



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201630935 A

(43)公開日：中華民國 105 (2016) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：104136927

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 11 月 09 日

(51)Int. Cl.：

*C07K16/22 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**A61P27/02 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2014/11/10

歐洲專利局

14192524.8

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

瑞士

(72)發明人：丹格爾 史蒂芬 DENGL, STEFAN (DE)；修斯曼 彼得 麥可 HUELSMANN, PETER MICHAEL (DE)；喬治絲 蓋 GEORGES, GUY (BE)；凱騰伯格 胡伯特 KETTENBERGER, HUBERT (DE)；瑞古拉 喬傑 湯瑪斯 REGULA, JOERG THOMAS (DE)；莫嫩肯 喬治 MOELLEKEN, JOERG (DE)；莫賀傑 麥可 MOLHOJ, MICHAEL (DK)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：16 項 圖式數：0 共 190 頁

(54)名稱

抗ANG2抗體及使用方法

ANTI-ANG2 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

(57)摘要

本文報導抗ANG2抗體。一種特異性抗ANG2抗體包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO：29之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO：30之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO：32之HVR-H3。

Herein are reported anti-ANG2 antibodies. A specific anti-ANG2 antibody comprises (a) a HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 29, (b) a HVR-H2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 30, and (c) a HVR-H3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 32.

※ 申請案號： 104136927

※ 申請日： 104/11/09

※IPC 分類： **C07K 16/22** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】

抗ANG2抗體及使用方法

ANTI-ANG2 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

【中文】

本文報導抗ANG2抗體。一種特異性抗ANG2抗體包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 29之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 30之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 32之HVR-H3。

【英文】

Herein are reported anti-ANG2 antibodies. A specific anti-ANG2 antibody comprises (a) a HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 29, (b) a HVR-H2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 30, and (c) a HVR-H3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 32.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

抗ANG2抗體及使用方法

ANTI-ANG2 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

【技術領域】

本發明係關於抗ANG2抗體及其使用方法。

【先前技術】

人類血管生成素-2 (ANG-2) (或者簡稱為ANGPT2或ANG2) (SEQ ID NO: 106)描述於Maisonpierre, P.C.等人, Science 277 (1997) 55-60及Cheung, A.H.等人, Genomics 48 (1998) 389-91中。發現血管生成素-1及血管生成素-2 (ANG-1 (SEQ ID NO: 107)及ANG-2 (SEQ ID NO: 106))為選擇性表現於血管內皮內之酪胺酸激酶家族(Tie)之配位體。Yancopoulos, G.D.等人, Nature 407 (2000) 242-48。現存在血管生成素家族之四個確定成員。血管生成素-3及血管生成素-4 (Ang-3及Ang-4)可表示小鼠及人中之相同基因座之廣泛不同對應物。Kim, I.等人, FEBS Lett, 443 (1999) 353-56; Kim, I.等人, J. Biol. Chem. 274 (1999) 26523-26528。ANG-1及ANG-2最初在組織培養實驗中分別鑑別為促效劑及拮抗劑(對於ANG-1, 參見: Davis, S.等人, Cell 87 (1996) 1161-69; 及對於ANG-2, 參見: Maisonpierre, P.C.等人, Science 277 (1997) 55-60)。所有已知血管生成素主要與Tie2結合, 且Ang-1及Ang-2以3 nM (Kd)親和力結合於Tie2。Maisonpierre, P.C.等人, Science 277 (1997) 55-60。展示Ang-1支持EC存活且促進內皮完整性, Davis, S.等人, Cell 87 (1996) 1161-69; Kwak, H.J.等人, FEBS Lett 448 (1999) 249-53; Suri, C.等人, Science 282 (1998) 468-71; Thurston, G.等人,

Science 286 (1999) 2511-2514 ; Thurston, G.等人, Nat. Med. 6 (2000) 460-63 , 而ANG-2具有相反影響且在存活因子VEGF或鹼性纖維母細胞生長因子不存在下促進血管不穩定及退化。Maisonpierre, P.C.等人, Science 277 (1997) 55-60。然而，許多ANG-2功能研究已提出更複雜情形。ANG-2可為血管重塑之複雜調節因子，其在血管萌發及血管退化中起作用。支持ANG-2之此類作用，表現分析顯示ANG-2連同VEGF在血管生成萌發之成人設置中被快速誘導，而在血管退化之設置中在VEGF不存在下誘導ANG-2。Holash, J.等人, Science 284 (1999) 1994-98 ; Holash, J.等人, Oncogene 18 (1999) 5356-62。與上下文相關作用一致，ANG-2特異性結合於相同內皮特異性受體Tie-2，其由Ang-1活化但對其活化具有上下文相關影響。Maisonpierre, P.C.等人 Science 277 (1997) 55-60。

角膜血管生成分析已展示ANG-1及ANG-2具有類似影響，與VEGF協同作用來促進新血管生長。Asahara, T.等人, Circ. Res. 83 (1998) 233-40。藉由觀測到在活體外高濃度ANG-2亦可促血管生成來提高存在劑量依賴性內皮反應之可能性。Kim, I.等人, Oncogene 19 (2000) 4549-52。在高濃度下，ANG-2藉由經由PI-3激酶及Akt路徑活化Tie2在血清去除細胞凋亡期間充當內皮細胞之細胞凋亡存活因子。Kim, I.等人, Oncogene 19 (2000) 4549-52。

其他活體外實驗提出在持續曝光期間，ANG-2之影響可自拮抗劑逐漸轉變為Tie2促效劑，且在稍後時間點，其可直接促進血管形成及新血管穩定。Teichert-Kuliszewska, K.等人, Cardiovas. Res. 49 (2001) 659-70。此外，若在纖維蛋白凝膠上培養EC，則亦觀測到Tie2經ANG-2活化，可能表明ANG-2之作用可視EC分化狀態而定。Teichert-Kuliszewska, K.等人, Cardiovas. Res. 49 (2001) 659-70。在三維膠原蛋白凝膠中培養之微血管EC中，ANG-2亦可誘導Tie2活化且促進毛細

管樣結構形成。Mochizuki, Y.等人, *J. Cell. Sci.* 115 (2002) 175-83。使用3-D類似球形共培養物作為血管成熟之活體外模型，展現EC與間葉細胞之間的直接接觸消除對VEGF之反應，而VEGF及ANG-2之存在誘導萌發。Korff, T.等人, *FASEB J.* 15 (2001) 447-457。Etoh, T.H.等人展現在VEGF存在下ANG-2強烈上調組成性表現Tie2（表現MMP-1、MMP-9及u-PA）之EC。Etoh, T.等人, *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53。在活體內瞳孔膜模型之情況下，Lobov, I.B.等人展示ANG-2在內源性VEGF存在下促進毛細管直徑快速增加、基底薄層重塑、內皮細胞增殖及遷移，且刺激新血管萌發。Lobov, I.B.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11205-10。相比之下，ANG-2在無內源性VEGF之情況下促進內皮細胞死亡及血管退化。Lobov, I.B.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11205-10。類似地，在活體內腫瘤模型之情況下，Vajkoczy, P.等人展現多細胞聚集體藉由經由宿主及腫瘤內皮同時表現VEGFR-2及ANG-2進行血管生成萌發來起始血管生長。Vajkoczy, P.等人, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 777-85。此模型說明生長腫瘤之已建立的微血管之特徵在於連續重塑，假定藉由VEGF及ANG-2之表現介導。(Vajkoczy, P.等人, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 777-85)。

Tie-2及血管生成素-1之基因剔除小鼠研究展示類似表型，且表明經血管生成素-1刺激之Tie-2磷酸化介導發育血管之重塑及穩定、在血管生成期間促進血管成熟及維持內皮細胞支持細胞黏附(Dumont, D.J.等人, *Genes & Development*, 8 (1994) 1897-1909；Sato, T.N., *Nature*, 376 (1995) 70-74；(Thurston, G.等人, *Nature Medicine* 6 (2000) 460-463)。認為血管生成素-1之作用在廣泛及組成性表現其之成人中為保守的(Hanahan, D., *Science*, 277 (1997) 48-50；Zagzag, D.等人, *Exp. Neurol.* 159 (1999) 391-400)。相比之下，血管生成素-2表現主要限於血管重塑位點，認為在血管重塑位點阻斷血管生成素-1之組成性穩定

或成熟功能，使血管恢復至且保持可更多回應於萌發信號之塑性狀態 (Hanahan, D., 1997 ; Holash, J.等人, *Oncogene* 18 (199) 5356-62 ; Maisonpierre, P.C., 1997)。在病理性血管生成中之血管生成素-2表現之研究已發現許多腫瘤類型展示血管之血管生成素-2表現 (Maisonpierre, P.C.等人, *Science* 277 (1997) 55-60)。功能研究表明血管生成素-2參與腫瘤血管生成，且認為血管生成素-2過度表現與小鼠異種移植模型中之腫瘤生長增加相關 (Ahmad, S.A.等人, *Cancer Res.*, 61 (2001) 1255-1259)。其他研究認為血管生成素-2過度表現與腫瘤超血管分佈相關 (Etoh, T.等人, *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53 ; Tanaka, F.等人, *Cancer Res.* 62 (2002) 7124-7129)。

近年來，已提出血管生成素-1、血管生成素-2及/或Tie-2作為可能的抗癌治療標靶。舉例而言，US 6,166,185、US 5,650,490及US 5,814,464各自揭示抗Tie-2配位體及受體抗體。使用可溶性Tie-2之研究據報導減小嚙齒動物中腫瘤之數目及尺寸 (Lin, 1997 ; Lin 1998)。Siemeister, G.等人, *Cancer Res.* 59:3 (1999) 3185-91產生表現Tie-2之胞外域之人類黑素瘤細胞株，將此等細胞株注射至裸鼠中，且報導可溶性Tie-2導致腫瘤生長及腫瘤血管生成之顯著抑制。鑒於血管生成素-1及血管生成素-2與Tie-2結合，此等研究不清楚血管生成素-1、血管生成素-2或Tie-2是否將為用於抗癌療法之有吸引力的標靶。然而，認為有效抗血管生成素-2療法在治療諸如癌症之疾病中具有益處，其中進展視異常血管生成而定，其中阻斷該過程可導致預防疾病進展。(Folkman, J., *Nature Medicine.* 1 (1995) 27-31)。

另外，一些組已報導使用與血管生成素-2結合之抗體及肽。參見例如 US 6,166,185 及 US 2003/10124129。WO 03/030833、WO 2006/068953、WO 03/057134或US 2006/0122370。

血管生成素-2之病灶性表現的影響之研究已展示血管生成素-

1/Tie-2信號之拮抗使緊血管結構變松，進而使EC暴露於來自血管生成誘導物(例如VEGF)之活化信號(Hanahan, D., *Science*, 277 (1997) 48-50)。此由抑制血管生成素-1產生之促血管生成作用指示抗血管生成素-1療法將不為有效抗癌治療。

在發生血管重塑之位點處發展期間表現ANG-2。Maisonpierre, P.C.等人, *Science* 277 (1997) 55-60。在成人個體中，ANG-2表現受限於血管重塑位點以及高度血管化腫瘤，包括神經膠質瘤，Osada, H.等人, *Int. J. Oncol.* 18 (2001) 305-09；Koga, K.等人, *Cancer Res.* 61 (2001) 6248-54；肝細胞癌，Tanaka, S.等人, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 341-45；胃癌，Etoh, T.等人, *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53；Lee, J.H.等人, *Int. J. Oncol.* 18 (2001) 355-61；甲狀腺腫瘤，Bunone, G.等人, *Am J Pathol* 155 (1999) 1967-76；非小細胞肺癌，Wong, M.P.等人, *Lung Cancer* 29 (2000) 11-22；及結腸癌，Ahmad, S.A.等人, *Cancer* 92 (2001) 1138-43；及前列腺癌，J.H.等人, *Anticancer Res.* 20 (2000) 5217-20。發現一些腫瘤細胞表現ANG-2。舉例而言，Tanaka, S.等人, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 341-45在人類肝細胞癌(HCC)之12個樣本中之10個中偵測到ANG-2 mRNA。Ellis組報導ANG-2在腫瘤上皮中廣泛表現。Ahmad, S.A.等人, *Cancer* 92 (2001) 1138-43。其他研究者報導類似結果。Chen, L.等人, *J. Tongji Med. Univ.* 21 (2001) 228-35。藉由偵測存檔人類乳癌樣本中之ANG-2 mRNA水準，Sfiligoi, C.等人, *Int. J. Cancer* 103 (2003) 466-74報導ANG-2 mRNA與輔助淋巴結侵襲、無病時間短及整體存活率不佳顯著相關。Tanaka, F.等人, *Cancer Res.* 62 (2002) 7124-29綜述總計236個分別處於病理I期至IIIA期之非小細胞肺癌(NSCLC)患者。使用免疫組織化學，其發現16.9% NSCLC患者為ANG-2陽性。ANG-2陽性腫瘤之微血管密度比ANG-2陰性之微血管密度顯著更高。僅在VEGF表現較高時可見ANG-2之此類血管生成作

用。此外，ANG-2之陽性表現為預測不佳手術後存活率之一重要因素。Tanaka, F.等人, *Cancer Res.* 62 (2002) 7124-7129。然而，其發現Ang-1表現與微血管密度之間無重要相關性。Tanaka, F.等人, *Cancer Res.* 62 (2002) 7124-7129。此等結果表明ANG-2為患有幾種類型之癌症的患者之不佳預後的指標。

最近，使用ANG-2基因剔除小鼠模型，Yancopoulos組報導需要ANG-2用於產後血管生成。Gale, N.W.等人, *Dev. Cell* 3 (2002) 411-23。其展示在ANG-2基因剔除小鼠中不發生眼中類玻璃體脈管之發育程式化退化，且小鼠視網膜血管未能自視網膜中心動脈萌發出。Gale, N.W.等人, *Dev. Cell* 3 (2002) 411-423。其亦發現缺失ANG-2導致淋巴脈管之模式化及功能的深度缺陷。Gale, N.W.等人, *Dev. Cell* 3 (2002) 411-423。Ang-1基因拯救校正淋巴而非血管生成缺陷。Gale, N.W.等人, *Dev. Cell* 3 (2002) 411-423。

Peters及其同事報導可溶性Tie2在以重組蛋白或病毒表現載體之形式遞送時在小鼠模型中抑制鼠類乳房癌及黑素瘤之活體內生長。Lin, P.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 8829-34；Lin, P.等人, *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 2072-78。如此經治療之腫瘤組織中之血管密度大大降低。另外，可溶性Tie2阻斷由腫瘤細胞改良性培養基刺激之大鼠角膜中之血管生成。Lin, P.等人, *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 2072-78。此外，Isner及其小組展現添加ANG-2至VEGF比單獨VEGF促進顯著更長及更多圓周新血管生成。Asahara, T.等人, *Circ. Res.* 83 (1998) 233-40。過量可溶性Tie2受體藉由ANG-2排除經VEGF誘導之新血管生成之調節。Asahara, T.等人, *Circ. Res.* 83 (1998) 233-40。Siemeister, G.等人, *Cancer Res.* 59:3 (1999) 3185-91在裸鼠異種移植物之情況下展示過度表現異種移植物中之Flt-1或Tie2之胞外配位體-結合域導致顯著路徑抑制不可由另一者補償，表明VEGF受體路徑及

Tie2路徑應視為活體內血管生成過程所必需的兩個獨立介體。Siemeister, G.等人, *Cancer Res.* 59:3 (1999) 3185-3191。此由White, R., R.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 5028-33之最近出版物證實。在其研究中，展現特異性結合及抑制ANG-2之抗核酸酶RNA適體顯著抑制大鼠角膜微囊袋血管生成模型中由bFGF誘導之新血管生成。

眼部血管疾病，諸如年齡相關之黃斑退化(AMD)及糖尿病性視網膜病變(DR)分別歸因於異常脈絡膜或視網膜新血管生成。其為工業化國家中視力喪失之主要原因。由於視網膜由界限分明的神經元、神經膠質及血管元件之層組成，因此相對較小紊亂(諸如在血管增殖或水腫中可見之紊亂)可導致視覺功能顯著喪失。遺傳性視網膜變性(諸如視網膜色素變性(RP))亦與血管異常(諸如小動脈變窄及血管萎縮)相關。其影響多達1/3,500個個體，且其特徵在於進行性夜盲、視野喪失、視神經萎縮、小動脈變細及通常會發展為完全失明之中心視力喪失。

缺血性視網膜病之特徵在於視網膜脈管之損失或功能障礙，其導致血流減少及缺氧。視網膜藉由產生使新血管生長之信號來回應缺氧，但此等新血管通常脆弱且雜亂。此等異常新血管之生長產生大多數視力威脅，因為該等血管可能滲漏、導致出血或導致疤痕，可能最終引起視網膜剝離。目前對缺血性視網膜病之治療試圖中斷病理性血管之生長但不解決驅動其生長之根本性缺血。此外，糖尿病性視網膜病變(影響數百萬之缺血性視網膜病)之標準治療涉及在試圖停止新血管生長及保持中心視力中用雷射破壞視網膜之一部分。已採用策略來阻斷血管內皮生長因子(VEGF) (一種血管生長主要啟動子)之功能。在短期內，抗VEGF療法可提昇視力，但其不解決根本性缺血，且實際上由於其抑制所有血管生長(包括有益側支)可能加重此病狀。亦存

在此等藥物在老年及/或糖尿病患者中之全身性暴露的嚴重問題，其中在缺血性大腦、心臟或肢體中可能需要新血管生長。

通常，對於眼部疾病，經由玻璃體內應用通常使用之較小抗體片段(如Fab或Fab₂)，因為其具有低血清半衰期且全身性毒性風險較低。然而，此較小片段通常亦具有較低玻璃體內半衰期(例如歸因於較快擴散至血清中)且通常必須更經常給藥。

在一個結合臂中具有域替換/交換之多特異性抗體(CrossMabVH-VL)詳細描述於WO 2009/080252及Schaefer, W.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108 (2011) 11187-11191 (其以引用的方式併入本文中)中。其明顯地減少由針對第一抗原之輕鏈與針對第二抗原之錯誤重鏈失配(與無此類域交換之方法相比)而造成的副產物。然而，其製備並非完全不含副產物。主要副產物係基於本瓊型(Bence-Jones-type)相互作用。亦參見Schaefer, W.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108 (2011) 11187-11191；在增刊之圖S1I中)。

在WO 2010/040508中報導雙特異性抗VEGF/抗ANG-2抗體。人類FcRn結合修飾抗體及使用方法報導於WO 2014/177460中。Thomas, M.等人報導與泛血管生成素-1/-2抑制劑相比具有有效抗腫瘤及抗血管生成功效及優良副作用概況之新穎血管生成素-2選擇性完全人類抗體(PLOS One 8 (2013) E54923)。Papadopoulos, K. P.等人報導在患有晚期惡性實體腫瘤之患者中第I階段(首先在REGN910 (SAR307746)之人類研究中)完全人類及選擇性血管生成素-2 (Ang2)單株抗體(MAb) (摘要2517，2013年ASCO年會)。

【發明內容】

本發明提供抗ANG2抗體及其使用方法。在特定實施例中，該抗體為親和力成熟抗體。

如本文所報導之一個態樣為一種特異性結合於人類ANG2之抗

體，其中該抗體包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 20之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 21之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 23之HVR-H3。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，抗體進一步包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 25之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 26之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 27之HVR-L3。

如本文所報導之一個態樣為一種特異性結合於人類ANG2之抗體，其中該抗體包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 29之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 30之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 32之HVR-H3。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，抗體進一步包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 34之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 35之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 36之HVR-L3。

如本文所報導之一個態樣為一種特異性結合於人類ANG2之抗體，其中該抗體包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 38之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 39之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 41之HVR-H3。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，抗體進一步包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 43之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 44之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 45之HVR-L3。

在一個實施例中，抗體包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 19之重鏈可變域及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 33之輕鏈可變域。

如本文所報導之一個態樣為一種特異性結合於人類ANG2之抗體，其中該抗體

i) 包含與SEQ ID NO: 19具有超過70%、或85%、或90%、或95%序列一致性之重鏈可變域及與SEQ ID NO: 6具有超過70%、或85%、或90%、或95%序列一致性之輕鏈可變域，

ii) 在重鏈可變域中在位置28具有胺基酸殘基天冬醯胺(N)、在位置30具有胺基酸殘基丙胺酸(A)、在位置100b具有胺基酸殘基脯胺酸(P)及在位置100j具有胺基酸殘基丙胺酸(A)，且在輕鏈可變域中在位置51具有胺基酸殘基蘇胺酸(T) (根據Kabat編號)，及

iii) 與包含具有序列SEQ ID NO: 19之重鏈可變域及具有序列SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 33之輕鏈可變域的抗體相比，該抗體在使用穩定表現人類Tie2之HEK293細胞之基於細胞的分析中使用Tie2磷酸化ELISA測定的抑制ANG2結合於其受體Tie2之EC₅₀值較低。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，抗體為人類子類IgG1或人類子類IgG4。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，抗體為具有κ輕鏈之人類子類IgG1。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，抗體為具有λ輕鏈之人類子類IgG1。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，抗體為單株抗體。

如本文所報導之一個態樣為一種包含SEQ ID NO: 19之VH序列及SEQ ID NO: 24之VL序列的抗體。

如本文所報導之一個態樣為一種包含SEQ ID NO: 28之VH序列及SEQ ID NO: 33之VL序列的抗體。

如本文所報導之一個態樣為一種包含SEQ ID NO: 37之VH序列及

SEQ ID NO: 42之VL序列的抗體。

在一個實施例中，抗體為雙特異性抗體。

在所有態樣之一個實施例中，人類化抗體藉由抑制人類ANG2結合於Tie2受體來阻斷人類ANG2之生物活性。

如本文所報導之一個態樣為一種特異性結合於人類ANG2之抗體Fab片段，其中該抗體Fab片段包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 20之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 21之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 23之HVR-H3。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，抗體Fab片段進一步包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 25之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 26之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 27之HVR-L3。

如本文所報導之一個態樣為一種特異性結合於人類ANG2之抗體Fab片段，其中該抗體Fab片段包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 29之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 30之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 32之HVR-H3。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，抗體Fab片段進一步包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 34之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 35之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 36之HVR-L3。

如本文所報導之一個態樣為一種特異性結合於人類ANG2之抗體Fab片段，其中該抗體Fab片段包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 38之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 39之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 41之HVR-H3。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，抗體Fab片段進一步包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 43之HVR-L1；(b)包含胺基酸

序列SEQ ID NO: 44之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 45之HVR-L3。

如本文所報導之一個態樣為一種包含SEQ ID NO: 19之VH序列及SEQ ID NO: 24之VL序列的抗體Fab片段。

如本文所報導之一個態樣為一種包含SEQ ID NO: 28之VH序列及SEQ ID NO: 33之VL序列的抗體Fab片段。

如本文所報導之一個態樣為一種包含SEQ ID NO: 37之VH序列及SEQ ID NO: 42之VL序列的抗體Fab片段。

如本文所報導之一個態樣為一種特異性結合於人類ANG2之scFv抗體片段，其中該scFv抗體片段包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 20之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 21之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 23之HVR-H3。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，scFv抗體片段進一步包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 25之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 26之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 27之HVR-L3。

如本文所報導之一個態樣為一種特異性結合於人類ANG2之scFv抗體片段，其中該scFv抗體片段包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 29之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 30之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 32之HVR-H3。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，scFv抗體片段進一步包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 34之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 35之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 36之HVR-L3。

如本文所報導之一個態樣為一種特異性結合於人類ANG2之scFv抗體片段，其中該scFv抗體片段包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO:

38之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 39之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 41之HVR-H3。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，scFv抗體片段進一步包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 43之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 44之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 45之HVR-L3。

