을 포함한다. 토끼 모델은 안구 약동학의 초기 연구에서 일반적으로 사용된다. 안타깝게도, 대부분의 인간 및 인간화 항체는 토끼에서 면역 원성을 가지므로, 장시간 전달 전달 기술을 사용하여 주요 약동학 매개 변수 예측에는 배제된다. 이 문제를 해결하기 위해, 토끼 모델에서 전달 기술을 평가하는 μ 유용한 중-일치하는 토끼 Fab ("rabFab") 인 대리 화합물이 개발되었다. 본원에 기재된 rabFab은 인간 포스포 c-Met에 결합하는 토끼 단일클론 항체로부터 유래된 것이다. 토끼 단일클론 항체를 포함하는 토끼 항체를 제조하는 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다. 예를 들면, U.S. 특허 번호 5,675,063 및/또는 7,429,487 참고. 인간 포스포 c-Met에 결합하는 예시적인 토끼 단일클론 항체는 Abcam (Cambridge, MA, USA)로부터 제품 번호 ab68141로 구입가능하다.

[0644] 본 실험에서 G6.31 AARR 또는 rabFab Fab-C 분자는 40 kDa (HA40K-), 100 kDa (HA100K-), 200 kDa (HA200K-), 및 600 kDa (HA600K-)을 비롯하여 다양한 중량-평균 몰중량 (Mw)의 선형, 가교안된 HA에 콘주게이트되었다. Fab-C 분자는 첫번째 힌지 시스테인이 절두된 서열로 발현되어, 발현시 바로 자유 시스테인을 갖는 Fab를 야기하는 Fab 분자다. 전장 단일클론 항체의 절단에 의해 생성된 자유 시스테인을 갖는 Fab 분자인 Fab '분자도 또한 사용될 수 있다. 본 실시예에서 기술된 HA 콘주게이트 경우, Fab-C 분자는 HA의 글루쿠로닉 사카라이드 단위 상의 카복실산 그룹에 공유 결합되었다. 합성의 첫 단계에서, HA상의 이들 산 그룹 중 일정 비율이 말레이미드로 전환되었다 (전형적으로 산 그룹의 2-10%가 전환되었다). 그 다음 Fab-C 분자는 Fab-C 분자 상에 자유 시스테인을 통하여 말레이미드 그룹에 콘주게이트되었다. 그러나, 결합 화학에 대한 약간의 변형은 Fab 분자 또는 다른 항체 포맷을 HA에 콘주게이트하는데 사용될 수 있다.

[0645] 크기 배제 크로마토그래피 (SEC), 굴절 지수 (RI) 다-각도 광산란 (MALS), 및 준-탄성 광 산란(QELS) (또한 SEC-RI-MALS-QELS으로도 지칭됨)의 조합을 이용하여 HA Mw, 콘주게이트 Mw, Fab 로딩 백분율 (공유적으로-부착된 Fab 분자에 의해 점령된 HA 카르복실산의 백분율로 정의됨), 유체역학적 반경 (Rh), 자유 Fab (용액 안에서 자유롭고, HA에 공유적으로 부착되지 않은 Fab 분자의 백분율로 정의됨), 그리고 선택된 HA-Fab 콘주게이트의 단백질 덩어리 분획(단백질 덩어리/(단백질 덩어리 + HA 덩어리)(표 16)을 평가하였다. 도 14는 HA40K-rabFab, HA200K-rabFab, 및 HA600K-rabFab의 중량-평균 몰 질량 (Mw)을 평가하기 위한 SEC-RI-MALS-QELS의 예시적인 결과를 나타낸다(QELS 데이터는 도 14에 나타내지 않음).

표 16. SEC-RI-MALS-QELS 에 의해 평가된 선택 HA-Fab 콘주게이트의 성질

시료	HA Mw (kDa)	콘주게이트 Mw (kDa)	Fab 로딩 %	Rh (nm)	자유 Fab	단백질 덩어리 분획
HA40K-rabFab	45.3	636.2	7.4	~ 10*	0.45 %	0.929
HA100K-rabFab**	110.0	679.3	5.9	17.3	3.71 %	0.838
HA200K-rabFab	204.3	1805.3	8.6	~ 30*	0.55 %	0.887
HA600K-rabFab	619.8	2569.2	3.2	~ 50*	1.87 %	0.759
HA200K-G6.31 AARR	204.3	2478.0	11.0	27.7	0.63 %	0.918

* 예상치 Rh 값

** 토끼 PK 연구에서 조사된 시료 (예컨대, 도 16 및 이하 참고)

[0646] AMD와 같은 안구 장애 치료를 위해, 예를 들어, 전신 항-VEGF 노출을 최소화하기 위해, 안구 반감기는 길지만, 전신 반감기는 짧은 것이 바람직할 수 있다. 전신 순환계로부터 HA 제거는 히알루노니다제-보유 간 세포에 의해 중재되었다. 이전 보고서는 천연 HA에 대한 히알루노니다제 활성이 글루쿠론산 카르복실산 그룹을 통한 인지를 포함함을 나타낸다. 이들 카복실산기가 Fab-C 분자에 결합하도록 변형되었기 때문에, 접합된 HA가 효소적으로 히알루노니다제로 분해되는 능력을 평가하였다. HA-콘주게이트된 rabFab는 HYAL2-배양된 HA 및 HA100K-rabFab의 SEC-MALS 분석에 의해 평가되었을 때, 히알루노니다제-2 (HYAL2)에 의한 절단에 대하여 효소적 민감성을 유지하였다(도 15).

[0648] 유리체내 투여 후 토끼 유리체 안에서 안구 약동학 매개변수 (예컨데, 반감기 및 제거)에 있어서 Fab 단편의 HA 콘쥬게이션 효과가 결정되었다. rabFab를 HA100K에 콘쥬게이션 (HA100K-I¹²⁵-rabFab)시키면 콘쥬게이트안된 rabFab 또는 라니비주마브와 비교하였을 때, 유리체 반감기의 상당한 증가 및 제거의 상당한 감소가 결과되었다 (도 16 및 표 17). HA100K-콘쥬게이트된 rabFab는 역사적 데이터로부터 콘쥬게이트안된 rabFab와 비교하였을 때, 유리체 반감기 ($t_{1/2}$)는 대략 4-배 증가되었다(차례로 11.9 일 vs 3.2 일) (도 16 및 표 17). 표 17은 또한 rabFab 및 HA100K-I¹²⁵-rabFab의 Rh를 나타낸다. 이들 데이터로부터 HA 콘쥬게이션은 Fabs의 유체역학적 반경을 증가시키고, 유리체 제거를 지연시키고, 유리체 반감기를 증가시켰음을 알 수 있다.

표 17. 유리체내 투여 후 토끼 유리체로부터 rabFab 및 HA100K-¹²⁵I-rabFab 의 제거

테스트 물질	Rh (nm)	$t_{1/2}$ (일)	CL (mL/일)
HA100K-I ¹²⁵ -rabFab	17.3	11.9	0.076
rabFab (역사적)	2.5	3.2	0.32

[0649]

[0650] rabFab, 20kDa 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) (rabFab-20kDa PEG)에 콘쥬게이션된 rabFab, 및 40 kDa PEG (rabFab-40kDa PEG) (Shatz et al. *supra*)콘쥬게이션된 rabFab에 대한 역사적 데이터와 HA100K-rabFab에 대하여 상기에 서 기술된 데이터를 함께 결부하여, 유체역학적 크기 (예컨데, 유체역학적 반경의 측면)와 유리체 잔류 시간 (예컨데, 반감기 측면) 사이에 선형 관계는 HA100K 또는 HA200K에 콘쥬게이트된 G6.31와 HA300K에 콘쥬게이트된 G6.31의 유리체 반감기 예측을 가능하게 하였다 (도 17). HA100K-G6.31은 약 11 일의 예측된 유리체 반감기를 갖는 반면, HA200K-G6.31은 약 17 일의 더 높은 유리체 반감기를 갖는다(도 17). HA300K-G6.31은 대략 19일의 예측된 유리체 반감기를 갖는다(도 17). 이러한 결과는 본원에 기술된 G6.31 AARR 또는 다른 G6.31 변이체를 선형의, 가교안된 HA에 접합시킴으로써 안구 내 잔류 시간 (예 : 반감기)이 증가하고, 유리체 강내 주사 후 제거가 감소된다는 추가적인 증거를 제공한다.

[0651] Fab의 열역학적 안정성에 대한 HA 콘쥬게이션 효과 또한 평가되었다(표 18). 3 개의 상이한 물 질량의 HA에 대한 rabFab의 공유 부착은 부모계 Fab와 비교하여, 콘쥬게이션에 대한 유사한 T_m 개시 및 피크 T_m에 의해 입증된 바와 같이 Fab의 열역학적 안정성을 변경시키지 않았다(표 18).

표 18. HA 에 Fab 의 콘쥬게이션은 Fab 열역학 안정성을 크게 변화시키지 않는다

시료	T _m 개시, °C	T _m , °C
rabFab	66.8	85.6
HA39K-rabFab	69.5	84.1
HA100K-rabFab	69.8	84.0
HA300K-rabFab	69.7	83.8

[0652]

[0653] 마지막으로, G6.31 AARR의 VEGF 억제 효능에 대한 HA 콘쥬게이션의 효과를 평가하였다. 놀랍게도, 선형, 비가교 HA에 G6.31 AARR의 콘쥬게이션은 VEGF 억제에 대한 pKDR 분석에서 비교할 때, 부모계 Fab보다 현저하게 개선된 효능을 나타냈다(표 19). 표 19의 qAC50 값은 활성 분석 포맷에서 50 % 반응을 유도하는데 필요한 농도를 나타낸다. qAC50 값은 IC50 값과 동일하다. 상기 HA-콘쥬게이트된 G6.31 AARR은 콘쥬게이트안된 부모계 Fab에 비교하여 약 7 배의 역가 증가를 보였다 (표 19). 따라서, 본원에 기재된 G6.31 AARR 및 다른 G6.31 변이체의 콘쥬게이션은 VEGF 억제 효능 뿐만 아니라 유리체 약동학 매개변수 (반감기 및 제거 포함) 개선에 있어서 유용할 수 있다.

표 19. G6.31 AARR 를 HA 에 콘쥬게이션으로 VEGF 억제 역가가 개선된다.

테스트 물질	qAC50, nM
G6.31.AARR	0.9325
HA100K-G6.31 AARR	0.1346

[0654]

[0655] 상기 실험 데이터에 기초하여, HA-콘쥬게이트된 G6.31 AARR 분자는 AMD (예를 들어, 습식 AMD), DME, DR 및

RVO를 비롯한 안구 질환 치료에 대한 특성을 상당히 개선시켰다. 이러한 개선된 특성은 증가된 역가 및 향상된 유리체 잔류 시간으로 인하여, 투약 빈도가 줄어들게 되는 것을 포함한다.

[0656] 재료 및 방법

[0657] A. 말레이미드-기능화된 HA (HA-mal)의 합성

[0658] Lifecore Biomedical로부터 다양한 몰 질량의 선형, 비가교된 HA 중합체를 얻었다. HA는 결합 시약 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸몰포리니늄 클로라이드 (DMTMM) 및 링커 N-(2-아미노에틸)말레이미드 트리플루오로아세트이트 염 (AEM)을 이용한 수용액 반응으로 말레이미드 그룹으로 변형되었다. HA를 2.5 mg/mL에서 100 mM 2-(N-몰폴리노) 에탄 술폰산 pH 5.5에 용해시키고, 교반하에서 이 용액에 1.5 몰 과량의 DMTMM 및 3.75 몰 과량의 AEM을 첨가하였다 (몰 과량은 HA 내의 카르복실 산의 몰에 기초하여 산출됨). 용액을 2 시간 동안 70°C로 가열하였다.

[0659] 과량의 AEM 및 DMTMM을 탈염 절차를 통해 반응으로부터 제거 하였다. HiPrep™ 26/10 탈염 칼럼을 ÄKTA™ 정제 시스템에 장착하고, 10 mM 아세트산 나트륨 pH 4.0 150 mM NaCl로 평형화시켰다. 반응물을 컬럼에 깔끔하게 주입하고, HA-mal 피크를 302nm의 흡광도에 따라 수집하고, 원심 한외 여과 장치를 사용하여 5mg/mL 이상으로 농축시켰다. HA-mal 스톱 용액 안에 말레이미드 농도는 UV-가시 분광광도계를 이용하여 302nm에서 측정되었으며, HA 설탕 말레이미드 그룹의 몰 비율은 다-각도 광산란 (SEC-MALS)과 크기 배제 크로마토그래피를 통하여 평가되었다.

[0660] B. Fab-C를 HA-mal에 콘주게이션

[0661] Fab-C의 용액을 1M 인산염 pH 6.5를 사용하여 pH를 6.5로 조정하여, 최종 인산염 농도를 50 mM로 조정하였다. 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA)을 최종 농도 2.5 mM이 되도록 용액에 첨가하였다. Fab-C 용액을 교반하고, 반응 완충액(10 mM 포스페이트 150 mM NaCl 2.5 mM EDTA (pH 6.5))에 희석된 HA-mal을 첨가하였다. 최종 반응에서 말레이미드 1 몰당 1.2 몰의 Fab-C로 화학량을 설정하고, 최종 단백질 농도가 1 mg/mL이 되도록 부피를 설정 하였다. 콘주게이션 반응은 실온에서 교반 하에 실행되었다. 3 시간 시점에, 멸균에탄올을 말레이미드 1 몰당 2 몰로 첨가하여, 반응안된 말레이미드기를 캡핑하였다. 멸균에탄올의 첨가 30 분 후에, 반응물을 정제를 위해 10 mM 인산염 (pH 6.5)을 이용하여 50 mM 미만의 NaCl로 희석시켰다.

[0662] 콘주게이터로부터 유리 Fab-C 및 Fab 이합체를 분리하기 위하여, 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 정제 하였다. HiTrap™ Q FF 5 mL 칼럼을 ÄKTA™ 정제 시스템에 장착하고 10 mM HisHCl (pH 5.5)로 평형화시켰다. 희석된 반응물을 컬럼 위로 흘려 HA-Fab 콘주게이트를 포획하고 동시에 자유 Fab-C 및 이합체를 용리시켰다. 10 mM HisHCl (pH 5.5) 100 mM NaCl로 세척한 후, 10 mM HisHCl (pH 5.5) 500 mM NaCl로 단계적 구배에 의해 상기 콘주게이트가 용리되었다. 용리된 콘주게이트를 모아서 10 mM HisHCl (pH 5.5) 150 mM NaCl의 최종 조성물로 희석시켰다. 제제화된 콘주게이트를 원심 한외 여과법으로 농축시켰다.

[0663] C. HA-Fab 콘주게이트의 분석

[0664] Wyatt Optilab T-rEX RI 검출기와 Wyatt HELEOS-II MALS 검출기를 직렬로 연결된 Agilent 1200 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 시스템에서 굴절률 (RI), 다-각도 광산란 (MALS), 준-탄성 광 산란 (QELS)(SEC-RI-MALS-QELS라고 지칭되기도 함)이 조합된 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)와 잔류 유리 Fab 함량, 총 콘주게이트 몰 질량 및 단백질 덩이 분해를 평가하였다. 실행 버퍼로 PBS (pH 7.4)를 이용한 분석에 Tosoh G6000 PWx1 컬럼을 사용하였다. BSA 대조군을 사용하여 MALS 검출기를 정상화하고, 검출기간의 확장된 대역을 교정했다. Fab 및 HA-Fab 콘주게이트에 상응하는 UV A₂₈₀ 피크를 통합시킴으로써, 잔류 Fab 함량을 측정하였다. 콘주게이트 분자량은 콘주게이트 피크의 중량-평균 분자량 (Mw) (중량 평균 몰 질량이라고도 함)으로 취하였다. 단백질 덩이 분해는 차등 RI (dRI) 및 UV A₂₈₀ 신호를 이용한 단백질 콘주게이트 분석을 사용하여 계산되었다.

