



(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 201617366 A

(43)公開日：中華民國 105 (2016) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：104122782

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 07 月 14 日

(51)Int. Cl.：

C07K16/28 (2006.01)

C07K16/46 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P9/10 (2006.01)

A61P7/10 (2006.01)

A61P43/00 (2006.01)

(30)優先權：2014/07/15 日本

2014-145135

(71)申請人：安斯泰來製藥股份有限公司 (日本) ASTELLAS PHARMA INC. (JP)

日本

(72)發明人：蒲原正純 KAMOHARA, MASAZUMI (JP)；八木繁典 YAGI, SHIGENORI (JP)；

石井芳則 ISHII, YOSHINORI (JP)；奈良裕美 NARA, HIROMI (JP)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：34 項 圖式數：7 共 142 頁

(54)名稱

新穎抗人類 Tie2 抗體

NOVEL ANTI-HUMAN TIE2 ANTIBODY

(57)摘要

提供藉由結合於人類 Tie2，使人類 Tie2 活性化而預防或治療糖尿病黃斑部水腫、糖尿病網膜症或重症下肢缺血之抗人類 Tie2 抗體。本發明者等人對於抗人類 Tie2 抗體進行探討，來提供一種抗人類 Tie2 抗體，其係包含 4 個重鏈可變區域及 4 個輕鏈可變區域之抗人類 Tie2 抗體，其中該重鏈可變區域係由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 122 的胺基酸序列所構成、該輕鏈可變區域係由序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列所構成，1 個該重鏈可變區域與 1 個該輕鏈可變區域構成 1 個抗原結合部位，該抗體包含 4 個抗原結合部位。

[Problem] Provided is an anti-human Tie2 antibody for preventing or treating diabetic macular edema, diabetic retinopathy, and critical limb ischemia by binding to a human Tie2 to activate the human Tie2.

[Means for Solution] The present inventors have conducted investigations on an anti-human Tie2 antibody, and have thus provided an anti-human Tie2 antibody comprising four heavy chain variable regions and four light chain variable regions, in which the heavy chain variable region consists of the amino acid sequence of the amino acid numbers 1 to 122 of SEQ ID NO: 2, the light chain variable region consists of the amino acid sequence of the amino acid numbers 1 to 113 of SEQ ID NO: 4, the one heavy chain variable region and the one light chain variable region constitute one antigen-binding site, and the antibody comprises four antigen-binding sites.

201617366

發明摘要

※申請案號：104122782

※申請日：104 年 07 月 14 日

※IPC 分類：
C07K 16/28, 16/46 (2006.01)
A61K 39/95 (2006.01)
A61P 9/10, 9/43 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

新穎抗人類 Tie2 抗體

Novel anti-human Tie2 antibody

【中文】

〔課題〕提供藉由結合於人類 Tie2，使人類 Tie2 活性化而預防或治療糖尿病黃斑部水腫、糖尿病網膜症或重症下肢缺血之抗人類 Tie2 抗體。

〔解決手段〕本發明者等人對於抗人類 Tie2 抗體進行探討，來提供一種抗人類 Tie2 抗體，其係包含 4 個重鏈可變區域及 4 個輕鏈可變區域之抗人類 Tie2 抗體，其中該重鏈可變區域係由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 122 的胺基酸序列所構成、該輕鏈可變區域係由序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列所構成，1 個該重鏈可變區域與 1 個該輕鏈可變區域構成 1 個抗原結合部位，該抗體包含 4 個抗原結合部位。

【 英文 】

[Problem] Provided is an anti-human Tie2 antibody for preventing or treating diabetic macular edema, diabetic retinopathy, and critical limb ischemia by binding to a human Tie2 to activate the human Tie2.

[Means for Solution] The present inventors have conducted investigations on an anti-human Tie2 antibody, and have thus provided an anti-human Tie2 antibody comprising four heavy chain variable regions and four light chain variable regions, in which the heavy chain variable region consists of the amino acid sequence of the amino acid numbers 1 to 122 of SEQ ID NO: 2, the light chain variable region consists of the amino acid sequence of the amino acid numbers 1 to 113 of SEQ ID NO: 4, the one heavy chain variable region and the one light chain variable region constitute one antigen-binding site, and the antibody comprises four antigen-binding sites.