如本文所報導之一個態樣為一種包含SEQ ID NO: 19之VH序列及SEQ ID NO: 24之VL序列的scFv抗體片段。

如本文所報導之一個態樣為一種包含SEQ ID NO: 28之VH序列及SEQ ID NO: 33之VL序列的scFv抗體片段。

如本文所報導之一個態樣為一種包含SEQ ID NO: 37之VH序列及SEQ ID NO: 42之VL序列的scFv抗體片段。

如本文所報導之一個態樣為一種如在藉由X射線晶體學測定時本文所報導之抗體一樣與至少90%之ANG2殘基相互作用之抗ANG2抗體。

如本文所報導之一個態樣為一種如在藉由X射線晶體學測定時本文所報導之抗體一樣與至少相同ANG2殘基相互作用之抗ANG2抗體。

如本文所報導之一個態樣為一種如在藉由X射線晶體學測定時本文所報導之抗體一樣與至少90%之ANG2殘基相互作用且抑制ANG2結合於其受體之抗ANG2抗體。

如本文所報導之一個態樣為一種如在藉由X射線晶體學測定時本文所報導之抗體一樣與至少相同ANG2殘基相互作用且抑制ANG2結合於其受體之抗ANG2抗體。

如本文所報導之一個態樣為一種編碼如本文所報導之抗體的(分離)核酸。

如本文所報導之一個態樣為一種包含如本文所報導之核酸的宿主細胞。

如本文所報導之一個態樣為一種產生如本文所報導之抗體的方法，其包含培養如本文所報導之宿主細胞以產生抗體及自宿主細胞或培養基回收抗體。

如本文所報導之一個態樣為一種醫藥調配物，其包含如本文所報導之抗體及醫藥學上可接受之載劑。

在一個實施例中，醫藥調配物進一步包含額外治療劑。在一個實施例中，額外治療劑為抗VEGF抗體、抗-IL-1 β 抗體或抗-PDGF-B抗體。

如本文所報導之一個態樣為如本文所報導之抗體作為藥物之用途。

如本文所報導之一個態樣為如本文所報導之抗體用於治療血管疾病。

如本文所報導之一個態樣為一種醫藥組合物，其用於治療血管疾病。

如本文所報導之一個態樣為如本文所報導之抗體用於製造治療血管疾病的藥物之用途。

如本文所報導之一個態樣為一種藉由向需要此類治療之患者投與如本文所報導之抗體來治療罹患血管疾病之患者的方法。

如本文所報導之一個態樣為如本文所報導之抗體用於治療血管疾病，較佳用於治療癌症。

本發明之一個實施例為如本文所報導之抗體用於治療癌症。

如本文所報導之一個態樣為作為用於治療癌症的藥物之用途。

如本文所報導之一個態樣為如本文所報導之抗體用於製造治療癌症的藥物之用途。

如本文所報導之一個態樣為一種藉由向需要此類治療之患者投與如本文所報導之抗體來治療罹患癌症之患者的方法。

如本文所報導之一個態樣為作為用於預防癌轉移的藥物之用途。

如本文所報導之一個態樣為如本文所報導之抗體用於製造預防癌轉移的藥物之用途。

如本文所報導之一個態樣為一種藉由向需要此類預防性治療之患者投與如本文所報導之抗體來預防罹患原發癌之患者中癌轉移的方法。

如本文所報導之一個態樣為如本文所報導之抗體用於治療眼部血管疾病，較佳用於治療黃斑退化。

如本文所報導之抗體用於抑制ANG2與Tie2受體之間相互作用。

如本文所報導之一個態樣為如本文所報導之抗體用於製造藥物之用途。

在一個實施例中，該藥物用於治療眼部血管疾病，較佳用於治療黃斑退化。

在一個實施例中，該藥物用於抑制ANG2與Tie2受體之間相互作用。

如本文所報導之一個態樣為一種治療患有眼部血管疾病、較佳黃斑退化之個體的方法，其包含向該個體投與有效量之如本文所報導之抗體。

如本文所報導之一個態樣為一種抑制個體中ANG2與Tie2受體之間相互作用之方法，其包含向該個體投與有效量之如本文所報導之抗體來抑制ANG2與Tie2受體之間相互作用。

【圖式簡單說明】

無

【實施方式】

I. 定義

出於本文之目的，「接受體人類構架」為包含源於如下文所定義之人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之輕鏈可變域(VL)構架或重鏈可變域(VH)構架之胺基酸序列的構架。「源於」人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之接受體人類構架可包含人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之相同胺基酸序列，或其可含有胺基酸序列變化。在一些實施例中，胺基酸變化之數目為10個或10個以下、9個或9個以下、8個或8個以下、7個或7個以下、6個或6個以下、5個或5個以下、4個或4個以下、3個或3個以下或2個或2個以下。在一些實施例中，VL接受體人類構架之序列與VL人類免疫球蛋白構架序列或人類共同構架序列一致。

「親和力」係指分子(例如，抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如，抗原)之間的非共價相互作用之總和的強度。除非另外指示，否則如本文所用，「結合親和力」係指反映結合對(例如，抗體與抗原)成員之間1:1相互作用之固有結合親和力。分子X對其搭配物Y之親和力一般可由解離常數(k_d)表示。可藉由此項技術中已知之常用方法(包括本文所描述之方法)量測親和力。用於量測結合親和力之特定說明性及例示性實施例描述於下文中。

「親和力成熟」抗體係指相比於在一或多個高變區(HVR)中不具有一或多個變化之親本抗體，在一或多個高變區中具有此類變化之抗體，此類變化使抗體對抗原之親和力得到改良。

術語「抗ANG2抗體」及「結合於ANG2之抗體」係指能夠以足夠親和力結合ANG2之抗體，使得該抗體適用作靶向ANG2之診斷劑及/或治療劑。在一個實施例中，抗ANG2抗體與不相關非ANG2蛋白之結合程度小於該抗體與ANG2之結合的約10%，如例如藉由ELISA

或表面電漿子共振量測。在某些實施例中，結合於ANG2之抗體之解離常數(KD)為 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 或 $\leq 10 \text{ nM}$ (例如 10^{-8} M 或 10^{-8} M 以下)。在某些實施例中，抗ANG2抗體與保存在來自不同物種之ANG2中的ANG2抗原決定基結合。

術語「抗體」在本文中以最廣泛意義使用且涵蓋各種抗體結構，包括(但不限於)單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如，雙特異性抗體)及抗體片段，只要其展現所需抗原結合活性即可。

「抗體片段」係指除完整抗體之外的分子，其包含結合完整抗體所結合之抗原的完整抗體之一部分。抗體片段之實例包括(但不限於) Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；雙功能抗體；線性抗體；單鏈抗體分子(例如scFv)；及由抗體片段形成之多特異性抗體。

與參考抗體「結合於相同抗原決定基之抗體」係指具有與至少與參考抗體相同之胺基酸殘基之相互作用的抗體。此等相互作用為例如帶電荷胺基酸殘基之間的離子相互作用或疏水性胺基酸殘基之間的疏水相互作用。

術語「嵌合」抗體係指重鏈及/或輕鏈之一部分源於特定來源或物種，同時重鏈及/或輕鏈之其餘部分源於不同來源或物種之抗體。

如本文所用之術語「癌症」係指增殖性疾病，諸如淋巴瘤、淋巴球性白血病、肺癌、非小細胞肺(NSCL)癌、支氣管肺泡細胞肺癌、骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭癌或頸癌、皮膚或眼內黑素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門區癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、結腸癌、乳癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、膀胱癌、腎癌或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、間皮瘤、肝細胞癌、膽道癌、中樞神經系統

(CNS)贅瘤、脊軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、神經鞘瘤、室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、腦膜瘤、鱗狀細胞癌、垂體腺瘤及尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)，包括任一上述癌症之難治癒型式，或上述癌症中之一或多者的組合。

抗體之「類別」係指其重鏈所具有之恆定域或恆定區的類型。存在五個主要類別之抗體：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且此等抗體中之幾個可進一步分成子類(同型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同類別之免疫球蛋白之重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。

術語「免疫結合物」指示抗體與非抗體部分之間的共價結合物。此類非抗體部分可為可偵測標記、效應分子或細胞毒性劑。

如本文所用之術語「細胞毒性劑」係指抑制或預防細胞功能及/或引起細胞死亡或破壞之物質。細胞毒性劑包括(但不限於)放射性同位素(例如，At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²及Lu之放射性同位素)；化學治療劑或藥物(例如，甲胺喋呤(methotrexate)、阿德力黴素(adriamycin)、長春花生物鹼(長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、依託泊苷(etoposide))、小紅莓(doxorubicin)、美法侖(melphalan)、絲裂黴素C (mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道諾黴素(daunorubicin)或其他插入劑)；生長抑制劑；酶及其片段，諸如溶核酶；抗生素；毒素，諸如小分子毒素或細菌、真菌、植物或動物來源之酶促活性毒素，包括其片段及/或變異體；及以下所揭示之各種抗腫瘤劑或抗癌劑。

「效應功能」係指可歸因於抗體之Fc區之彼等生物活性，其隨抗體類別變化。抗體效應功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體)之下調；及B細

胞活化。

藥劑(例如，醫藥調配物)之「有效量」係指以所需劑量及持續所需時間段有效達成所要治療或預防結果之量。

本文之術語「Fc區」用於定義含有至少一部分恆定區之免疫球蛋白重鏈之C端區。該術語包括天然序列Fc區及變異Fc區。在一個實施例中，人類IgG重鏈Fc區自Cys226或自Pro230延伸至重鏈之羧基端。然而，Fc區之C端離胺酸(Lys447)或C端甘胺醯基-離胺酸二肽(Gly446Lys447)可能存在或可能不存在。除非本文另外說明，否則Fc區或恆定區中之胺基酸殘基之編號係根據EU編號系統，亦稱為EU索引，如描述於Kabat, E.A.等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242中。

「構架」或「FR」係指除高變區(HVR)殘基之外的可變域殘基。可變域之FR一般由四個FR域：FR1、FR2、FR3及FR4組成。因此，在VH (或VL)中，HVR及FR序列一般依以下序列呈現：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

術語「全長抗體」、「完整抗體」及「完全抗體」在本文中可互換使用來指結構實質上類似於天然抗體結構或具有含有如本文所定義之Fc區之重鏈的抗體。

術語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及「宿主細胞培養物」可互換使用且係指已引入外源核酸之細胞，包括此類細胞之後代。宿主細胞包括「轉型體」及「轉型細胞」，其包括初級轉型細胞及自其衍生之後代(不考慮繼代次數)。後代與母細胞之核酸含量可能不完全相同，但可能含有突變。本文包括具有與針對最初轉型細胞所篩選或選擇相同的功能或生物活性之突變後代。

「人類抗體」為胺基酸序列對應於由人類或人類細胞產生或源

於利用人類抗體譜系或其他編碼人類抗體之序列之非人類來源的抗體之胺基酸序列的抗體。人類抗體之此定義特定排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

「人類共同構架」為表示所選人類免疫球蛋白VL或VH構架序列中最常出現之胺基酸殘基之構架。一般而言，人類免疫球蛋白VL或VH序列係選自可變域序列之亞群。一般而言，序列亞群為如Kabat, E.A.等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, 第1-3卷中之亞群。在一個實施例中，對於VL，亞群為如Kabat等人(見上文)中之亞群κ I。在一個實施例中，對於VH，亞群為如Kabat等人(見上文)中之亞群III。

「人類化」抗體係指包含來自非人類HVR之胺基酸殘基及來自人類FR之胺基酸殘基的嵌合抗體。在某些實施例中，人類化抗體將包含至少一個且通常兩個可變域之實質上全部，其中全部或實質上全部HVR (例如，CDR)皆對應於非人類抗體之HVR，且全部或實質上全部FR皆對應於人類抗體之FR。人類化抗體視情況可包含源於人類抗體之抗體恆定區之至少一部分。抗體(例如，非人類抗體)之「人類化形式」係指已經歷人類化之抗體。

如本文所用之術語「高變區」或「HVR」係指抗體可變域中序列高變(「互補決定區」或「CDR」)及/或形成結構上定義環(「高變環」)及/或含有接觸抗原之殘基(「抗原觸點」)之各區域。一般而言，抗體包含六個HVR；三個在VH中(H1、H2、H3)，且三個在VL中(L1、L2、L3)。

本文之HVR包括

(a) 出現在胺基酸殘基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)及96-101 (H3)處之高變環(Chothia, C.及Lesk,

A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917) ;

(b) 出現在胺基酸殘基24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2)及95-102 (H3)處之CDR (Kabat, E.A. 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.) ;

(c) 出現在胺基酸殘基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2)及93-101 (H3)處之抗原觸點(MacCallum 等人 J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)) ; 及

(d) (a)、(b)及/或(c)之組合，包括HVR胺基酸殘基46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3)及94-102 (H3)。

除非另外指示，否則在本文中，根據Kabat等人(見上文)對可變域中之HVR殘基及其他殘基(例如，FR殘基)進行編號。

「免疫結合物」為與一或多個異源分子結合之抗體。

「個體(individual/subject)」為哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)馴養動物(例如牛、羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如人類及非人類靈長類動物，諸如猴)、兔及啮齒動物(例如，小鼠及大鼠)。在某些實施例中，該個體(individual/subject)為人類。

「分離」抗體為已與其天然環境之組分分離之抗體。在一些實施例中，抗體純化至大於95%或99%之純度，如藉由例如電泳(例如，SDS-PAGE、等電聚焦(IEF)、毛細電泳法)或層析(例如，離子交換或逆相HPLC)所測定。關於評估抗體純度之方法之綜述，參見例如 Flatman, S. 等人, J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87。

「分離」核酸係指已與其天然環境之組分分離之核酸分子。分離核酸包括通常含有核酸分子之細胞中所含的核酸分子，但該核酸分

子存在於染色體外或在不同於其天然染色體位置之染色體位置。

「編碼抗ANG2抗體之分離核酸」係指編碼抗體重鏈及輕鏈(或其片段)之一或多個核酸分子，包括單一載體或各別載體中之此類核酸分子及存在於宿主細胞中之一或多個位置之此類核酸分子。

根據本發明之術語「癌轉移」係指癌細胞自原發腫瘤傳輸至患者中其他處之一或多個位點，隨後在該等位點發展繼發腫瘤。判定癌症是否已轉移之手段為此項技術中已知且包括骨掃描、胸部X射線、CAT掃描、MRI掃描及腫瘤標記測試。

如本文所用之術語「預防癌轉移」或「預防繼發腫瘤」具有相同意義且係指對抗罹患癌症之患者中癌轉移之預防劑，以此方式抑制或減少癌細胞自原發腫瘤進一步傳輸至患者中其他處之一或多個位點。此意謂預防、延遲或減少原發腫瘤或癌症之癌轉移，且因此預防、延遲或減少繼發腫瘤發展。較佳地，預防或減少癌轉移，亦即肺之繼發腫瘤，意謂預防或減少癌細胞自原發腫瘤轉移傳輸至肺。

如本文所用之術語「單株抗體」係指自實質上均質抗體之群體獲得之抗體，亦即除可能變異抗體(例如，含有天然存在之突變或在產生單株抗體製劑期間出現之變異抗體，此類變異體一般以較小量存在)之外，構成該群體之個別抗體相同及/或結合相同抗原決定基。相比於通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑，單株抗體製劑之各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。因此，修飾語「單株」指示抗體之特徵為自實質上均質之抗體群體獲得，且不應解釋為需要藉由任何特定方法產生該抗體。舉例而言，根據本發明使用之單株抗體可藉由多種技術製得，包括(但不限於)融合瘤方法、重組DNA方法、噬菌體呈現方法及利用含有全部或部分人類免疫球蛋白基因座之轉殖基因動物的方法、本文所描述之製得單株抗體之此類方法及其他例示性方法。

「裸抗體」係指未與異源部分(例如，細胞毒性部分)或放射性標記結合之抗體。裸抗體可以醫藥調配物形式存在。

「天然抗體」係指具有不同結構之天然存在之免疫球蛋白分子。舉例而言，天然IgG抗體為約150,000道爾頓(dalton)之雜四聚體醣蛋白，其由二硫鍵鍵結之兩個相同輕鏈及兩個相同重鏈組成。自N端至C端，各重鏈具有可變區(VH)，亦稱為可變重鏈域或重鏈可變域，繼而三個恆定域(CH1、CH2及CH3)。類似地，自N端至C端，各輕鏈具有可變區(VL)，亦稱為可變輕鏈域或輕鏈可變域，繼而恆定輕鏈(CL)域。抗體輕鏈可基於其恆定域之胺基酸序列歸為兩種類型中之一種，稱為 κ 及 λ 。

術語「藥品說明書」用於指通常包括於治療性產品之商業包裝中之說明書，其含有關於與使用此類治療性產品有關之適應症、用法、劑量、投藥、組合療法、禁忌及/或警告的資訊。

相對於參考多肽序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為在比對參考多肽序列與候選序列且必要時引入間隙以達成最大序列一致性百分比之後，且在不將任何保守取代視為序列一致性之一部分的情況下，候選序列中與參考多肽序列中之胺基酸殘基一致的胺基酸殘基之百分比。出於測定胺基酸序列一致性百分比之目的之比對可以此項技術中之技能範圍內的各種方式達成，例如使用公開可獲得之電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體。熟習此項技術者可測定用於比對序列之適當參數，包括在所比較序列之全長內達成最大比對所需的任何算法。然而，出於本文之目的，使用序列比較電腦程式ALIGN-2產生胺基酸序列一致性%值。ALIGN-2序列比較電腦程式由Genentech, Inc.創作，且原始碼已隨使用者文件一起提交於美國版權局(U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559，其在美國版權局以美國版權登記號TXU510087登記。

ALIGN-2 程式可公開購自 Genentech, Inc., South San Francisco, California或可自原始碼編譯。ALIGN-2程式應經編譯以用於UNIX操作系統，包括數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數由ALIGN-2程式設置且不變化。

在採用ALIGN-2進行胺基酸序列比較之情形下，既定胺基酸序列A相對於、與或針對既定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性% (或者其可表述為，既定胺基酸序列A具有或包含相對於、與或針對既定胺基酸序列B的一定胺基酸序列一致性%)如下計算：

100乘以分率X/Y

其中X為在A與B之程式比對中藉由序列比對程式ALIGN-2評為一致匹配之胺基酸殘基的數目，且其中Y為B中之胺基酸殘基的總數目。應瞭解，在胺基酸序列A之長度與胺基酸序列B之長度不相等的情況下，A相對於B之胺基酸序列一致性%與B相對於A之胺基酸序列一致性%將不相等。除非另外特定陳述，否則本文所用之所有胺基酸序列一致性%值如緊接前述段落中所描述使用ALIGN-2電腦程式獲得。

術語「醫藥調配物」係指呈准許其中所含活性成分之生物活性有效之形式且不含對將投與調配物之個體具有不可接受毒性之額外組分的製劑。

「醫藥學上可接受之載劑」係指醫藥調配物中之除活性成分之外對個體無毒的成分。醫藥學上可接受之載劑包括(但不限於)緩衝劑、賦形劑、穩定劑或防腐劑。

如本文所用之術語「ANG2」係指人類血管生成素-2(ANG-2) (或者簡稱為ANGPT2或ANG2) (SEQ ID NO: 54)，其描述於例如Maisonpierre, P.C.等人, Science 277 (1997) 55-60及Cheung, A.H.等人, Genomics 48 (1998) 389-91中。發現血管生成素-1及血管生成素-2為

選擇性表現於血管內皮內之酪胺酸激酶家族(Tie)之配位體(Yancopoulos, G.D.等人, *Nature* 407 (2000) 242-248)。現存在血管生成素家族之四個確定成員。血管生成素-3及血管生成素-4 (ANG3及ANG4)可表示小鼠及人中之相同基因座之廣泛不同對應物(參見例如Kim, I.等人, *FEBS Lett.*, 443 (1999) 353-56; Kim, I.等人, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 26523-26528)。ANG1及ANG2最初在組織培養實驗中分別鑑別為促效劑及拮抗劑(對於ANG-1, 參見: Davis, S.等人, *Cell* 87 (1996) 1161-69; 及對於ANG-2, 參見: Maisonpierre, P.C.等人, *Science* 277 (1997) 55-60)。所有已知血管生成素主要與Tie2結合, 且ANG1及ANG2以3 nM (Kd)親和力結合於Tie2 (Maisonpierre, P.C.等人, *Science* 277 (1997) 55-60)。

如本文所用,「治療(treatment)」(及其語法變化形式, 諸如「治療(treat/treating)」)係指試圖改變所治療個體之自然病程的臨床干預, 且可出於預防目的或在臨床病理學之病程期間進行。所需治療作用包括(但不限於)預防疾病發生或復發、緩解症狀、減輕疾病之任何直接或間接病理性後果、預防癌轉移、降低疾病進展速率、改善或緩和疾病病況及緩解或改善預後。在一些實施例中, 本發明抗體用於延遲疾病發展或減慢疾病進展。

術語「可變區」或「可變域」係指參與抗體結合抗原之抗體重鏈或輕鏈域。天然抗體之重鏈及輕鏈(分別為VH及VL)可變域一般具有類似結構, 其中各域皆包含四個保守構架區(FR)及三個高變區(HVR)。(參見例如Kindt, T.J.等人 *Kuby Immunology*, 第6版, W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), 第91頁)單一VH或VL域可足以賦予抗原結合特異性。此外, 可使用來自結合抗原之抗體的VH或VL域分離結合特定抗原之抗體以分別篩選互補VL或VH域之庫。參見例如Portolano, S.等人, *J. Immunol.* 150 (1993) 880-887; Clackson, T.等人,

Nature 352 (1991) 624-628)。

術語「血管疾病」包括癌症、發炎性疾病、動脈粥樣硬化、缺血、創傷、敗血症、COPD、哮喘、糖尿病、AMD、視網膜病、中風、肥胖症、急性肺損傷、出血、血管滲漏(例如細胞激素誘導)、過敏症、格雷夫氏病(Graves'Disease)、橋本氏自體免疫甲狀腺炎(Hashimoto's Autoimmune Thyroiditis)、特發性血小板減少性紫癜、巨細胞動脈炎、類風濕性關節炎、全身性紅斑性狼瘡症(SLE)、狼瘡性腎炎、克羅恩氏病(Crohn's Disease)、多發性硬化症、潰瘍性結腸炎，尤其實體腫瘤、眼內新生血管性症候群(諸如增殖性視網膜病或年齡相關之黃斑退化(AMD))、類風濕性關節炎及牛皮癬(Folkman, J.等人, J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934；Klagsbrun; M.等人, Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239；及 Garner, A., Vascular diseases, 於: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A.及Klintworth, G.K., (編), 第2版, Marcel Dekker, New York (1994), 第1625-1710頁)。

如本文所用之術語「載體」係指能夠傳播其所連接之另一核酸的核酸分子。該術語包括作為自我複製核酸結構的載體以及併入已引入其之宿主細胞之基因組中的載體。某些載體能夠導引其可操作地連接之核酸的表現。此類載體在本文中稱為「表現載體」。

II. 組合物及方法

本文報導具有改良之親和力的抗ANG2抗體。

本發明抗體為適用的，例如用於治療血管疾病(諸如眼部血管疾病，例如黃斑退化)或癌症。

根據本發明之抗體具有使罹患此類疾病(尤其罹患癌症或黃斑退化)之患者受益之高價值特性。如本文所報導之抗體極有效抑制血管生成或血管疾病。

根據本發明之抗體將在以下各者中為有效的

- a) 腫瘤生長抑制，及/或
- b) 腫瘤血管生成或血管疾病之抑制，及/或
- c) 黃斑退化之抑制。

A. 如本文所報導之例示性抗ANG2抗體

本文報導具有改良之結合特性的抗ANG2抗體及其片段。

人類ANG2結合動力學：

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

*親合力。

食蟹獼猴ANG2結合動力學：

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

下表中給出如藉由根據如本文所報導之抗體之實例6的分析所測定之相對生物活性。

分子	相對生物活性[%]
0009	72
0041	838
0075	128
0090	706
0098	100

已藉由測定聚集起始溫度(T_{agg})及熔融溫度(T_m)來評估不同抗體之熱穩定性(參見下表)。

分子	T_{agg} [°C]	T_m [°C]
0009	62.2	65.9

分子	Tagg [°C]	Tm [°C]
0041	63.1	66.0
0075	63.6	67.0
0090	64.0	67.4

另外，該等抗體在壓力測試中展示良好穩定性。已使用表面電漿子共振測定結合活性(參見下表)。

分子	相對結合活性	
	在37°C、pH 7.4下2週	在40°C、pH 6.0下2週
0009	99%	91%
0041	100%	101%
0075	101%	105%
0090	112%	100%

100 % = 樣品儲存在-80°C 下

在CE-SDS分析中可見相同穩定性(參見下表)。

分子	相對面積%		
	開始	在37°C、pH 7.4下2週	在40°C、pH 6.0下2週
0009	98.9	98.5	98.8
0041	98.9	98.6	98.6
0090	99.2	98.5	98.2

以下各表概述如本文所報導之抗體之特性。

分子	0009	0015	0016	0017	0021	0025	0026
格式	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1
ANG2之價數	1	1	1	1	1	1	1
差異	參考分子	VH: S100dP VL: wt	VH: S100dP Y100fP VL: wt	VH: S54C D100bC VL: wt	VH: G100jA VL: wt	VH: T28N T30V VL: wt	VH: T28N T30A VL: wt
SEQ ID NO:	HC: 46 LC: 49	HC: 57 LC: 49	HC: 58 LC: 49	HC: 59 LC: 49	HC: 60 LC: 49	HC: 61 LC: 49	HC: 62 LC: 49
ka [1/Ms]	2.15E+06	1.87E+06		3.03E+06	3.35E+06		2.03E+06
kd [1/s]	7.23E-02	1.49E-02		3.57E-02	3.00E-02		3.71E-02
KD [nM]	34	8		12	9		18
t _{1/2} (s)	10	46	3	19	23	10	19
第一純化步驟	kappa select	kappa select		kappa select	kappa select		kappa select
尺度[l]	0.3	0.3		0.3	0.3		0.3
產量 [mg/l 上清液]	123	153		136	103		77
單體 (SEC) [%]	78	76		72	74		87
單體 (CE-SDS) [%]	80	66		92	77		89
第二純化步驟	SEC	SEC		SEC	SEC		SEC

分子	0009	0015	0016	0017	0021	0025	0026
產量 [mg/l 上清液]	80	77		60	60		54
單體 (SEC) [%]	> 99	98		96	> 99		>99
單體 (CE-SDS) [%]	> 99	99		99	99		98
結合抑制 ANG2 tie2 受體EC50 [nM]	69						
T _{agg} [°C]	62						
T _m [°C]	66						
在pH 6.0下培育2週後損失 ANG2結合	9						
在pH 7.4下培育2週後損失 ANG2結合	1						