[0665] D. HA-rabFab 콘주게이트의 동적 스캐닝 열량계 (DSC) 연구

[0666] rabFab, 39 kDa의 중량-평균 몰 질량 (Mw)을 갖는 HA에 콘주게이트된 rabFab(HA39K-rabFab), 100 kDa의 Mw을 갖는 HA에 콘주게이트된 rabFab (HA100K-rabFab), 그리고 300 kDa의 Mw을 갖는 HA에 콘주게이트된 rabFab (HA300K-rabFab) 용액은 10 mM HisHCl (pH 5.5) 150 mM NaCl에서 0.5 mg/mL (단백질 기반에서 제시된 농도) 농도로 준비되었다. DSC 연구는 VP-DSC 마이크로열량계 (MicroCal, Inc.)에서 1°C/분의 램프 속도로 15에서 105°C까지 수행되었다. 각 시료의 스캔으로부터 완충액 만으로된 기준 스캔을 차감하였다. 용융 온도 (T_m) 및

Tm 개시는 첨부된 ORIGIN 소프트웨어를 사용하여 평가되었다.

[0667]

E. 포스포틸화된 KDR (pKDR) 수용체 활성화 분석

[0668]

KDR를 발현시키도록 조작된 CHO 세포 (KDR-CHO 세포; Binetruy-Tournaire et al. *EMBO J.* 19(7):1525-1533, 2000 및 Benzinger et al. *BBA Biomembranes* 1466:71-78, 2000 참고, 이들은 전문이 본원의 참고자료에 편입됨)는 편평-바닥의 96-웰 조직 배양 플레이트에서 80 μ l의 세포 플레이트링 배지(50:50 고 글루코스 DMEM/Ham's F-12, 0.2% BSA, 0.25% 디아필터된(diafiltered) 태아 소 혈청 (FBS), 25 mM HEPES, 및 2 mM L-글루타맥스)에서 웰당 1×10^4 세포로 도말되었다. 상기 세포는 하룻밤 동안 37°C에서 배양되었다. 나란하게, NUNC® MAXISORB® 384-웰 ELISA 플레이트 (Thermo 카탈로그 번호 439454)는 PBS에서 희석된 25 μ l의 항-gD 항체 (Genentech)로 피복되었고, 4°C에서 하룻밤 동안 배양되었다.

[0669]

다음 날 세포 자극 2 시간 전, 조직 배양 플레이트를 가볍게 치면서 탬핑하고, 40 μ l의 혈청-없는 세포 자극 배지(50:50 고 글루코스 DMEM/Ham's F-12, 0.5% BSA, 및 25 mM HEPES)로 교환한 후, 2 h 동안 37°C에서 배양되었다. 세포 자극 배지에서 G6.31 AARR 또는 HA100K-G6.31 AARR의 3-배 연속 희석물이 만들어졌다. 인간 VEGF₁₆₅ (100 ng/ml)의 희석도 세포 자극 배지에서 준비하였다. 심도 웰 블럭 플레이트를 이용하여, G6.31 AARR 또는 HA100K-G6.31 AARR의 연속 희석액으로부터의 시료를 희석된 VEGF 샘플과 혼합하고, 37°C에서 1 시간 동안 배양하였다. 80 μ l의 총 배양 용적을 위해 40 μ l의 생성된 혼합물을 세포의 각 웰에 첨가하였다. VEGF만을 가졌거나 또는 VEGF가 첨가되지 않은 웰을 대조군으로 준비하였다. 상기 세포는 37°C에서 15분간 배양되었다. 상기 배양 배지는 가볍게 치면서 탬핑하고, 25 μ l의 얼음-냉각된 세포 용해 완충액 (150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 0.5% TRITON™ X-100, 1x HALT® 프로테아제 및 포스파타제 억제제 각테일 (Thermo 카탈로그 번호 78444, 100x 스톱으로부터 사용하기 직전에 추가됨), 5 mM EDTA)을 추가하였다. 세포를 ELISA로 진행하기 전, 얼음 위에서 15 분 동안 용해시켰다.

[0670]

항-gD 피복된 ELISA 플레이트의 웰은 세척 완충액 (PBS+ 0.05% TWEEN® 20, pH 7.4)으로 3회 세척되었다. 웰은 실온에서 1 시간 동안 80 μ l의 차단 완충액 (PBS + 0.5% BSA (R&D Systems, 카탈로그 번호 #DY995))으로 차단되었다. 그 다음 웰은 세척 완충액으로 3회 세척되었다. 그 다음, 웰당 25 μ l의 세포 용해물을 각 웰에 추가하고, 2 h 동안 실온에서 배양한 후, 세척 완충액으로 4회 웰을 세척하였다. 25 μ l의 1:2000 희석된 항-포스포티로신 (Clone 4G10) 비오틴-콘주게이트된 항체 (0.5 μ g/ml) (Millipore 카탈로그 번호 16-103)를 분석 완충액 (PBS + 0.5% BSA; 차단 완충액과 동일)에서 각각의 웰에 추가하고, 생성된 혼합물은 2 h 동안 실온에서 배양되고, 세척 완충액으로 3회 세척되었다. 25 μ l의 1:10,000 희석된 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)-스트렙타비딘 (GE Health Care UK; 카탈로그 번호 RPN440IV)을 분석 완충액에서 각각의 웰에 추가하고, 생성된 혼합물은 30 분 동안 실온에서 배양되고, 세척 완충액으로 3회 세척되었다. 25 μ l의 TMB를 각 웰에 첨가하고, 반응을 중지시키기 위해 25의 H₂SO₄의 첨가 전, 20 분 동안 발색시켰다. 마지막으로, 웰의 광학 밀도를 450/620 nm에서 플레이트 판독기로 판독하였다.

[0671]

F. HA100K-rabFab의 히알루로니다제 절단

[0672]

최대 10 % (HA 상의 이용가능한 산 그룹에 기초하여 나타낸 퍼센트)까지의 Fab 콘주게이션이 HA-Fab 콘주게이트의 히알루로니다제 민감성을 변경시키지 않았음을 확인하기 위해, Mw 100 kDa (HA100K)의 HA와 HA100K에 결합, 결합 콘주게이트된 rabFab(HA100K-rabFab)는 10 mM 나트륨 아세테이트, pH 4.5에서 4 μ g/mL 히알루로니다제-2와 함께 200 μ g/mL HA에서 배양되었다(HA100K-rabFab 농도는 상기 HA 기본에 대하여 200 μ g/mL 농도를 얻기 위하여 조정되었다). 시료는 37°C에서 배양된 후, 위에서 설명한 바와 같이 즉시 Mw 분석을 위해 30 분 간격으로 SEC-RI-MALS에 주입했다.

[0673]

G. 토끼 유리체로부터 HA-Fab 제거 속도를 평가하기 위한 PK 연구

[0674]

토끼 유리체에서의 HA100K-rabFab의 안구 약동학 프로파일은 하기 기술된 바와 같이 rabFab에 대한 과거 데이터와 비교하였다.

[0675]

HA100K-rabFab는 투여하기 하루 전, ¹²⁵I로 라벨링되었다. 투약 제제를 제조하기 위해, Millipore AMICON® 30K 원심 분리 필터 튜브를 사용하여 적절한 양의 HA100K-rabFab을 Tris 요오드화 완충액 (25mM Tris HCl, 0.4M NaCl, pH 7.5)으로 교환했다. Pierce 사전-코팅된 요오드화 튜브를 Tris 요오드화 완충액으로 적시고, 옮겨 부었다. 적당한 용적의 Tris 요오드화 완충액을 관의 바닥에 첨가한 후, 적절한 양의 Na¹²⁵I (Perkin

Elmer)를 첨가하였다. 요오드는 30 초마다 소용돌이와 함께(swirling) 15 분 동안 활성화시켰다. 적절한 용적의 시험 시료, Tris 요오드화 완충액 및 활성화된 요오드를 NUNC® 마이크로원심분리 판에 넣고 약 1 ~ 5 분간 부드럽게 흔들어 혼합하였다. 요오드화 반응은 소거 완충액 (티로신, 2 mg/mL Tris 완충액)을 추가하여 종료시키고, 상기 제제는 혼합하고, 5 분 동안 배양되는데, 1분과 4 분에 두드린다. 단백질 정제의 경우, AMICON® 30K 원심분리 필터 튜브는 PBS와 함께 15분간 6,000 RPM에서 원심분리에 의해 준비되었다. NUNC® 튜브 내용물을 AMICON® 30K 원심분리 필터 튜브에 넣고, PBS로 최대 4 회 세척하여 약 400 µL의 방사능라벨된 제품을 얻었다. 각 시험 물질의 방사능, 단백질 농도 및 방사 화학 순도를 측정 하였다. 피펫을 사용하여 AMICON® 튜브의 내용물을 NUNC® 튜브로 옮기고, 제제는 약 10 mg/mL의 최종 농도로 만들었다.

[0676] HA100K-rabFab-¹²⁵I는 뉴질랜드 흰 토끼의 눈(n = 24개 눈)의 유리체강내 (500 µg/눈)에 주사하였다. 유리체강내 주사의 경우, 토끼를 진정시키고/마취하여 이소플루란과 함께 효과를 발휘하고 측두위에 위치시켰다. 트로피카미드 점안액 (2 방울)과 2.5 % 페닐에피린 HCl (1 방울)을 양쪽 눈에 제공했다. 국소 프로프라카인은 준비 및 투약 직전에 각 눈에 제공되었다. 결막 포진은 베타딘 용액 1:50 희석액으로 씻어내고, 눈꺼풀 가장자리는 희석되지 않은 5 % 베타딘 용액으로 닦았다. 상위일시적(superotemporal) 안구 결막은 희석안된 베타딘 용액으로 닦았다. Jameson 캘리퍼스를 사용하여 상위일시적(superotemporal) 안구 결막의 윤부 후방 1.5 ~ 2.0 mm 지점을 표시했다. 결막 검자를 사용하여 왼손으로 눈 위치를 고정시켰고, 한편 오른손으로 주입 주사기에 부착된 바늘을 표시된 부위에 공막을 통해 삽입하고 유리체 체액으로 5 mm 전진시켰다. 주사 바늘은 안구의 후방 축과 마주 보도록 위치시키고, 주사기 플런저를 천천히 눌러 내용물을 중간 유리질로 전달했다. 주사기에 부착된 바늘을 빼고, 삽입 부위에 근사한 상공막 조직은 결막 집계를 30 초 동안 잡아서 주입된 물질의 역류를 감소시켰다. 투여 부위는 잔류 방사능을 위하여 면봉으로 닦았다. 두번째 안구에 대해서도 동일한 방법으로 제제 및 투여를 반복 하였다. 적절한 시험 제품은 과정 동안 젖은 얼음 위에서 유지되었고, 한 눈에 50 µL 씩의 투여량으로 한 번 투여되었다. 렌즈 또는 망막 접촉이 일어나지 않도록 주입 후 간접 검안경 검사가 시행되었다. 각 주사 부위의 선량(dose wipe)을 닦아내고, 잔류 방사능을 측정하기 위해 액체 섬광 계수(LSC)에 의한 분석에 앞서 실온에서 유지시켰다. 회수된 방사능활성은 투여된 양으로부터 차감하여, 실제 방사능 투여량을 제시하였다.

[0677] 투여-전, 그리고 투여-후 6시간 그리고 투여-후 1, 2, 4, 7, 11, 14, 21 및 28 일째에, 실온에서 동물의 경정맥으로부터 혈액 시료를 항-응고 제를 함유하지 않은 튜브에 수집하였다. 전체 혈액의 분량 (약 0.1 mL)을 수집하고, 방사성 분석을 위해 처리하였다. 남은 혈액을 주위 온도에서 원심 분리하여 혈청을 얻고 방사성 분석을 위해 가공하였다.

[0678] 시간당 2 마리의 동물을 안락사 용액을 정맥 내 주사하여 안락사시켰고, 청진하였다. 종료 시점은 다음과 같다: 투여-후 6 시간, 그리고 투여-후 2, 7, 14, 21, 및 28 일. 명시된 동물로부터 수용액 체액, 렌즈, 유리체 체액, 망막/맥락막, 그리고 공막을 수거하였다. 눈을 떼어내고, 안구 바깥으로부터 임의의 무관한 조직을 떼어내었다. 수용액 체액을 투베르쿨린 주사 바늘이 달린 주사기를 통해 제거하고, 사전 칭량된 감마 튜브에 수집하였다. 남아있는 눈은 약 30 초 동안 액체 질소에서 동결시켰다. 냉각된 절단 표면에서 각막, 홍채 및 렌즈가 제거되었다. 렌즈를 소량의 PBS로 헹구고, 헹굼액을 감마 튜브에 수집하였다. 렌즈를 건조시키고, 사전 칭량된 감마 튜브에 넣었다. 눈을 필요에 따라 액체 질소로 재-동결시켰다. 공막은 잘라내었고, 유리체 체액으로부터 다시 벗겨냈다. 상기 유리체 체액은 제거되었고, 가용화를 위하여 사전-계량된 용기에 넣었다. 부착된 망막/맥락막이 있는 공막을 PBS로 1ml 헹굼한 후, 이전 헹굼액을 모으고, 조직은 부드럽게 닦아내었다 망막/맥락막을 공막으로부터 제거하고, 미리 계량된 감마 튜브에 넣었다. 적절한 표면과 공구를 축축한 거즈로 닦고, 감마 튜브에 집계하여 계수한다. 모든 조직, 헹굼 물 및 닦은 것을 플라스틱 용기에 수집하고, 방사성 분석을 위해 처리하였다.

[0679] 선택된 동물 (투여 후 2 일, 14 일 및 28 일 시점의 동물을 포함)에서 시간 당 1개의 눈을 유리체 체액의 방사능 크로마토그래피 프로파일링을 위해 처리하였다. 우측 눈을 떼어내고, 안구 바깥으로부터 무관한 조직을 떼어내었다. 수용액 체액을 투베르쿨린 주사 바늘이 달린 주사기를 통해 제거하고, 사전 칭량된 감마 튜브에 위치시켰다. 18-게이지 바늘이 달린 10-ml 주사기를 사용하여 유리체 체액의 최대 양을 수집했다. 내용물을 HPLC-Gamma-RAM™에 의한 분석을 위해 미리 칭량된 용기로 옮겼다. 유리체 체액 시료는 방사능 크로마토그래피 프로파일링을 위해 냉장 보관하거나 또는 젖은 얼음에 보관했다. 나머지 오른쪽 눈 조직은 가용화를 위해 미리 칭량한 용기에 넣고, 방사성 분석을 위해 처리했다.

[0680] 투약 제제, 혈청 및 전혈의 단일 또는 중복 분취량을 잘 혼합하고, 감마 카운터를 통한 방사능의 직접 분석을

위해 샘플링하였다. 안구 조직을 직접 카운트하였고, PBS에서 회석하거나, 또는 3N KOH/메탄올/TRITON™ X-100 용액에 약 50 °C로 설정된 배양 오븐에서 가용화되었고, 감마 카운터를 통해 방사능 분석을 위해 3 중으로 샘플링했다. 수집된 모든 방사성 샘플을 최소 5 분 또는 100,000 카운트에서 2 회 또는 3 회로 샘플링 하였다. 방사능이 200dpm보다 큰 모든 시료 결과 (dpm/시료 g으로 계산)는 평균값의 15 % 안에 있었다.

[0681] 방사능크로마토그래피 프로파일링은 투여 후 2 시간, 14 시간 및 28 시간에 한 동물의 오른쪽 눈의 유리체 체액 시료에서 수행되었다. 시료는 HPLC-Gamma-RAM™에 의해 목적에 맞는 방법에 따라 분석되었다. 피크 면적과 잔류 시간을 비교하여 시간 경과에 따른 테스트 물품의 무결성을 평가했다. 이 시료를 준비하기 위해, PRECELLYS® 24 균질화기를 냉각된 질소 기류로 -10에서 0°C로 사전 냉각시켰다. 지르코니아(Zirconia) 비드를 적절한 튜브에 첨가하였다. 양성 배치 피펫으로, 유리질 체액 시료는 지르코니아 구슬을 포함하는 튜브에 추가되었다. 상기 시료는 미리 냉각시킨 PRECELLYS® 24 균질화기에 넣고 60-초 주기로 6,500 RPM으로 균질화시켰다. 튜브를 분석하기 전, 14,000 RPM에서 10 분간 원심분리하였다.

[0682] PHOENIX® WinNonlin® 버전 6.2.1 (Certara USA, Inc., Princeton, NJ)을 사용하여 약동학 매개변수를 추정했다. 유리체내 투여 경로와 일치하는 비-구획적 접근법을 매개 변수 추정에 사용하였다. 역사적 데이터로부터 rabFab의 반감기 3.2일과 비교하였을 때, 토끼 유리체에서 HA100K-rabFab-¹²⁵I의 반감기는 11.9 일이었다(Shatz et al. *Mol. Pharmaceutics* 2016; PubMed identifier (PMID) 27244474).