【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】(中文/英文)

新穎抗人類 Tie2 抗體

Novel anti-human Tie2 antibody

【技術領域】

[0001] 本發明係關於新穎之抗人類 Tie2 抗體。

【先前技術】

[0002] Tie2 (Tyrosine kinase with Ig and EGF homology domain 2) 為受體型酪胺酸激酶。已知 Tie2 主要表現於血管內皮細胞。其配位子已知有多聚體型分泌糖蛋白質之血管生長素-1 (Angiopoietin-1 ; Ang-1) 及血管生長素-2 (Ang-2) 。

[0003] Ang-1 對 Tie2 係有作為促效劑之功能。Tie2 與 Ang-1 結合時，藉由形成多聚體而自我磷酸化，對細胞內傳達訊息，而顯示了促進血管內皮細胞之抗細胞凋亡作用、血管之透過性阻礙作用等之血管安定化、成熟化及重塑 (remodeling) (Cell 、 1996 、 Vol.87 、 p.1171-1180 。 Genes Dev. 、 1994 、 Vol.8 、 p.1897-1909 。 Science 、 1999 、 Vol.286 、 p.2511-2514 。 Nat.Struct.Biol. 、 2003 、 Vol.10 、 p.38-44) 。又，亦已知 Ang-1 係透過 Tie2 活性化，來透過產生一氧化氮而發揮血管擴張及血流亢進作用

(Pharmacol.Res. 、 2014 、 Vol.80 、 p.43-51) 。 進一步地，可認為 Ang-1 係透過 Tie2 活性化而抑制血管內皮鈣黏蛋白之內在化，來對血管之安定化做出貢獻 (Dev.Cell 、 2008 、 Vol.14 、 p.25-36) 。 另一方面，Ang-2 被認為可於血管內皮細胞上使 Tie2 活性化，但其活性化被認為相較於 Ang-1 而言，係部分的 (Mol.Cell Biol. 、 2009 、 Vol.29 、 p.2011-2022) 。 因為 Ang-2 係與 Ang-1 對 Tie2 之相同部位以相同程度之親和性結合，故由 Ang-2 結果會將 Ang-1 所致之 Tie2 活性化取代為部分活性來看，暗示了 Ang-2 會發揮作為內因性之 Tie2 拮抗劑的功能 (Science 、 1997 、 Vol.277 、 p.55-60) 。

[0004] 血中 Ang-2 濃度之上昇，係於糖尿病、糖尿病網膜症、敗血症及急性腎衰竭等之血管的脆弱性被認為是病因之一的疾病中有被報告 (Atherosclerosis 、 2005 、 Vol.180 、 p.113-118 。 Br.J.Ophthalmol. 、 2004 、 Vol.88 、 p.1543-1546 。 Critical Care 、 2009 、 Vol.13 、 p.207 。 Intensive Care Med. 、 2010 、 Vol.36 、 p.462-470) 。

[0005] 作為與糖尿病網膜症及糖尿病黃斑部水腫之關聯，係有於患者之血漿中或玻璃體液中 Ang-2 濃度上昇的報告 (Br.J.Ophthalmol. 、 2004 、 Vol.88 、 p.1543-1546 。 Br.J.Ophthalmol. 、 2005 、 Vol.89 、 p.480-483) 。 又，於糖尿病網膜症患者之網膜血管中，作為特徵性病變之一，已知有 Ang-1 之主要產生細胞之外被細胞 (Cell 、 1996 、 Vol.87 、 p.1161-1169) 的脫落 (Retina 、 2013 、 Fifth

edition、p.925-939)。作為病態之一，已知有黃斑部肥厚的糖尿病黃斑部水腫，但亦有於藉由玻璃體去除手術，使眼內 Ang-1 濃度上昇之患者中，黃斑部之肥厚減少的報告（Br.J.Ophthalmol.、2005、Vol.89、p.480-483）。進一步地，由於使網膜血管之外被細胞脫落的網膜水腫小鼠模式中，觀察到網膜之水腫或出血，以 Ang-1 之玻璃體內投與而阻礙了病態發病（J.Clin.Invest.、2002、Vol.110、p.1619-1628）、及於使用了小鼠糖尿病網膜症模式的試驗中，投與含有編碼 Ang-1 之基因的腺病毒時，網膜中之血管內皮細胞障礙受到抑制（Am.J.Pathol.、2002、Vol.160、p.1683-1693）來看，暗示了 Ang-1 之病態改善作用。另一方面，於網膜特異性地過剩表現 Ang-2 的基因改造小鼠中，被報告了網膜之細胞障礙有亢進（Acta.Diabetol.2010、Vol.47、p.59-64）。