分子	0027	0028	0029	0031	0032	0033	0039
格式	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1
ANG2之價數	1	1	1	1	1	1	1
差異	VH: T28N T30K VL: wt	VH: T30K VL: wt	VH: S100dP G100jA VL: wt	VH: wt VL: Y48W	VH: wt VL: D49S	VH: T28N S100dP G100jA VL: wt	VH: D100bT VL: D50T
SEQ ID NO:	HC: 63 LC: 49	HC: 64 LC: 49	HC: 65 LC: 49	HC: 46 LC: 66	HC: 46 LC: 67	HC: 68 LC: 49	HC: 69 LC: 50
ka [1/Ms]			2.41E+06			7.53E+05	1.14E+06
kd [1/s]			4.24E-03			2.25E-03	0.1848
KD [nM]			2			3	162
t _{1/2} (s)	5	3	164	2	5	308	4
第一純化步驟			kappa select			kappa select	
尺度[l]			0.3			0.3	
產量 [mg/l 上清液]			136				
單體 (SEC) [%]			80			48	
單體 (CE-SDS) [%]			76			16+41	
第二純化步驟			SEC			SEC	
產量 [mg/l 上清液]			89			54	

分子	0027	0028	0029	0031	0032	0033	0039
單體 (SEC) [%]			>99			>99	
單體 (CE- SDS) [%]			98			27+72	
結合抑制 ANG2 tie2受 體EC50 [nM]							
T_agg [°C]							
T_m [°C]							
在pH 6.0下培 育2週後損失 ANG2結合							
在pH 7.4下培 育2週後損失 ANG2結合							

分子	0040	0041	0042	0057	0058	0060	0061
格式	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1
ANG2之價數	1	1	1	1	1	1	1
差異	VH: S100dP G100jA T28N T30V VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30K VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bE VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bT VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bE VL: D50T	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bT VL: D50T
SEQ ID NO:	HC: 70 LC: 49	HC: 47 LC: 49	HC: 71 LC: 49	HC: 72 LC: 49	HC: 73 LC: 49	HC: 72 LC: 50	HC: 73 LC: 50
ka [1/Ms]	2.59E+06	3.85E+06	3.22E+06	3.28E+06	1.80E+06	3.72E+06	1.80E+06
kd [1/s]	5.92E-03	3.17E-03	1.28E-02	0.09483	0.03832	0.0786	0.03145
KD [nM]	23	1	4	29	21	21	18
t _{1/2} (s)	117	219	54	7	18	9	22
第一純化步驟		kappa select					
尺度[μ]		0.5					
產量 [mg/l 上 清液]		206					
單體 (SEC) [%]		74					
單體(CE-SDS) [%]		77					
第二純化步驟		SEC					
產量 [mg/l 上 清液]		136					
單體 (SEC)		>98					

分子	0040	0041	0042	0057	0058	0060	0061
[%]							
單體(CE-SDS) [%]		97					
結 合 抑 制 ANG2 tie2 受 體EC50 [nM]		5.4					
T _{agg} [°C]		63				64	64
T _m [°C]		67				67	67
在pH 6.0下培 育2週後損失 ANG2結合		0				0	3
在pH 7.4下培 育2週後損失 ANG2結合		0				1	3

分子	0074	0075	0076	0077	0090	IgG	0098
格式	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	MAb	CrossMab CL-CH1
ANG2之價數	1	1	1	1	1	2	2
差異	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bS VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bS VL: D50T	VH: D100bS VL: wt	VH: D100bS VL: D50T	VH: S100dP G100jA T28N T30A VL: D50T	參考分子	VH: wt VL: wt
SEQ ID NO:	HC: 48 LC: 49	HC: 48 LC: 50	HC: 74 LC: 49	HC: 74 LC: 50	HC: 47 LC: 50	HC: 75 LC: 76	HC: 51 LC: 49
ka [1/Ms]	2.27E+06	2.22E+06	1.06E+06	1.05E+06	2.16E+06		1.56E+07
kd [1/s]	3.66E-02	3.10E-02	2.60E-01	2.58E-01	2.53E-03		1.58E-04
KD [nM]	16	14	247	247	1		0.01
t _{1/2} (s)	19	22	3	3	274		4381
第一純化步驟		kappa select			kappa select		MabSelec tSuRe
尺度[l]		0.3			0.5		1
產量[mg/l上清 液]		157			92		302
單體(SEC) [%]		70			80		
單體(CE-SDS) [%]		77			95		
第二純化步驟		SEC			SEC		HIC+SEC
產量[mg/l上清 液]		95			69		42
單體(SEC) [%]		>98			>98		>98
單體(CE-SDS) [%]		>99			99		99

分子	0074	0075	0076	0077	0090	IgG	0098
結合抑制 ANG2 tie2 受 體EC50 [nM]		39			7	3.9	3.1
T_agg [°C]		64			64		
T_m [°C]		67			67		
在pH 6.0下培 育2週後損失 ANG2結合		0			0		
在pH 7.4下培 育2週後損失 ANG2結合		0			0		

分子	0099	0100	0101	0154	0155	0156	0157
格式	CrossMab CL-CH1	CrossMab CL-CH1	CrossMab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1
ANG2之價數	2	2	2	1	1	1	1
差異	VH: S100dP G100jA T28N T30A VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A VL: D50T	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bE VL: D50T	VH: wt VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A VL: D50T	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bS VL: D50T	VH: wt VL: D50T
SEQ ID NO:	HC: 52 LC: 49	HC: 52 LC: 50	HC: 53 LC: 50	HC: 46 LC: 77	HC: 47 LC: 78	HC: 48 LC: 78	HC: 46 LC: 50
ka [1/Ms]	2.61E+07	2.06E+07	1.83E+07				
kd [1/s]	1.10E-04	1.67E-04	1.20E-04				
KD [nM]	0.004	0.008	0.007				
t _{1/2} (s)	6284	4156	5771				
第一純化步驟	MabSelec tSuRe	MabSelec tSuRe	MabSelect SuRe	kappa select	kappa select	kappa select	kappa select
尺度[l]	1	1	1				
產量 [mg/l 上清 液]	270	221	153				
單體(SEC) [%]	33	34					
單體 (CE-SDS) [%]			83				
第二純化步驟	HIC+SEC	HIC+SEC	HIC+SEC				
產量 [mg/l 上清 液]	52	78	74				
單體(SEC) [%]	>98	>98	>99				
單體 (CE-SDS) [%]	99	99	95				
結合抑制ANG2 tie2 受體 EC50 [nM]	3.2	3.2	3				

分子	0099	0100	0101	0154	0155	0156	0157
T _{agg} [°C]				61	61	61	61
T _m [°C]				63	64	64	64
在pH 6.0下培育 2 週 後 損 失 ANG2結合							
在pH 7.4下培育 2 週 後 損 失 ANG2結合							

分子	0162	0163	0164	0165	0166	0167
格式	CrossMab CL-CH1	CrossMab CL-CH1	CrossMab CL-CH1	CrossMab CL-CH1	CrossMab CL-CH1	CrossMab CL-CH1
ANG2之價數	1	1	1	1	1	1
差異	參考分子 ANG2: wt1 VEGF: wt1	ANG2: VH: S100dP G100jA T30A T28N VL: D50T VEGF: VH: wt1 VL: wt1	ANG2: VH: S100dP G100jA T30A T28N D100bS VL: D50T VEGF: VH: wt1 VL: wt1	ANG2: VH: S100dP G100jA T30A T28N VL: D50T VEGF: VH: wt2 VL: wt2	ANG2: VH: S100dP G100jA T30A T28N D100bS VL: D50T VEGF: VH: wt2 VL: wt2	參考分子 ANG2: wt2 VEGF: wt2
SEQ ID NO:	ANG2: HC: 79 LC: 80 VEGF: LC: 81 HC: 82	ANG2: HC: 83 LC: 84 VEGF: LC: 81 HC: 82	ANG2: HC: 85 LC: 86 VEGF: LC: 81 HC: 82	ANG2: HC: 89 LC: 90 VEGF: HC: 87 LC: 88	ANG2: HC: 91 LC: 92 VEGF: HC: 87 LC: 88	ANG2: HC: 93 LC: 94 VEGF: HC: 87 LC: 88
ka [1/Ms]						
kd [1/s]						
KD [nM]						
t _{1/2} (s)						
第一純化步驟	MabSelect SuRe	MabSelect SuRe	MabSelect SuRe	kappa select	kappa select	kappa select
尺度[l]						
產量[mg/l上清液]						
單體(SEC) [%]						
單體(CE-SDS) [%]						
第二純化步驟						
產量[mg/l上清液]						
單體(SEC) [%]						
單體(CE-SDS) [%]						
結合抑制ANG2 tie2 受體EC50 [nM]						

分子	0162	0163	0164	0165	0166	0167
T _{agg} [°C]	60	60	60	60	60	60
T _m [°C]	64	65	65	66	66	66
在pH 6.0下培育2週 後損失ANG2結合						
在pH 7.4下培育2週 後損失ANG2結合						

如本文所報導之態樣為如上述各表中所給出之重鏈及輕鏈之所有個別組合。

如本文所報導之一個態樣為一種人類化抗人類ANG2抗體，其包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 29之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 30之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 32之HVR-H3。在一個實施例中，該抗體進一步包含(d)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 34之HVR-L1；(e)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 35之HVR-L2；及(f)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 36之HVR-L3。

如本文所報導之一個態樣為一種人類化抗人類ANG2抗體，其包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 29之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 31之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 32之HVR-H3。在一個實施例中，該抗體進一步包含(d)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 34之HVR-L1；(e)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 35之HVR-L2；及(f)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 36之HVR-L3。

在一個態樣中，本發明提供一種包含選自以下之至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個HVR之抗ANG2抗體：(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 29之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 30之HVR-H2；(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 32之HVR-H3；(d)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 34之HVR-L1；(e)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 35之HVR-L2；及(f)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 36之HVR-L3。

在一個態樣中，本發明提供一種包含選自以下之至少一個、至少兩個或所有三個VH HVR序列之抗體：(a)包含胺基酸序列SEQ ID

NO: 29之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 30之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 32之HVR-H3。在一個實施例中，該抗體包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO: 32之HVR-H3。在另一實施例中，該抗體包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO: 32之HVR-H3及包含胺基酸序列SEQ ID NO: 36之HVR-L3在又一實施例中，該抗體包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO: 32之HVR-H3、包含胺基酸序列SEQ ID NO: 36之HVR-L3及包含胺基酸序列SEQ ID NO: 30之HVR-H2。在又一實施例中，該抗體包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 29之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 30之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 32之HVR-H3。

在另一態樣中，本發明提供一種包含選自以下之至少一個、至少兩個或所有三個VL HVR序列之抗體：(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 34之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 35之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 36之HVR-L3。在一個實施例中，該抗體包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 34之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 35之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 36之HVR-L3。

在另一態樣中，本發明抗體包含(a) VH域，其包含選自以下之至少一個、至少兩個或所有三個VH HVR序列：(i)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 29之HVR-H1、(ii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 30之HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO: 32之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含選自以下之至少一個、至少兩個或所有三個VL HVR序列：(i)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 34之HVR-L1、(ii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 35之HVR-L2及(iii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 36之HVR-L3。

在另一態樣中，本發明提供一種抗體，其包含(a)包含胺基酸序

列SEQ ID NO: 29之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 31之HVR-H2；(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 32之HVR-H3；(d)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 34之HVR-L1；(e)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 35之HVR-L2；及(f)包含選自SEQ ID NO: 36之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，抗ANG2抗體包含與胺基酸序列SEQ ID NO: 28具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之重鏈可變域(VH)序列。在某些實施例中，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之VH序列相對於參考序列含有取代(例如，保守取代)、插入或缺失，但包含彼序列之抗ANG2抗體保留與ANG2結合之能力。在某些實施例中，在SEQ ID NO: 28中已取代、插入及/或缺失總計1至10個胺基酸。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR外部區域中(亦即，在FR中)。視情況，抗ANG2抗體包含SEQ ID NO: 28中之VH序列，包括彼序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，VH包含選自以下之一個、兩個或三個HVR：(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 29之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 30之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 32之HVR-H3。

在另一態樣中，提供一種抗ANG2抗體，其中該抗體包含與胺基酸序列SEQ ID NO: 33具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之輕鏈可變域(VL)。在某些實施例中，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之VL序列相對於參考序列含有取代(例如，保守取代)、插入或缺失，但包含彼序列之抗ANG2抗體保留與ANG2結合之能力。在某些實施例中，在SEQ ID NO: 33中已取代、插入及/或缺失總計1至10個胺基酸。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR外部區域中(亦即，在FR中)。視情況，抗ANG2

抗體包含SEQ ID NO: 33中之VL序列，包括彼序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，VL包含選自以下之一個、兩個或三個HVR：(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 34之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 35之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 36之HVR-L3。

在另一態樣中，提供一種抗ANG2抗體，其中該抗體包含如上文所提供之任一實施例中之VH及如上文所提供之任一實施例中之VL。在一個實施例中，該抗體分別包含SEQ ID NO: 28及SEQ ID NO: 33中之VH及VL序列，包括彼等序列之轉譯後修飾。

在本發明之又一態樣中，根據任一上述實施例之抗ANG2抗體為單株抗體。在一個實施例中，抗ANG2抗體為抗體片段，例如Fv、Fab、Fab'、scFv、雙功能抗體或F(ab')₂片段。在另一實施例中，抗體為全長抗體，例如完整IgG1抗體或如本文所定義之其他抗體類別或同型。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，抗ANG2抗體為效應沉默抗ANG2抗體。在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，抗ANG2抗體為效應沉默抗ANG2抗體且不與人類FcRn結合。在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中為人類子類IgG1之抗ANG2抗體且在兩個重鏈中具有突變L234A、L235A、P329G、I253A、H310A及H434A (根據Kabat索引編號)。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，抗ANG2抗體為雙特異性抗體。

如本文所報導之一個態樣為一種二價雙特異性抗體，其包含

- a) 特異性結合於第一抗原之抗體之第一輕鏈及第一重鏈，及
- b) 特異性結合於第二抗原之抗體之第二輕鏈及第二重鏈，其中第二輕鏈及第二重鏈之可變域VL及VH經彼此置換，

其中第一抗原或第二抗原為人類ANG2。

a)項之抗體不含如b)項所報導之修飾，且a)項之重鏈及輕鏈為分離鏈。

在b)項之抗體中

在輕鏈內

可變輕鏈域VL經該抗體之可變重鏈域VH置換，

及

在重鏈內

可變重鏈域VH經該抗體之可變輕鏈域VL置換。

在一個實施例中

i) 在a)項之第一輕鏈之恆定域CL中，位置124之胺基酸(根據Kabat編號)經帶正電荷胺基酸取代，且其中在a)項之第一重鏈之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸(根據Kabat EU索引編號)經帶負電荷胺基酸取代，

或

ii) 在b)項之第二輕鏈之恆定域CL中，位置124之胺基酸(根據Kabat編號)經帶正電荷胺基酸取代，且其中在b)項之第二重鏈之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸(根據Kabat EU索引編號)經帶負電荷胺基酸取代。

在一個較佳實施例中

i) 在a)項之第一輕鏈之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H) (根據Kabat編號)獨立取代(在一個較佳實施例中，經離胺酸(K)或精胺酸(R)獨立取代)，且其中在a)項之第一重鏈之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D) (根據Kabat EU索引編號)獨立取代，

或

ii) 在b)項之第二輕鏈之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺

酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H) (根據Kabat編號)獨立取代(在一個較佳實施例中，經離胺酸(K)或精胺酸(R)獨立取代)，且其中在b)項之第二重鏈之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D) (根據Kabat EU索引編號)獨立取代。

在一個實施例中，在第二重鏈之恆定域CL中，位置124及123之胺基酸經K (根據Kabat EU索引編號)取代。

在一個實施例中，在第二輕鏈之恆定域CH1中，位置147及213之胺基酸經E (根據Kabat EU索引編號)取代。

在一個較佳實施例中，在第一輕鏈之恆定域CL中，位置124及123之胺基酸經K取代，且在第一重鏈之恆定域CH1中，位置147及213之胺基酸經E取代(根據Kabat EU索引編號)。

在一個實施例中，在第二重鏈之恆定域CL中，位置124及123之胺基酸經K取代，且其中在第二輕鏈之恆定域CH1中，位置147及213之胺基酸經E取代，且在第一輕鏈之可變域VL中，位置38之胺基酸經K取代，在第一重鏈之可變域VH中，位置39之胺基酸經E取代，在第二重鏈之可變域VL中，位置38之胺基酸經K取代，且在第二輕鏈之可變域VH中，位置39之胺基酸經E取代(根據Kabat EU索引編號)。

如本文所報導之一個態樣為一種二價雙特異性抗體，其包含

- a) 特異性結合於第一抗原之抗體之第一輕鏈及第一重鏈，及
- b) 特異性結合於第二抗原之抗體之第二輕鏈及第二重鏈，其中第二輕鏈及第二重鏈之可變域VL及VH經彼此置換，且其中第二輕鏈及第二重鏈之恆定域CL及CH1經彼此置換，

其中第一抗原或第二抗原為人類ANG2。

a)項之抗體不含如b)項所報導之修飾，且a)項之重鏈及輕鏈為分離鏈。

在b)項之抗體中

在輕鏈內

可變輕鏈域VL經該抗體之可變重鏈域VH置換，且恆定輕鏈域CL經該抗體之恆定重鏈域CH1置換；

及

在重鏈內

可變重鏈域VH經該抗體之可變輕鏈域VL置換，且恆定重鏈域CH1經該抗體之恆定輕鏈域CL置換。

如本文所報導之一個態樣為一種二價雙特異性抗體，其包含

a) 特異性結合於第一抗原之抗體之第一輕鏈及第一重鏈，及

b) 特異性結合於第二抗原之抗體之第二輕鏈及第二重鏈，其中第二輕鏈及第二重鏈之恆定域CL及CH1經彼此置換，

其中第一抗原或第二抗原為人類ANG2。

a)項之抗體不含如b)項所報導之修飾，且a)項之重鏈及輕鏈為分離鏈。

在b)項之抗體中

在輕鏈內

恆定輕鏈域CL經該抗體之恆定重鏈域CH1置換；

及在重鏈內

恆定重鏈域CH1經該抗體之恆定輕鏈域CL置換。

如本文所報導之一個態樣為一種多特異性抗體，其包含

a) 全長抗體，其特異性結合於第一抗原且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成，及

b) 一個、兩個、三個或四個單鏈Fab片段，其特異性結合於一至四個其他抗原(亦即第二及/或第三及/或第四及/或第五抗原，較佳特異性結合於另一抗原，亦即第二抗原)，

其中b)項之該等單鏈Fab片段與a)項之該全長抗體在該全長抗體

之重鏈或輕鏈之C端或N端經由肽連接子融合，

其中第一抗原或其他抗原中之一者為人類ANG2。

在一個實施例中，與第二抗原結合之一或兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體在該全長抗體之重鏈或輕鏈之C端經由肽連接子融合。

在一個實施例中，與第二抗原結合之一或兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體在該全長抗體之重鏈之C端經由肽連接子融合。

在一個實施例中，與第二抗原結合之一或兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體在該全長抗體之輕鏈之C端經由肽連接子融合。

在一個實施例中，與第二抗原結合之兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體在該全長抗體之各重鏈或輕鏈之C端經由肽連接子融合。

在一個實施例中，與第二抗原結合之兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體在該全長抗體之各重鏈之C端經由肽連接子融合。

在一個實施例中，與第二抗原結合之兩個相同單鏈Fab片段與該全長抗體在該全長抗體之各輕鏈之C端經由肽連接子融合。

如本文所報導之一個態樣為一種三價雙特異性抗體，其包含

a) 全長抗體，其特異性結合於第一抗原且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成，

b) 第一多肽，其由以下組成

ba) 抗體重鏈可變域(VH)，

或

bb) 抗體重鏈可變域(VH)及抗體恆定域1 (CH1)，

其中該第一多肽之VH域之N端經由肽連接子與該全長抗體之兩個重鏈之一者的C端融合，

c) 第二多肽，其由以下組成

ca) 抗體輕鏈可變域(VL)，

或

cb) 抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域(CL)，

其中該第二多肽之VL域之N端經由肽連接子與該全長抗體之兩個重鏈中之另一者的C端融合，

及

其中第一多肽之抗體重鏈可變域(VH)與第二多肽之抗體輕鏈可變域(VL)一起形成特異性結合於第二抗原之抗原結合位點，

及

其中第一抗原或第二抗原為人類ANG2。

在一個實施例中，將b)項之多肽之抗體重鏈可變域(VH)與c)項之多肽之抗體輕鏈可變域(VL)連接且藉由在以下位置之間引入二硫鍵經由鏈間二硫橋鍵穩定：

i) 重鏈可變域位置44至輕鏈可變域位置100，或

ii) 重鏈可變域位置105至輕鏈可變域位置43，或

iii) 重鏈可變域位置101至輕鏈可變域位置100 (始終根據Kabat EU索引編號)。

引入非天然二硫橋鍵用於穩定之技術描述於例如 WO 94/029350；Rajagopal, V.等人, Prot. Eng. (1997) 1453-59；Kobayashi, H.等人, Nuclear Medicine & Biology, 第25卷, (1998) 387-393；或 Schmidt, M.等人, Oncogene (1999) 18 1711-1721中。在一個實施例中，b)及c)項之多肽之可變域之間的視情況存在之二硫鍵係在重鏈可變域位置44與輕鏈可變域位置100之間。在一個實施例中，b)及c)項之多肽之可變域之間的視情況存在之二硫鍵係在重鏈可變域位置105與輕鏈可變域位置43之間。(始終根據Kabat EU索引編號)在一個實施例中，在單鏈Fab片段之可變域VH及VL之間無該視情況存在之二硫鍵穩定的三價雙特異性抗體為較佳的。

如本文所報導之一個態樣為一種三特異性或四特異性抗體，其

包含

a) 特異性結合於第一抗原之全長抗體之第一輕鏈及第一重鏈，
及

b) 特異性結合於第二抗原之全長抗體之第二(修飾)輕鏈及第二(修飾)重鏈，其中可變域VL及VH經彼此置換，及/或其中恆定域CL及CH1經彼此置換，及

c) 其中特異性結合於一或兩個其他抗原(亦即，第三及/或第四抗原)之一至四個抗原結合肽經由肽連接子與a)及/或b)之輕鏈或重鏈之C端或N端融合，

其中第一抗原或第二抗原或其他抗原中之一者為人類ANG2。

a)項之抗體不含如b)項所報導之修飾，且a)項之重鏈及輕鏈為分離鏈。

在一個實施例中，三特異性或四特異性抗體在c)項包含特異性結合於一或兩個其他抗原之一或兩個抗原結合肽。

在一個實施例中，抗原結合肽選自scFv片段及scFab片段之群。

在一個實施例中，抗原結合肽為scFv片段。

在一個實施例中，抗原結合肽為scFab片段。

在一個實施例中，抗原結合肽與a)及/或b)之重鏈之C端融合。

在一個實施例中，三特異性或四特異性抗體在c)項包含特異性結合於另一抗原之一或兩個抗原結合肽。

在一個實施例中，三特異性或四特異性抗體在c)項包含特異性結合於第三抗原之兩個相同抗原結合肽。在一個較佳實施例中，此兩個相同抗原結合肽皆經由相同肽連接子與a)及b)之重鏈之C端融合。在一個較佳實施例中，兩個相同抗原結合肽為scFv片段或scFab片段。