[0683] 전술한 발명은 이해를 분명하게 하기 위한 목적으로, 설명 및 실시예를 통하여 일부 상세하게 설명되어 있지만, 설명 및 실시예들은 본 발명의 범위를 제한시키는 것으로 간주되어서는 안된다. 본원에 인용된 모든 특허 및 과학 문헌의 개시는 그 전체가 참고 문헌으로 편입된다.

도면

도면1a

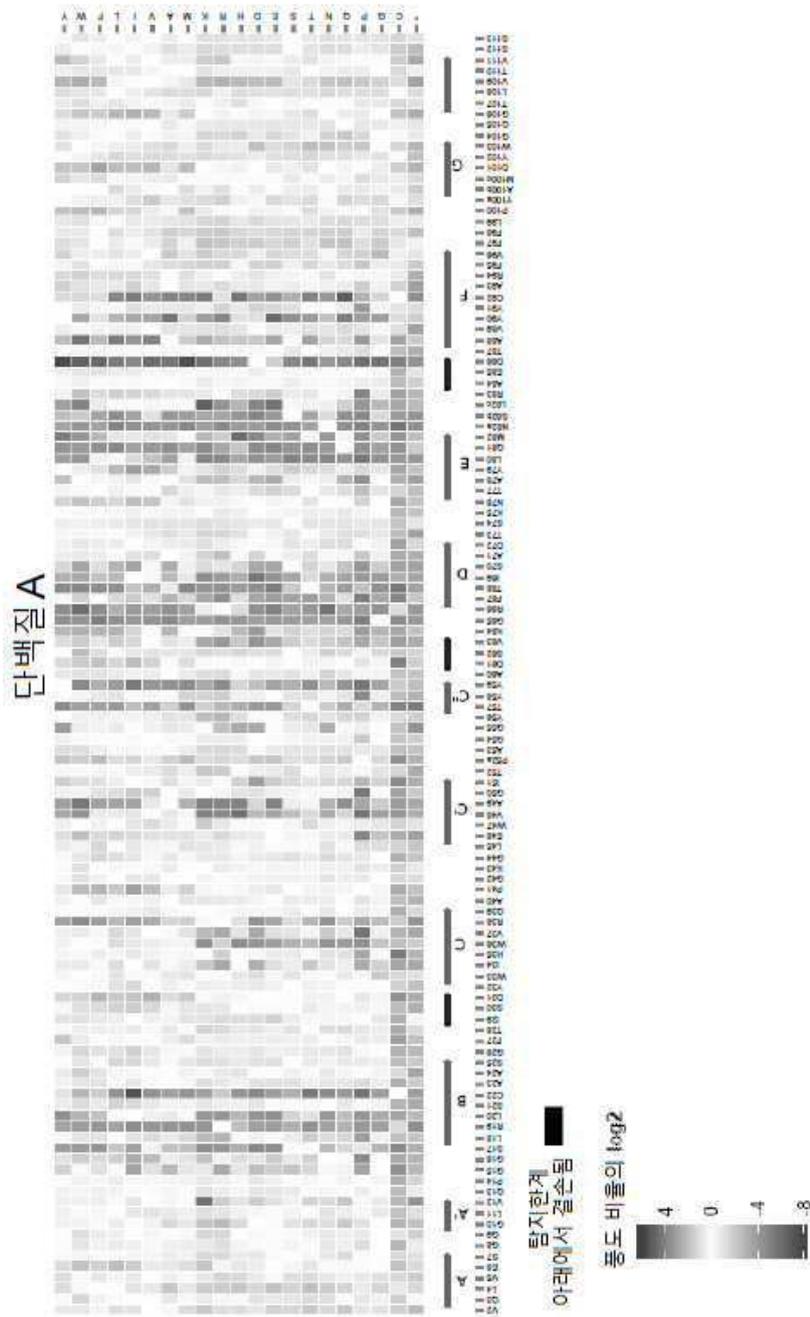
항-gD



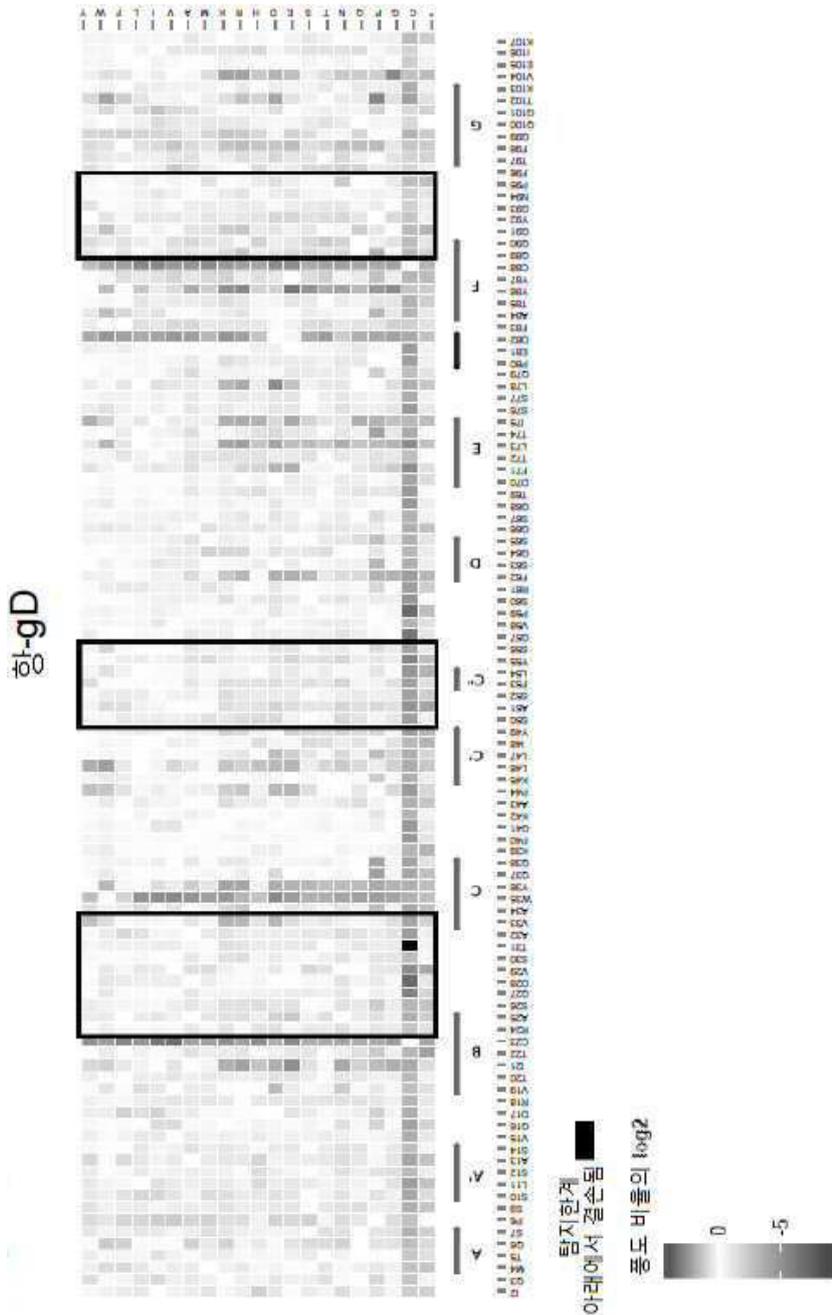
항-gD의 비결정 영역



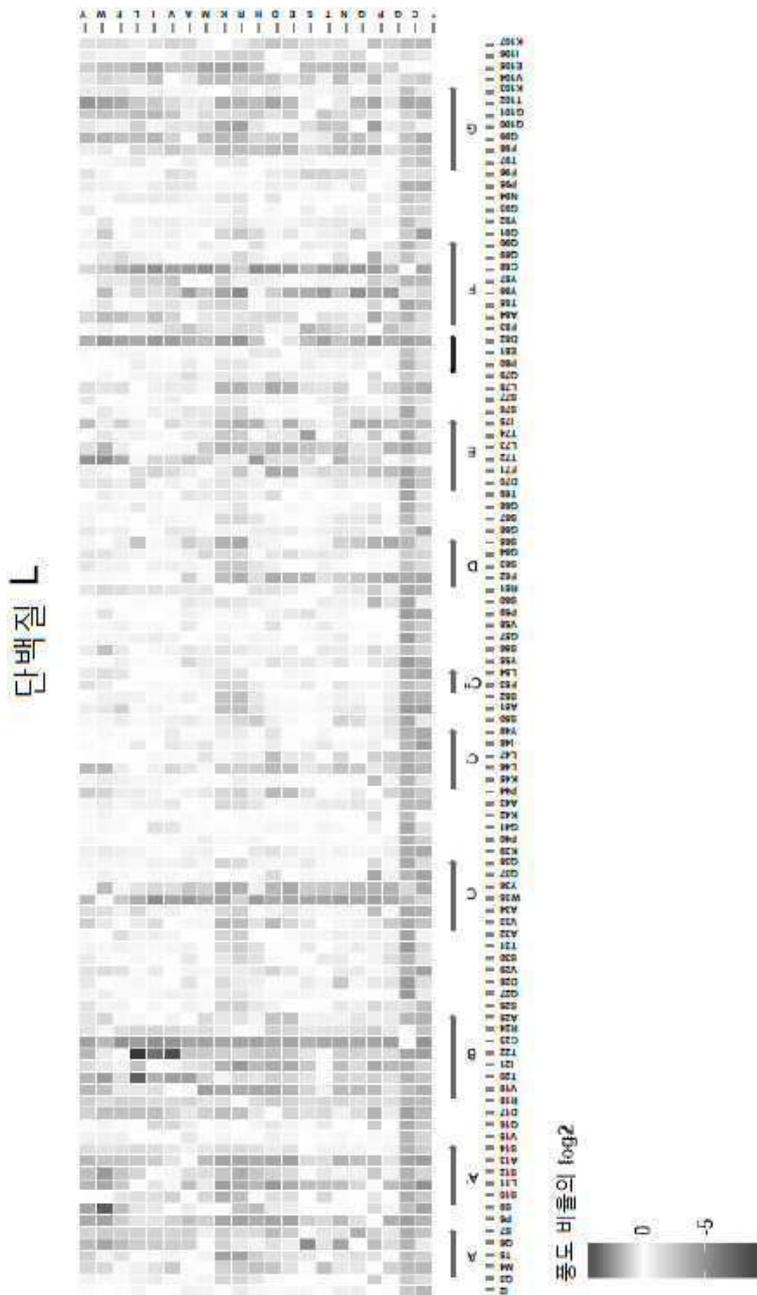
도면1c



도면1d



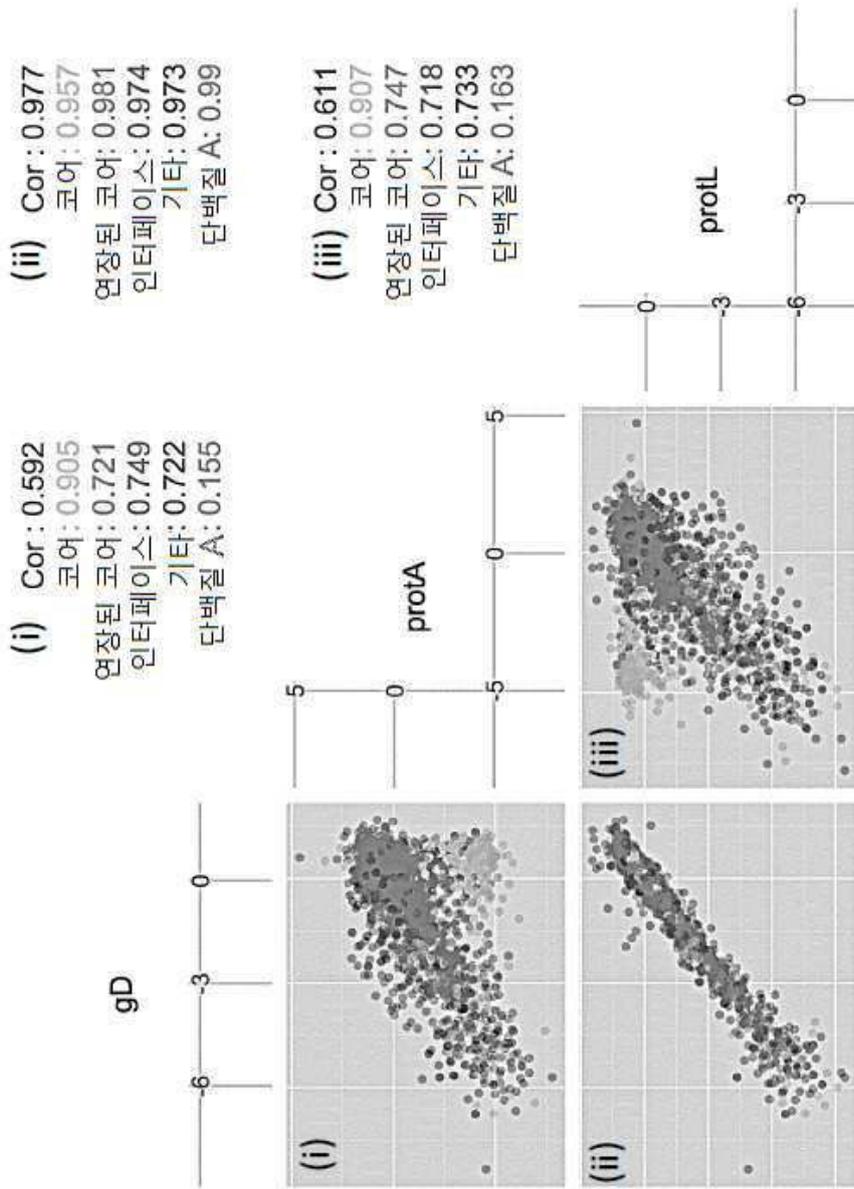
도면1e



도면1f



도면2a

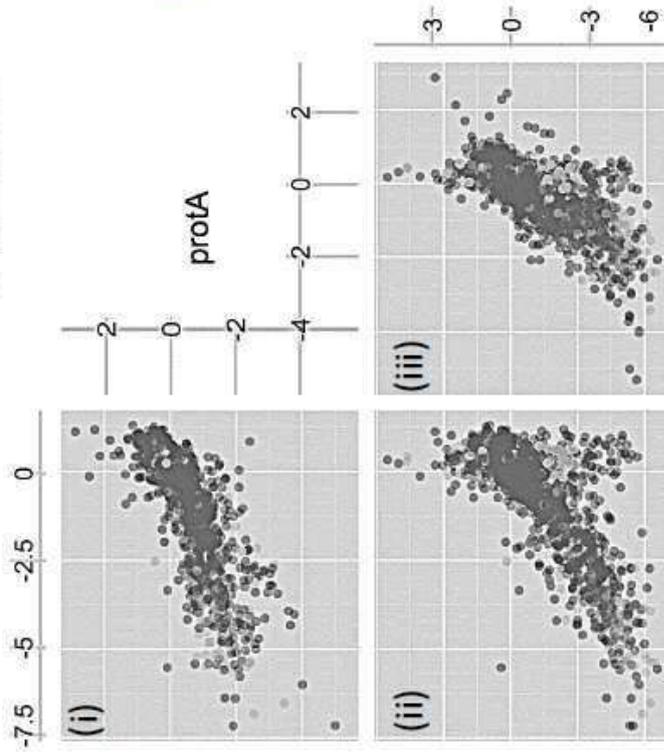


도면2b

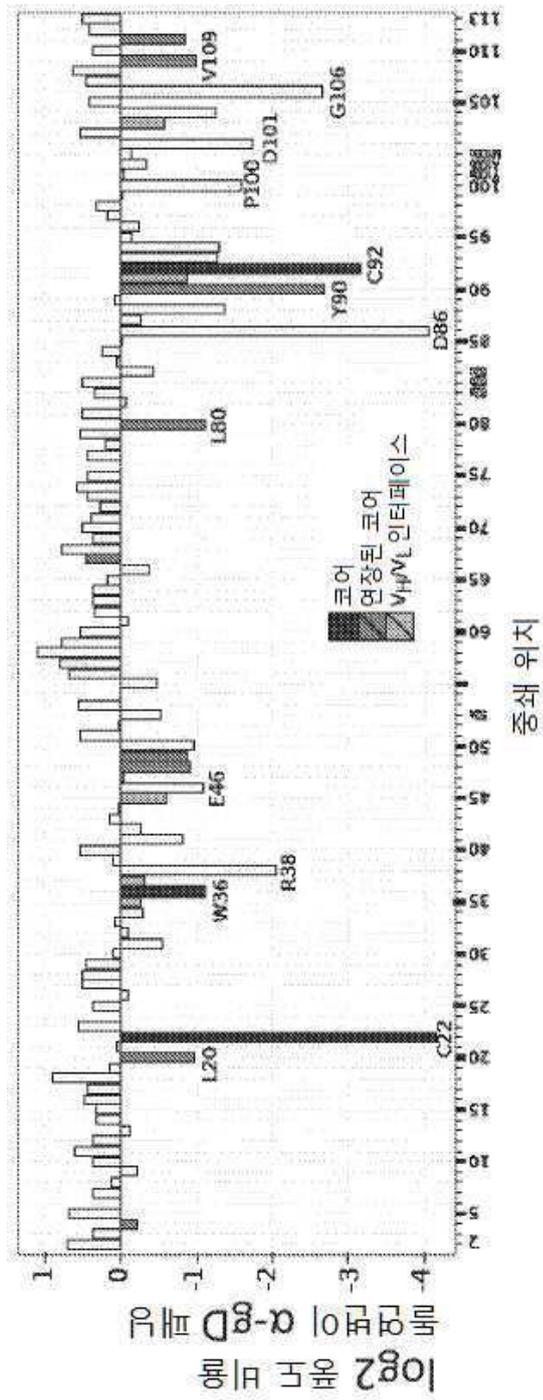
(ii) Cor: 0.783
 코어: 0.803
 연장된 코어: 0.883
 인터페이스: 0.943
 기타: 0.738
 단백질 L 1: 0.54
 단백질 L 2: 0.439