[0006] 作為與重症下肢缺血之關聯，報告了於末梢動脈疾病中，血漿中 Ang-2 有增加、或於重症下肢缺血患者之缺血肢肌肉或皮膚組織中，Ang-2 表現量高（J.Am.Coll Cardiol.、2008、Vol.52、p.387-393。Int Angiol.、2011、Vol.30、p.25-34）。又，於使用了大鼠後肢缺血模式之試驗中，藉由投與含有編碼 Ang-1 之基因的病毒載體，顯示了促進缺血肢之血流回復，誘導抗細胞凋亡效果（Angiogenesis、2009、Vol.12、p.243-249）。由在第 2 型糖尿病模式動物之 db/db 小鼠的冠狀動脈結紮模式中，被報告藉由投與含有編碼 Ang-1 之基因的病毒，於

梗塞邊界區域被平滑肌細胞所被覆之成熟血管有增加（Diabetes、2008、Vol.57、p.3335-3343）來看，可期待藉由 Tie2 訊息之活性化，來促進不安定之新生血管的成熟之效果。

[0007] 作為對人類 Tie2 顯示促效劑作用之抗體，有報告了小鼠單株抗體 15B8（專利文獻 1）。15B8 係被報告與人類 Tie2 結合，而誘導人類血管內皮細胞 HUVEC 之抗細胞凋亡作用（專利文獻 1）。

〔先前技術文獻〕

〔專利文獻〕

[0008]

〔專利文獻 1〕國際公開第 2000/018804 號

【發明內容】

〔發明所欲解決之課題〕

[0009] 本發明之課題，係提供結合於人類 Tie2，使人類 Tie2 活性化，藉以預防或治療糖尿病黃斑部水腫、糖尿病網膜症或重症下肢缺血之抗人類 Tie2 抗體。

〔用以解決課題之手段〕

[0010] 本發明者等人於抗人類 Tie2 抗體之製作上重複相當的創意探討，結果發現了製作包含由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 122 的胺基酸序列所構成之重鏈可變區域、及由序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列

所構成之輕鏈可變區域的 4 價之抗人類 Tie2 抗體（實施例 1~8），該抗人類 Tie2 抗體會結合於人類 Tie2（實施例 12）、誘導人類 Tie2 表現 BaF3 細胞之抗細胞凋亡作用（實施例 9 及 11）、以及於大鼠血管透過性亢進模式中會阻礙血管透過性亢進（實施例 10 及 13）。此等之結果，會提供前述抗人類 Tie2 抗體，而完成了本發明。

[0011] 亦即，本發明，可包含以下之發明作為醫學上或產業上有用的物質或方法。

〔1〕一種抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其係包含 4 個重鏈可變區域及 4 個輕鏈可變區域之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其中

該重鏈可變區域，係包含由序列編號 2 之胺基酸編號 31 至 35 的胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 2 之胺基酸編號 50 至 66 的胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 2 之胺基酸編號 99 至 111 的胺基酸序列所構成之 CDR3，

該輕鏈可變區域，係包含由序列編號 4 之胺基酸編號 24 至 39 的胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 4 之胺基酸編號 55 至 61 的胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 4 之胺基酸編號 94 至 102 的胺基酸序列所構成之 CDR3，

1 個該重鏈可變區域與 1 個該輕鏈可變區域構成 1 個抗原結合部位，該抗體或其抗原結合片段包含 4 個抗原結合部位。

〔2〕如〔1〕之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其係由以下之（1）或（2）中選擇：

（1）一種抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其係包含 4 個重鏈可變區域及 4 個輕鏈可變區域之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，且

該重鏈可變區域係由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 122 的胺基酸序列所構成，

該輕鏈可變區域係由序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列所構成，

1 個該重鏈可變區域與 1 個該輕鏈可變區域構成 1 個抗原結合部位，該抗體或其抗原結合片段包含 4 個抗原結合部位；以及

（2）一種抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其係藉由（1）之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段的轉譯後修飾所產生之抗體或其抗原結合片段。

〔3〕一種抗人類 Tie2 抗體，其係如〔1〕之抗人類 Tie2 抗體，且該抗體係含有 2 個重鏈及 4 個輕鏈，

各重鏈係包含 2 個之由包含由序列編號 2 之胺基酸編號 31 至 35 的胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 2 之胺基酸編號 50 至 66 的胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 2 之胺基酸編號 99 至 111 的胺基酸序列所構成之 CDR3 的重鏈可變區域及 CH1 區域所構成之構造、以及包含 CH2 區域及 CH3 區域，一方之該構造的羧基末端（C 末端）係透過連結子（linker）與另一方之該構造

的胺基末端（N 末端）連結，

各輕鏈係含有包含由序列編號 4 之胺基酸編號 24 至 39 的胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 4 之胺基酸編號 55 至 61 的胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 4 之胺基酸編號 94 至 102 的胺基酸序列所構成之 CDR3 的輕鏈可變區域及輕鏈恆定區域。