在一個實施例中，三特異性或四特異性抗體在c)項包含特異性結合於第三及第四抗原之兩個抗原結合肽。在一個實施例中，該兩個抗

原結合肽皆經由相同肽連接子與a)及b)之重鏈之C端融合。在一個較佳實施例中，該兩個抗原結合肽為scFv片段或scFab片段。

如本文所報導之一個態樣為一種雙特異性四價抗體，其包含

a) 特異性結合於第一抗原(且包含兩個Fab片段)之抗體之兩個輕鏈及兩個重鏈，

b) 特異性結合於第二抗原之抗體之兩個額外Fab片段，其中該等額外Fab片段皆經由肽連接子與a)之重鏈之C端或N端融合，

及

其中在Fab片段中進行以下修飾

i) 在a)之兩個Fab片段中或在b)之兩個Fab片段中，可變域VL及VH經彼此置換，及/或恆定域CL及CH1經彼此置換，

或

ii) 在a)之兩個Fab片段中，可變域VL及VH經彼此置換，且恆定域CL及CH1經彼此置換，

及

在b)之兩個Fab片段中，可變域VL及VH經彼此置換，或恆定域CL及CH1經彼此置換，

或

iii) 在a)之兩個Fab片段中，可變域VL及VH經彼此置換，或恆定域CL及CH1經彼此置換，

及

在b)之兩個Fab片段中，可變域VL及VH經彼此置換，且恆定域CL及CH1經彼此置換，

或

iv) 在a)之兩個Fab片段中，可變域VL及VH經彼此置換，且在b)之兩個Fab片段中，恆定域CL及CH1經彼此置換，

或

v) 在a)之兩個Fab片段中，恆定域CL及CH1經彼此置換，且在b)之兩個Fab片段中，可變域VL及VH經彼此置換，

其中第一抗原或第二抗原為人類ANG2。

在一個實施例中，該等額外Fab片段皆經由肽連接子與a)之重鏈之C端或a)之重鏈之N端融合。

在一個實施例中，該等額外Fab片段皆經由肽連接子與a)之重鏈之C端融合。

在一個實施例中，該等額外Fab片段皆經由肽連接子與a)之重鏈之N端融合。

在一個實施例中，在Fab片段中進行以下修飾：

i) 在a)之兩個Fab片段中或在b)之兩個Fab片段中，可變域VL及VH經彼此置換，

及/或

恆定域CL及CH1經彼此置換。

在一個實施例中，在Fab片段中進行以下修飾：

i) 在a)之兩個Fab片段中，可變域VL及VH經彼此置換，

及/或

恆定域CL及CH1經彼此置換。

在一個實施例中，在Fab片段中進行以下修飾：

i) 在a)之兩個Fab片段中，恆定域CL及CH1經彼此置換。

在一個實施例中，在Fab片段中進行以下修飾：

i) 在b)之兩個Fab片段中，可變域VL及VH經彼此置換，

及/或

恆定域CL及CH1經彼此置換。

在一個實施例中，在Fab片段中進行以下修飾：

i) 在b)之兩個Fab片段中，恆定域CL及CH1經彼此置換。

如本文所報導之一個態樣為一種雙特異性四價抗體，其包含：

a) 特異性結合於第一抗原且包含第一VH-CH1域對之第一抗體之(修飾)重鏈，其中該第一抗體之第二VH-CH1域對之N端經由肽連接子與該重鏈之C端融合，

b) a)之該第一抗體之兩個輕鏈，

c) 特異性結合於第二抗原且包含第一VH-CL域對之第二抗體之(修飾)重鏈，其中該第二抗體之第二VH-CL域對之N端經由肽連接子與該重鏈之C端融合，及

d) c)之該第二抗體之兩個(修飾)輕鏈，各自包含CL-CH1域對，其中第一抗原或第二抗原為人類ANG2。

如本文所報導之一個態樣為一種雙特異性抗體，其包含

a) 特異性結合於第一抗原之第一全長抗體之重鏈及輕鏈，及

b) 特異性結合於第二抗原之第二全長抗體之重鏈及輕鏈，其中重鏈之N端經由肽連接子與輕鏈之C端連接，

其中第一抗原或第二抗原為人類ANG2。

a)項之抗體不含如b)項所報導之修飾，且重鏈及輕鏈為分離鏈。

如本文所報導之一個態樣為一種雙特異性抗體，其包含

a) 全長抗體，其特異性結合於第一抗原且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成，及

b) Fv片段，其特異性結合於包含VH²域及VL²域之第二抗原，其中兩個域經由二硫橋鍵彼此連接，

其中僅VH²域或VL²域經由肽連接子與特異性結合於第一抗原之全長抗體之重鏈或輕鏈融合，

其中第一抗原或第二抗原為人類ANG2。

在雙特異性中，a)項之重鏈及輕鏈為分離鏈。

在一個實施例中，VH²域或VL²域之另一者不經由肽連接子與特異性結合於第一抗原之全長抗體之重鏈或輕鏈融合。

在如本文所報導之所有態樣中，第一輕鏈包含VL域及CL域，且第一重鏈包含VH域、CH1域、鉸鏈區、CH2域及CH3域。

在所有態樣之一個實施例中，如本文所報導之抗體為多特異性抗體，其需要至少兩個重鏈多肽雜二聚，且其中該抗體特異性結合於人類ANG2及第二非人類ANG2抗原。

用於CH3修飾以便支持雜二聚之幾種方法已描述於例如WO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012/058768、WO 2013/157954、WO 2013/096291中，各者皆以引用的方式包括於本文中。通常，在此項技術中已知之方法中，第一重鏈之CH3域及第二重鏈之CH3域皆以互補方式經工程改造，使得包含一個經工程改造之CH3域的重鏈不可再與相同結構之另一重鏈均二聚(例如，CH3工程改造之第一重鏈不可再與另一CH3工程改造之第一重鏈均二聚；及CH3工程改造之第二重鏈不可再與另一CH3工程改造之第二重鏈均二聚)。進而迫使包含一個經工程改造之CH3域的重鏈與包含以互補方式經工程改造之CH3域的另一重鏈雜二聚。對於本發明之此實施例，第一重鏈之CH3域及第二重鏈之CH3域藉由胺基酸取代以互補方式經工程改造，以便迫使第一重鏈與第二重鏈雜二聚，而第一重鏈與第二重鏈不可再均二聚(例如，出於空間原因)。

涵蓋上文所引用及包括之此項技術中已知用於支持重鏈雜二聚之不同方法作為用於根據本發明之多特異性抗體的不同替代方案，該多特異性抗體包含源於特異性結合於第一抗原之第一抗體的「非交叉Fab區」及源於特異性結合於第二抗原之第二抗體的「交叉Fab區」；

以及上文針對本發明所描述之特定胺基酸取代。

如本文所報導之多特異性抗體之CH3域可藉由「結進孔(knob-into-hole)」技術改變，該技術以幾個實例詳細描述於例如 WO 96/027011；Ridgway, J.B.等人, Protein Eng. 9 (1996) 617-621；及 Merchant, A.M.等人, Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681中。在此方法中，改變兩個CH3域之相互作用表面以提高含有此兩個CH3域之兩個重鏈的雜二聚。(兩個重鏈之)兩個CH3域中之每一者可為「結」，而另一者為「孔」。引入二硫橋鍵進一步使雜二聚體穩定(Merchant, A.M.等人, Nature Biotech 16 (1998) 677-681；Atwell, S.等人, J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35)且提高產量。

在一個較佳實施例中，如本文所報導之多特異性抗體在「結鏈」之CH3域中包含T366W突變且在「孔鏈」之CH3域中包含T366S、L368A、Y407V突變(根據Kabat EU索引編號)。亦可使用CH3域之間的額外鏈間二硫橋鍵(Merchant, A.M.等人, Nature Biotech. 16 (1998) 677-681)，例如藉由將Y349C突變引入「結鏈」之CH3域中及將E356C突變或S354C突變引入「孔鏈」之CH3域中。因此，在另一較佳實施例中，如本文所報導之多特異性抗體在兩個CH3域之一者中包含Y349C及T366W突變且在兩個CH3域之另一者中包含E356C、T366S、L368A及Y407V突變，或如本文所報導之多特異性抗體在兩個CH3域之一者中包含Y349C及T366W突變且在兩個CH3域之另一者中包含S354C、T366S、L368A及Y407V突變(一個CH3域中之額外Y349C突變與另一CH3域中之額外E356C或S354C突變形成鏈間二硫橋鍵)(根據Kabat EU索引編號)。

或者或另外，而且可使用如EP 1 870 459A1描述之其他孔中結技術。在一個實施例中，如本文所報導之多特異性抗體在「結鏈」之CH3域中包含R409D及K370E突變且在「孔鏈」之CH3域中包含

D399K及E357K突變(根據Kabat EU索引編號)。

在一個實施例中，如本文所報導之多特異性抗體在「結鏈」之CH3域中包含T366W突變且在「孔鏈」之CH3域中包含T366S、L368A及Y407V突變，及另外，在「結鏈」之CH3域中包含R409D及K370E突變且在「孔鏈」之CH3域中包含D399K及E357K突變(根據Kabat EU索引編號)。

在一個實施例中，如本文所報導之多特異性抗體在兩個CH3域之一者中包含Y349C及T366W突變且在兩個CH3域之另一者中包含S354C、T366S、L368A及Y407V突變，或如本文所報導之多特異性抗體在兩個CH3域之一者中包含Y349C及T366W突變且在兩個CH3域之另一者中包含S354C、T366S、L368A及Y407V突變，及另外，在「結鏈」之CH3域中包含R409D及K370E突變且在「孔鏈」之CH3域中包含D399K及E357K突變(根據Kabat EU索引編號)。

除「結進孔技術」以外，用於修飾多特異性抗體之重鏈之CH3域以便實施雜二聚之其他技術為此項技術中已知。本文涵蓋此等技術，尤其WO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012/058768、WO 2013/157954及WO 2013/096291中所描述之技術作為「結進孔技術」之替代方案；以及如本文所報導之多特異性抗體。

在如本文所報導之多特異性抗體之一個實施例中，使用EP 1870459中所描述之方法來支持多特異性抗體之第一重鏈及第二重鏈之雜二聚。此方法係基於在第一與第二重鏈之間的CH3/CH3域界面中之特定胺基酸位置引入具有相反電荷之帶電胺基酸。

因此，此實施例係關於一種如本文所報導之多特異性抗體，其中在抗體之三級結構中第一重鏈之CH3域與第二重鏈之CH3域形成位

於各別抗體CH3域之間的界面，其中第一重鏈之CH3域及第二重鏈之CH3域之各別胺基酸序列各自包含位於抗體之三級結構中的該界面內之一組胺基酸，其中來自位於一個重鏈之CH3域中的界面中之胺基酸組的第一胺基酸經帶正電荷胺基酸取代，且來自位於另一重鏈之CH3域中的界面中之胺基酸組的第二胺基酸經帶負電荷胺基酸取代。根據此實施例之多特異性抗體在本文中亦稱為「CH3(+/-)工程改造之多特異性抗體」(其中縮寫「+/-」表示引入各別CH3域中之帶相反電荷胺基酸)。

在如本文所報導之該CH3(+/-)工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，帶正電荷胺基酸選自K、R及H，且帶負電荷胺基酸選自E或D。

在如本文所報導之該CH3(+/-)工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，帶正電荷胺基酸選自K及R，且帶負電荷胺基酸選自E或D。

在如本文所報導之該CH3(+/-)工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，帶正電荷胺基酸為K，且帶負電荷胺基酸為E。

在如本文所報導之該CH3(+/-)工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，在一個重鏈之CH3域中位置409之胺基酸R經D取代及位置392之胺基酸K經E取代，且在另一重鏈之CH3域中位置399之胺基酸D經K取代及位置357之胺基酸E經K取代(根據Kabat EU索引編號)。

在如本文所報導之多特異性抗體之一個實施例中，使用WO 2013/157953中所描述之方法來支持多特異性抗體之第一重鏈及第二重鏈之雜二聚。在如本文所報導之該多特異性抗體之一個實施例中，在一個重鏈之CH3域中位置366之胺基酸T經K取代，且在另一重鏈之CH3域中位置351之胺基酸L經D取代(根據Kabat EU索引編號)。在如本文所報導之該多特異性抗體之另一實施例中，在一個重鏈之CH3域中位置366之胺基酸T經K取代及位置351之胺基酸L經K取代，且在另

一重鏈之CH3域中位置351之胺基酸L經D取代(根據Kabat EU索引編號)。

在如本文所報導之該多特異性抗體之另一實施例中，在一個重鏈之CH3域中位置366之胺基酸T經K取代及位置351之胺基酸L經K取代，且在另一重鏈之CH3域中位置351之胺基酸L經D取代(根據Kabat EU索引編號)。另外，在另一重鏈之CH3域中包含以下取代中之至少一者：位置349之胺基酸Y經E取代、位置349之胺基酸Y經D取代及位置368之胺基酸L經E取代(根據Kabat EU索引編號)。在一個實施例中，位置368之胺基酸L經E取代(根據Kabat EU索引編號)。

在如本文所報導之多特異性抗體之一個實施例中，使用WO 2012/058768中所描述之方法來支持多特異性抗體之第一重鏈及第二重鏈之雜二聚。在如本文所報導之該多特異性抗體之一個實施例中，在一個重鏈之CH3域中位置351之胺基酸L經Y取代及位置407之胺基酸Y經A取代，且在另一重鏈之CH3域中位置366之胺基酸T經A取代及位置409之胺基酸K經F取代(根據Kabat EU索引編號)。在另一實施例中，除前述取代之外，在另一重鏈之CH3域中位置411 (最初T)、399 (最初D)、400 (最初S)、405 (最初F)、390 (最初N)及392 (最初K)之胺基酸中之至少一者經取代(根據Kabat EU索引編號)。較佳取代為：

- 位置411之胺基酸T經選自N、R、Q、K、D、E及W之胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)，

- 位置399之胺基酸D經選自R、W、Y及K之胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)，

- 位置400之胺基酸S經選自E、D、R及K之胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)，

- 位置405之胺基酸F經選自I、M、T、S、V及W之胺基酸取代(根據Kabat EU index編號)；

- 位置390之胺基酸N經選自R、K及D之胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)；及

- 位置392之胺基酸K經選自V、M、R、L、F及E之胺基酸取代(根據Kabat EU索引編號)。

在如本文所報導之該多特異性抗體(根據WO 2012/058768經工程改造)之另一實施例中，在一個重鏈之CH3域中位置351之胺基酸L經Y取代及位置407之胺基酸Y經A取代，且在另一重鏈之CH3域中位置366之胺基酸T經V取代及位置409之胺基酸K經F取代(根據Kabat EU索引編號)。在如本文所報導之該多特異性抗體之另一實施例中，在一個重鏈之CH3域中位置407之胺基酸Y經A取代，且在另一重鏈之CH3域中位置366之胺基酸T經A取代及位置409之胺基酸K經F取代(根據Kabat EU索引編號)。在該上一前述實施例中，在該另一重鏈之CH3域中位置392之胺基酸K經E取代、位置411之胺基酸T經E取代、位置399之胺基酸D經R取代及位置400之胺基酸S經R取代(根據Kabat EU索引編號)。

在如本文所報導之多特異性抗體之一個實施例中，使用WO 2011/143545中所描述之方法來支持多特異性抗體之第一重鏈及第二重鏈之雜二聚。在如本文所報導之該多特異性抗體之一個實施例中，在兩個重鏈之CH3域中在位置368及/或409引入胺基酸修飾(根據Kabat EU索引編號)。

在如本文所報導之多特異性抗體之一個實施例中，使用WO 2011/090762中所描述之方法來支持多特異性抗體之第一重鏈及第二重鏈之雜二聚。WO 2011/090762係關於根據「結進孔」技術之胺基酸修飾。在如本文所報導之該CH3(KiH)工程改造之多特異性抗體之一個實施例中，在一個重鏈之CH3域中位置366之胺基酸T經W取代，且在另一重鏈之CH3域中位置407之胺基酸Y經A取代(根據Kabat EU索引編號)。

引編號)。在如本文所報導之該CH3(KiH)工程改造之多特異性抗體之另一實施例中，在一個重鏈之CH3域中位置366之胺基酸T經Y取代，且在另一重鏈之CH3域中位置407之胺基酸Y經T取代(根據Kabat EU索引編號)。

在如本文所報導之多特異性抗體(其為IgG2同型)之一個實施例中，使用WO 2011/090762中所描述之方法來支持多特異性抗體之第一重鏈及第二重鏈之雜二聚。

在如本文所報導之多特異性抗體之一個實施例中，使用WO 2009/089004中所描述之方法來支持多特異性抗體之第一重鏈及第二重鏈之雜二聚。在如本文所報導之該多特異性抗體之一個實施例中，在一個重鏈之CH3域中位置392之胺基酸K或N經帶負電荷胺基酸(在一個較佳實施例中，經E或D，在一個較佳實施例中，經D)取代，且在另一重鏈之CH3域中位置399之胺基酸D、位置356之胺基酸E或D或位置357之胺基酸E經帶正電荷胺基酸取代(在一個較佳實施例中，K或R，在一個較佳實施例中，經K，在一個較佳實施例中，位置399或356之胺基酸經K取代)(根據Kabat EU索引編號)。在另一實施例中，除前述取代之外，在一個重鏈之CH3域中位置409之胺基酸K或R經帶負電荷胺基酸(在一個較佳實施例中，經E或D，在一個較佳實施例中，經D)取代(根據Kabat EU索引編號)。在甚至另一實施例中，除前述取代之外或作為前述取代之替代，在一個重鏈之CH3域中位置439之胺基酸K及/或位置370之胺基酸K彼此獨立地經帶負電荷胺基酸(在一個較佳實施例中，經E或D，在一個較佳實施例中，經D)取代(根據Kabat EU索引編號)。

在如本文所報導之多特異性抗體之一個實施例中，使用WO 2007/147901中所描述之方法來支持多特異性抗體之第一重鏈及第二重鏈之雜二聚。在如本文所報導之該多特異性抗體之一個實施例中，

在一個重鏈之CH3域中位置253之胺基酸K經E取代、位置282之胺基酸經K取代及位置322之胺基酸K經D取代，且在另一重鏈之CH3域中位置239之胺基酸D經K取代、位置240之胺基酸E經K取代及位置292之胺基酸K經D取代(根據Kabat EU索引編號)。

在如本文所報導之多特異性抗體之一個實施例中，使用WO 2007/110205中所描述之方法來支持多特異性抗體之第一重鏈及第二重鏈之雜二聚。

在如本文所報導之所有態樣及實施例之一個實施例中，多特異性抗體為雙特異性抗體或三特異性抗體。在本發明之一個較佳實施例中，多特異性抗體為雙特異性抗體。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，抗體為二價或三價抗體。在一個實施例中，抗體為二價抗體。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，多特異性抗體具有IgG型抗體之恆定域結構。在如本文所報導之所有態樣之另一實施例中，多特異性抗體之特徵在於該多特異性抗體為人類子類IgG1或具有突變L234A及L235A之人類子類IgG1。在如本文所報導之所有態樣之另一實施例中，多特異性抗體之特徵在於該多特異性抗體為人類子類IgG2。在如本文所報導之所有態樣之另一實施例中，多特異性抗體之特徵在於該多特異性抗體為人類子類IgG3。在如本文所報導之所有態樣之另一實施例中，多特異性抗體之特徵在於該多特異性抗體為人類子類IgG4或具有額外突變S228P之人類子類IgG4。在如本文所報導之所有態樣之另一實施例中，多特異性抗體之特徵在於該多特異性抗體為人類子類IgG1或人類子類IgG4。在如本文所報導之所有態樣之另一實施例中，多特異性抗體之特徵在於該多特異性抗體為具有突變L234A及L235A之人類子類IgG1 (根據Kabat EU索引編號)。在如本文所報導之所有態樣之另一實施例中，多特異性抗體之特徵在於該多特

異性抗體為具有突變L234A、L235A及P329G之人類子類IgG1 (根據Kabat EU索引編號)。在如本文所報導之所有態樣之另一實施例中，多特異性抗體之特徵在於該多特異性抗體為具有突變S228P及L235E之人類子類IgG4 (根據Kabat EU索引編號)。在如本文所報導之所有態樣之另一實施例中，多特異性抗體之特徵在於該多特異性抗體為具有突變S228P、L235E及P329G之人類子類IgG4 (根據Kabat EU索引編號)。

在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，如本文所指定包含包括CH3域之重鏈的抗體包含額外C端甘胺酸-離胺酸二肽(G446及K447，根據Kabat EU索引編號)。在如本文所報導之所有態樣之一個實施例中，如本文所指定包含包括CH3域之重鏈的抗體包含額外C端甘胺酸殘基(G446，根據Kabat EU索引編號)。

在又一態樣中，根據任一以上實施例之抗ANG2抗體可併有如以下部分1至5中所描述之單一或組合之特徵中任一者。

1. 抗體親和力

在某些實施例中，本文所提供之抗體之解離常數(KD) $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 或 $\leq 10 \text{ nM}$ (例如 10^{-8} M 或 10^{-8} M 以下)。

測定KD值之方法概述於以下實例中。

在使用BIACORE[®]表面電漿子共振分析時，KD值或者可如下量測：可使用BIACORE T200儀器(GE Healthcare)藉由表面電漿子共振研究抗體或抗體片段與人類ANG2-RBD-Fc區融合物之結合。藉由使用由GE Healthcare供應之胺偶合套組，在pH 5.0下將大約4000 RU抗人類抗體(10 $\mu\text{g/ml}$ 抗人類IgG (Fc)抗體；訂購碼BR-1008-39；GE Healthcare)偶合在系列S CM5晶片(GE Healthcare BR-1005-30)上。在固定程序期間使用HBS-N (10 mM HEPES、150 mM NaCl pH 7.4，GE Healthcare)作為操作緩衝劑。對於以下動力學表徵，樣品及操作緩衝

劑為HBS-P (10 mM HEPES、150 mM NaCl pH 7.4、0.05%界面活性劑P20；GE Healthcare)。將流槽設置為25°C且樣品嵌段設置為12°C，且在動力學表徵之前用操作緩衝劑預致敏兩次。

藉由以5 μ l/min流動速率注射1 μ g/ml溶液持續30 sec.來捕捉ANG2-RBD-Fc區融合物。以300 nM連續1:3稀釋液為起始物質，藉由以90 μ l/min流動速率在溶液中注射各種濃度之Cross-Fab持續90 sec.來量測締合。長達600 sec.監測解離相，且藉由自樣品溶液轉換為操作緩衝劑來觸發。藉由以5 μ l/min流動速率用3 M MgCl₂溶液洗滌60 sec.使所有表面再生。藉由減去自抗人類IgG抗體(Fc)表面獲得之反應來校正整體折射率差異。亦減去空白注射(=二次參考)。為計算KD及其他動力學參數，使用朗格繆爾(Langmuir) 1:1模型。

2. 抗體片段

在某些實施例中，本文所提供之抗體為抗體片段。抗體片段包括(但不限於) Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv及scFv片段及下文所描述之其他片段。關於某些抗體片段之綜述，參見Hudson, P.J.等人, Nat. Med. 9 (2003) 129-134。關於scFv片段之綜述，參見例如 Plueckthun, A., In; The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷, Rosenberg and Moore (編), Springer-Verlag, New York (1994), 第269-315頁；亦參見WO 93/16185；US 5,571,894及US 5,587,458。關於包含救助受體結合抗原決定基殘基且具有延長之活體內半衰期之Fab及F(ab')₂片段之論述，參見US 5,869,046。

雙功能抗體為可為二價或雙特異性之具有兩個抗原結合位點之抗體片段。參見例如EP 0 404 097；WO 1993/01161；Hudson, P.J.等人, Nat. Med. 9 (2003) 129-134；及Holliger, P.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448。三功能抗體及四功能抗體亦描述於Hudson, P.J.等人, Nat. Med. 9 (2003) 129-134中。

單域抗體為包含抗體之全部或部分重鏈可變域或全部或部分輕鏈可變域的抗體片段。在某些實施例中，單域抗體為人類單域抗體 (Domantis, Inc., Waltham, MA；參見例如US 6,248,516)。

抗體片段可藉由各種技術製得，包括(但不限於)蛋白分解消化完整抗體以及藉由重組宿主細胞(例如大腸桿菌或噬菌體)產生，如本文所描述。

3. 嵌合及人類化抗體

在某些實施例中，本文所提供之抗體為嵌合抗體。某些嵌合抗體描述於例如US 4,816,567；及Morrison, S.L.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855中。在一個實例中，嵌合抗體包含非人類可變區(例如，源於小鼠、大鼠、倉鼠、兔或非人類靈長類動物(諸如猴)之可變區)及人類恆定區。在又一實例中，嵌合抗體為「類別轉換」抗體，其中類別或子類已自親本抗體之類別或子類改變。嵌合抗體包括其抗原結合片段。

在某些實施例中，嵌合抗體為人類化抗體。通常，對非人類抗體進行人類化以降低對人類之免疫原性，同時保留親本非人類抗體之特異性及親和力。一般而言，人類化抗體包含一或多個可變域，其中HVR (例如CDR) (或其部分)源於非人類抗體，且FR (或其部分)源於人類抗體序列。人類化抗體視情況將亦包含人類恆定區之至少一部分。在一些實施例中，人類化抗體中的一些FR殘基經來自非人類抗體(例如，HVR殘基所來源之抗體)之相應殘基取代以例如恢復或改良抗體特異性或親和力。

人類化抗體及其製造方法綜述於例如Almagro, J.C.及Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633中，且進一步描述於例如Riechmann, I.等人, *Nature* 332 (1988) 323-329；Queen, C.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033；US 5,821,337、US

7,527,791、US 6,982,321 及 US 7,087,409；Kashmiri, S.V. 等人, Methods 36 (2005) 25-34 (描述特異性決定區(SDR)移植)；Padlan, E.A., Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498 (描述「表面再塑」)；Dall'Acqua, W.F.等人, Methods 36 (2005) 43-60 (描述「FR改組」)；及Osbourn, J. 等人, Methods 36 (2005) 61-68及Klimka, A.等人, Br. J. Cancer 83 (2000) 252-260 (描述FR改組之「導引選擇」方法)中。

可用於人類化之人類構架區包括(但不限於)：使用「最佳擬合」方法選擇之構架區(參見例如Sims, M.J. 等人, J. Immunol. 151 (1993) 2296-2308)；源於具有輕鏈或重鏈可變區之特定亞群之人類抗體共同序列的構架區(參見例如Carter, P.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289；及Presta, L.G.等人, J. Immunol. 151 (1993) 2623-2632)；人類成熟(體細胞突變)構架區或人類生殖系構架區(參見例如Almagro, J.C.及Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633)；及源於篩選FR庫之構架區(參見例如Baca, M.等人, J. Biol. Chem. 272 (1997) 10678-10684及Rosok, M.J.等人, J. Biol. Chem. 271 (1996) 22611-22618)。