(iii) Cor: 0.738
 코어: 0.622
 연장된 코어: 0.803
 인터페이스: 0.832
 기타: 0.714
 단백질 L 1: 0.592
 단백질 L 2: 0.511

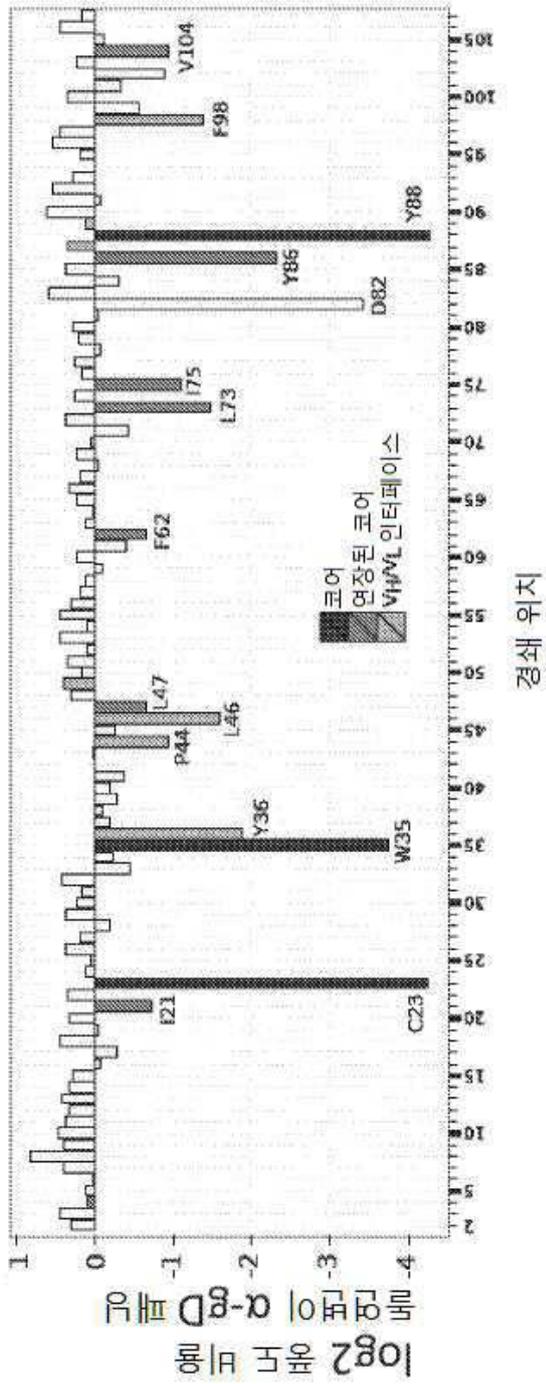
(i) Cor: 0.823
 코어: 0.69
 연장된 코어: 0.804
 인터페이스: 0.832
 기타: 0.818
 단백질 L 1: 0.87
 단백질 L 2: 0.779



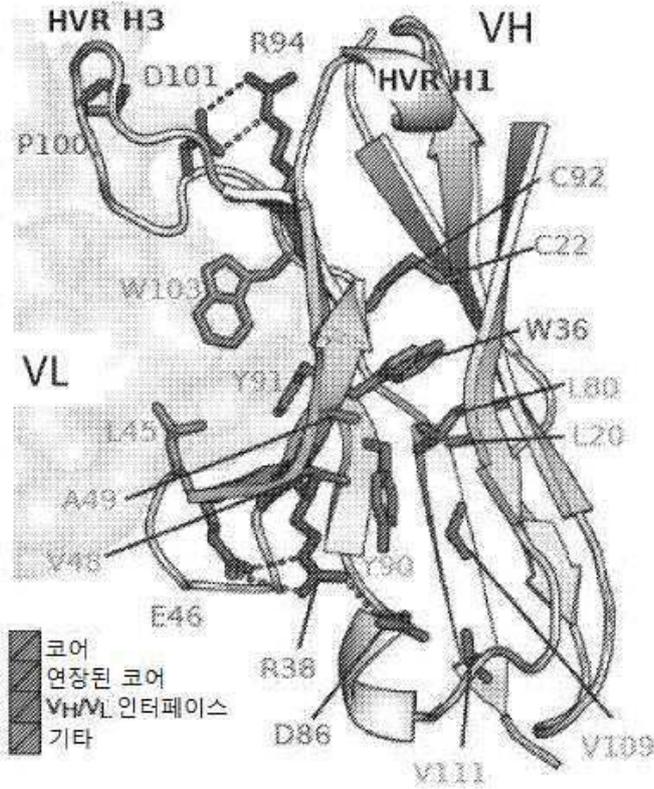
도면3a



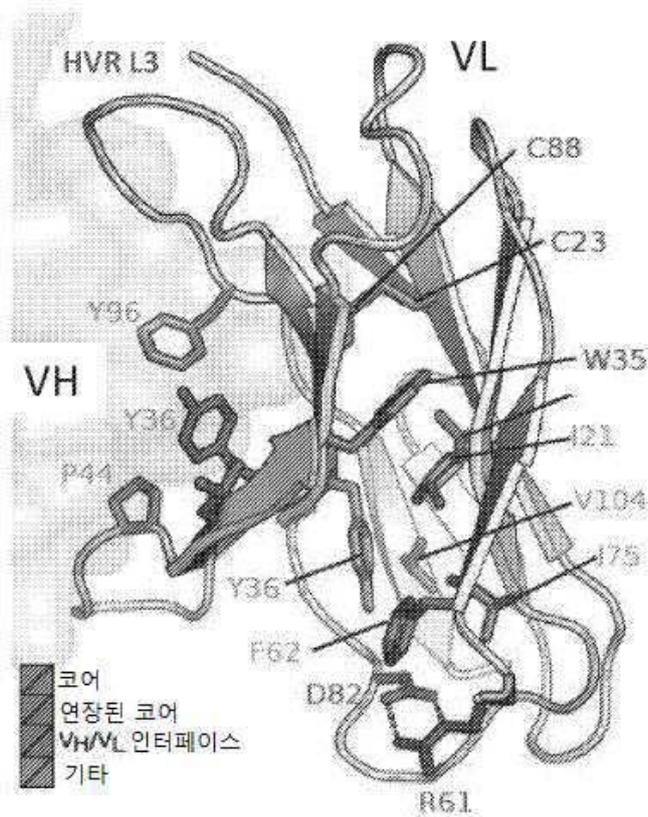
도면3b



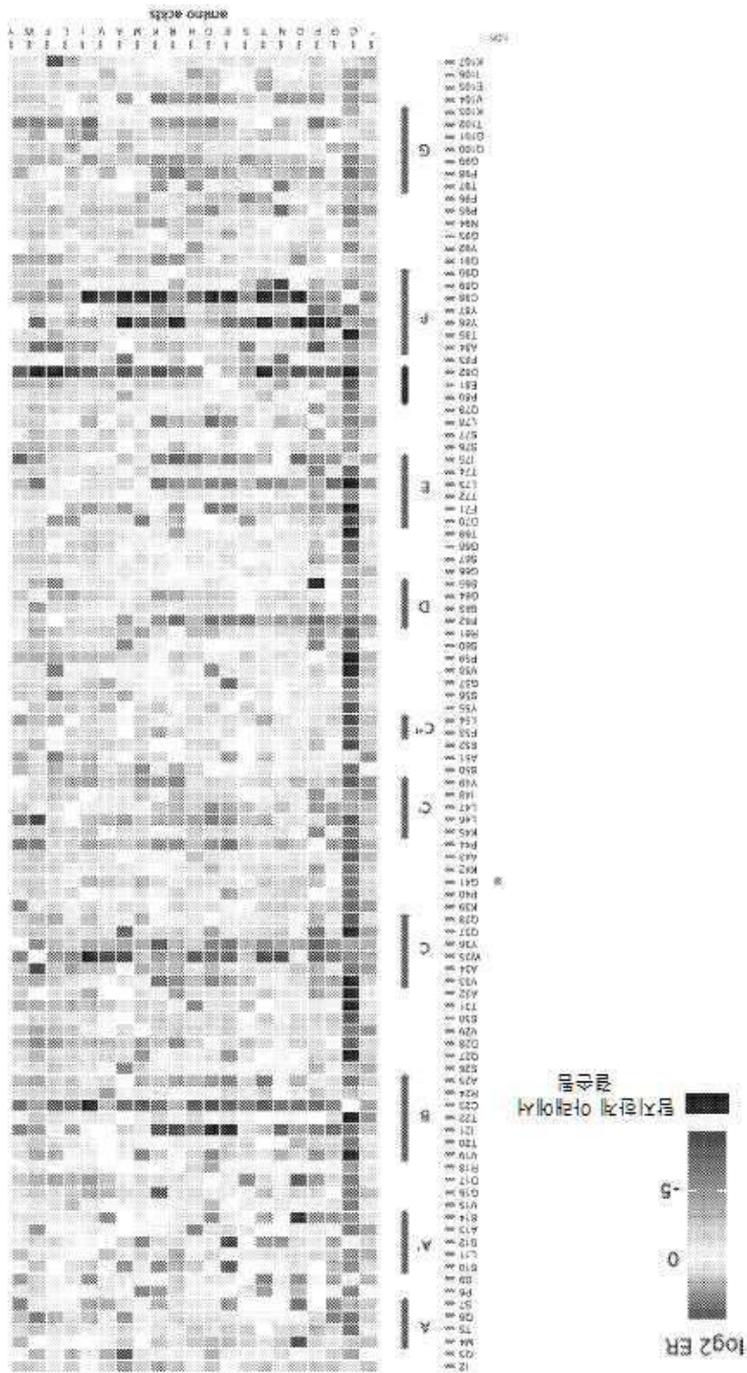
도면3c



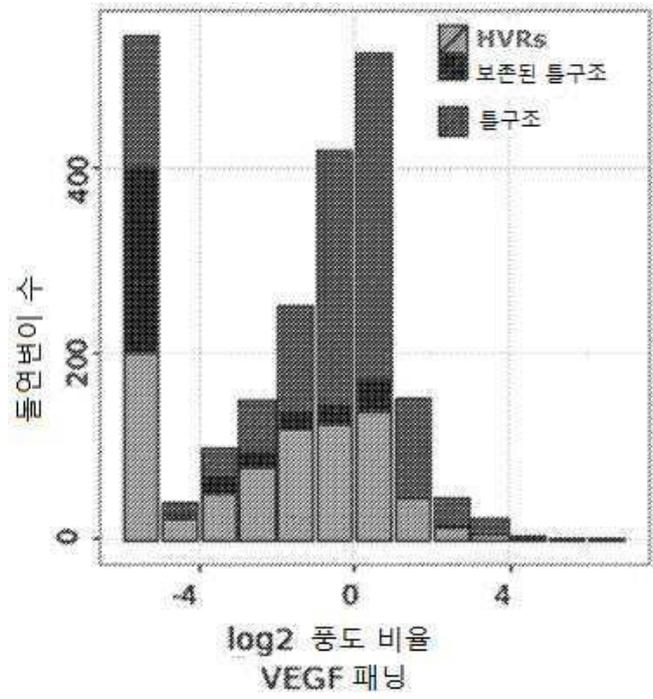
도면3d



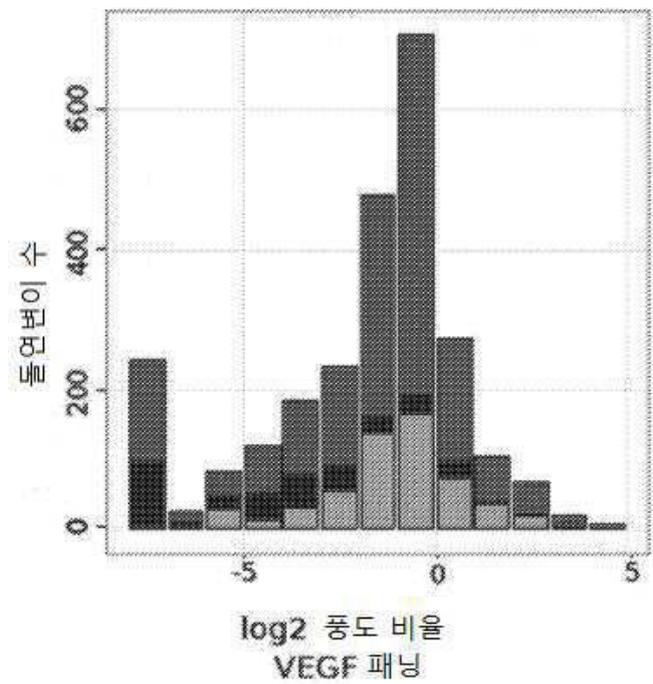
도면4b



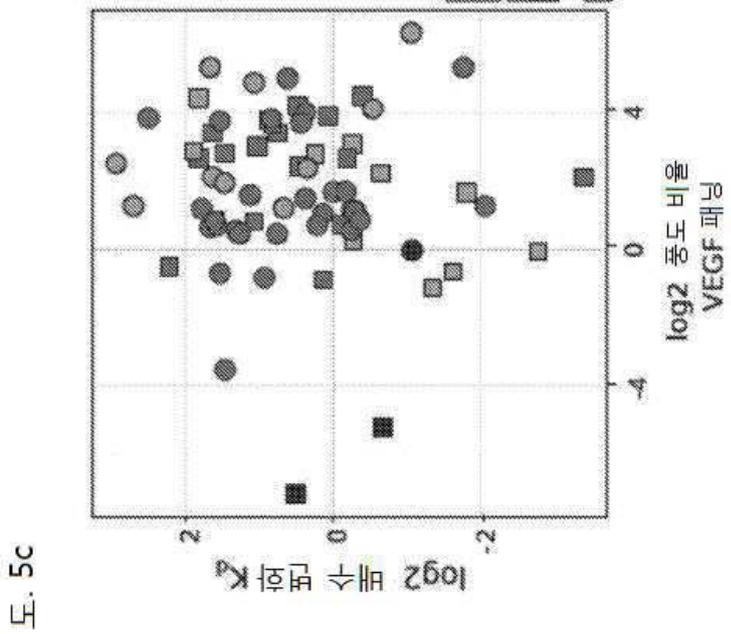
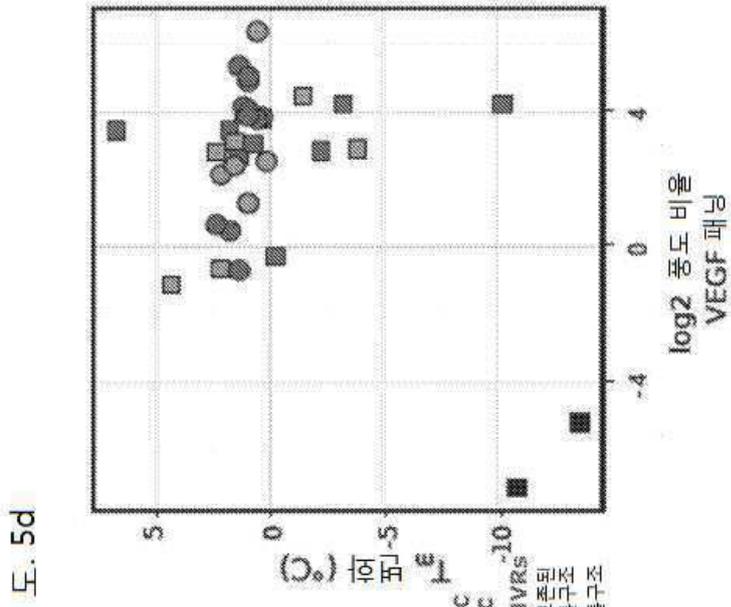
도면5a