〔4〕如〔3〕之抗人類 Tie2 抗體，其係由以下之（1）或（2）中選擇：

（1）一種抗人類 Tie2 抗體，其係包含 2 個重鏈及 4 個輕鏈，

各重鏈係包含 2 個之由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 122 的胺基酸序列所構成之重鏈可變區域及 CH1 區域所構成之構造、以及包含 CH2 區域及 CH3 區域，一方之該構造的 C 末端係透過連結子與另一方之該構造的 N 末端連結，

各輕鏈係包含由序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列所構成之輕鏈可變區域及輕鏈恆定區域；以及

（2）一種抗人類 Tie2 抗體，其係藉由（1）之抗人類 Tie2 抗體的轉譯後修飾所產生之抗體。

〔5〕一種抗人類 Tie2 抗體，其係如〔4〕之抗人類 Tie2 抗體，該抗人類 Tie2 抗體係包含 2 個重鏈及 4 個輕鏈，

各重鏈係包含 2 個之由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 122 的胺基酸序列所構成之重鏈可變區域及 CH1 區域所構

成之構造、以及包含 CH2 區域及 CH3 區域，一方之該構造的 C 末端係透過連結子與另一方之該構造的 N 末端連結，

各輕鏈係包含由序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列所構成之輕鏈可變區域及輕鏈恆定區域。

〔6〕一種抗人類 Tie2 抗體，其係藉由如〔5〕之抗人類 Tie2 抗體的轉譯後修飾所產生之抗體。

〔7〕如〔6〕之抗人類 Tie2 抗體，其中轉譯後修飾，係重鏈可變區域 N 末端之焦麩胺醯基化（pyroglutamylation）及/或重鏈 C 末端之離胺酸缺失。

〔8〕如〔3〕～〔7〕中任一項之抗人類 Tie2 抗體，其係包含人類 Ig γ 1 恆定區域或人類 Ig γ 4 恆定區域的重鏈恆定區域。

〔9〕如〔8〕之抗人類 Tie2 抗體，其中人類 Ig γ 1 恆定區域為具有 L234A、L235A、及 P331S 之胺基酸變異的人類 Ig γ 1 恆定區域；或為具有 L234A、L235A、P331S、及 I253A 之胺基酸變異的人類 Ig γ 1 恆定區域。

〔10〕如〔8〕之抗人類 Tie2 抗體，其中人類 Ig γ 4 恆定區域為具有 S228P 及 L235E 之胺基酸變異的人類 Ig γ 4 恆定區域。

〔11〕如〔3〕～〔7〕中任一項之抗人類 Tie2 抗體，其係包含人類 Ig κ 恆定區域的輕鏈恆定區域。

〔12〕如〔3〕～〔7〕中任一項之抗人類 Tie2 抗體，其係包含人類 Ig γ 1 恆定區域或人類 Ig γ 4 恆定區域的重

鏈恆定區域、且包含人類 Ig κ 恆定區域的輕鏈恆定區域。

〔13〕如〔12〕之抗人類 Tie2 抗體，其中人類 Ig γ 1 恆定區域為具有 L234A、L235A、及 P331S 之胺基酸變異的人類 Ig γ 1 恆定區域；或為具有 L234A、L235A、P331S、及 I253A 之胺基酸變異的人類 Ig γ 1 恆定區域。

〔14〕如〔12〕之抗人類 Tie2 抗體，其中人類 Ig γ 4 恆定區域為具有 S228P 及 L235E 之胺基酸變異的人類 Ig γ 4 恆定區域。

〔15〕如〔3〕~〔7〕中任一項之抗人類 Tie2 抗體，其中連結子為由 5~70 個胺基酸所構成之胜肽連結子。

〔16〕如〔15〕之抗人類 Tie2 抗體，其中連結子係包含絞鏈（hinge）區域或其一部分之胺基酸序列。

〔17〕如〔16〕之抗人類 Tie2 抗體，其中連結子係由序列編號 13 表示之胺基酸序列所構成。

〔18〕如〔4〕之抗人類 Tie2 抗體，其係包含 2 個之由序列編號 2 表示之胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

〔19〕如〔4〕之抗人類 Tie2 抗體，其係包含 2 個之由序列編號 6 表示之胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

〔20〕如〔4〕之抗人類 Tie2 抗體，其係包含 2 個之由序列編號 10 表示之胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

〔21〕一種抗人類 Tie2 抗體，其係藉由如〔18〕~〔

20〕中任一項之抗人類 Tie2 抗體的轉譯後修飾所產生之抗體。

〔22〕如〔21〕之抗人類 Tie2 抗體，其中轉譯後修飾，為重鏈可變區域 N 末端之焦麩胺醯基化及/或重鏈 C 末端之離胺酸缺失。

〔23〕如〔21〕之抗人類 Tie2 抗體，其係包含 2 個之由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 678 的胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