4. 多特異性抗體

在某些實施例中，本文所提供之抗體為多特異性抗體，例如雙特異性抗體。多特異性抗體為對至少兩個不同位點具有結合特異性之單株抗體。在某些實施例中，結合特異性中之一者係針對ANG2且另一者係針對任何其他抗原。在某些實施例中，雙特異性抗體可結合於ANG2之兩個不同抗原決定基。雙特異性抗體亦可用於將細胞毒性劑定位至表現ANG2之細胞。雙特異性抗體可製備為全長抗體或抗體片段。

用於製造多特異性抗體之技術包括(但不限於)重組共表現具有不同特異性之兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(參見Milstein, C.及Cuello,

A.C., *Nature* 305 (1983) 537-540 ; WO 93/08829 ; 及Traunecker, A.等人, *EMBO J.* 10 (1991) 3655-3659)及「孔中結」工程改造(參見例如US 5,731,168)。多特異性抗體亦可藉由以下來製造：製造抗體Fc-雜二聚分子之工程改造靜電轉向效應(WO 2009/089004)；交聯兩個或兩個以上抗體或片段(參見例如US 4,676,980及Brennan, M.等人, *Science* 229 (1985) 81-83)；使用白胺酸拉鏈產生雙特異性抗體(參見例如Kostelny, S.A.等人, *J. Immunol.* 148 (1992) 1547-1553)；使用製造雙特異性抗體片段之「雙功能抗體」技術(參見例如Holliger, P.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6444-6448)；及使用單鏈Fv (sFv)二聚體(參見例如Gruber, M等人, *J. Immunol.* 152 (1994) 5368-5374)；及如例如Tutt, A.等人 *J. Immunol.* 147 (1991) 60-69中所描述製備三特異性抗體。

本文中亦包括具有三個或三個以上功能性抗原結合位點之工程改造抗體，包括「章魚抗體」(參見例如US 2006/0025576)。

本文之抗體或片段亦包括包含結合於ANG2以及另一不同抗原之抗原結合位點的「雙作用 Fab」或「DAF」(參見例如US 2008/0069820)。

本文之抗體或片段亦包括以下各者中所描述之多特異性抗體

WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254、WO 2010/112193、WO 2010/115589、WO 2010/136172、WO 2010/145792及WO 2010/145793。

5. 抗體變異體

在某些實施例中，涵蓋本文所提供之抗體之胺基酸序列變異體。舉例而言，可能需要改良抗體之結合親和力及/或其他生物特性。抗體之胺基酸序列變異體可藉由將適當修飾引入編碼該抗體之核苷酸序列中或藉由肽合成製備。此類修飾包括例如在抗體之胺基酸序

列內殘基之缺失及/或插入及/或取代。可進行缺失、插入及取代之任何組合以獲得最終構築體，其限制條件為最終構築體具有所需特徵，例如抗原結合。

a) 取代、插入及缺失變異體

在某些實施例中，提供具有一或多個胺基酸取代之抗體變異體。用於取代型突變誘發之相關位點包括HVR及FR。保守取代以標題「較佳取代」展示於下表中。更多實質性變化以標題「例示性取代」提供於表1中，且如下文參考胺基酸側鏈類別進一步描述。胺基酸取代可引入相關抗體中，且針對如下所需活性篩選產物：例如保留/改良之抗原結合、降低之免疫原性或改良之ADCC或CDC。

表

原始殘基	例示性取代	較佳取代
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; 正白胺酸	Leu
Leu (L)	正白胺酸; 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; 正白胺酸	Leu

胺基酸可根據共有側鏈特性進行分組：

- (1) 疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 鹼性：His、Lys、Arg；
- (5) 影響鏈取向之殘基：Gly、Pro；
- (6) 芳族：Trp、Tyr、Phe。

非保守取代將需要將此等類別中之一者之成員換成另一類別。

一種類型之取代型變異體涉及取代親本抗體(例如人類化或人類抗體)之一或多個高變區殘基。一般而言，選用於進一步研究之所得變異體相對於親本抗體將在某些生物特性方面具有修飾(例如，改良)(例如，親和力提高、免疫原性降低)及/或將實質上保留親本抗體之某些生物特性。例示性取代型變異體為親和力成熟抗體，其可例如使用基於噬菌體呈現之親和力成熟技術(諸如本文所描述之技術)便利地產生。簡言之，使一或多個HVR殘基突變且在噬菌體上呈現變異抗體且針對特定生物活性(例如結合親和力)進行篩選。

改變(例如，取代)可在HVR中進行以例如提高抗體親和力。可在HVR「熱點」，亦即，由在體細胞成熟過程期間經歷高頻率突變之密碼子編碼之殘基(參見例如Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179-196)及/或接觸抗原之殘基中用待測試結合親和力之所得變異VH或VL進行此類改變。藉由構築及自二級庫再選擇之親和力成熟已描述於例如Hoogenboom, H.R.等人 *Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37中。在親和力成熟之一些實施例中，藉由多種方法(例如，易錯PCR、鏈改組或寡核苷酸導引之突變誘發)中之任一者將多樣性引入選用於成熟之可變基因中。隨後產生二級庫。隨後篩選該庫以鑑別具有所需親和力之任何抗體變異體。引入多樣性之另一方法涉及HVR導引方法，其中將幾個HVR殘基(例如，一次4-6個殘基)隨機分組。參與抗原結合之HVR殘基可例如使用丙胺酸掃描突變誘發或模型化來特定鑑別。特定言之，通常以CDR-H3及CDR-L3為標靶。

在某些實施例中，取代、插入或缺失可發生在一或多個HVR內，只要此類改變不實質上降低抗體結合抗原之能力即可。舉例而言，可在HVR中進行不實質上降低結合親和力之保守改變(例如，如本文所提供之保守取代)。此類改變可例如在HVR中接觸抗原之殘基之外。在上文所提供之變異VH及VL序列之某些實施例中，各HVR未改變或含有不超過一個、兩個或三個胺基酸取代。

一種適用於鑑別可經靶向以用於突變誘發之抗體之殘基或區域的方法稱為「丙胺酸掃描突變誘發」，如由Cunningham, B.C.及Wells, J.A., *Science* 244 (1989) 1081-1085所描述。在此方法中，鑑別出一個殘基或一組標靶殘基(例如帶電荷殘基，諸如arg、asp、his、lys及glu)且將其置換為中性或帶負電荷胺基酸(例如，丙胺酸或聚丙胺酸)以判定抗體與抗原之相互作用是否受到影響。可在對初始取代展現功能敏感性之胺基酸位置引入其他取代。或者或另外，抗原-抗體複合物之晶體結構用於鑑別抗體與抗原之間的接觸點。此類接觸殘基及相鄰殘基可作為取代候選物之標靶或排除在取代候選物之外。可篩選變異體以判定其是否含有所需特性。

胺基酸序列插入包括長度在一個殘基至含有一百個或一百個以上殘基之多肽範圍內的胺基端及/或羧基端融合，以及單個或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有N端甲硫胺基殘基之抗體。抗體分子之其他插入型變異體包括抗體之N端或C端與酶(例如對於ADEPT而言)或延長抗體之血清半衰期之多肽的融合物。

b) 糖基化變異體

在某些實施例中，對本文所提供之抗體進行改變以增加或降低抗體糖基化之程度。向抗體添加糖基化位點或使抗體缺失糖基化位點可藉由改變胺基酸序列以便產生或移除一或多個糖基化位點來便利地實現。

在抗體包含Fc區之情況下，可改變連接於其上之碳水化合物。由哺乳動物細胞產生之天然抗體通常包含分支鏈雙觸角寡醣，其一般藉由N鍵連接至Fc區之CH2域的Asn297（參見例如Wright, A.及Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32）。寡醣可包括各種碳水化合物，例如甘露糖、N-乙醯基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸，以及連接至雙觸角寡醣結構之「主幹」中之GlcNAc的海藻糖。在一些實施例中，可對本發明抗體中之寡醣進行修飾以便產生具有某些改良特性之抗體變異體。

在一個實施例中，提供具有缺乏連接(直接或間接)至Fc區之海藻糖之碳水化合物結構的抗體變異體。舉例而言，此類抗體中海藻糖之量可為1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。海藻糖之量係藉由計算糖鏈內Asn297處之海藻糖相對於如藉由MALDI-TOF質譜分析量測之連接至Asn 297之所有醣結構(例如複合、雜交及高甘露糖結構)的總和之平均量來確定，如例如WO 2008/077546中所描述。Asn297係指位於Fc區中位置297周圍之天冬醯胺殘基(EU編號Fc區殘基)；然而，由於抗體中之少量序列變異體，Asn297亦可位於位置297之上游或下游 ± 3 個胺基酸周圍，亦即位置294與300之間。此類海藻糖基化變異體可具有改良之ADCC功能。參見例如US 2003/0157108；US 2004/0093621。與「去海藻糖基化」或「缺乏海藻糖」之抗體變異體相關的公開案之實例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO 2005/053742；WO 2002/031140；Okazaki, A.等人, J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249；Yamane-Ohnuki, N.等人, Biotech. Bioeng. 87

(2004) 614-622。能夠產生去海藻糖基化抗體之細胞株之實例包括缺乏蛋白質海藻糖基化之Lec13 CHO細胞(Ripka, J.等人, Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545 ; US 2003/0157108 ; 及 WO 2004/056312, 尤其在實例11處), 及基因剔除細胞株, 諸如 α -1,6-海藻糖基轉移酶基因、FUT8、基因剔除CHO細胞(參見例如 Yamane-Ohnuki, N.等人, Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622 ; Kanda, Y.等人, Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688 ; 及 WO 2003/085107)。

抗體變異體進一步具備平分寡醣, 例如其中連接於抗體之Fc區的雙觸角寡醣藉由GlcNAc平分。此類抗體變異體可具有減少之海藻糖基化及/或改良之ADCC功能。此類抗體變異體之實例描述於例如 WO 2003/011878 ; US 6,602,684 ; 及 US 2005/0123546中。亦提供寡醣中之至少一個半乳糖殘基與Fc區連接之抗體變異體。此類抗體變異體可具有改良之CDC功能。此類抗體變異體描述於例如 WO 1997/30087 ; WO 1998/58964 ; 及 WO 1999/22764中。

c) Fc區變異體

在某些實施例中, 可將一或多個胺基酸修飾引入本文所提供之抗體之Fc區中, 進而產生Fc區變異體。Fc區變異體可包含在一或多個胺基酸位置包含胺基酸修飾(例如取代)之人類Fc區序列(例如, 人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)。

在某些實施例中, 本發明涵蓋具有一些而非所有效應功能之抗體變異體, 此使得該抗體成為合乎應用需要之候選物, 在該等應用中, 活體內抗體半衰期至關重要, 而某些效應功能(諸如補體及ADCC)為不必要或有害的。可進行活體外及/或活體內細胞毒性分析以確認CDC及/或ADCC活性之降低/損耗。舉例而言, 可進行Fc受體(FcR)結合分析以確保抗體缺乏Fc γ R結合(因此可能缺乏ADCC活性), 但保留FcR α 結合能力。用於介導ADCC之初級細胞NK細胞僅表現

FcγRIII，而單核細胞表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。FcR在造血細胞上之表現概述於Ravetch, J.V.及Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492之第464頁之表3中。評估相關分子之ADCC活性之活體外分析之非限制性實例描述於US 5,500,362 (參見例如Hellstrom, I.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 7059-7063；及Hellstrom, I.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1499-1502)；US 5,821,337 (參見Bruggemann, M.等人, *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1351-1361)中。或者，可採用非放射性分析方法(參見例如流動式細胞量測術之ACTI™非放射性細胞毒性分析(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA)；及CytoTox 96®非放射性細胞毒性分析(Promega, Madison, WI))。適用於此類分析之效應細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者或另外，可在活體內，例如在諸如Clynes, R.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 652-656中所揭示之動物模型中評估相關分子之ADCC活性。亦可進行C1q結合分析以確認抗體不能結合C1q且因此缺乏CDC活性(參見例如WO 2006/029879及WO 2005/100402中之C1q及C3c結合ELISA)。為評估補體活化，可進行CDC分析(參見例如Gazzano-Santoro, H.等人, *J. Immunol. Methods* 202 (1996) 163-171；Cragg, M.S.等人, *Blood* 101 (2003) 1045-1052；及Cragg, M.S.及M.J. Glennie, *Blood* 103 (2004) 2738-2743)。亦可使用此項技術中已知之方法(參見例如Petkova, S.B.等人, *Int. Immunol.* 18 (2006: 1759-1769)進行FcRn結合及活體內消除率/半衰期測定。

效應功能降低之抗體包括Fc區殘基238、265、269、270、297、327及329中之一或多者經取代之抗體(US 6,737,056)。此類Fc突變體包括在胺基酸位置265、269、270、297及327中之兩者或兩者以上處具有取代之Fc突變體，包括殘基265及297取代為丙胺酸之所謂「DANA」Fc突變體(US 7,332,581)。

描述與FcR之結合改良或減弱之某些抗體變異體。(參見例如US 6,737,056；WO 2004/056312；及Shields, R.L.等人, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604)。

在某些實施例中，抗體變異體包含具有改良ADCC之一或多個胺基酸取代(例如，Fc區之位置298、333及/或334處之取代(EU編號殘基))之Fc區。

在一些實施例中，在Fc區中進行改變，致使C1q結合及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)改變(亦即，改良或減弱)，例如如US 6,194,551、WO 99/51642及Idusogie, E.E.等人, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184中所描述。

半衰期延長且與負責將母體IgG轉移至胎兒之新生兒Fc受體(FcRn) (Guyer, R.L.等人, J. Immunol. 117 (1976) 587-593；及Kim, J.K.等人, J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434)之結合改良之抗體描述於US 2005/0014934中。彼等抗體包含具有一或多個取代之Fc區，在Fc區中該等取代改良Fc區與FcRn之結合。此類Fc變異體包括以下Fc區殘基中之一或多者經取代之Fc變異體：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434，例如Fc區殘基434經取代(US 7,371,826)。

關於Fc區變異體之其他實例，亦參見Duncan, A.R.及Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740；US 5,648,260；US 5,624,821；及WO 94/29351。

d) 半胱胺酸工程改造之抗體變異體

在某些實施例中，可能需要產生半胱胺酸工程改造之抗體，例如「thioMAb」，其中抗體之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代。在特定實施例中，經取代之殘基存在於抗體之可近接位點。藉由用半胱胺酸取代彼等殘基，反應性硫醇基進而定位於抗體之可近接位點且可

用於使抗體與其他部分(諸如藥物部分或連接子-藥物部分)結合以產生如本文中進一步描述之免疫結合物。在某些實施例中,以下殘基中之任一者或多者可經半胱胺酸取代:輕鏈之V205 (Kabat編號);重鏈之A118 (EU編號);及重鏈Fc區之S400 (EU編號)。可如例如US 7,521,541中所描述產生半胱胺酸工程改造之抗體。

e) 抗體衍生物

在某些實施例中,可將本文所提供之抗體進一步修飾以含有此項技術中已知且可易於獲得之額外非蛋白質部分。適合於抗體衍生作用之部分包括(但不限於)水可溶聚合物。水可溶聚合物之非限制性實例包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、聚葡萄糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啶酮、聚-1,3-二氧雜環戊烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)及聚葡萄糖或聚(n-乙烯吡咯啶酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯多元醇(例如,甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛因其於水中之穩定性而可具有製造優勢。聚合物可具有任何分子量,且可為分支鏈或未分支鏈的。與抗體連接之聚合物的數目可變化,且若連接一種以上聚合物,則聚合物可為相同或不同分子。一般而言,用於衍生作用之聚合物之數目及/或類型可基於包括(但不限於)待改良抗體之特定特性或功能、抗體衍生物是否將用於限定條件下之療法等考慮因素來確定。

在另一實施例中,提供抗體與可藉由暴露於輻射選擇性地加熱之非蛋白質部分之結合物。在一個實施例中,非蛋白質部分為碳奈米管(Kam, N.W.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605)。輻射可具有任何波長,且包括(但不限於)不損害普通細胞但將非蛋白質部分加熱至殺死抗體-非蛋白質部分近側之細胞之溫度的波長。

B. 重組方法及組合物

可使用例如如US 4,816,567中所描述之重組方法及組合物產生抗體。在一個實施例中，提供編碼本文所描述之抗ANG2抗體之分離核酸。此類核酸可編碼包含抗體之VL的胺基酸序列及/或包含抗體之VH的胺基酸序列(例如，抗體之輕鏈及/或重鏈)。在又一實施例中，提供包含此類核酸之一或多個載體(例如，表現載體)。在又一實施例中，提供包含此類核酸之宿主細胞。在一個此類實施例中，宿主細胞包含(例如例如已經以下轉化)：(1)包含編碼包含抗體之VL的胺基酸序列及包含抗體之VH的胺基酸序列之核酸的載體；或(2)包含編碼包含抗體之VL的胺基酸序列之核酸的第一載體，及包含編碼包含抗體之VH的胺基酸序列之核酸的第二載體。在一個實施例中，宿主細胞為真核的，例如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或淋巴細胞(例如，Y0、NS0、Sp20細胞)。在一個實施例中，提供一種製造抗ANG2抗體之方法，其中該方法包含在適合於表現抗體之條件下培養如上文所提供之包含編碼抗體之核酸的宿主細胞且視情況自宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收抗體。

為重組產生抗ANG2抗體，將例如如上文所描述之編碼抗體之核酸分離且插入一或多個載體中以便在宿主細胞中進一步選殖及/或表現。該核酸可易於使用習知程序(例如，藉由使用能夠特異結合於編碼抗體之重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)分離及定序。

適合於選殖或表現編碼抗體之載體之宿主細胞包括本文所描述之原核或真核細胞。舉例而言，抗體可於細菌中產生，尤其在不需要糖基化及Fc效應功能時。關於在細菌中表現抗體片段及多肽，參見例如US 5,648,237、US 5,789,199及US 5,840,523。(亦參見Charlton, K.A., In: *Methods in Molecular Biology*, 第248卷, Lo, B.K.C. (編), Humana Press, Totowa, NJ (2003), 第245-254頁，描述在大腸桿菌中表

現抗體片段)在表現之後，抗體可以可溶性部分自細菌細胞糊狀物分離且可進一步經純化。

除原核生物外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為適合於編碼抗體之載體的選殖或表現宿主，包括糖基化路徑已經「人類化」從而產生具有部分或完全人類糖基化型態之抗體的真菌及酵母菌株。參見Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414；及Li, H.等人, Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215。

適合於表現糖基化抗體之宿主細胞亦源於多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別出多種桿狀病毒株，其可與昆蟲細胞結合使用，尤其用於轉染草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞。

植物細胞培養物亦可用作宿主(參見例如US 5,959,177、US 6,040,498、US 6,420,548、US 7,125,978及US 6,417,429 (描述在轉殖基因植物中產生抗體之PLANTIBODIES™技術))。

脊椎動物細胞亦可用作宿主。舉例而言，適於在懸浮液中生長之哺乳動物細胞株可為適用的。適用之哺乳動物宿主細胞株之其他實例為經SV40 (COS-7)轉型之猴腎CV1株；人類胚腎株(如例如Graham, F.L.等人, J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74中所描述之293或293細胞)；幼倉鼠腎細胞(BHK)；小鼠塞特利氏細胞(mouse sertoli cell) (如例如Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252中所描述之TM4細胞)；猴腎細胞(CV1)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76)；人類子宮頸癌細胞(HELA)；犬腎細胞(MDCK；布法羅大鼠肝細胞(buffalo rat liver cell) (BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝細胞(Hep G2)；小鼠乳房瘤(MMT 060562)；如例如Mather, J.P.等人, Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68中所描述之TRI細胞；MRC 5細胞；及FS4細胞。其他適用之哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括DHFR-

CHO細胞(Urlaub, G.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220)；及骨髓瘤細胞株，諸如Y0、NS0及Sp2/0。關於適合於抗體產生之某些哺乳動物宿主細胞株之綜述，參見例如Yazaki, P.及Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, 第248卷，Lo, B.K.C. (編), Humana Press, Totowa, NJ (2004), 第255-268頁。

C. 分析

可藉由此項技術中已知之各種分析對本文所提供之抗ANG2抗體針對其物理/化學特性及/或生物活性進行鑑別、篩選或表徵。例示性分析報導於實例中。

D. 免疫結合物

本發明亦提供包含與一或多種細胞毒性劑結合之如本文所報導之抗ANG2抗體的免疫結合物，細胞毒性劑諸如化學治療劑或藥物、生長抑制劑、毒素(例如，蛋白毒素，細菌、真菌、植物或動物來源之酶促活性毒素，或其片段)或放射性同位素。

在一個實施例中，免疫結合物為抗體-藥物結合物(ADC)，其中抗體結合於一或多種藥物，包括(但不限於)類美登素(maytansinoid)(參見US 5,208,020、US 5,416,064及EP 0 425 235 B1)；奧瑞他汀(auristatin)，諸如單甲基奧瑞他汀藥物部分DE及DF (MMAE及MMAF)(參見US 5,635,483、US 5,780,588及US 7,498,298)；海兔毒素(dolastatin)；卡奇黴素(calicheamicin)或其衍生物(參見US 5,712,374、US 5,714,586、US 5,739,116、US 5,767,285、US 5,770,701、US 5,770,710、US 5,773,001及US 5,877,296；Hinman, L. M.等人, Cancer Res. 53 (1993) 3336-3342；及Lode, H.N.等人, Cancer Res. 58 (1998) 2925-2928)；蒽環黴素(anthracycline)，諸如道諾黴素(daunomycin)或小紅莓(doxorubicin)(參見Kratz, F.等人, Curr. Med. Chem. 13 (2006) 477-523；Jeffrey, S. C.等人, Bioorg. Med. Chem. Lett. 16 (2006) 358-

362 ; Torgov, M.Y.等人, Bioconjug. Chem. 16 (2005) 717-721 ; Nagy, A.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 829-834 ; Dubowchik, G.M.等人, Bioorg. & Med. Chem. Letters 12 (2002) 1529-1532 ; King, H.D.等人, J. Med. Chem. 45 (2002) 4336-4343 ; 及US 6,630,579) ; 甲胺喋呤(methotrexate) ; 長春地辛(vindesine) ; 紫杉烷(taxane) , 諸如多西他賽(docetaxel) 、太平洋紫杉醇、拉洛他賽(larotaxel) 、替司他賽(tesetaxel)及奧他賽(ortataxel) ; 單端孢黴烯族毒素(trichothecene) ; 及CC1065 。

在另一實施例中，免疫結合物包含與酶促活性毒素或其片段結合之如本文所描述之抗體，該酶促活性毒素或其片段包括(但不限於)白喉A鏈(diphtheria A chain)、白喉毒素(diphtheria toxin)之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A鏈(ricin A chain)、相思子毒素A鏈(abrin A chain)、莫迪素A鏈(modeccin A chain)、 α -帶麴菌素(alpha-sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、康乃馨(dianthin)蛋白、洋商陸(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(*momordica charantia*)抑制劑、麻瘋樹毒蛋白(curcin)、巴豆毒素(crotin)、肥皂草(*sapaonaria officinalis*)抑制劑、白樹素(gelonin)、有絲分裂素(mitogellin)、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素(phenomycin)、伊諾黴素(enomycin)及單端孢黴烯族毒素。

在另一實施例中，免疫結合物包含與放射性原子結合形成放射性結合物之如本文所描述之抗體。多種放射性同位素可用於產生放射性結合物。實例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及Lu之放射性同位素。當放射性結合物用於偵測時，其可包含用於閃爍攝影研究之放射性原子，例如 $\text{TC}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} ；或用於核磁共振(NMR)成像(亦稱為磁共振成像，MRI)之自旋標記，又

諸如碘-123、碘-131、銥-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、釷、錳或鐵。

可使用多種雙功能蛋白質偶合劑製得抗體與細胞毒性劑之結合物，該等雙功能蛋白質偶合劑諸如N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、丁二醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、亞胺基酯之雙功能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯HCl)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺基酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta, E.S.等人, *Science* 238 (1987) 1098-1104中所描述製備。碳-14標記之1-異硫氰基苄基-3-甲基二伸乙三胺五乙酸(MX-DTPA)為用於放射性核苷酸與抗體結合之例示性螯合劑。參見WO 94/11026。連接子可為在細胞中促進細胞毒性藥物釋放之「可裂解連接子」。舉例而言，可使用酸不穩定連接子、肽酶敏感連接子、光不穩定連接子、二甲基連接子或含二硫鍵連接子(Chari, R.V.等人, *Cancer Res.* 52 (1992) 127-131; US 5,208,020)。

本文之免疫結合物或ADC明確涵蓋(但不限於)用包括(但不限於)以下之交聯試劑製備之此類結合物：BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC及磺基-SMPB及SVSB(丁二醯亞胺基-(4-乙烯基磺)苯甲酸酯)，該等交聯試劑為市售可得(例如，來自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。

E. 用於診斷及偵測之方法及組合物

在某些實施例中，本文所提供之抗ANG2抗體中之任一者適用於偵測生物樣品中ANG2之存在。如本文所用之術語「偵測」涵蓋定量或定性偵測。

在一個實施例中，提供一種用於診斷或偵測方法之抗ANG2抗體。在又一態樣中，提供一種偵測生物樣品中ANG2之存在的方法。在某些實施例中，該方法包含使生物樣品與如本文所描述之抗ANG2抗體在容許抗ANG2抗體與ANG2結合之條件下接觸，且偵測抗ANG2抗體與ANG2之間是否形成複合物。此類方法可為活體外或活體內方法。在一個實施例中，使用抗ANG2抗體來選擇適於用抗ANG2抗體治療之個體，例如其中ANG2為用於患者選擇之生物標記。