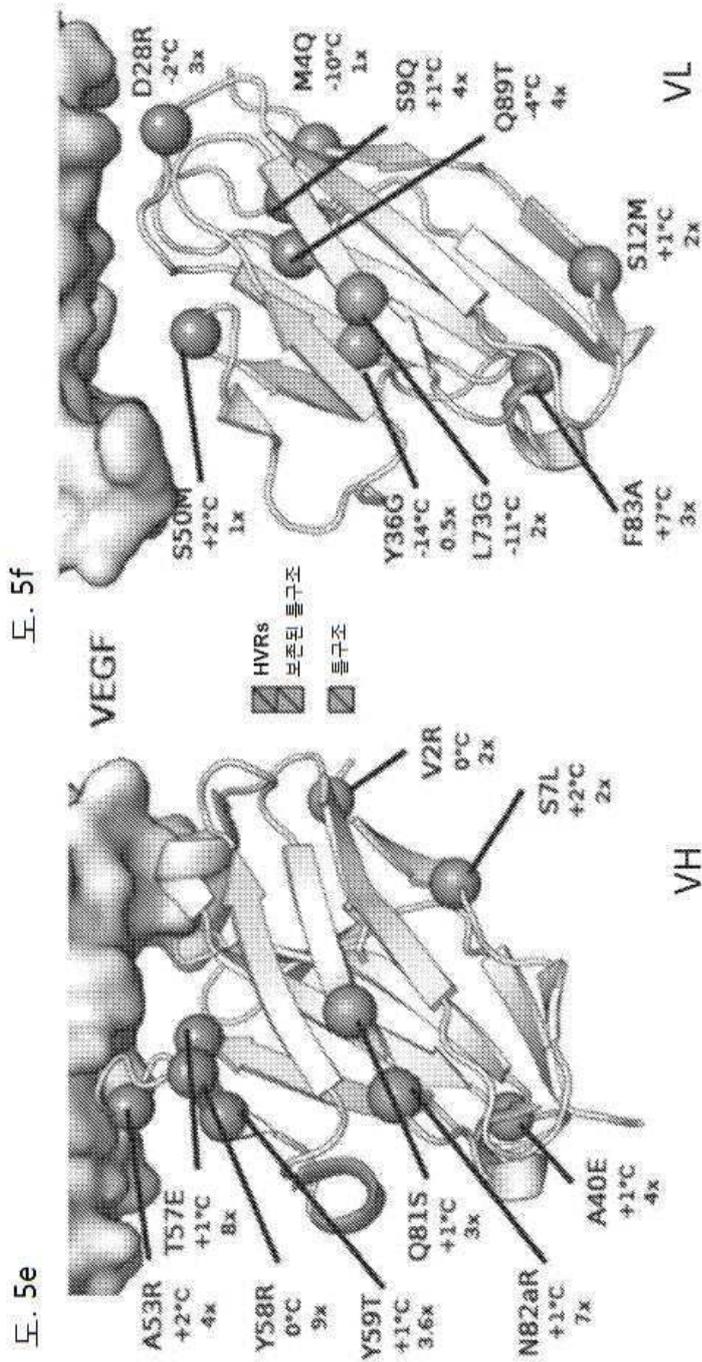
도면5b



도면5cd

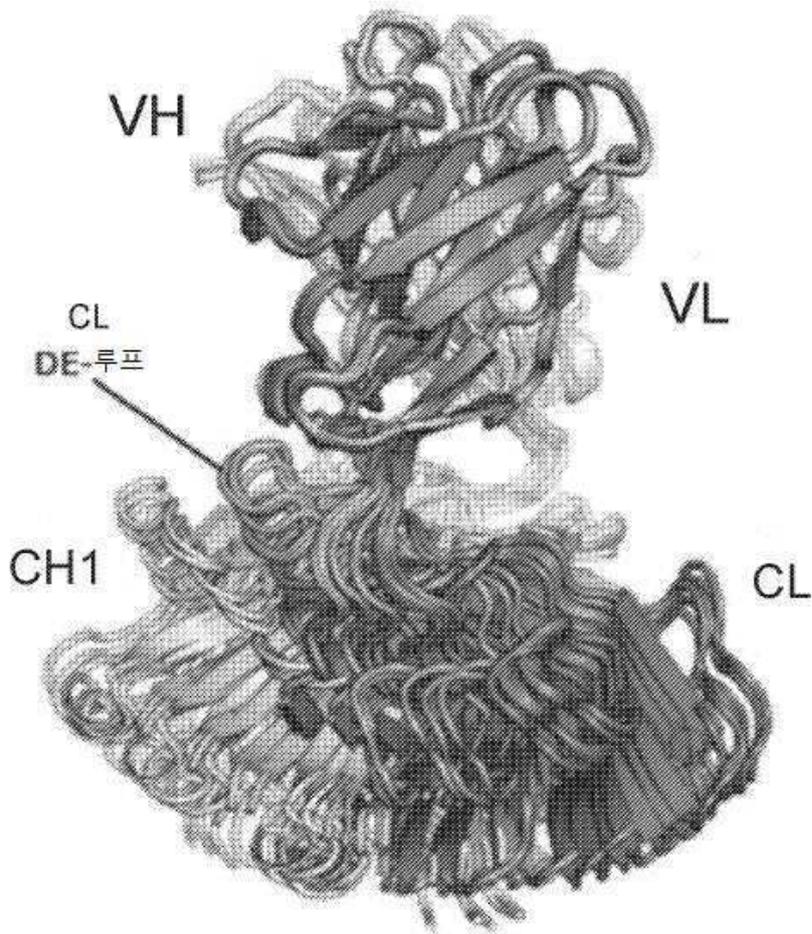


도면5ef

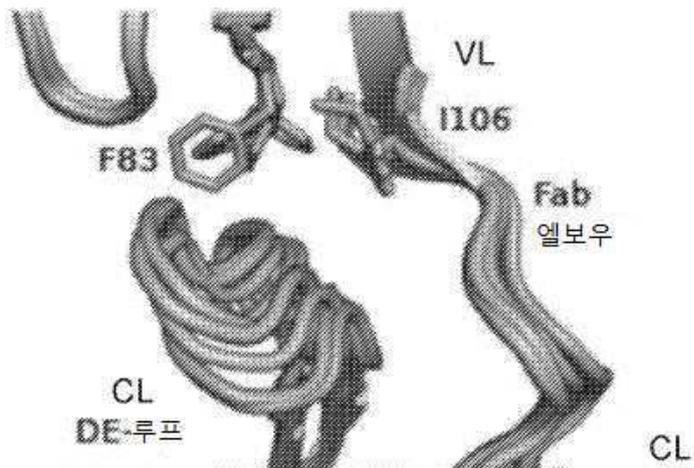


도. 5f

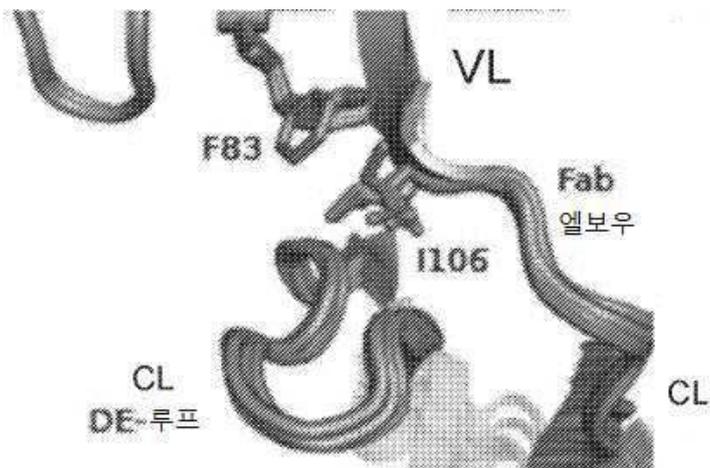
도면6a



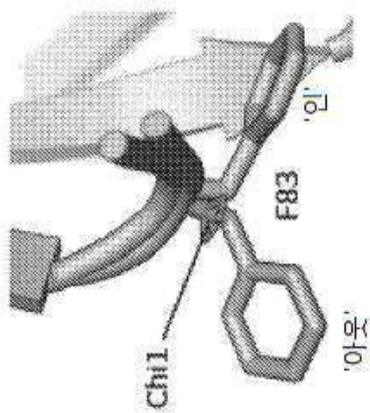
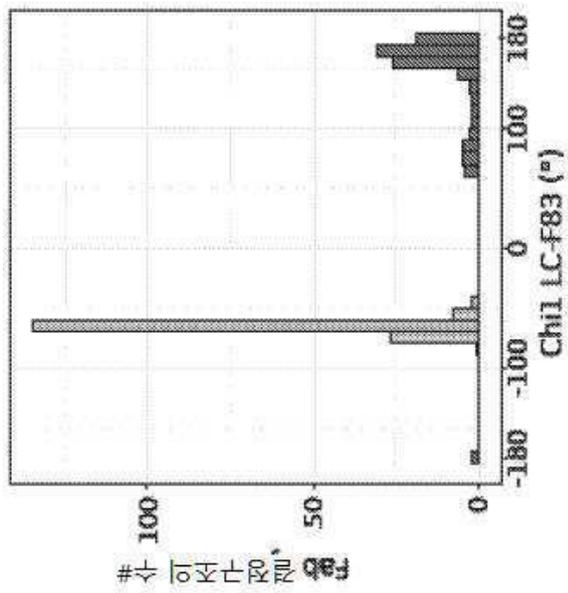
도면6b