〔24〕一種 4 價之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其係結合於與如〔18〕或〔23〕之抗人類 Tie2 抗體相同的人類 Tie2 抗原決定位。

〔25〕如〔24〕之 4 價之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其中人類 Tie2 抗原決定位，為包含 Accession No.NP_000450.2 之胺基酸編號 192、195 及 197 之胺基酸的人類 Tie2 抗原決定位。

〔26〕一種聚核苷酸，其係包含編碼如〔2〕之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列。

〔27〕一種聚核苷酸，其係包含編碼如〔2〕之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列。

〔28〕一種聚核苷酸，其係包含編碼如〔18〕~〔20〕中任一項之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列。

〔 29 〕一種聚核苷酸，其係包含編碼如〔 18 〕～〔 20 〕中任一項之抗人類 Tie2 抗體之輕鏈的鹼基序列。

〔 30 〕一種表現載體，其係包含如〔 26 〕及/或〔 27 〕之聚核苷酸。

〔 31 〕一種表現載體，其係包含如〔 28 〕及/或〔 29 〕之聚核苷酸。

〔 32 〕一種經如〔 30 〕之表現載體轉形之宿主細胞，其係選自由以下之（ a ）～（ d ）所成之群：

（ a ）經含有包含編碼如〔 2 〕之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

（ b ）經含有包含編碼如〔 2 〕之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體與含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

（ c ）經含有包含編碼如〔 2 〕之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；及

（ d ）經含有包含編碼如〔 2 〕之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞。

〔 33 〕一種經如〔 31 〕之表現載體轉形之宿主細胞，

其係選自由以下之 (a) ~ (d) 所成之群：

(a) 經含有包含編碼如 [18] ~ [20] 中任一項之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

(b) 經含有包含編碼如 [18] ~ [20] 中任一項之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體與含有包含編碼該抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

(c) 經含有包含編碼如 [18] ~ [20] 中任一項之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；及

(d) 經含有包含編碼如 [18] ~ [20] 中任一項之抗人類 Tie2 抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞。

[34] 一種生產抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之方法，其係包含培養選自由以下之 (a) ~ (c) 所成之群的宿主細胞，使 4 價之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段表現之步驟：

(a) 經含有包含編碼如 [2] 之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼如該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

(b) 經含有包含編碼如 [2] 之抗人類 Tie2 抗體或

其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體與含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；以及

(c) 經含有包含編碼如〔2〕之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞、及經含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞。

〔35〕一種生產抗人類 Tie2 抗體之方法，其係包含培養選自由以下之(a)~(c)所成之群的宿主細胞，使抗人類 Tie2 抗體表現之步驟：

(a) 經含有包含編碼如〔18〕~〔20〕中任一項之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

(b) 經含有包含編碼如〔18〕~〔20〕中任一項之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體與含有包含編碼該抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；以及

(c) 經含有包含編碼如〔18〕~〔20〕中任一項之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞、及經含有包含編碼該抗人類 Tie2 抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞。

胞。

〔36〕一種抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其係以如〔34〕之方法生產。

〔37〕一種抗人類 Tie2 抗體，其係以如〔35〕之方法生產。

〔38〕一種醫藥組成物，其係含有如〔1〕～〔23〕、〔36〕及〔37〕中任一項之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段及藥學上容許之賦形劑。

〔39〕一種醫藥組成物，其係含有如〔5〕之抗人類 Tie2 抗體、如〔6〕之抗人類 Tie2 抗體、及藥學上容許之賦形劑。

〔40〕一種醫藥組成物，其係含有如〔18〕之抗人類 Tie2 抗體、如〔23〕之抗人類 Tie2 抗體、及藥學上容許之賦形劑。

〔41〕如〔38〕～〔40〕中任一項之醫藥組成物，其係糖尿病黃斑部水腫、糖尿病網膜症或重症下肢缺血之預防或治療用醫藥組成物。

〔42〕一種預防或治療糖尿病黃斑部水腫、糖尿病網膜症或重症下肢缺血之方法，其係包含投與如〔1〕～〔23〕、〔36〕及〔37〕中任一項之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之治療有效量的步驟。

〔43〕如〔1〕～〔23〕、〔36〕及〔37〕中任一項之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其係使用於糖尿病黃斑部水腫、糖尿病網膜症或重症下肢缺血之預防或治