在某些實施例中，提供標記之抗ANG2抗體。標記包括(但不限於)直接偵測之標記或部分(諸如螢光、發色、電子緻密、化學發光及放射性標記)，以及例如經由酶促反應或分子相互作用間接偵測之部分(諸如酶或配位體)。例示性標記包括(但不限於)放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 及 ^{131}I ；螢光團，諸如稀土螯合物或螢光素及其衍生物、若丹明(rhodamine)及其衍生物、丹醯基、傘酮；螢光素酶，例如螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶(US 4,737,456)；螢光素；2,3-二氫酞嗪二酮；辣根過氧化酶(HRP)；鹼性磷酸酶； β -半乳糖苷酶；葡糖澱粉酶；溶菌酶；醣氧化酶，例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸去氫酶；雜環氧化酶，諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶，其與採用過氧化氫氧化染料前驅體之酶(諸如HRP、乳過氧化酶或微過氧化酶)偶合；生物素/抗生物素蛋白；自旋標記；噬菌體標記；穩定自由基；及其類似標記。

F. 醫藥調配物

如本文所描述之抗ANG2抗體之醫藥調配物係藉由將具有所要純度之此類抗體與一或多種視情況選用之醫藥學上可接受之載劑混合

(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A. (編) (1980)), 以凍乾調配物或水溶液形式來製備。醫藥學上可接受之載劑在所用劑量及濃度下一般對接受者無毒, 且包括(但不限於): 緩衝劑, 諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸; 抗氧化劑, 包括抗壞血酸及甲硫胺酸; 防腐劑(諸如十八烷基二甲基苄基氯化銨; 氯化六羥季銨; 氯化苯甲烴銨; 苄索氯銨; 苯酚、丁醇或苄醇; 對羥基苯甲酸烷酯, 諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯; 兒茶酚; 間苯二酚; 環己醇; 3-戊醇; 及間甲酚); 低分子量(小於約10個殘基)多肽; 蛋白質, 諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白; 親水性聚合物, 諸如聚(乙烯吡咯啉酮); 胺基酸, 諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸; 單醣、雙醣及其他碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合劑, 諸如EDTA; 糖, 諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇; 成鹽相對離子, 諸如鈉; 金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物); 及/或非離子型界面活性劑, 諸如聚乙二醇(PEG)。本文之例示性醫藥學上可接受之載劑進一步包括間質性藥物分散劑, 諸如可溶性中性活性玻尿酸酶醣蛋白(sHASEGP), 例如人類可溶性PH-20玻尿酸酶醣蛋白, 諸如rhuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)。某些例示性 sHASEGP (包括 rhuPH20) 及使用方法描述於 US 2005/0260186及US 2006/0104968中。在一個態樣中, sHASEGP與一種或多種額外葡萄糖胺聚糖酶(諸如軟骨素酶)組合。

例示性凍乾抗體調配物描述於US 6,267,958中。水性抗體調配物包括US 6,171,586及WO 2006/044908中所描述之彼等調配物, WO 2006/044908中所描述之調配物包括組胺酸-乙酸鹽緩衝劑。

本文之調配物亦可含有一種以上為所治療之特定適應症所必需之活性成分, 較佳為具有不會對彼此產生不利影響之互補活性的活性成分。舉例而言, 可能需要進一步提供抗-IL-1 β 抗體或抗-PDGF-B抗

體。此類活性成分宜以有效達成預期目的之量組合存在。

可例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合將活性成分包覆於所製備之微囊中，例如羥甲基纖維素或明膠微囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊分別包覆於膠狀藥物遞送系統(例如，脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米囊劑)或巨乳液中。此類技術揭示於Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A. (編) (1980)中。

可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適合實例包括含有抗體之固體疏水性聚合物之半滲透基質，該等基質呈成形物品形式，例如膜或微囊。

用於活體內投與之調配物一般為無菌的。無菌性可易於藉由例如經由無菌過濾膜過濾來實現。

G. 治療方法及組合物

本文所提供之抗ANG2抗體中之任一者可用於治療方法中。

在一個態樣中，提供一種用作藥物之抗ANG2抗體。在其他態樣中，提供一種用於治療眼部血管疾病、較佳黃斑退化之抗ANG2抗體。在某些實施例中，提供一種用於治療方法中之抗ANG2抗體。在某些實施例中，本發明提供一種用於治療患有眼部血管疾病(較佳黃斑退化)之個體的方法中之抗ANG2抗體，該方法包含向個體投與有效量之抗ANG2抗體。在一個此類實施例中，該方法進一步包含向個體投與有效量之至少一種例如如下文所描述之額外治療劑。在其他實施例中，本發明提供一種用於抑制血管生成之抗ANG2抗體。在某些實施例中，本發明提供一種用於抑制個體中血管生成之方法中的抗ANG2抗體，該方法包含向個體投與有效之抗ANG2抗體以抑制血管生成。根據以上實施例中之任一者之「個體」較佳為人類。

在又一態樣中，本發明提供抗ANG2抗體用於製造或製備藥物之用途。在一個實施例中，該藥物用於治療眼部血管疾病，較佳黃斑退

化。在又一實施例中，該藥物用於治療眼部血管疾病(較佳黃斑退化)之方法，該方法包含向患有眼部血管疾病(較佳黃斑退化)之個體投與有效量之藥物。在一個此類實施例中，該方法進一步包含向個體投與有效量之至少一種例如如下文所描述之額外治療劑。在又一實施例中，藥物用於抑制血管生成。在又一實施例中，藥物用於抑制個體中血管生成之方法中，該方法包含向個體投與有效量之藥物以抑制血管生成。根據以上實施例中之任一者之「個體」可為人類。

在又一態樣中，本發明提供一種治療眼部血管疾病(較佳黃斑退化)之方法。在一個實施例中，該方法包含向患有此類眼部血管疾病(較佳黃斑退化)之個體投與有效量之抗ANG2抗體。在一個此類實施例中，該方法進一步包含向個體投與有效量之至少一種如下文所描述之額外治療劑。根據以上實施例中之任一者之「個體」可為人類。

在又一態樣中，本發明提供一種抑制個體中血管生成之方法。在一個實施例中，該方法包含向個體投與有效量之抗ANG2抗體以抑制血管生成。在一個實施例中，「個體」為人類。

在又一態樣中，本發明提供包含本文所提供之抗ANG2抗體中之任一者的醫藥調配物，其例如用於上述治療方法中之任一者。在一個實施例中，醫藥調配物包含本文所提供之抗ANG2抗體中之任一者及醫藥學上可接受之載劑。在另一實施例中，醫藥調配物包含本文所提供之抗ANG2抗體中之任一者及至少一種例如如下文所描述之額外治療劑。

本發明抗體可單獨或與其他藥劑組合用於療法中。舉例而言，本發明抗體可與至少一種額外治療劑共投與。在某些實施例中，額外治療劑為抗-IL-1 β 抗體或抗-PDGF-B抗體。

上文所提及之此類組合療法涵蓋組合投與(其中兩種或兩種以上治療劑包括在同一或單獨調配物中)及單獨投與，在此情況下，本發

明抗體之投與可在投與額外治療劑之前、同時及/或之後進行。在一個實施例中，抗ANG2抗體之投與及額外治療劑之投與彼此在約一個月內；或在約一週、兩週或三週內；或在約一天、兩天、三天、四天、五天或六天內進行。

本發明抗體(及任何額外治療劑)可藉由任何適合手段投與，包括非經腸、靜脈內、玻璃體內、肺內及鼻內及視局部治療需要病灶內投與。非經腸輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投與。部分視投與之短期或長期性而定，可藉由任何適合途徑(例如藉由注射，諸如靜脈內或皮下注射)給藥。本文涵蓋各種給藥時程，包括(但不限於)單次投與或在不同時間點多次投與、快速投與及脈衝式輸注。

本發明抗體將以與良好醫療實踐一致之方式調配、給藥及投與。在此情形下考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床病狀、病症起因、藥劑遞送位點、投與方法、投與時程及醫學從業者已知之其他因素。抗體無需但視情況可與一或多種當前用於預防或治療所述病症之藥劑一起調配。此類其他藥劑之有效量視存在於調配物中之抗體之量、病症或治療之類型及上文所論述之其他因素而定。此等藥劑一般以相同劑量且以如本文所描述之投與途徑使用，或以本文所描述之劑量之約1%至99%使用，或以任何劑量且以憑經驗/臨床上確定為適當之任何途徑使用。

為預防或治療疾病，本發明抗體之適當劑量(當單獨或與一或多種其他額外治療劑組合使用時)將視待治療疾病之類型、抗體類型、疾病之嚴重程度及病程、是否出於預防或治療目的投與抗體、先前療法、患者之臨床病史及對抗體之反應及主治醫師之判斷而定。一次性或歷經一系列治療向患者適當投與抗體。視疾病之類型及嚴重程度而定，約1 $\mu\text{g/kg}$ 至50 mg/kg (例如0.5 mg/kg 至30 mg/kg)抗體可為向患者

投與之初始候選劑量，例如不論藉由一或多次單獨投與或藉由連續輸注。一個典型日劑量視上文所提及之因素而定可在約1 $\mu\text{g/kg}$ 至100 mg/kg 或100 mg/kg 以上之範圍內。對於經歷數日或更長時間之重複投與，視病狀而定，治療一般將持續至疾病症狀之所需抑制發生為止。抗體之一個例示性劑量將在約0.05 mg/kg 至約10 mg/kg 範圍內。因此，可向患者投與約0.5 mg/kg 、2.0 mg/kg 、4.0 mg/kg 、10 mg/kg 、30 mg/kg 或50 mg/kg (或其任何組合)中之一或多個劑量。此類劑量可間歇地投與，例如每週或每三週(例如以使得患者接受約二至約二十或例如約六個劑量的抗體)。初始可投與較高起始劑量，隨後可投與一或多個較低劑量。然而，其他給藥方案可為適用的。此療法之進展易於藉由習知技術及分析監測。

應理解，替代或除抗ANG2抗體之外，可使用本發明之免疫結合物進行任何上述調配或治療方法。

III. 製品

在本發明之另一態樣中，提供一種含有適用於治療、預防及/或診斷上文所描述之病症之物質的製品。製品包含容器及容器上或容器隨附之標記或藥品說明書。適合容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可由多種材料(諸如玻璃或塑膠)形成。容器容納單獨或與有效治療、預防及/或診斷病狀之另一組合物組合之組合物，且可具有無菌接取口(例如容器可為具有可由皮下注射針刺穿之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。組合物中之至少一種活性劑為本發明抗體。標記或藥品說明書指示組合物用於治療所選病狀。此外，製品可包含(a)其中含有組合物之第一容器，其中該組合物包含本發明抗體；及(b)其中含有組合物之第二容器，其中該組合物包含另一細胞毒性劑或其他治療劑。本發明之此實施例中之製品可進一步包含指示組合物可用於治療特定病狀之藥品說明書。或者或另外，製品可進一

步包含第二(或第三)容器，其包含醫藥學上可接受之緩衝劑，諸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。其可進一步包括就商業及使用者觀點而言所需之其他物質，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

應理解，替代或除抗ANG2抗體之外，上述製品中之任一者可包括本發明之免疫結合物。

IV. 特定實施例

1. 一種特異性結合於人類ANG2之抗體，其中該抗體包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 20之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 21之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 23之HVR-H3。

2. 一種特異性結合於人類ANG2之抗體，其中該抗體包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 20之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 22之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 23之HVR-H3。

3. 如實施例1至2中任一項之抗體，其中該抗體包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 25之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 26之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 27之HVR-L3。

4. 如實施例1至2中任一項之抗體，其中該抗體包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 34之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 35之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 36之HVR-L3。

5. 如實施例1至4中任一項之抗體，其中該抗體包含(a)與胺基酸序列SEQ ID NO: 19具有至少95%序列一致性之VH序列；(b)與胺基酸序列SEQ ID NO: 06或SEQ ID NO: 33具有至少95%序列一致性之VL序列；或(c)如(a)中之VH序列及如(b)中之VL序列。

6. 一種特異性結合於人類ANG2之抗體，其中該抗體包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 38之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 39之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 41之HVR-H3。

7. 一種特異性結合於人類ANG2之抗體，其中該抗體包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 38之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 40之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 41之HVR-H3。

8. 如實施例6至7中任一項之抗體，其中該抗體包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 43之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 44之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 45之HVR-L3。

9. 如實施例6至8中任一項之抗體，其中該抗體包含(a)與胺基酸序列SEQ ID NO: 37具有至少95%序列一致性之VH序列；(b)與胺基酸序列SEQ ID NO: 42具有至少95%序列一致性之VL序列；或(c)如(a)中之VH序列及如(b)中之VL序列。

10. 一種特異性結合於人類ANG2之抗體，其中該抗體

i) 包含與SEQ ID NO: 19之序列一致性超過70%之重鏈可變域及與SEQ ID NO: 6之序列一致性超過70%之輕鏈可變域，

ii) 在該重鏈可變域中在位置28具有胺基酸殘基天冬醯胺(N)、在位置30具有胺基酸殘基丙胺酸(A)、在位置100b具有胺基酸殘基脯胺酸(P)及在位置100j具有胺基酸殘基丙胺酸(A)，且在該輕鏈可變域中在位置51具有胺基酸殘基蘇胺酸(T) (根據Kabat編號)，及

iii) 與包含與SEQ ID NO: 19具有序列一致性之重鏈可變域及與SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 33具有序列一致性之輕鏈可變域的抗體相比，該抗體在使用穩定表現人類Tie2之HEK293細胞之基於細胞的分析中使用Tie2磷酸化ELISA測定的抑制ANG2結合於其受體Tie2之EC₅₀值較低。

11. 如實施例10之抗體，其中該序列一致性為超過80%，較佳超過90%，最佳95%或95%以上。

12. 如實施例1至11中任一項之抗體，其中該抗體為人類子類IgG1或人類子類IgG4。

13. 如實施例1至12中任一項之抗體，其中該抗體為單株抗體。
14. 一種抗體，其包含SEQ ID NO: 28之VH序列及SEQ ID NO: 33之VL序列。
15. 一種抗體，其包含SEQ ID NO: 19之VH序列及SEQ ID NO: 24之VL序列。
16. 一種抗體，其包含SEQ ID NO: 37之VH序列及SEQ ID NO: 42之VL序列。
17. 如實施例1至16中任一項之抗體，其中該抗體為雙特異性抗體。
18. 如實施例17之抗體，其中該雙特異性抗體為CrossMab。
19. 如實施例1至18中任一項之抗體，其中該抗體藉由抑制人類ANG2與人類Tie2受體結合來阻斷人類ANG2之生物活性。
20. 如實施例1至19中任一項之抗體，其中該抗體為二價雙特異性抗體，其包含
 - a) 特異性結合於第一抗原之抗體之第一輕鏈及第一重鏈，及
 - b) 特異性結合於第二抗原之抗體之第二輕鏈及第二重鏈，其中該第二輕鏈及該第二重鏈之可變域VL及VH經彼此置換，其中該第一抗原或該第二抗原為人類ANG2。
21. 如實施例20之抗體，其中該抗體包含
 - i) 在a)項之該第一輕鏈之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H) (根據Kabat編號)獨立取代(在一個較佳實施例中，經離胺酸(K)或精胺酸(R)獨立取代)，且其中在a)項之該第一重鏈之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D) (根據Kabat EU索引編號)獨立取代，
 - 或
 - ii) 在b)項之該第二輕鏈之恆定域CL中，位置124之胺基酸經離

胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H) (根據Kabat編號)獨立取代(在一個較佳實施例中，經離胺酸(K)或精胺酸(R)獨立取代)，且其中在b)項之該第二重鏈之恆定域CH1中，位置147之胺基酸或位置213之胺基酸經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D) (根據Kabat EU索引編號)獨立取代。

22. 如實施例20至21中任一項之抗體，其中該抗體包含在該第二重鏈之該恆定域CL中位置124及123之胺基酸經K取代(根據Kabat EU索引編號)。

23. 如實施例20至22中任一項之抗體，其中該抗體包含在該第二輕鏈之該恆定域CH1中位置147及213之胺基酸經E取代(根據Kabat EU索引編號)。

24. 如實施例20至23中任一項之抗體，其中該抗體包含在該第一輕鏈之該恆定域CL中位置124及123之胺基酸經K取代，且在該第一重鏈之該恆定域CH1中位置147及213之胺基酸經E取代(根據Kabat EU索引編號)。

25. 如實施例20至24中任一項之抗體，其中該抗體包含在該第二重鏈之該恆定域CL中位置124及123之胺基酸經K取代，且其中在該第二輕鏈之該恆定域CH1中位置147及213之胺基酸經E取代，且在該第一輕鏈之該可變域VL中位置38之胺基酸經K取代，在該第一重鏈之該可變域VH中位置39之胺基酸經E取代，在該第二重鏈之該可變域VL中位置38之胺基酸經K取代，且在該第二輕鏈之該可變域VH中位置39之胺基酸經E取代(根據Kabat EU索引編號)。

26. 如實施例1至19中任一項之抗體，其中該抗體為二價雙特異性抗體，其包含

a) 特異性結合於第一抗原之抗體之第一輕鏈及第一重鏈，及

b) 特異性結合於第二抗原之抗體之第二輕鏈及第二重鏈，其中該第二輕鏈及該第二重鏈之可變域VL及VH經彼此置換，且其中該第

二輕鏈及該第二重鏈之恆定域CL及CH1經彼此置換，

其中該第一抗原或該第二抗原為人類ANG2。

27. 如實施例1至19中任一項之抗體，其中該抗體為二價雙特異性抗體，其包含

a) 特異性結合於第一抗原之抗體之第一輕鏈及第一重鏈，及

b) 特異性結合於第二抗原之抗體之第二輕鏈及第二重鏈，其中該第二輕鏈及該第二重鏈之恆定域CL及CH1經彼此置換，

其中該第一抗原或該第二抗原為人類ANG2。

28. 如實施例1至19中任一項之抗體，其中該抗體為多特異性抗體，其包含

a) 全長抗體，其特異性結合於第一抗原且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成，及

b) 一個、兩個、三個或四個單鏈Fab片段，其特異性結合於一至四個其他抗原(亦即第二及/或第三及/或第四及/或第五抗原，較佳特異性結合於另一抗原，亦即第二抗原)，

其中b)項之該等單鏈Fab片段與a)項之該全長抗體在該全長抗體之該重鏈或輕鏈之C端或N端經由肽連接子融合，

其中該第一抗原或該等其他抗原中之一者為人類ANG2。

29. 如實施例1至19中任一項之抗體，其中該抗體為三價雙特異性抗體，其包含

a) 全長抗體，其特異性結合於第一抗原且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成，

b) 第一多肽，其由以下組成

ba) 抗體重鏈可變域(VH)，

或

bb) 抗體重鏈可變域(VH)及抗體恆定域1 (CH1)，

其中該第一多肽之VH域之N端經由肽連接子與該全長抗體之該等兩個重鏈中之一者的C端融合，

c) 第二多肽，其由以下組成

ca) 抗體輕鏈可變域(VL)，

或

cb) 抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域(CL)，

其中該第二多肽之VL域之N端經由肽連接子與該全長抗體之該等兩個重鏈中之另一者的C端融合，

及

其中該第一多肽之該抗體重鏈可變域(VH)與該第二多肽之該抗體輕鏈可變域(VL)一起形成特異性結合於第二抗原之抗原結合位點，

及

其中該第一抗原或該第二抗原為人類ANG2。

30. 如實施例29之抗體，其中將b)項之該多肽之該抗體重鏈可變域(VH)與c)項之該多肽之該抗體輕鏈可變域(VL)連接且藉由在以下位置之間引入二硫鍵經由鏈間二硫橋鍵穩定：

i) 重鏈可變域位置44至輕鏈可變域位置100，或

ii) 重鏈可變域位置105至輕鏈可變域位置43，或

iii) 重鏈可變域位置101至輕鏈可變域位置100 (始終根據Kabat EU索引編號)。

31. 如實施例1至19中任一項之抗體，其中該抗體為三特異性或四特異性抗體，其包含

a) 特異性結合於第一抗原之全長抗體之第一輕鏈及第一重鏈，

及

b) 特異性結合於第二抗原之全長抗體之第二(修飾)輕鏈及第二(修飾)重鏈，其中可變域VL及VH經彼此置換，及/或其中恆定域CL及

CH1經彼此置換，及

c) 其中特異性結合於一或兩個其他抗原(亦即，第三及/或第四抗原)之一至四個抗原結合肽經由肽連接子與a)及/或b)之該等輕鏈或重鏈之C端或N端融合，

其中該第一抗原或該第二抗原或該等其他抗原中之一者為人類ANG2。

32. 如實施例1至19中任一項之抗體，其中該抗體為雙特異性四價抗體，其包含

a) 特異性結合於第一抗原(且包含兩個Fab片段)之抗體之兩個輕鏈及兩個重鏈，

b) 特異性結合於第二抗原之抗體之兩個額外Fab片段，其中該等額外Fab片段皆經由肽連接子與a)之該等重鏈之C端或N端融合，

及

其中在該等Fab片段中進行以下修飾

i) 在a)之兩個Fab片段中或在b)之兩個Fab片段中，該等可變域VL及VH經彼此置換，及/或該等恆定域CL及CH1經彼此置換，

或

ii) 在a)之兩個Fab片段中，該等可變域VL及VH經彼此置換，且該等恆定域CL及CH1經彼此置換，

及

在b)之兩個Fab片段中，該等可變域VL及VH經彼此置換，或該等恆定域CL及CH1經彼此置換，

或

iii) 在a)之兩個Fab片段中，該等可變域VL及VH經彼此置換，或該等恆定域CL及CH1經彼此置換，

及

在b)之兩個Fab片段中，該等可變域VL及VH經彼此置換，且該等恆定域CL及CH1經彼此置換，

或

iv) 在a)之兩個Fab片段中，該等可變域VL及VH經彼此置換，且在b)之兩個Fab片段中，該等恆定域CL及CH1經彼此置換，

或

v) 在a)之兩個Fab片段中，該等恆定域CL及CH1經彼此置換，且在b)之兩個Fab片段中，該等可變域VL及VH經彼此置換，

其中該第一抗原或該第二抗原為人類ANG2。

33. 如實施例1至19中任一項之抗體，其中該抗體為雙特異性四價抗體，其包含：

a) 特異性結合於第一抗原且包含第一VH-CH1域對之第一抗體之(修飾)重鏈，其中該第一抗體之第二VH-CH1域對之N端經由肽連接子與該重鏈之C端融合，

b) a)之該第一抗體之兩個輕鏈，

c) 特異性結合於第二抗原且包含第一VH-CL域對之第二抗體之(修飾)重鏈，其中該第二抗體之第二VH-CL域對之N端經由肽連接子與該重鏈之C端融合，及

d) c)之該第二抗體之兩個(修飾)輕鏈，各自包含CL-CH1域對，其中該第一抗原或該第二抗原為人類ANG2。

34. 如實施例1至19中任一項之抗體，其中該抗體為雙特異性抗體，其包含

a) 特異性結合於第一抗原之第一全長抗體之重鏈及輕鏈，及

b) 特異性結合於第二抗原之第二全長抗體之重鏈及輕鏈，其中該重鏈之N端經由肽連接子與該輕鏈之C端連接，

其中該第一抗原或該第二抗原為人類ANG2。

35. 如實施例1至19中任一項之抗體，其中該抗體為雙特異性抗體，其包含

a) 全長抗體，其特異性結合於第一抗原且由兩個抗體重鏈及兩個抗體輕鏈組成，及

b) Fv片段，其特異性結合於包含VH²域及VL²域之第二抗原，其中兩個域經由二硫橋鍵彼此連接，

其中僅該VH²域或該VL²域經由肽連接子與特異性結合於第一抗原之該全長抗體之該重鏈或輕鏈融合，

其中該第一抗原或該第二抗原為人類ANG2。

36. 如實施例1至35中任一項之抗體，其中該抗體包含第一Fc區多肽及第二Fc區多肽，及

其中

i) 該第一Fc區多肽選自包含以下之群

- 人類IgG1 Fc區多肽，
- 人類IgG2 Fc區多肽，
- 人類IgG3 Fc區多肽，
- 人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變L234A、L235A之人類IgG1 Fc區多肽，
- 具有突變Y349C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG1 Fc區多肽，
- 具有突變S354C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG1 Fc區多肽，
- 具有突變L234A、L235A、Y349C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG1 Fc區多肽，
- 具有突變L234A、L235A、S354C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG1 Fc區多肽，

- 具有突變P329G之人類IgG1 Fc區多肽，
- 具有突變L234A、L235A、P329G之人類IgG1 Fc區多肽，
- 具有突變P329G、Y349C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG1 Fc區多肽，
- 具有突變P329G、S354C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG1 Fc區多肽，
- 具有突變L234A、L235A、P329G、Y349C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG1 Fc區多肽，
- 具有突變L234A、L235A、P329G、S354C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG1 Fc區多肽，
- 具有突變S228P、L235E之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變S228P、L235E、P329G之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變Y349C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變S354C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變S228P、L235E、Y349C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變S228P、L235E、S354C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變P329G之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變P329G、Y349C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變P329G、S354C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變S228P、L235E、P329G、Y349C、T366S、L368A、