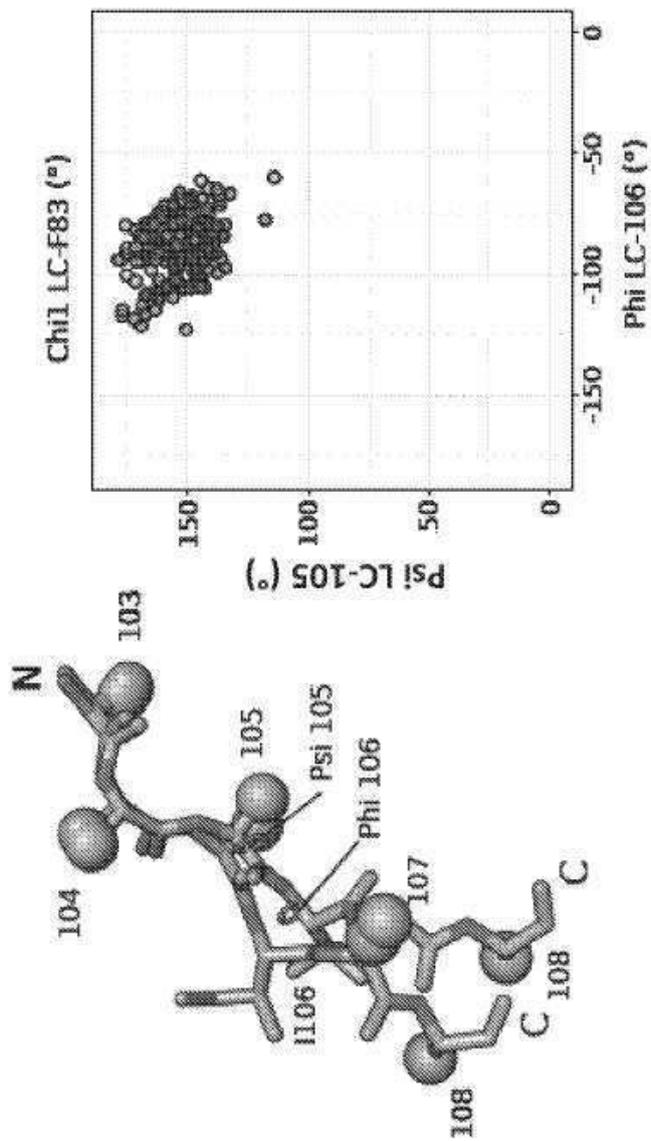
도면6c



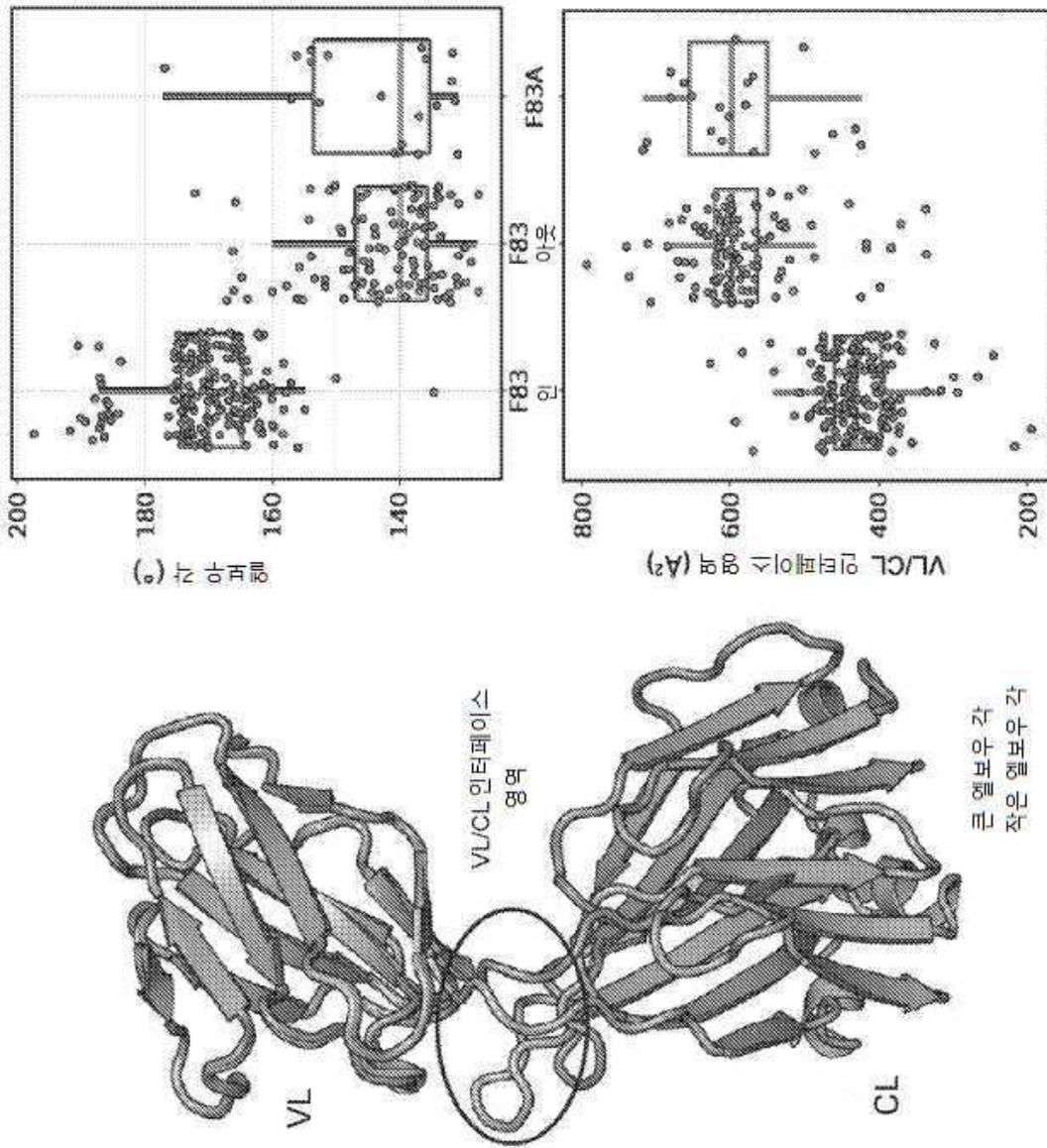
도면7a



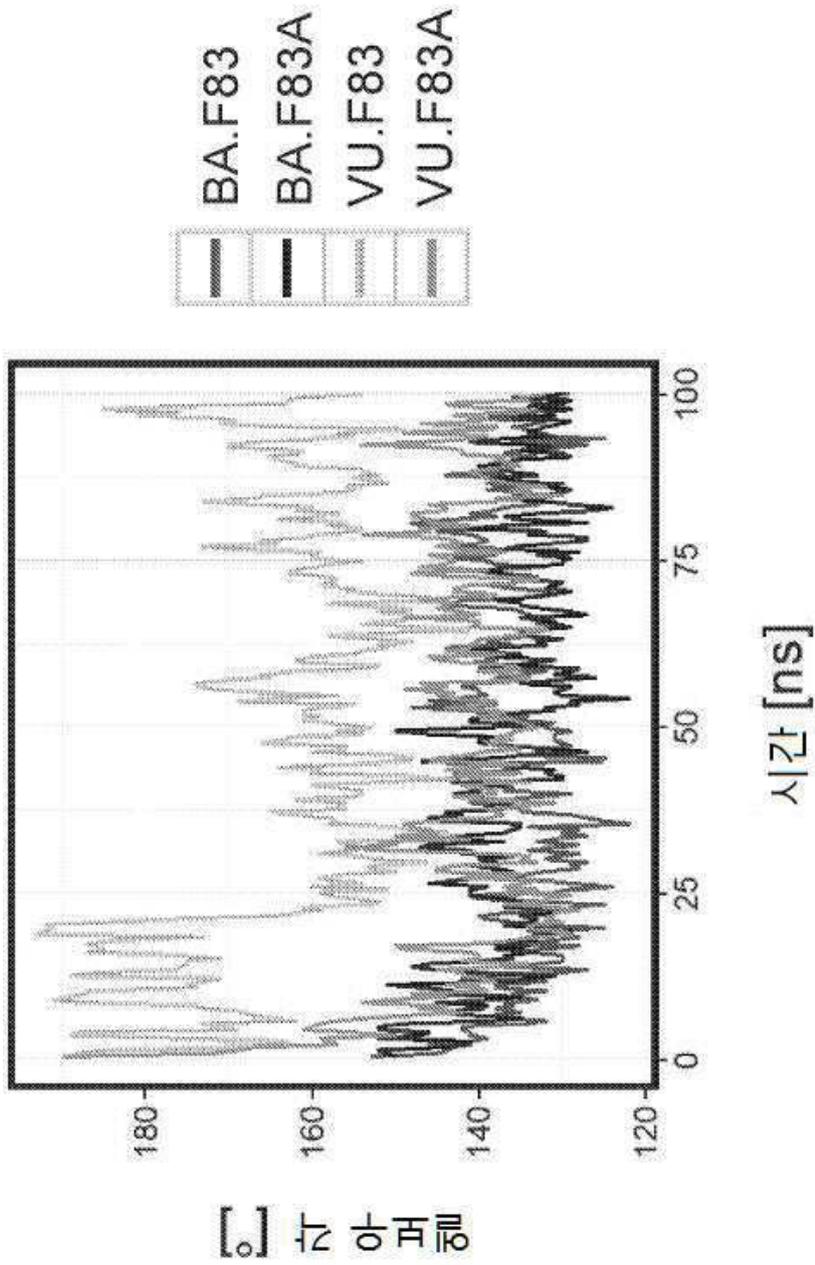
도면7b



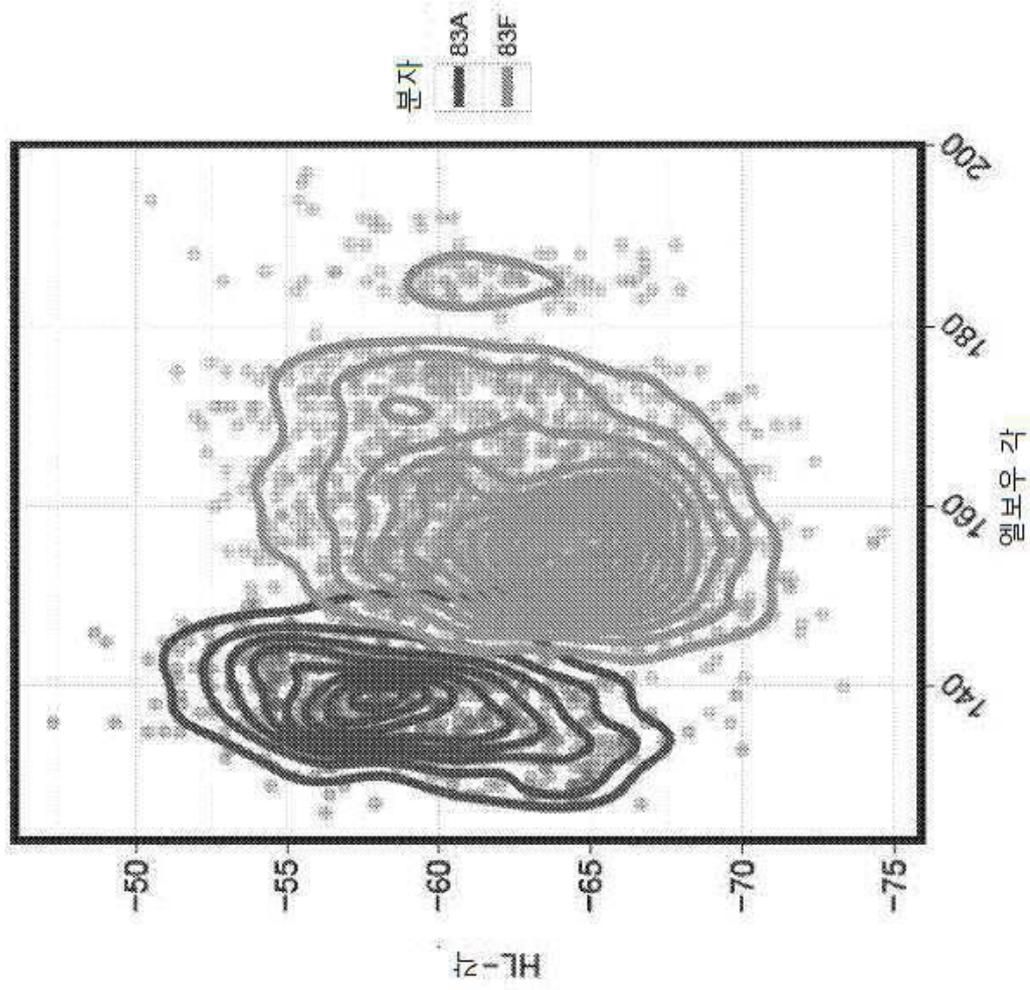
도면7c



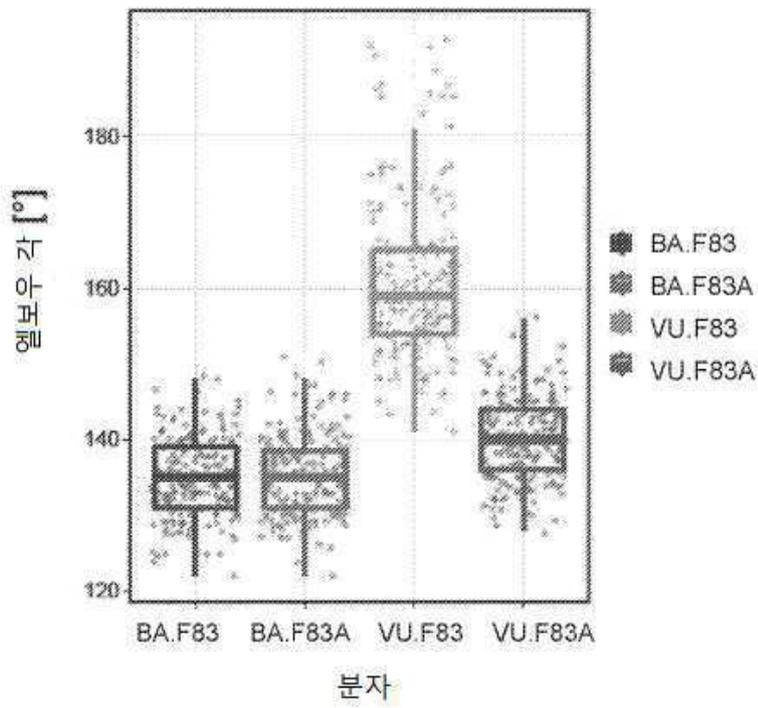
도면8b



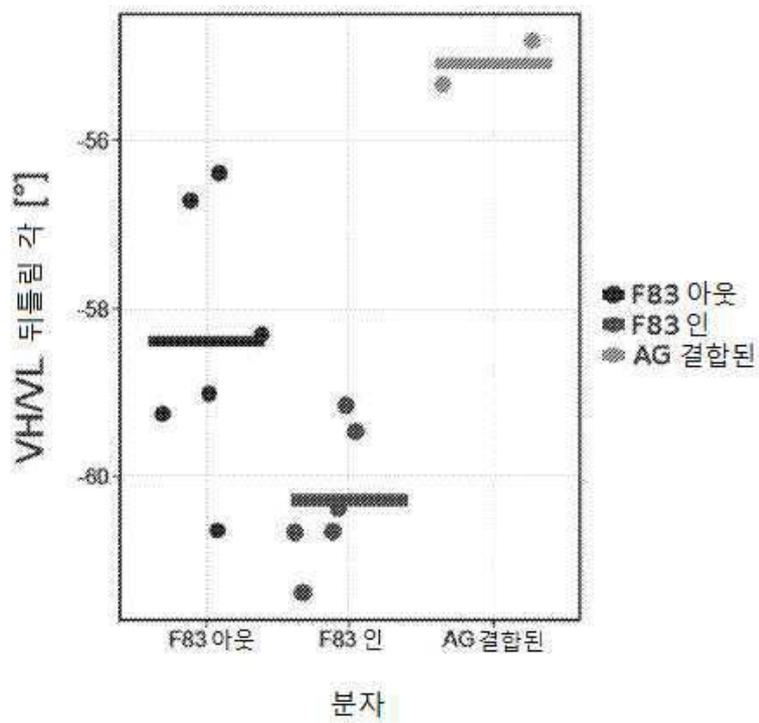
도면8c



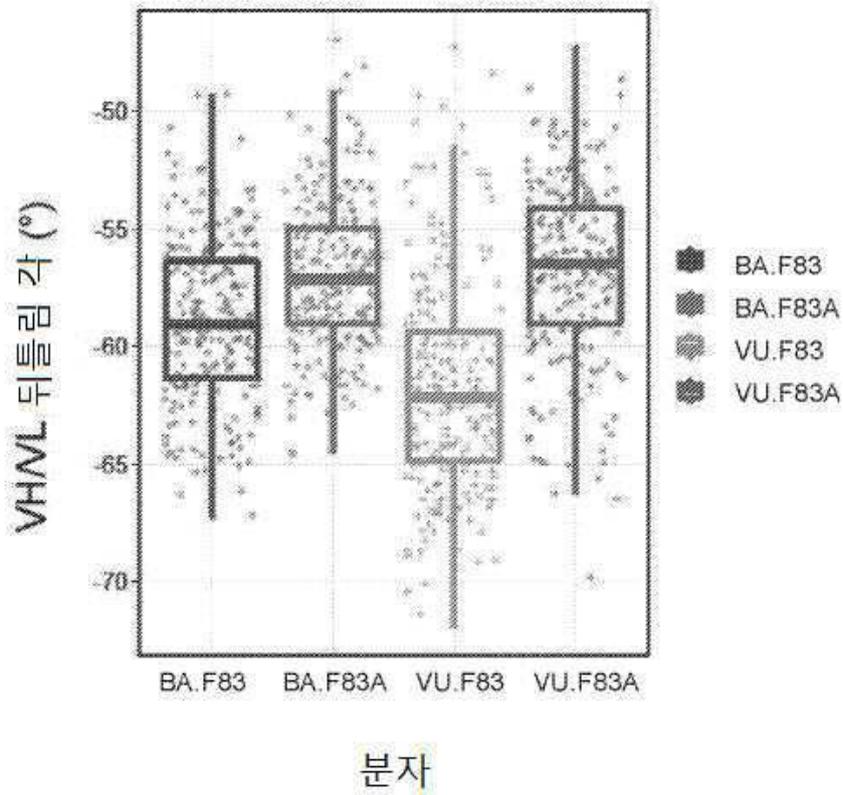
도면9a



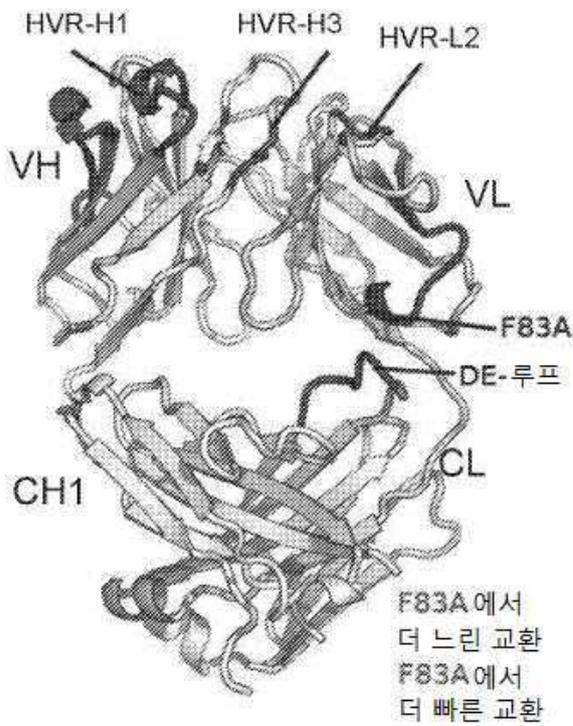