療。

〔44〕一種如〔1〕～〔23〕、〔36〕及〔37〕中任一項之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之使用，其係用於製造糖尿病黃斑部水腫、糖尿病網膜症或重症下肢缺血之預防或治療用醫藥組成物。

[0012] 前述抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，亦包含與其他胜肽及蛋白質之融合抗體、或結合有修飾劑之修飾抗體。

〔發明之效果〕

[0013] 本發明之抗人類 Tie2 抗體，藉由與人類 Tie2 結合，使人類 Tie2 活性化，可使用作為糖尿病黃斑部水腫、糖尿病網膜症或重症下肢缺血之預防或治療劑。

【圖式簡單說明】

[0014] 〔圖 1〕表示本發明之 4 價之抗人類 Tie2 抗體的形式之一例。

[0015] 〔圖 2〕表示完全人類型 2-16A2 及 TIE-1-Ig γ 1-WT 於大鼠血管透過性模式中的血管透過性阻礙作用。縱軸表示伊凡氏藍色素漏出量。（****：p<0.0001 vs Vehicle 群）。

[0016] 〔圖 3〕表示 TIE-1-Ig γ 1-LALA 於大鼠血管透過性模式中的血管透過性阻礙作用。縱軸表示伊凡氏藍色素漏出量。（****：p<0.0001 vs Vehicle 群）。

[0017] [圖 4] 表示 TIE-1-Ig γ 1-LALA 於小鼠網膜血管外被細胞脫落模式中的網膜水腫阻礙作用。縱軸表示網膜神經纖維層及網膜神經節細胞層之面積和。(## : $p < 0.005$ vs Cont.群、* : $p < 0.05$ vs Veh.群)。

[0018] [圖 5] 表示 TIE-1-Ig γ 1-LALA 於後肢缺血小鼠模式中的血流改善作用。縱軸表示血流量。(* : $p < 0.05$ vs 對照群、** : $p < 0.01$ vs 對照群)。

[0019] [圖 6] 作為 TIE-1-Ig γ 1-LALA 之抗原決定位解析的一環，表示表面電漿共振現象之結果的代表例子。縱軸表示結合感應性 (Resonance Unit : RU)、橫軸表示時間 (秒)。

[0020] [圖 7] 作為 TIE-1-Ig γ 1-LALA 之抗原決定位解析的一環，表示 ELISA 之結果。縱軸表示發光強度、橫軸表示 TIE-1-Ig γ 1-LALA 之濃度 (ng/mL)。

【實施方式】

[0021] 以下詳述本發明。

[0022] 抗體係存在有 IgG、IgM、IgA、IgD 及 IgE 之 5 個類型 (class)。該抗體分子之基本構造，係各類型共通地由分子量 5 萬~7 萬之重鏈與 2~3 萬之輕鏈所構成。重鏈通常由包含約 440 個胺基酸之多肽鏈所構成，各類型係具有特徵性構造，對應於 IgG、IgM、IgA、IgD、IgE 而稱作 Ig γ 、Ig μ 、Ig α 、Ig δ 、Ig ϵ 。進一步地，於 IgG 係存在有 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 之次類型 (subclass)，各

自所對應之重鏈係稱為 $Ig\gamma 1$ 、 $Ig\gamma 2$ 、 $Ig\gamma 3$ 、 $Ig\gamma 4$ 。輕鏈通常由包含約 220 個胺基酸之多肽鏈所構成，已知有 L 型與 K 型 2 種，各自稱作 $Ig\lambda$ 、 $Ig\kappa$ 。抗體分子之基本構造的胜肽構成，係由分別相同的 2 條重鏈及 2 條輕鏈，藉由雙硫鍵（S-S 鍵）及非共價鍵而結合，分子量為 15 萬~19 萬。2 種輕鏈不管與何種重鏈均可成對。

[0023] 鏈內 S-S 鍵，於重鏈有四個（ μ 、 ϵ 鏈有五個）、於輕鏈有二個，每 100~110 個胺基酸殘基係成為一個環狀域（loop），在各環狀域間該立體構造類似，稱為構造單位或結構域（domain）。不管重鏈、輕鏈的位於胺基末端（N 末端）之結構域，均為即使來自同種動物之同一類型（次類型）的標本，其胺基酸序列亦並非一定，稱作可變區域，各結構域分別稱為重鏈可變區域及輕鏈可變區域。較可變區域靠近羧基末端（C 末端）側之胺基酸序列，於各個類型或次類型係大致恆定，而稱為恆定區域。