Y407V之人類IgG4 Fc區多肽，

- 具有突變 S228P、L235E、P329G、S354C、T366S、L368A、

Y407V之人類IgG4 Fc區多肽，

- 具有突變K392D之人類IgG1、IgG2或IgG4，及
- 具有突變N392D之人類IgG3，

及

ii) 該第二Fc區多肽選自包含以下之群

- 人類IgG1 Fc區多肽，
- 人類IgG2 Fc區多肽，
- 人類IgG3 Fc區多肽，
- 人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變L234A、L235A之人類IgG1 Fc區多肽，
- 具有突變S354C、T366W之人類IgG1 Fc區多肽，
- 具有突變Y349C、T366W之人類IgG1 Fc區多肽，
- 具有突變L234A、L235A、S354C、T366W之人類IgG1 Fc區多

肽，

- 具有突變L234A、L235A、Y349C、T366W之人類IgG1 Fc區多

肽，

- 具有突變P329G之人類IgG1 Fc區多肽，
- 具有突變L234A、L235A、P329G之人類IgG1 Fc區多肽，
- 具有突變P329G、S354C、T366W之人類IgG1 Fc區多肽，
- 具有突變P329G、Y349C、T366W之人類IgG1 Fc區多肽，
- 具有突變L234A、L235A、P329G、S354C、T366W之人類IgG1

Fc區多肽，

- 具有突變L234A、L235A、P329G、Y349C、T366W之人類

IgG1 Fc區多肽，

- 具有突變S228P、L235E之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變S228P、L235E、P329G之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變S354C、T366W之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變Y349C、T366W之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變S228P、L235E、S354C、T366W之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變S228P、L235E、Y349C、T366W之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變P329G之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變P329G、S354C、T366W之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變P329G、Y349C、T366W之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變S228P、L235E、P329G、S354C、T366W之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變S228P、L235E、P329G、Y349C、T366W之人類IgG4 Fc區多肽，
- 具有突變D399K、D356K及/或E357K之人類IgG1，及
- 具有突變D399K、E356K及/或E357K之人類IgG2、IgG3或IgG4。

37. 如實施例1至35中任一項之抗體，其中該抗體包含第一Fc區多肽及第二Fc區多肽，及

其中

- i) 該第一Fc區多肽為人類IgG1 Fc區多肽且該第二Fc區多肽為人類IgG1 Fc區多肽，或
- ii) 該第一Fc區多肽為具有突變L234A、L235A之人類IgG1 Fc區多肽且該第二Fc區多肽為具有突變L234A、L235A之人類IgG1 Fc區多肽，或

iii) 該第一Fc區多肽為具有突變L234A、L235A、P329G之人類IgG1 Fc區多肽且該第二Fc區多肽為具有突變L234A、L235A、P329G之人類IgG1 Fc區多肽，或

iv) 該第一Fc區多肽為具有突變L234A、L235A、S354C、T366W之人類IgG1 Fc區多肽且該第二Fc區多肽為具有突變L234A、L235A、Y349C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG1 Fc區多肽，或

v) 該第一Fc區多肽為具有突變L234A、L235A、P329G、S354C、T366W之人類IgG1 Fc區多肽且該第二Fc區多肽為具有突變L234A、L235A、P329G、Y349C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG1 Fc區多肽，或

vi) 該第一Fc區多肽為人類IgG4 Fc區多肽且該第二Fc區多肽為人類IgG4 Fc區多肽，或

vii) 該第一Fc區多肽為具有突變S228P、L235E之人類IgG4 Fc區多肽且該第二Fc區多肽為具有突變S228P、L235E之人類IgG4 Fc區多肽，或

viii) 該第一Fc區多肽為具有突變S228P、L235E、P329G之人類IgG4 Fc區多肽且該第二Fc區多肽為具有突變S228P、L235E、P329G之人類IgG4 Fc區多肽，或

ix) 該第一Fc區多肽為具有突變S228P、L235E、S354C、T366W之人類IgG4 Fc區多肽且該第二Fc區多肽為具有突變S228P、L235E、Y349C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG4 Fc區多肽，或

x) 該第一Fc區多肽為具有突變S228P、L235E、P329G、S354C、T366W之人類IgG4 Fc區多肽且該第二Fc區多肽為具有突變S228P、L235E、P329G、Y349C、T366S、L368A、Y407V之人類IgG4 Fc區多肽。

38. 如實施例1至37中任一項之抗體，其中該抗體包含第一Fc區

多肽及第二Fc區多肽，及

其中該抗體將以下突變之組合

- i) I253A、H310A及H435A，或
- ii) H310A、H433A及Y436A，或
- iii) L251D、L314D及L432D，或
- iv) i)至iii)之組合

包含於該第一Fc區多肽及該第二Fc區多肽中。

39. 如實施例1至37中任一項之抗體，其中該抗體包含第一Fc區多肽及第二Fc區多肽，且其中

a) 該第一及第二Fc區多肽皆為人類IgG1或人類IgG4子類(源於人源)，且在該第一Fc區多肽中包含選自i)組I253A、H310A及H435A或ii)組H310A、H433A及Y436A或iii)組L251D、L314D及L432D (根據Kabat EU索引編號系統編號)之一或兩個突變，且在該第二Fc區多肽中包含選自包含突變L251D、I253A、H310A、L314D、L432D、H433A、H435A及Y436A (根據Kabat EU索引編號系統編號)之群之一或兩個突變，使得該第一及第二Fc區多肽中之所有突變在結合在一起時導致突變i) I253A、H310A及H435A或ii) H310A、H433A及Y436A或iii) L251D、L314D及L432D包含於變異體(人類) IgG類別Fc區中，
或

b) 該第一及第二Fc區多肽皆為人類IgG1或人類IgG4子類(亦即源於人源)，且皆在Fc區中包含突變I253A/H310A/H435A或H310A/H433A/Y436A或L251D/L314D/L432D或其組合(根據Kabat EU索引編號系統編號)，其中所有突變在該第一或該第二Fc區多肽中，或一或兩個突變在該第一Fc區多肽中且一或兩個突變在該第二Fc區多肽中，使得該第一及該第二Fc區多肽中之所有突變在結合在一起時導致突變i) I253A、H310A及H435A或ii) H310A、H433A及Y436A或iii)

L251D、L314D及L432D包含於Fc區中，

或

c) 該第一及第二Fc區多肽皆為人類IgG1或人類IgG4子類(亦即源於人源)，且在該第一以及該第二Fc區多肽中包含突變I253A/H310A/H435A或H310A/H433A/Y436A或L251D/L314D/L432D(根據Kabat EU索引編號系統編號)，或在該第一Fc區多肽中包含突變I253A/H310A/H435A之組合且在該第二Fc區多肽中包含突變H310A/H433A/Y436A之組合(根據Kabat EU索引編號系統編號)。

40. 如實施例1至37中任一項之抗體，其中該抗體包含第一Fc區多肽及第二Fc區多肽，且其中

a) 第一變異體Fc區多肽源於第一親本IgG類別Fc區多肽且第二變異體Fc區多肽源於第二親本IgG類別Fc區多肽，其中該第一親本IgG類別Fc區多肽與該第二親本IgG類別Fc區多肽相同或不同，及

b) 該第一變異體Fc區多肽與該第二變異體Fc區多肽之一或多個胺基酸殘基不同，該第一親本IgG類別Fc區多肽與該第二親本IgG類別Fc區多肽不同之彼等胺基酸殘基除外，及

c) 包含該第一變異體Fc區多肽及該第二變異體Fc區多肽之IgG類別Fc區對人類Fc受體的親和力不同於包含a)之該第一親本IgG類別Fc區多肽及a)之該第二親本IgG類別Fc區多肽的IgG類別Fc區對人類Fc受體的親和力，

其中該第一Fc區多肽或該第二Fc區多肽或兩個Fc區多肽彼此獨立地包含以下突變或突變組合中之一者：

- T307H，或
- Q311H，或
- E430 H，或
- N434H，或

- T307H及Q311H，或
- T307H及E430H，或
- T307H及N434A，或
- T307H及N434H，或
- T307Q及Q311H，或
- T307Q及E430H，或
- T307Q及N434H，或
- T307H及Q311H及E430H及N434A，或
- T307H及Q311H及E430H及N434H，或
- T307H及Q311H及E430H及N434Y，或
- T307Q及Q311H及E430H及N434A，或
- T307Q及Q311H及E430H及N434H，或
- T307Q及Q311H及E430H及N434Y，或
- T307Q及V308P及N434Y及Y436H，或
- T307H及M252Y及S254T及T256E，或
- T307Q及M252Y及S254T及T256E，或
- Q311H及M252Y及S254T及T256E，或
- E430 H及M252Y及S254T及T256E，或
- N434H及M252Y及S254T及T256E，或
- T307H及Q311H及M252Y及S254T及T256E，或
- T307H及E430H及M252Y及S254T及T256E，或
- T307H及N434A及M252Y及S254T及T256E，或
- T307H及N434H及M252Y及S254T及T256E，或
- T307Q及Q311H及M252Y及S254T及T256E，或
- T307Q及E430H及M252Y及S254T及T256E，或
- T307Q及N434H及M252Y及S254T及T256E，或

- T307H及Q311H及E430H及N434A及M252Y及S254T及T256E，
或
- T307H及Q311H及E430H及N434H及M252Y及S254T及T256E，
或
- T307H及Q311H及E430H及N434Y及M252Y及S254T及T256E，
或
- T307Q及Q311H及E430H及N434A及M252Y及S254T及T256E，
或
- T307Q及Q311H及E430H及N434H及M252Y及S254T及T256E，
或
- T307Q及Q311H及E430H及N434Y及M252Y及S254T及T256E，
或
- T307Q及V308P及N434Y及Y436H及M252Y及S254T及T256E。

41. 如實施例1至37中任一項之抗體，其中該抗體包含第一Fc區多肽及第二Fc區多肽，

且其中該第一Fc區多肽包含突變Y349C、T366S、L368A及Y407V(孔鏈)且該第二Fc區多肽包含突變S354C及T366W(結鏈)，

且其中該第一Fc區多肽(孔鏈)包含以下突變

- i) I253A或I253G，及
- ii) L314A或L314G或L314D，

且其中該第一Fc區多肽與該第二Fc區多肽藉由一或多個二硫橋鍵連接，

且其中第一多肽之CH3域及第二多肽之CH3域皆結合或不結合於蛋白A

(根據Kabat EU索引編號)。

42. 如實施例41之抗體，其中該抗體包含以下突變

- i) I253A或I253G，及
- ii) L314A或L314G或L314D，及
- iii) T250Q，及/或
- iv) T256E或T256A。

43. 如實施例41至42中任一項之抗體，其中該抗體包含以下突

變

- i) I253A或I253G，及
- ii) L314A或L314G或L314D，及
- iii) 視情況a) T250Q及/或T256E或T256A，及
- iv) a) L251A或L251G或L251D，及/或b) H310A或H310G。

44. 如實施例41至43中任一項之抗體，其中該抗體包含以下突

變

- i) I253A或I253G，及
- ii) L314A或L314G或L314D，及
- iii) a) T250Q及/或T256E或T256A，及
- iv) a) L251A或L251G或L251D，及/或b) H310A或H310G，
- v) 視情況 a) T307A 或 T307H 或 T307Q 或 T307P，及 / 或 b) Q311H，及/或c) M252Y，及/或d) S254T。

45. 如實施例41至44中任一項之抗體，其中該抗體包含以下突變

- i) T250Q，及/或
- ii) M252Y，及/或
- iii) S254T，及/或
- iv) T256E或T256A，及/或
- v) T307A或T307H或T307Q或T307P，及/或
- vi) Q311H。

46. 一種分離抗體或分離抗體Fab片段，其包含

- a) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 57之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- b) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 58之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- c) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 59之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- d) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 60之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- e) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 61之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- f) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 62之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- g) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 63之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- h) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 64之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- i) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 65之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- j) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 46之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 66之輕鏈，或
- k) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 46之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 67之輕鏈，或
- l) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 68之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- m) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 69之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 50之輕鏈，或

- n) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 70之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- o) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 47之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- p) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 71之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- q) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 72之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- r) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 73之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- s) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 72之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 50之輕鏈，或
- t) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 73之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 50之輕鏈，或
- u) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 48之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- v) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 48之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 50之輕鏈，或
- w) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 74之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- x) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 74之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 50之輕鏈，或
- y) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 47之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 50之輕鏈，或
- z) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 51之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或

- aa) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 52之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 49之輕鏈，或
- ab) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 52之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 50之輕鏈，或
- ac) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 53之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 50之輕鏈，或
- ad) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 47之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 78之輕鏈，或
- ae) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 48之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 78之輕鏈，或
- af) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 46之重鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 50之輕鏈，或
- ag) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 83之第一重鏈、具有胺基酸序列SEQ ID NO: 81之第二重鏈、具有胺基酸序列SEQ ID NO: 84之第一輕鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 82之第二輕鏈，或
- ah) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 85之第一重鏈、具有胺基酸序列SEQ ID NO: 81之第二重鏈、具有胺基酸序列SEQ ID NO: 86之第一輕鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 82之第二輕鏈，或
- ai) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 89之第一重鏈、具有胺基酸序列SEQ ID NO: 87之第二重鏈、具有胺基酸序列SEQ ID NO: 90之第一輕鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 88之第二輕鏈，或
- aj) 具有胺基酸序列SEQ ID NO: 81之第一重鏈、具有胺基酸序列SEQ ID NO: 87之第二重鏈、具有胺基酸序列SEQ ID NO: 92之第一輕鏈及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 88之第二輕鏈。

47. 如實施例1至46中任一項之抗體，其用作藥物。

48. 如實施例1至46中任一項之抗體，其用於治療眼部血管疾

病。

49. 一種如實施例1至46中任一項之抗體的用途，其用於治療眼病，尤其眼部血管疾病。

50. 如實施例1至46中任一項之抗體，其用於治療眼病。

51. 如實施例1至46中任一項之抗體，其用於治療眼病，尤其眼部血管疾病。

52. 一種治療患有眼部血管疾病之個體的方法，其包含向該個體投與有效量之如實施例1至46中任一項之抗體。

53. 一種醫藥調配物，其包含如實施例1至46中任一項之抗體。

54. 一種包含如實施例1至46中任一項之抗體的醫藥調配物，其用於治療眼部血管疾病。

55. 一種如實施例1至46中任一項之抗體的用途，其用於製造治療眼部血管疾病之藥物。

56. 一種治療罹患眼部血管疾病之患者的方法，其藉由向需要此類治療之患者投與如實施例1至46中任一項之抗體來進行。

57. 如實施例53至54中任一項之醫藥調配物，其中該抗體經由玻璃體內施用來投與。

58. 如實施例56至57中任一項之投與，其中該投與為玻璃體內施用。

59. 一種核酸，其編碼如實施例1至46中任一項之抗體。

60. 一種細胞，其包含編碼如實施例1至46中任一項之抗體之一或多種核酸。

61. 一種產生如實施例1至46中任一項之抗體的方法，其中該方法包含以下步驟：

a) 視情況用編碼如實施例1至46中任一項之抗體之一或多種核酸轉染哺乳動物細胞，

- b) 培養該細胞以表現該抗體，及
- c) 自該細胞或培養基回收該抗體且進而產生該抗體。

V. 實例

以下為本發明之方法及組合物之實例。應理解，考慮到上文所提供之一般描述，可實施各種其他實施例。

材料及方法

選殖：

已使用 QuikChange II XL 定點突變誘發套組 (Agilent Technologies) 引入點突變。挑選少數單群落且轉移至 4 ml LB-Amp 培養基中，且在 37°C 下培養 16-18 小時。藉由離心收集其 2 ml，隨後用高純度質體分離套組 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 根據製造商之說明書進行質體製備。在藉由定序確認之後，使質體在大腸桿菌細胞 (Agilent Technologies) 中再轉型。將單菌落轉移至 2 ml LB-Amp 培養基中且在 37°C 下培養 6-8 小時。其後，使用 200 μ l 此培養物在震盪燒瓶中接種 150 ml LB-Amp 培養基。在 37°C、300 rpm 下培育培養物隔夜，且隨後藉由離心收集細胞。用 HiSpeed 質體 Maxi 套組 (Qiagen) 根據製造商之說明書進行質體製備。

已使用突變 CrossFab 作為模板用於藉由分別改變 CrossFab 及 CrossMab 骨架-質體中之 VH 區、VL 區經由限制側選殖。在用同一對限制酶消化模板及骨架-質體之後，將混合物添加至 1% 瓊脂糖-凝膠中以便供體 DNA (VH 區或 VL 區) 與受體 DNA (質體骨架) 分離。其後，用高純度 PCR 產物純化套組 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 純化瓊脂糖片。然後，受體 DNA 經 rAPid 鹼性磷酸酶 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 去磷酸化，且隨後藉由使用快速 DNA 連接套組 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 來連接受體 DNA 與供體 DNA。所連接之 DNA 已轉型為大腸桿菌細胞

(Agilent Technologies)。

短暫表現

HEK293F細胞(Invitrogen)在於125 ml震盪燒瓶中解凍之後藉由稀釋至少四次(體積30 ml)來繼代(在37°C、7% CO₂、85%濕度、135 rpm下培育/震盪)。

將細胞擴增至在250 ml體積下 3×10^5 個細胞/毫升。三天後，細胞已分裂且以在250 ml體積下 7×10^5 個細胞/毫升之密度新接種於1公升震盪燒瓶中。24小時後以大約 $1.4-2.0 \times 10^6$ 個細胞/毫升之細胞密度進行轉染。

在轉染前，用預熱(水浴；37°C)之Opti-MEM培養基(Gibco)將250 µg質體DNA (122 µg輕鏈質體及128 µg重鏈質體)稀釋為10 ml最終體積。輕輕混合溶液且在室溫下培育不超過5 min。其後，將333.3 µl 293-free轉染試劑添加至DNA-OptiMEM溶液中。輕輕混合溶液且在室溫下培育15-20分鐘。將總體積之混合物添加至具有250 ml HEK-細胞-培養物體積的1 L震盪燒瓶中。燒瓶在37°C、7% CO₂、85%濕度、135 rpm下培育/震盪6或7天。藉由在2,000 rpm、4°C下持續10分鐘之第一離心步驟來收集上清液。將上清液轉移至新離心燒瓶中以便在4,000 rpm、4°C下進行第二離心步驟持續20分鐘。其後，經由0.22 µm瓶頂過濾器過濾無細胞上清液且儲存於冷凍器(-20°C)中。

純化

使用MabSelectSure-Sepharose™ (GE Healthcare, Sweden)藉由親和層析自細胞培養上清液純化抗體及CrossMAb^{CH1-CL}，而使用KappaSelect-瓊脂糖(對於非含Fc區結合域) (GE Healthcare, Sweden)，隨後藉由使用丁基-瓊脂糖(GE Healthcare, Sweden)之疏水相互作用層析及Superdex 200尺寸排阻(GE Healthcare, Sweden)層析來純化具有AAA突變之Fab、CrossFab及Ang2VEGF CrossMAb。

簡言之，在用PBS緩衝劑(10 mM Na₂HPO₄、1 mM KH₂PO₄、137 mM NaCl及2.7 mM KCl，pH 7.4)平衡、用平衡緩衝劑洗滌及用25 mM 檸檬酸鈉(pH為3.0)溶離之MabSelectSuRe樹脂上自無菌過濾細胞培養上清液捕捉抗體及CrossMAb。在用25 mM Tris、50 mM NaCl (pH 7.2)平衡、用平衡緩衝劑洗滌及用25 mM 檸檬酸鈉(pH 2.9)溶離之KappaSelect樹脂上捕捉Fab。將含有溶離抗體或Fab之部分合併且用2 M Tris (pH 9.0)中和。藉由添加1.6 M硫酸銨溶液達到0.8 M硫酸銨最終濃度來製備抗體/Fab合併物以用於疏水相互作用層析。使用乙酸將pH調節至pH 5.0。在用35 mM乙酸鈉、0.8 M硫酸銨(pH 5.0)平衡丁基-瓊脂糖樹脂之後，將抗體塗覆至樹脂，用平衡緩衝劑洗滌且使用0至35 mM乙酸鈉(pH 5.0)之線性梯度溶離。將含有雙特異性抗體/抗體或Fab之部分合併且使用經20 mM組胺酸、140 mM NaCl (pH 6.0)平衡之Superdex 200 26/60 GL (GE Healthcare, Sweden)管柱藉由尺寸排阻層析進一步純化。將分別含有抗體或Fab之部分合併，使用Vivaspin超過濾裝置(Sartorius Stedim Biotech S.A., France)濃縮至所需濃度且儲存在-80℃下。

CE-SDS分析

在各純化步驟後使用微流控晶片實驗室技術(microfluidic Labchip technology) (Caliper Life Science, USA)藉由CE-SDS分析純度及抗體完整性。因此，使用HT蛋白表現試劑套組根據製造商之說明書製備5 µl分析物溶液，且使用HT蛋白表現晶片在晶片實驗室(LabChip) GXII系統上分析。使用晶片實驗室GX軟體分析資料。

實例1

與血管生成素2 (ANG2)結合之交叉抗體(CrossMab)及交叉抗體Fab片段(CrossFab)。

藉由分子生物學技術如方法部分中所描述進行選殖產生交叉抗

體 (CrossMab) 或交叉片段抗原結合 (CrossFab)，且如上文所描述在 HEK293細胞中短暫表現。

表1中給出所產生的在CDR中具有特定點突變之抗體及Fab之一般方案。使用含有編碼如表1中所示之胺基酸序列之核酸的表現質體表現交叉抗體及交叉Fab。

表1：如本文所報導之抗ANG2 CrossFab之胺基酸序列。

分子	突變VH	VH-X序列ID	突變VL	VL-X序列ID
XAng2-0009	wt	46	wt	49
XAng2-0015	S108P	57	wt	49
XAng2-0017	S-S橋S55C-D100BC	59	wt	49
XAng2-0021	G100JA	60	wt	49
XAng2-0026	T28N, T30A	62	wt	49
XAng2-0029	S108P, G100JA	65	wt	49
XAng2-0033	T28N, S108P, G100JA	68	wt	49
XAng2-0041	T30A, T28N, S108P, G100JA	47	wt	49
XAng2-0075	T30A, T28N, S108P, G100JA, D100BS	48	D50T	50
XAng2-0090	T30A, T28N, S108P, G100JA	47	D50T	50
XAng2-0098	wt	51	wt	49
XAng2-0099	G100JA, S108P, T28N, T30A	52	wt	49
XAng2-0100	G100JA, S108P, T28N, T30A	52	D50T	50
XAng2-0101	G100JA, S108P, T28N, T30A, D100BE	53	D50T	50
Xang2-0154	wt	46	wt	77
XAng2-0155	T30A, T28N, S108P, G100JA	47	D50T	78
XAng2-0156	T30A, T28N, S108P, G100JA, D100BS	48	D50T	78
XAng2-0157	wt (Ang2i-LC06)	46	D50T	50

實例2

與血管生成素-2 (ANG2)及血管內皮生長因子(VEGF)結合之交叉二價雙特異性抗體 (CrossMab)，在 ANG2 結合中具有 CL-CH1域交換 (*CrossMab*^{CH1/CL})

藉由分子生物學技術如上文所描述進行選殖產生ANG2 Fab臂中具有CH1-CL交叉之ANG2-VEGF CrossMabs^{CH1-CL}，且如上文所描述在 HEK293細胞中短暫表現。

表2中給出所產生的在CDR中具有特定點突變之ANG2-VEGF

CrossMabs^{CH1-CL}之一般方案。使用含有編碼如表2中所示之胺基酸序列之核酸的表現質體表現ANG2-VEGF CrossMabs^{CH1-CL}。

表2：如本文所報導之抗ANG2/VEGF雙特異性二價CrossMabs^{CH1-CL}之胺基酸序列。

分子	ANG2結合位點				VEGF結合位點	
	突變VH	<VH-CL-CH2-CH3>序列ID #	突 變 VL	<VL-CH1>序列ID #	HC序列ID #	LC序列ID #
Xang2-0162	wt	79	wt	80	81	82
Xang2-0163	T30A, T28N, S108P, G100JA	83	D50T	84	81	82
Xang2-0164	T30A, T28N, S108P, G100JA, D100BS	85	D50T	86	81	82
Xang2-0165	T30A, T28N, S108P, G100JA	89	D50T	90	87	88
Xang2-0166	T30A, T28N, S108P, G100JA, D100BS	91	D50T	92	87	88
Xang2-0167	wt	93	wt	94	87	88

對於所有構築體，結進孔雜二聚技術與第一CH3域中之典型結突變(T366W)及第二CH3域中之相應孔突變(T366S、L368A及Y407V) (以及兩個額外引入之半胱胺酸殘基S354C/Y349C) (含於以上所描繪之各別相應重鏈(HC)序列中)一起使用。

實例3

結合ANG2之CrossFab、抗體及Ang2-VEGF CrossMab^{CH1-CL}在HEK細胞中之轉染及短暫表現

在經懸浮液調適之HEK293F細胞(FreeStyle 293-F細胞；

Invitrogen)中用293-free轉染試劑(Novagen)短暫表現抗體。

細胞在於125 ml震盪燒瓶中解凍之後藉由稀釋至少四次(體積30 ml)來繼代(在37°C、7% CO₂、85%濕度、135 rpm下培育/震盪)。

將細胞擴增至在250 ml體積下 3×10^5 個細胞/毫升。三天後，細胞已分裂且以在250 ml體積下 7×10^5 個細胞/毫升之密度新接種於1公升震盪燒瓶中。24小時後將以大約 $1.4-2.0 \times 10^6$ 個細胞/毫升之細胞密度進行轉染。