도면9b



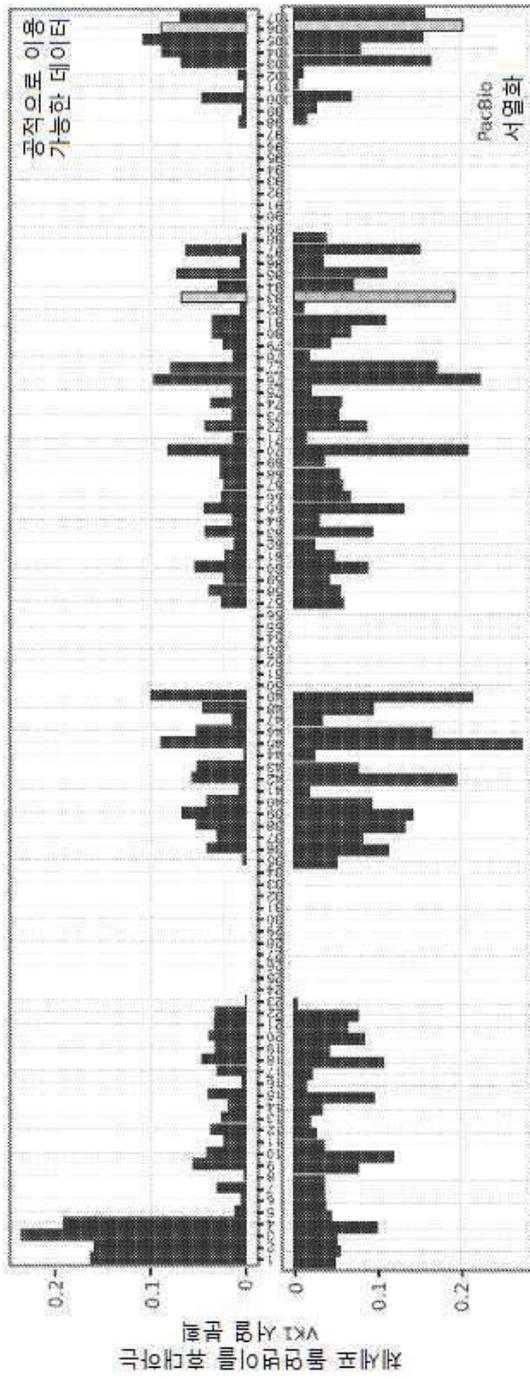
도면9c



도면9d

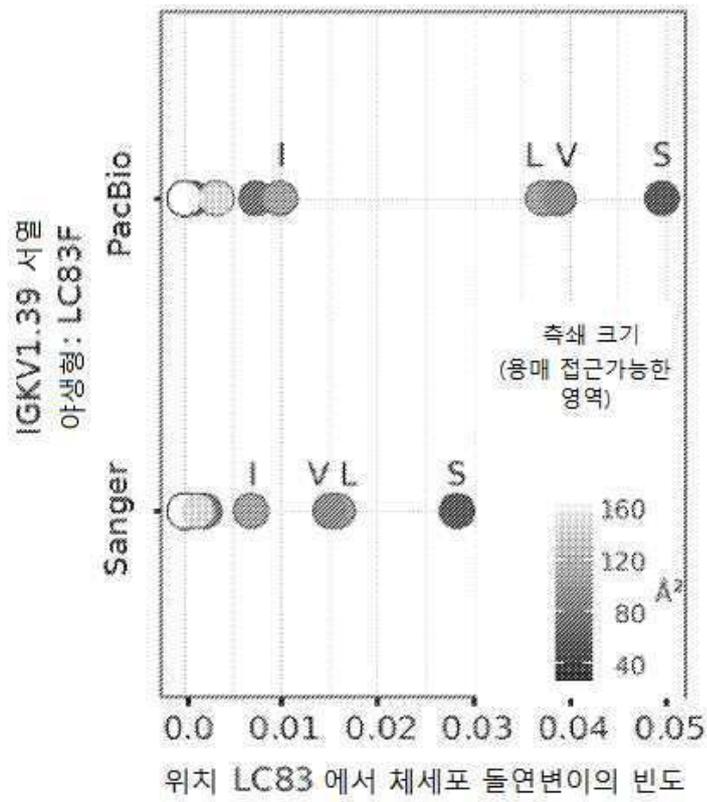


도면10a

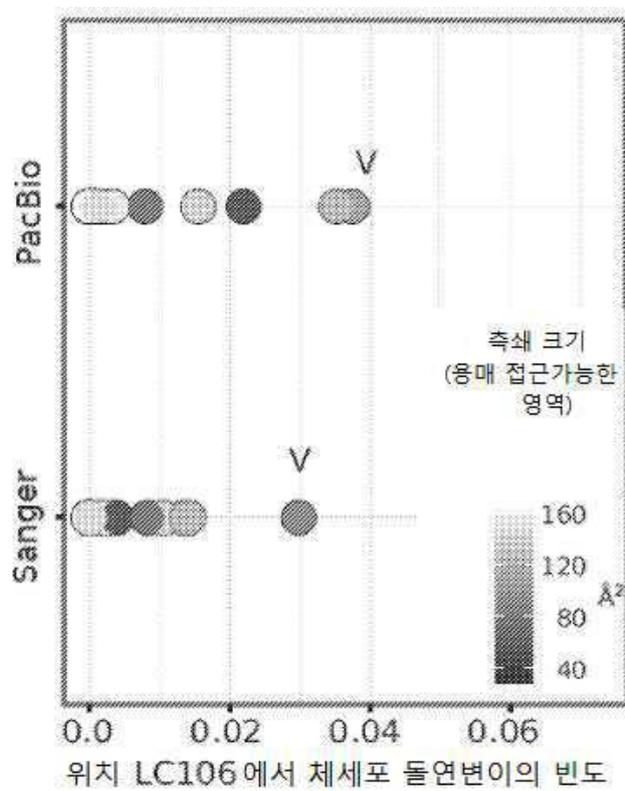


V1 위치 (Kabat 번호매김)

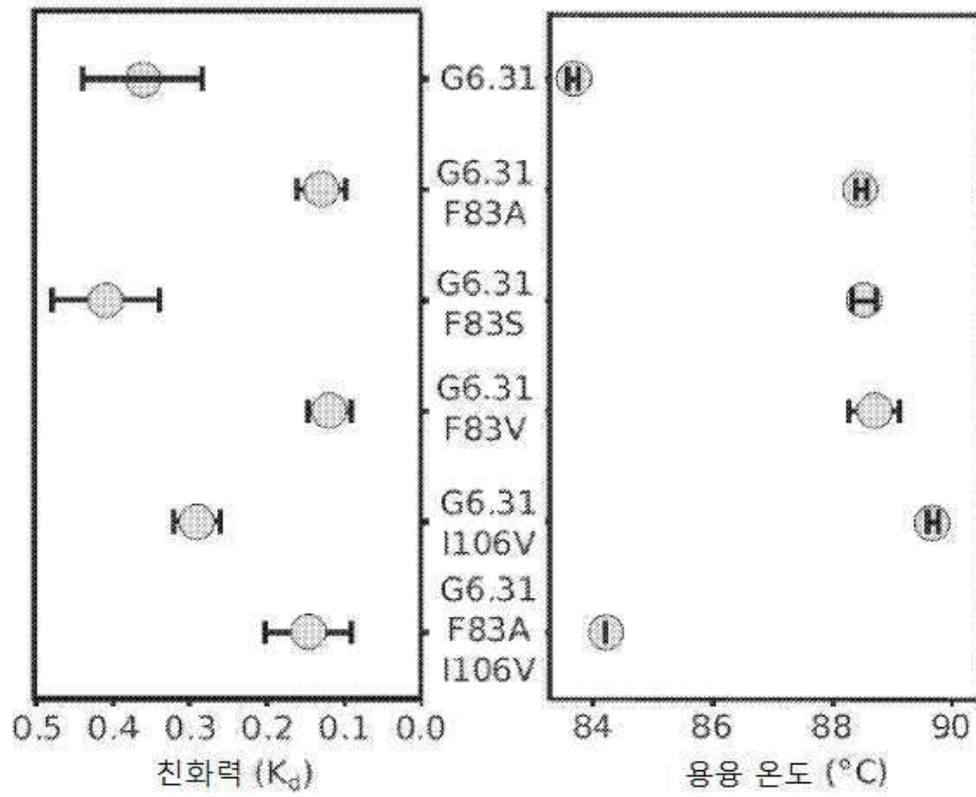
도면10b



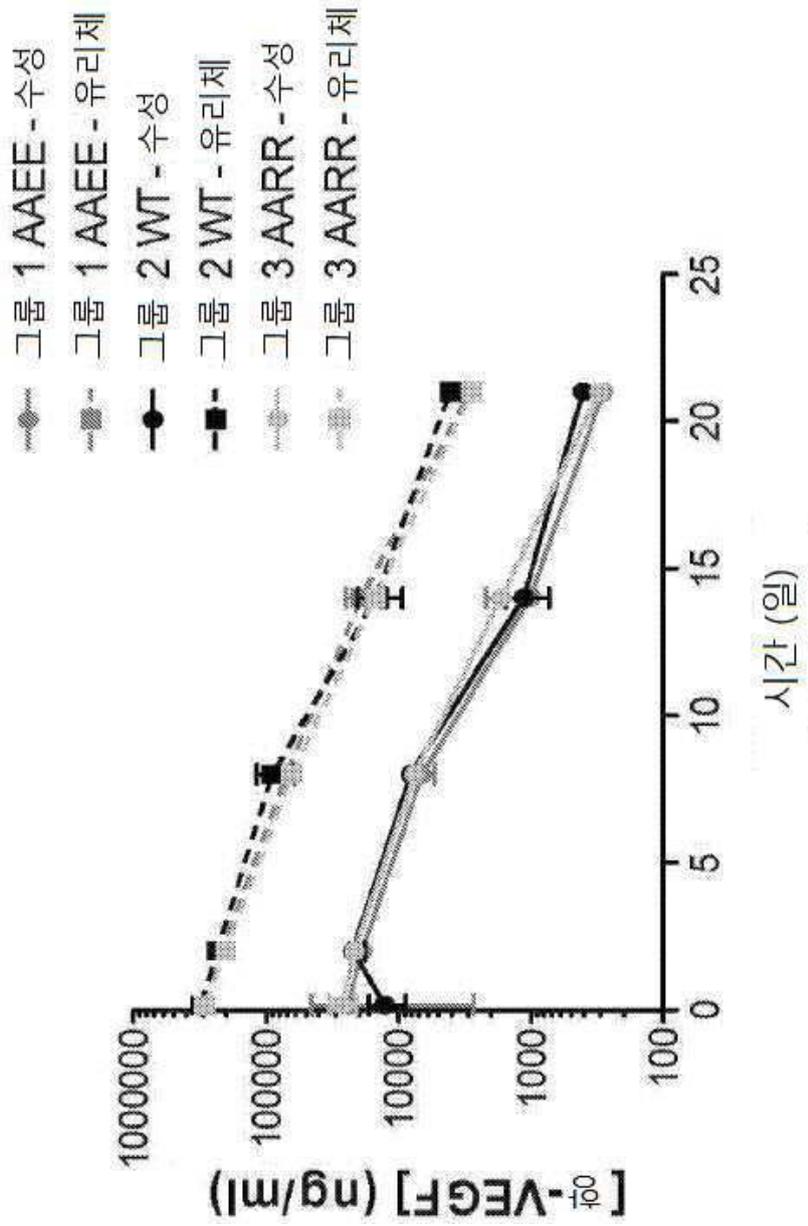
도면10c



도면10d

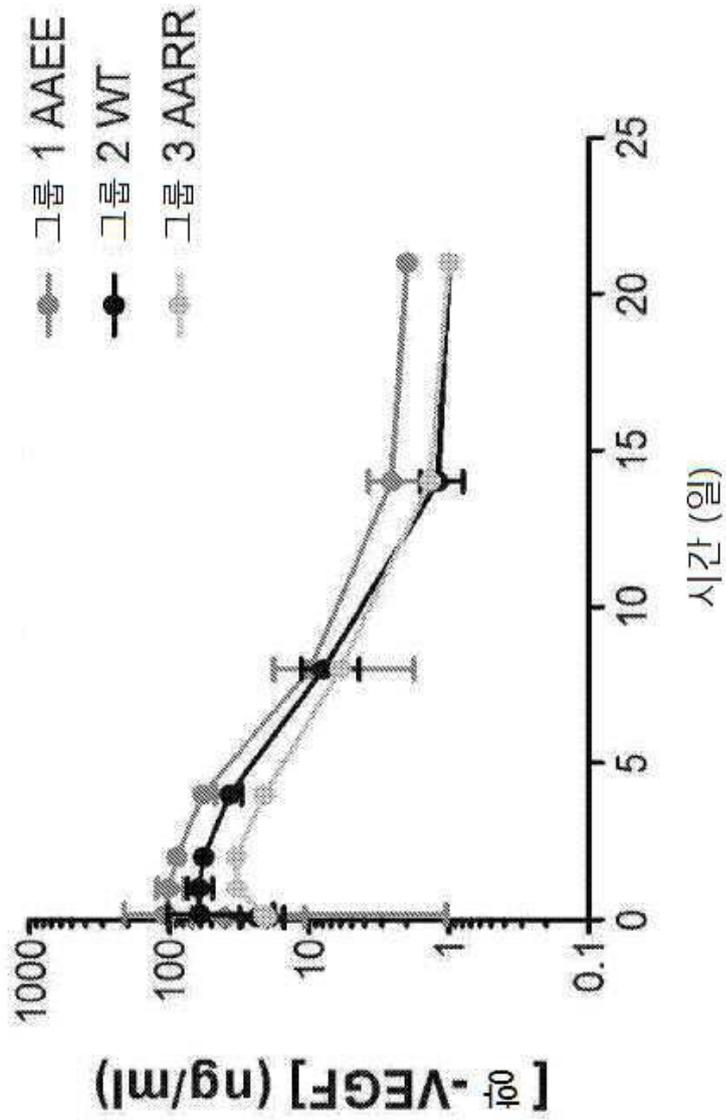


도면11a



n = 4개의 눈 (2마리 동물)