[0024] 抗體之抗原結合部位係由重鏈可變區域（VH）及輕鏈可變區域（VL）構成，結合之特異性係依該部位之胺基酸序列而定。另一方面，與補體或各種細胞之結合等的生物學活性，係反映了各類型 Ig 之恆定區域構造的差別。輕鏈與重鏈之可變區域的可變性，可知大致限定於不管於何種鏈均存在的 3 個小的超可變區域，此等區域稱為互補性決定區域（CDR；由 N 末端側起分別為 CDR1、CDR2、CDR3）。可變區域之剩餘部分稱為框架區域（FR），較為恆定。

[0025] 關於恆定區域，重鏈恆定區域係由 3 個區域所構成，自可變區域側起依序稱為 CH1 區域、CH2 區域及 CH3 區域。輕鏈恆定區域係由 1 個區域所構成。CH1 區域及 CH2 區域之間存在有稱為絞鏈區域之胜肽序列。絞鏈區域係與由重鏈可變區域及 CH1 區域所構成之構造的可動性相關。

[0026] 包含抗體之 VH 及 VL 的各種抗原結合片段亦具有抗原結合活性，作為如此之代表性的抗原結合片段，可列舉單鏈可變區域片段（scFv）、Fab、Fab'、F（ab'）₂。Fab 係由包含輕鏈、VH、CH1 區域與絞鏈區域之一部分的重鏈片段所構成之一價抗體片段。Fab'係由包含輕鏈、VH、CH1 區域與絞鏈區域之一部分的重鏈片段所構成之一價抗體片段，該絞鏈區域之部分係包含構成重鏈間 S-S 鍵之半胱胺酸殘基。F（ab'）₂ 片段，係 2 個 Fab'片段以絞鏈區域中之重鏈間 S-S 鍵結合而得的二價抗體片段。scFv 係由經連結子（linker）連結之 VH 與 VL 所構成之一價抗體片段。

[0027] 具有 2 個以上之抗原結合部位的抗體稱為多價抗體。其中，具有 4 個抗原結合部位之抗體稱為 4 價抗體。4 價抗體中被報告有各種形式（構造）（Nat. Rev. Immunol. 2010、Vol.10、p.301-316。J. Immunol.、2003、Vol.170、p.4854-4861。Mol. Immunol.、2000、Vol.37、p.1067-1077。Biochem. J.、2007、Vol.406、p.237-246。J. Immunol. Methods、2003、Vol.279、p.219-232）。例

如，被報告有對 2 價抗體之重鏈可變區域及輕鏈可變區域之 N 末端，透過連結子進一步分別連結有重鏈可變區域及輕鏈可變區域之 C 末端的 4 價抗體；包含 2 個重鏈及 4 個輕鏈，且含有 2 個之各重鏈係由重鏈可變區域及 CH1 區域所構成之構造的 4 價抗體；對 4 聚體鏈親和素之各個鏈親和素（streptavidin）分別各結合有 1 個 scFv 之 C 末端的 4 價抗體；對 4 聚體 p53 之各個 p53 分別各結合有 1 個 scFv 之 C 末端的 4 價抗體；及對 2 聚體 scFv 之 C 末端，透過連結子而連結有 CH3 區域之 N 末端的 4 價抗體等。

[0028]

<本發明之抗人類 Tie2 抗體>

本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，係包含具有以下特徵之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段。

一種抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其係包含 4 個重鏈可變區域及 4 個輕鏈可變區域之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其中

該重鏈可變區域係由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 122 的胺基酸序列所構成，

該輕鏈可變區域係由序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列所構成，且

1 個該重鏈可變區域與 1 個該輕鏈可變區域構成 1 個抗原結合部位，該抗體或其抗原結合片段包含 4 個抗原結合部位。

[0029] 本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段

只要係 4 價抗體，則抗體形式並無特殊限定，於本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段中，例如可使用如 Nat. Rev. Immunol. 2010、Vol.10、p.301-316、J. Immunol.、2003、Vol.170、p.4854-4861、Mol. Immunol.、2000、Vol.37、p.1067-1077、Biochem. J.、2007、Vol.406、p.237-246、J. Immunol. Methods、2003、Vol.279、p.219-232 等所記載之各種 4 價抗體的形式。

[0030] 較佳為，本發明之抗人類 Tie2 抗體，係一種抗人類 Tie2 抗體，其係包含 2 個重鏈及 4 個輕鏈，且

各重鏈係包含 2 個之由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 122 的胺基酸序列所構成之重鏈可變區域及 CH1 區域所構成之構造、以及包含 CH2 區域及 CH3 區域，一方之該構造的 C 末端係透過連結子與另一方之該構造的 N 末端連結，