在轉染前，用預熱(水浴；37°C)之Opti-MEM (Gibco)將250 µg質體DNA (122 µg輕鏈及128 µg重鏈)稀釋為10 ml最終體積。輕輕混合溶液且在室溫下培育不超過5 min。隨後將333.3 µl 293-free轉染試劑添加至DNA-OptiMEM溶液中。輕輕混合且在室溫下培育15-20分鐘。將總體積之混合物添加至具有250 ml HEK-細胞-培養物體積的1 L震盪燒瓶中。

在37°C、7% CO₂、85%濕度、135 rpm下培育/震盪6或7天。

藉由在2,000 rpm、4°C下持續10分鐘之第一離心步驟來收集上清液。隨後將上清液轉移至新離心燒瓶中以便在4,000 rpm、4°C下進行第二離心持續20分鐘。其後，經由0.22 µm瓶頂過濾器過濾無細胞上清液且儲存於冷凍器(-20°C)中。

實例4

自HEK上清液純化Fab

過濾含有抗體之細胞培養上清液，且藉由兩個層析步驟純化。使用Kappa Select (GE Healthcare)藉由親和層析捕捉具有AAA突變之CrossFab及CrossMAb，且藉由額外HIC及SEC層析步驟拋光。關於細節，參見上述材料及方法。

實例5

自HEK上清液純化CrossMab^{CH1-CL}

過濾培養上清液，且藉由三個層析步驟純化。使用 HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare)藉由親和層析捕捉抗體，且用HIC及SEC層析步驟拋光。用配備有Biomax-SK膜(Millipore, Billerica, MA)之Ultrafree-CL離心過濾器單元濃縮含有抗體之溶液且儲存在-80℃下。

實例6

CrossFab及CrossMAb^{CH1-CL}製劑之分析

使用基於胺基酸序列計算之莫耳消光係數藉由量測在280 nm下之光學密度(OD)測定製劑之蛋白質濃度。

使用晶片實驗室GX II (PerkinElmer)用蛋白表現晶片及HT蛋白表現試劑套組藉由CE-SDS分析抗體之純度及完整性。

使用TSK-GEL G3000SWXL使用2×PBS (pH 7.4)作為操作緩衝劑藉由高效能SEC，或使用BioSuite高解析度SEC 250 Å、5 μm分析型尺寸排阻管柱(Waters GmbH)使用200 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄、250 mM KCl (pH 7.0)作為操作緩衝劑藉由高效能SEC測定抗體製劑之聚集體含量。

實例7

自抗體製備Fab片段及分析

使12 mg抗體(1 mg/ml之20 mM組胺酸、140 mM NaCl，pH 6.0)與240 μl L-半胱胺酸溶液(Merck Millipore；250 mM之20 mM組胺酸、140 mM NaCl，pH 6.0)及327 μl番木瓜蛋白酶(Roche Life Science；0.001 U/mg抗體)在37℃下一起培育120 min。裂解後，使用經PBS (1 mM KH₂PO₄、10 mM Na₂HPO₄、137 mM NaCl、2.7 mM KCl) (pH 7.4)平衡之HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare)之親和層析用於移除完整IgG及Fc片段。隨後，作為第二純化步驟，使用在Superdex 200TM (GE Healthcare)上之尺寸排阻層析進一步純化MabSelectSuRe層析之

流過物。在20 mM組胺酸緩衝劑、0.14 M NaCl (pH 6.0)中進行尺寸排阻層析。用配備有Biomax-SK膜(Millipore, Billerica, MA)之Ultrafree-CL離心過濾器單元濃縮含有Fab片段之溶液且儲存在-80℃下。

使用基於胺基酸序列計算之莫耳消光係數藉由量測在280 nm下之光學密度(OD)測定Fab片段之蛋白質濃度。

在還原劑(5 mM 1, 4-二硫蘇糖醇)存在及不存在及用簡單藍色安全染色劑(Invitrogen)染色下藉由SDS-PAGE (NuPAGE 4-12% Bis-Tris凝膠, Invitrogen)分析Fab片段之純度及完整性。

使用BioSuite高解析度SEC 250 Å、5 μm分析型尺寸排阻管柱(Waters GmbH)使用200 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄、250 mM KCl (pH 7.0)作為操作緩衝劑藉由高效能SEC測定Fab製劑之聚集體含量。

實例8

ANG2結合動力學及成熟Cross-Fab之交叉反應性

使用BIAcore T200儀器(GE Healthcare)藉由表面電漿共振研究成熟Cross-Fab與人類ANG2-RBD-Fc區融合物之結合。藉由使用由GE Healthcare供應之胺偶合套組，在pH 5.0下將大約4000 RU抗人類抗體(10 μg/ml抗人類IgG (Fc)抗體；訂購碼BR-1008-39；GE Healthcare)偶合在系列S CM5晶片(GE Healthcare BR-1005-30)上。在固定程序期間使用HBS-N (10 mM HEPES、150 mM NaCl pH 7.4, GE Healthcare)作為操作緩衝劑。對於以下動力學表徵，樣品及操作緩衝劑為HBS-P (10 mM HEPES、150 mM NaCl pH 7.4、0.05%界面活性劑P20；GE Healthcare)。將流槽設置為25℃且樣品嵌段設置為12℃，且在動力學表徵之前用操作緩衝劑預致敏兩次。

藉由以5 μl/min流動速率注射1 μg/ml溶液持續30 sec來捕捉人類或食蟹獼猴ANG2-RBD-Fc區融合物。以300 nM連續1:3稀釋液為起始物質，藉由以90 μl/min流動速率在溶液中注射各種濃度之Cross-Fab

持續90 sec.來量測締合。長達600 sec.監測解離相，且藉由自樣品溶液轉換為操作緩衝劑來觸發。藉由以5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 流動速率用3 M MgCl_2 溶液洗滌60 sec.使所有表面再生。藉由減去自抗人類IgG抗體(Fc)表面獲得之反應來校正整體折射率差異。亦減去空白注射(=二次參考)。為計算KD及其他動力學參數，使用朗格繆爾1:1模型。

實例9

生物活性

該方法確定抗體抑制ANG2與其受體Tie2結合之能力。為在細胞表面上表現Tie2受體酪胺酸激酶，使人胚腎細胞株HEK293細胞株經人類Tie2之表現載體穩定轉染，產生細胞株HEK293_Tie2。

用結合於Tie2受體且誘發受體自體磷酸化之ANG2刺激細胞。可藉由添加如本文所報導之抗ANG2抗體來抑制與Tie2之結合。藉由ELISA分析磷酸化等級。OD值與磷酸化Tie2之量相關且相對於抗體濃度標繪。測定 EC_{50} 值，且相對於同一培養盤上之參考標準報導為相對生物活性(RBA)。

用針對人類Tie2受體之抗體塗佈多孔培養盤(100 μl 之10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；R&D Systems，目錄號MAB3132；96孔Maxisorb免疫培養盤，在室溫下培育隔夜；經塗佈之培養盤洗滌三次，體積250 μl ；其後在室溫下與200 μl 阻斷劑一起培育1-2小時)。

分別地，將HEK293_Tie2細胞(40 μl ； 5×10^6 個細胞/毫升；DMEM/F12)添加至所述抗體稀釋液系列與ANG2 (R&D Systems，目錄號623-CF)之預培育混合物(80 μl)中。10分鐘後，溶解細胞(添加60 μl 溶解緩衝劑；培育15 min.)且將細胞溶解物轉移至經塗佈之培養盤以用於ELISA。

溶解物之Tie2受體與捕捉抗Tie2抗體結合(100 μl 溶解物；在RT下培育90 min.)。藉由結合於生物素之抗磷酸酪胺酸抗體偵測Tie2受體

上之磷酸化酪胺酸 (100 μ l ; 0.3 μ g/ml 抗磷酸酪胺酸抗體，純系 4G10®，生物素結合物，Upstate，目錄號 16-103；在 RT 下培育 60 min.)。生物素殘基與抗生蛋白鏈菌素-辣根過氧化酶結合物結合 (100 μ l ; 100 mU/ml ; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, 目錄號 11089153001；在 RT 下培育 30 min.)。添加過氧化酶基質 TMB (100 μ l ; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, 目錄號 11835033001)，且在 5-10 min 後在 450 nm 下量測光學密度。

實例 10

化學降解測試

將樣品分成三個等分試樣，且分別再緩衝至 20 mM His/His*HCl、140 mM NaCl (pH 6.0) 中或 PBS 中，且儲存在 40°C (His/NaCl) 或 37°C (PBS) 下。對照樣品儲存在 -80°C 下。

培育結束後，分析樣品之相對活性濃度 (BIAcore)、聚集 (SEC) 及斷裂 (毛細電泳法或 SDS-PAGE)，且與未經處理之對照物進行比較。

實例 11

熱穩定性

在 20 mM 組胺酸/組胺酸氫、140 mM NaCl (pH 6.0) 中製備濃度為 1 mg/mL 之樣品，經由 0.4 μ m 濾板藉由離心轉移至光學 384 孔培養盤中且用石蠟油覆蓋。藉由動態光散射在 DynaPro 盤式讀取器 (Wyatt) 上重複量測流體動力學半徑，同時以 0.05°C/min 之速率將樣品自 25°C 加熱至 80°C。

或者，將樣品轉移至 10 μ L 微光析槽陣列中，且用 Optim1000 儀器 (Avacta Inc.) 記錄靜態光散射資料以及在 266 nm 雷射下激發後之螢光資料，同時以 0.1°C/min 之速率將樣品自 25°C 加熱至 90°C。

聚集起始溫度定義為流體動力學半徑 (DLS) 或散射光強度 (Optim1000) 開始增加之溫度。

或者，將樣品轉移至9 μL 多光析槽陣列中。在Optim1000儀器 (Avacta Analytical Inc.)中以 0.1°C /分鐘之恆定速率將多光析槽陣列自 35°C 加熱至 90°C 。該儀器連續記錄266 nm雷射之散射光強度，其中大約每 0.5°C 一個資料點。相對於溫度標繪光散射強度。聚集起始溫度 (T_{agg})定義為散射光強度開始增加之溫度。

熔融溫度定義為螢光強度對比波長之圖中的拐點。

雖然出於清楚理解之目的，已藉助於說明及實例相當詳細地描述前述本發明，但描述及實例不應解釋為限制本發明之範疇。本文所引用的所有專利及科學文獻之揭示內容以全文引用的方式明確併入本文中。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司
<120> 抗ANG2抗體及使用方法
<130> P32413
<150> EP14192524.8
<151> 2014-11-10
<160> 94
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 VH

<400> 1

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

Ser

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> Ang2 LC10 HVR-H1

<400> 2

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
1 5

<210> 3
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 HVR-H2
<400> 3

Asn Ser Gly
1

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 HVR-H2
<400> 4

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

Gly

<210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 HVR-H3
<400> 5

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

Phe Asp

<210> 6
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 VL
<400> 6

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

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 HVR-L1

<400> 7

Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser
1 5

<210> 8
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 HVR-L2

<400> 8

Asp Asp Ser
1

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 HVR-L3

<400> 9

Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp
1 5

<210> 10
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC06 VH

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC06 HVR-H1

<400> 11

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
1 5

<210> 12
<211> 3
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC06 HVR-H2

<400> 12

Asn Ser Gly
1

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC06 HVR-H2

<400> 13

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

Gly

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC06 HVR-H3

<400> 14

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

Phe Asp

<210> 15

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ang2 LC06 VL

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC06 HVR-L1

<400> 16

Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser
1 5

<210> 17
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC06 HVR-L2

<400> 17

Asp Asp Ser
1

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC06 HVR-L3

<400> 18

Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr
1 5

<210> 19
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

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

<400> 20

Gly Tyr Asn Phe Ala Gly Tyr
1 5

<210> 21

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

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

<400> 21

Asn Ser Gly
1

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

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

<400> 22

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

Gly

<210> 23
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

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

<400> 23

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

Phe Asp

<210> 24
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

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

<400> 24

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

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

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

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

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

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

85 90 95

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

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) HVR-L1
<400> 25

Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser
1 5

<210> 26
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) HVR-L2
<400> 26

Asp Asp Ser
1

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) HVR-L3
<400> 27

Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp
1 5

<210> 28
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) VH
<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 29

Gly Tyr Asn Phe Ala Gly Tyr
1 5

<210> 30
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 30

Asn Ser Gly
1

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 31

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

- 11 -

<220>
<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) HVR-L1
<400> 34
Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser
1 5

<210> 35
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) HVR-L2
<400> 35
Asp Thr Ser
1

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A (HC) + D50T (LC) HVR-L3
<400> 36
Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp
1 5

<210> 37
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T
(在LC中) VH
<400> 37
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly 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 Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

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

Ser

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T
(在LC中) HVR-H1

<400> 38

Gly Tyr Asn Phe Ala Gly Tyr
1 5

<210> 39
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 39

Asn Ser Gly
1

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 40

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

Gly

<210> 41
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 41

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

Phe Asp

<210> 42
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T
(在LC中) HVR-L1

<400> 43

Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser
1 5

<210> 44
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2 LC10 wt + G114A, S360P, T28N, T30A, D106S (HC) + D50T
(在LC中) HVR-L2

<400> 44

Asp Thr Ser
1

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 45

Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp
1 5

<210> 46
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2_wt VHVL 交叉LC κ

<400> 46

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

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

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

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

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

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

85

90

95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 47
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2-wt mut4 + D50T VHVL交叉κLC

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 48
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2-mut4 + D50T + D106S VHVL交叉κLC

<400> 48

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 49
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2_wt CHCk交叉LC κ

<400> 49

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 Ser Ser Ala Ser
100 105 110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
115 120 125

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 50
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ang2-wt mut4 + D50T CHCk交叉LC

<400> 50

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

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

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

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

50

55

60

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

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

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

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
115 120 125

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 51
<211> 461
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Xang2-0098 Ang2 LC 10 VH wt IgG1

<400> 51

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His
225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320

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

325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

<210> 52
<211> 461
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 52

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His
225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

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

355

360

365

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

370375380

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

385390395400

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

405410415

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

420425430

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

435440445

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

450455460

<210> 53

<211> 461

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Xang2-0101

<400> 53

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

151015

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

202530

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

354045

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

505560

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

65707580

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

859095

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

100105110

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

115120125

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His
225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
370 375 380

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

385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

<210> 54
<211> 496
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54

Met Trp Gln Ile Val Phe Phe Thr Leu Ser Cys Asp Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Ala Ala Tyr Asn Asn Phe Arg Lys Ser Met Asp Ser Ile Gly Lys Lys
20 25 30

Gln Tyr Gln Val Gln His Gly Ser Cys Ser Tyr Thr Phe Leu Leu Pro
35 40 45

Glu Met Asp Asn Cys Arg Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Val Ser Asn Ala
50 55 60

Val Gln Arg Asp Ala Pro Leu Glu Tyr Asp Asp Ser Val Gln Arg Leu
65 70 75 80

Gln Val Leu Glu Asn Ile Met Glu Asn Asn Thr Gln Trp Leu Met Lys
85 90 95

Leu Glu Asn Tyr Ile Gln Asp Asn Met Lys Lys Glu Met Val Glu Ile
100 105 110

Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn Gln Thr Ala Val Met Ile Glu Ile Gly
115 120 125

Thr Asn Leu Leu Asn Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys Leu Thr Asp
130 135 140

Val Glu Ala Gln Val Leu Asn Gln Thr Thr Arg Leu Glu Leu Gln Leu
145 150 155 160

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

165	170	175
Gln Thr Ser Glu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Lys Asn Ser Phe Leu Glu 180 185 190		
Lys Lys Val Leu Ala Met Glu Asp Lys His Ile Ile Gln Leu Gln Ser 195 200 205		
Ile Lys Glu Glu Lys Asp Gln Leu Gln Val Leu Val Ser Lys Gln Asn 210 215 220		
Ser Ile Ile Glu Glu Leu Glu Lys Lys Ile Val Thr Ala Thr Val Asn 225 230 235 240		
Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln His Asp Leu Met Glu Thr Val Asn 245 250 255		
Asn Leu Leu Thr Met Met Ser Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asp Pro Thr 260 265 270		
Val Ala Lys Glu Glu Gln Ile Ser Phe Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe 275 280 285		
Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn 290 295 300		
Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly Gly 305 310 315 320		
Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln 325 330 335		
Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu 340 345 350		
Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg 355 360 365		
Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr 370 375 380		
Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg 385 390 395 400		
Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile 405 410 415		
Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys 420 425 430		

Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp
435 440 445

Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln
450 455 460

Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser
465 470 475 480

Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala Asp Phe
485 490 495

<210> 55
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 55

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 56
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> ANg2 D106E HVR-H3

<400> 56

Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Glu Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr Pro Ala Ala
1 5 10 15

Phe Asp

<210> 57

<211> 236

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 0015 HC

<400> 57

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 58
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0016 HC

<400> 58

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

165

170

175

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

180185190

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

195200205

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

210215220

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

225230235

<210> 59

<211> 236

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 0017 HC

<400> 59

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

151015

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

202530

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

354045

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

505560

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

65707580

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

859095

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

100105110

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

115120125

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

130135140

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

145150155160

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

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

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

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

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

<210> 60
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0021 HC

<400> 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 61
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0025 HC

<400> 61

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 62
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0026 HC

<400> 62

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

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

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

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

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

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

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

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

115	120	125
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
130	135	140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
145	150	155
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
165	170	175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
180	185	190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
195	200	205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
210	215	220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	235

<210> 63
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 0027 HC
 <400> 63

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 64
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0028 HC

<400> 64

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 65
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0029 HC

<400> 65

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 66
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0031 HC

<400> 66

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

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

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

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

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

65	70	75	80
Asp Glu Ala Asp	Tyr Tyr Cys Gln Val	Trp Asp Ser Ser Ser	Asp His
	85	90	95
Trp Val Phe	Gly Gly Thr Lys	Leu Thr Val Leu Ser	Ser Ala Ser
	100	105	110
Thr Lys Gly	Pro Ser Val Phe	Pro Leu Ala Pro Ser	Ser Lys Ser Thr
	115	120	125
Ser Gly Gly	Thr Ala Ala	Leu Gly Cys Leu Val	Lys Asp Tyr Phe Pro
	130	135	140
Glu Pro Val Thr	Val Ser Trp Asn Ser	Gly Ala Leu Thr Ser Gly	Val
	145	150	155
His Thr Phe	Pro Ala Val Leu Gln Ser	Ser Gly Leu Tyr Ser	Leu Ser
	165	170	175
Ser Val Val	Thr Val Pro Ser Ser	Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile	
	180	185	190
Cys Asn Val	Asn His Lys Pro	Ser Asn Thr Lys Val	Asp Lys Lys Val
	195	200	205
Glu Pro Lys Ser Cys			
	210		

<210> 67
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 0032 HC

<400> 67

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln	1	5	10	15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val	20	25	30	
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr	35	40	45	
Ser Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser	50	55	60	
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly	65	70	75	80

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

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

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
115 120 125

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 68
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0033 HC

<400> 68

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 69
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0039 HC

<400> 69

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 70
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0040 HC

<400> 70

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

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

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

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

50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 71
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0042 HC

<400> 71

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 72
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0057 HC

<400> 72

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Glu Ser Pro Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Pro Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235
 <210> 73
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 0058 HC
 <400> 73
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 74
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0076 HC

<400> 74

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

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

<210> 75
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> ANG2 ref HC

<400> 75

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
145 150 155 160

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

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
210 215 220

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

260

265

270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
405 410 415

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 76
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ANG2 ref LC

<400> 76

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser 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 Ser Ser Arg Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 77
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0154 LC

<400> 77

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
115 120 125

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 78
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0155 LC

<400> 78

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
115 120 125

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 79
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VEGF ref1 HC
<400> 79

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

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

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

35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 80
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VEGF ref1 LC

<400> 80

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65		70		75		80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp						
		85		90		95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala						
		100		105		110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly						
		115		120		125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala						
		130		135		140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln						
		145		150		155
				160		
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser						
		165		170		175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr						
		180		185		190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser						
		195		200		205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys						
		210				
<210> 81						
<211> 463						
<212> PRT						
<213> 人工序列						
<220>						
<223> ANG2 ref1 HC						
<400> 81						
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala						
1		5		10		15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr						
		20		25		30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met						
		35		40		45
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe						
		50		55		60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr						
		65		70		75
						80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His
225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

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

340	345	350
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro		
355	360	365
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala		
370	375	380
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
385	390	395
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
405	410	415
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
420	425	430
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
435	440	445
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
450	455	460
<210> 82		
<211> 213		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> ANG2 refl LC		
<400> 82		
Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln		
1	5	10
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val		
20	25	30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr		
35	40	45
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser		
50	55	60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly		
65	70	75
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His		
85	90	95
Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser		
100	105	110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
115 120 125

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 83
<211> 463
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0163 ANG2 HC

<400> 83

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His
225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 84
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0163 ANG2 LC

<400> 84

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
115 120 125

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 85
<211> 463
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0164 ANG2 HC

<400> 85

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His
225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 86
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0164 ANG2 LC

<400> 86

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
115 120 125

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 87
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VEGF ref2 HC

<400> 87

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

180	185	190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val 195 200 205		
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys 210 215 220		
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala 225 230 235 240		
Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr 245 250 255		
Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val 260 265 270		
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val 275 280 285		
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser 290 295 300		
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu 305 310 315 320		
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala 325 330 335		
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro 340 345 350		
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln 355 360 365		
Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala 370 375 380		
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr 385 390 395 400		
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu 405 410 415		
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser 420 425 430		
Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser 435 440 445		

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 88
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VEGF ref2 LC

<400> 88

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 89
<211> 463
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0165 ANG2 HC

<400> 89

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His
225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

- <210> 90
- <211> 213
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>

<223> 0165 ANG2 LC

<400> 90

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
115 120 125

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 91

<211> 463

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 0166 ANG2 HC

<400> 91

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His
225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
245 250 255

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

<210> 92
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0166 ANG2 LC
<400> 92

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
115 120 125

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 93
<211> 463
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ANG2 ref2 HC

<400> 93

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

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

25

20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser 225 Pro Val Thr Lys Ser 230 Phe Asn Arg Gly Glu 235 Cys Asp Lys Thr His 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 94
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ANG2 ref2 LC

<400> 94

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

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

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

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

C192889SEQA.docx

申請專利範圍

1. 一種特異性結合於人類ANG2之抗體，其中該抗體包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 20之HVR-H1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 21之HVR-H2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 23之HVR-H3。
2. 如請求項1之抗體，其包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 25之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 26之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 27之HVR-L3。
3. 如請求項1之抗體，其包含(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 34之HVR-L1；(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 35之HVR-L2；及(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 36之HVR-L3。
4. 如請求項1至3中任一項之抗體，其中該抗體包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 19之重鏈可變域及具有胺基酸序列SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 33之輕鏈可變域。
5. 一種特異性結合於人類ANG2之抗體，其中該抗體
 - i) 包含與SEQ ID NO: 19之序列一致性超過70%之重鏈可變域及與SEQ ID NO: 6之序列一致性超過70%之輕鏈可變域，
 - ii) 在該重鏈可變域中在位置28具有胺基酸殘基天冬醯胺(N)、在位置30具有胺基酸殘基丙胺酸(A)、在位置100b具有胺基酸殘基脯胺酸(P)及在位置100j具有胺基酸殘基丙胺酸(A)，且在該輕鏈可變域中在位置51具有胺基酸殘基蘇胺酸(T)（根據Kabat編號），及
 - iii) 與包含具有該序列SEQ ID NO: 19之重鏈可變域及具有該序列SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 33之輕鏈可變域的抗體相比，該抗體在使用穩定表現人類Tie2之HEK293細胞之基於細胞的分析

中使用Tie2磷酸化ELISA測定的抑制ANG2結合於其受體Tie2之EC₅₀值較低。

6. 如請求項1至3及5中任一項之抗體，其中該抗體為雙特異性抗體。
7. 如請求項6之抗體，其中該雙特異性抗體為CrossMab。
8. 如請求項1至3及5中任一項之抗體，其中該抗體為人類子類IgG1或人類子類IgG4。
9. 如請求項1至3及5中任一項之抗體，其中該抗體藉由抑制人類ANG2與人類Tie2受體結合來阻斷人類ANG2之生物活性。
10. 一種醫藥調配物，其包含如請求項1至9中任一項之抗體及視情況醫藥學上可接受之載劑。
11. 如請求項10之醫藥調配物，其進一步包含選自抗-IL-1 β 抗體或抗-PDGF-B抗體之額外治療劑。
12. 如請求項1至3及5中任一項之抗體，其用作藥物。
13. 一種如請求項1至9中任一項之抗體的用途，其用於製造藥物。
14. 如請求項13之用途，其中該藥物用於治療眼部血管疾病，較佳用於治療黃斑退化。
15. 如請求項13之用途，其中該藥物用於治療癌症，較佳用於治療新血管生成癌。
16. 如請求項13至15中任一項之用途，其中該藥物用於抑制ANG2與該Tie2受體之間相互作用。