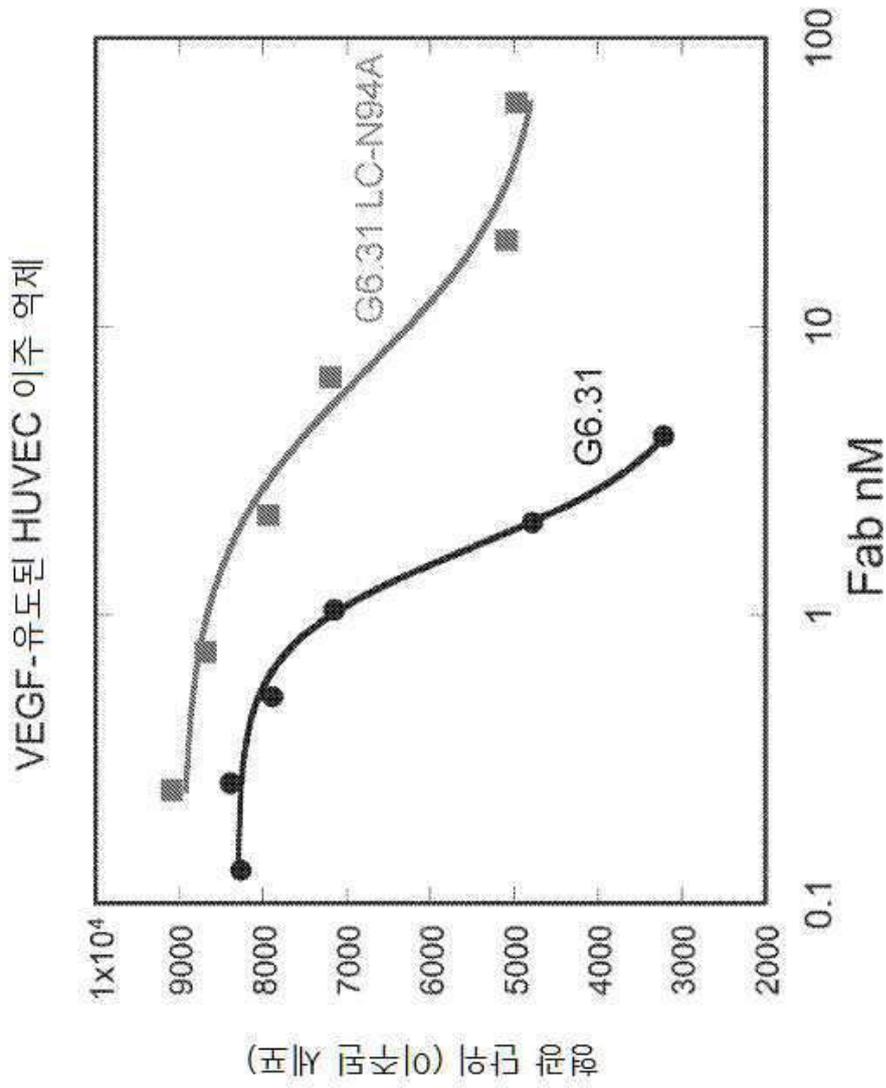
도면11b



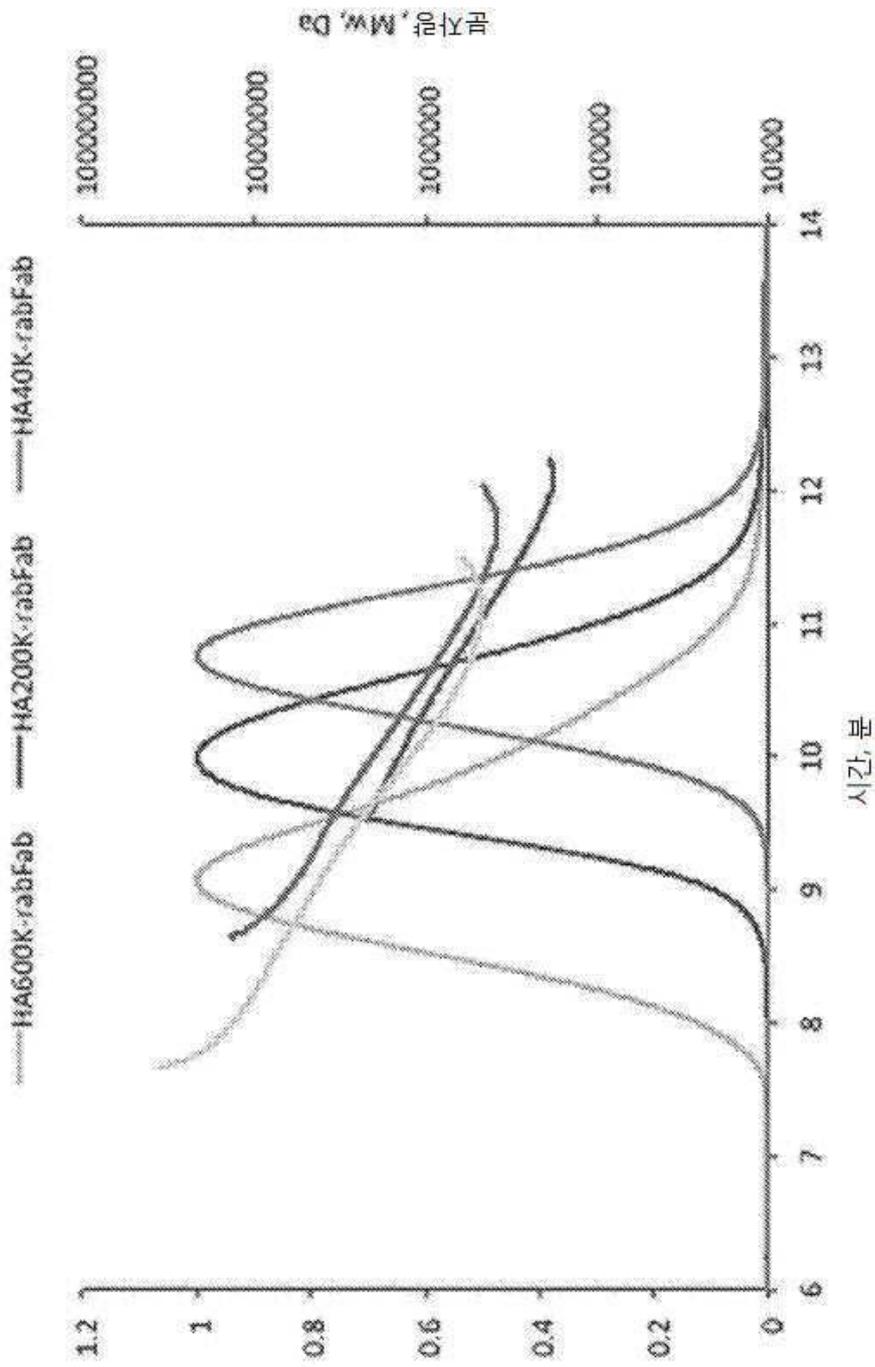
도면12

이름	0 주			4 주			12 주			24 주		
	%LMW	%단량제	%HMW	%LMW	%단량제	%HMW	%LMW	%단량제	%HMW	%LMW	%단량제	%HMW
HCLC5	1.11	97.42	1.46	5.88	93.36	0.76	11.18	81.95	6.88	18.08	80.25	1.67
N94A.F83A.Y58R.N82aR	0.93	97.62	1.45	3.53	95.37	1.10	8.55	89.09	2.26	14.25	83.81	1.93
N94A.F83A.A40E.T57E	1.34	95.91	2.75	3.66	94.06	2.29	8.73	87.80	3.46	14.01	83.55	2.44
N94A.F83A	1.43	95.41	3.16	3.64	93.35	3.01	8.67	86.85	4.49	14.00	82.26	3.74
HCLC2	3.29	91.73	4.99	5.13	90.98	3.89	9.19	84.91	5.90	14.98	81.70	3.33
N94A	1.05	97.17	1.78	4.84	93.74	1.42	10.53	87.99	1.48	16.08	81.58	2.34
야생형 G6.31	1.35	97.38	1.27	7.37	90.86	1.77	15.68	82.63	1.69	25.08	73.00	1.92
라니비주마브	0.72	98.99	0.29	4.38	95.18	0.44	10.46	88.75	0.78	17.99	81.04	0.97

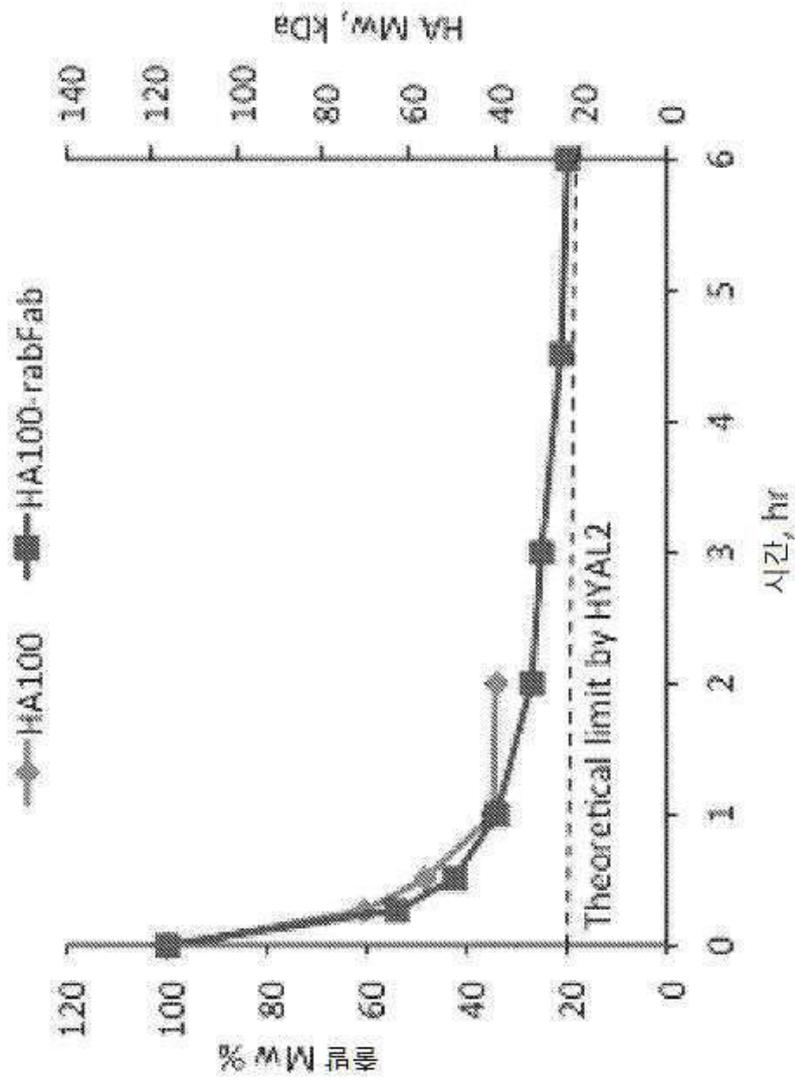
도면13



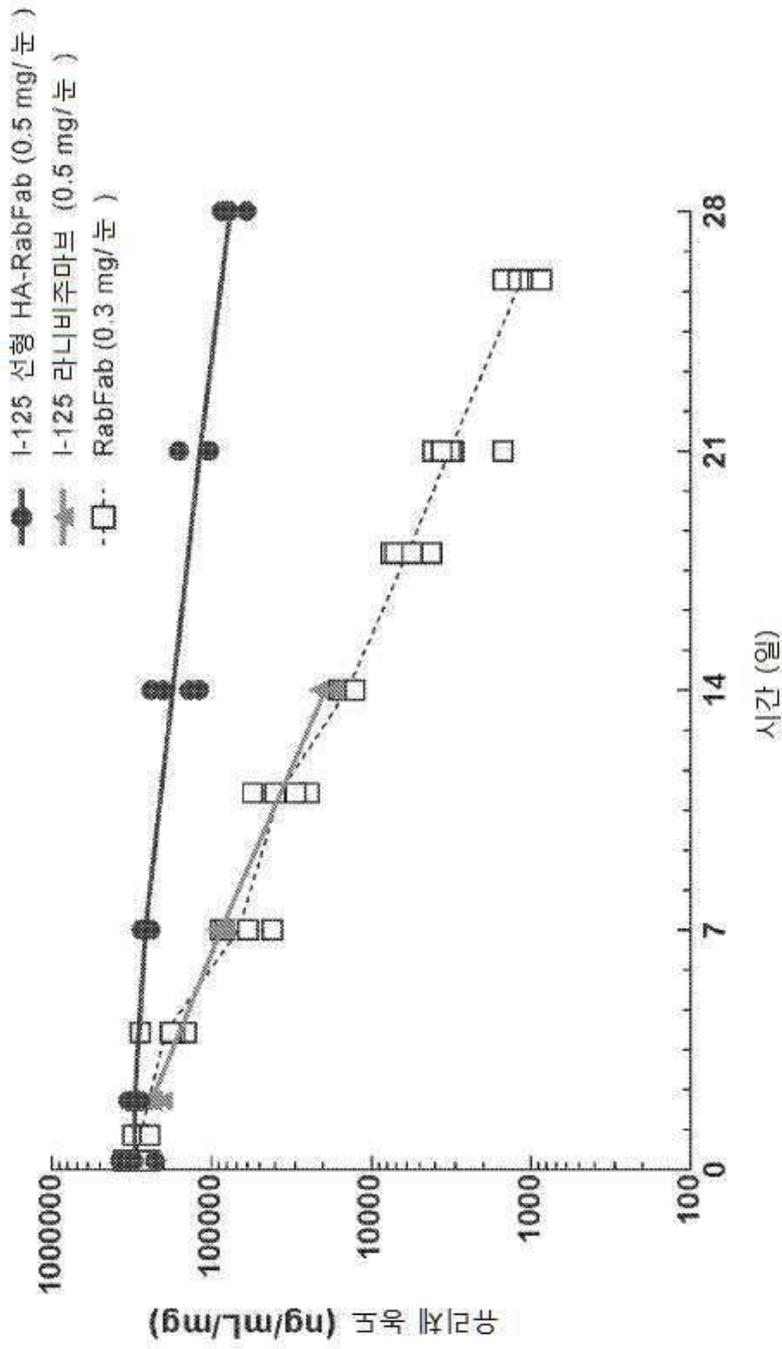
도면14



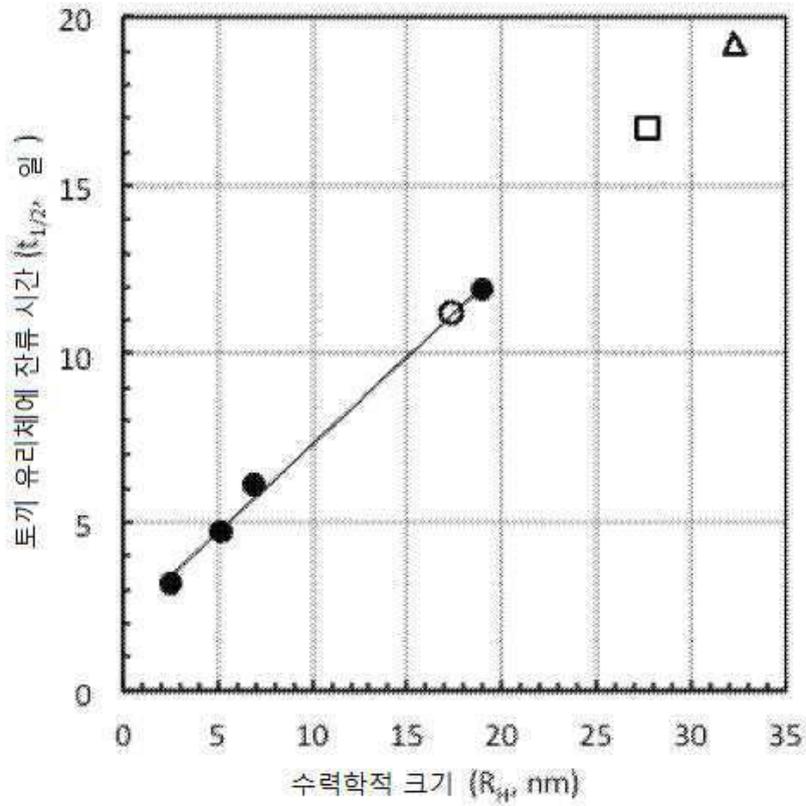
도면15



도면16



도면17



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Genentech, Inc. et al.

<120> OPTIMIZED VARIANTS OF ANTI-VEGF ANTIBODIES

<130> 50474-110W03

<150> US 62/271,913

<151> 2015-12-28

<150> US 62/222,698

<151> 2015-09-23

<160> 69

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 1

Asp Tyr Trp Ile His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Ile or His

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is Ala or Arg

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Tyr or Lys

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is Thr or Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is Arg, Tyr, Gln, or Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa is Ala or Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Lys or Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is Gly or Glu

<400> 2

Gly Xaa Thr Pro Xaa Gly Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Asp Ser Val Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is Asp or Arg

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Xaa Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is Ser or Met

<400> 5

Xaa Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 6

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa is Gln, Asn, or Thr
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa is Ala, Asn, Gln, or Arg
 <400> 6

Xaa Gln Gly Tyr Gly Xaa Pro Phe Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 7

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

<210> 8

 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 8

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

<210> 9
 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 9

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 10

Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe Thr

1 5

<210> 11

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 11

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 Arg 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 Arg 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

20 25 30

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 14

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

1 5 10

<210> 15

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 15

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 16

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 17

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 17

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

20

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 18

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

1 5 10 15

<210> 19

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 19

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 20

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 21

Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 22

Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 23

Gln Gln Gly Tyr Gly Asn Pro Phe Thr

1 5

<210> 24

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 24

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 25

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 25

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

1 5 10 15

Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 26

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 26

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

1 5 10 15

Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 27

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 28

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 28

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Glu Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

 20 25 30

<210> 29

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 29

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

1 5 10 15

Ser Leu Glu Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Ile Ser

 20 25 30

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 30

Trp Val Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 31

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 31

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Glu Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 32

Trp Gly Gln Gly Glu Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 33

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 33

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

1 5 10 15

Ser Leu Glu Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Ile Ser Asp Tyr

20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Glu Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

115 120

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 34

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

1	5	10	15
Asp	Glu	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	Ser	Leu	Gln
Pro			
65	70	75	80
Glu	Asp	Ala	Ala
Thr	Tyr	Tyr	Cys
Gln	Gln	Gly	Tyr
Gly	Ala	Pro	Phe
85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln
Gly	Thr	Lys	Val
Glu	Ile	Lys	
100	105		

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 35

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

1	5	10	15
Asp	Glu	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	Glu	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 Glu Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 36

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

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

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

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 37

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

1 5 10 15

Asp Glu 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 Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe

 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

 100 105

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 38

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> 39

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 39

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

1 5 10

<210> 40

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 40

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 Glu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu 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> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 41

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 Ala Pro Phe
 85 90 95

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

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 42

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> 43
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 43
 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 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

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

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

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

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

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

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His

225

<210> 44

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 44

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 45

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 45

<220><223> Synthetic Construct

<400> 48

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 Arg 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 Arg 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 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr
 225

<210> 49

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 49

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 Arg 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 Arg 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 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

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> 51

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 51

Glu Glu Gln Leu Val Glu Glu Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
 Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Glu Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Glu 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 Glu Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 52

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 52

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Ile Ser

 20 25 30

<210> 53

<211

> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 53

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

1 5 10 15

Gly

<210> 54

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 54

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys

 20 25 30

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 55

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys

1 5 10

<210> 56

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 56

catcagatgg cggaagatg aagacagatg gtgc 34

<210> 57

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 57

gccatccaga tgaccagtc tcc 23

<210> 58

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 58

ggctgacca tetgtcttc 19

<210> 59

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 59

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 Val 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> 60

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 60

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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 61

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 62

Gly Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 63

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

1 5 10 15

Gly

<210> 64

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 64

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> 65

<211>

> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 65

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His

1 5 10

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 66

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser

1 5

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 67

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val

1 5 10

<210> 68

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 68

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr 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> 69

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 69

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

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

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

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

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

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

85

90

95

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

100

105

110