各輕鏈係包含由序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列所構成之輕鏈可變區域及輕鏈恆定區域。

以下，將該形式之 4 價抗體亦稱為串列（tandem）抗體，其一例示於圖 1。

[0031] 本發明之抗人類 Tie2 抗體為串列抗體時，作為恆定區域者，不管何種次類型之恆定區域（例如，重鏈恆定區域為 Ig γ 1、Ig γ 2、Ig γ 3 或 Ig γ 4 之恆定區域；輕鏈恆定區域為 Ig λ 或 Ig κ 之恆定區域）均能夠選擇。較佳為重鏈恆定區域（包含 CH1 區域、CH2 區域及 CH3 區域）係人類 Ig γ 1 恆定區域或人類 Ig γ 4 恆定區域。較佳為輕鏈

恆定區域係人類 Ig κ 恆定區域。

[0032] 本發明之抗人類 Tie2 抗體之重鏈恆定區域使用人類 Ig γ 1 恆定區域時，人類 Ig γ 1 恆定區域之 CH1 區域、CH2 區域及 CH3 區域，可列舉例如由序列編號 8 之胺基酸編號 350 至 447 之胺基酸序列所構成之 CH1 區域、由序列編號 8 之胺基酸編號 463 至 572 之胺基酸序列所構成之 CH2 區域、及由序列編號 8 之胺基酸編號 573 至 679 之胺基酸序列所構成之 CH3 區域。

[0033] 本發明之抗人類 Tie2 抗體之重鏈恆定區域使用人類 Ig γ 1 恆定區域時，為了降低抗體之抗體依賴型細胞傷害活性或補體依賴型傷害活性，亦可使用導入了 L234A（依 Kabat 等之 EU 索引編號，將胺基酸 234 位之白胺酸以丙胺酸取代）、L235A（依 Kabat 等之 EU 索引編號，將胺基酸 235 位之白胺酸以丙胺酸取代）及 P331S（依 Kabat 等之 EU 索引編號，將胺基酸 331 位之脯胺酸以絲胺酸取代）等之胺基酸變異的人類 Ig γ 1 恆定區域（Mol. Immunol.、1992、Vol. 29、No.5、p. 633-639）。進一步地，由體內動態之觀點而言，為了使其由血液中快速消失，亦可使用導入了 I253A（依 Kabat 等之 EU 索引編號，將胺基酸 253 位之異白胺酸以丙胺酸取代）等之胺基酸變異的人類 Ig γ 1 恆定區域（J. Immunol.、1997、Vol.158、p.2211-2217）。關於本說明書中使用之抗體的恆定區域中之胺基酸變異導入的相關殘基編號，係依照 EU 索引編號（Kabat 等，1991、Sequences of Proteins of

Immunological Interest、5th Ed.、United States Public Health Service、National Institute of Health、Bethesda)。

[0034] 本發明之抗人類 Tie2 抗體之重鏈恆定區域使用人類 Ig γ 1 恆定區域時，較佳為，該人類 Ig γ 1 恆定區域係具有 L234A、L235A、及 P331S 之胺基酸變異的人類 Ig γ 1 恆定區域，或具有 L234A、L235A、P331S 及 I253A 之胺基酸變異的人類 Ig γ 1 恆定區域。具有 L234A、L235A、及 P331S 之胺基酸變異的人類 Ig γ 1 恆定區域之 CH1 區域、CH2 區域及 CH3 區域，可列舉例如由序列編號 2 之胺基酸編號 350 至 447 之胺基酸序列所構成之 CH1 區域、由序列編號 2 之胺基酸編號 463 至 572 之胺基酸序列所構成之 CH2 區域、及由序列編號 2 之胺基酸編號 573 至 679 之胺基酸序列所構成之 CH3 區域。具有 L234A、L235A、P331S 及 I253A 之胺基酸變異的人類 Ig γ 1 恆定區域之 CH1 區域、CH2 區域及 CH3 區域，可列舉例如由序列編號 6 之胺基酸編號 350 至 447 之胺基酸序列所構成之 CH1 區域、由序列編號 6 之胺基酸編號 463 至 572 之胺基酸序列所構成之 CH2 區域、及由序列編號 6 之胺基酸編號 573 至 679 之胺基酸序列所構成之 CH3 區域。

[0035] 本發明之抗人類 Tie2 抗體之重鏈恆定區域使用人類 Ig γ 4 恆定區域時，為了抑制 Fab 臂交換 (Fab arm exchange)，亦可使用導入了 S228P (依 Kabat 等之 EU 索引編號，將胺基酸 228 位之絲胺酸以脯胺酸取代) 及 L235E (依 Kabat 等之 EU 索引編號，將胺基酸 235 位之

白胺酸以麩胺酸取代)等之胺基酸變異的人類 Ig γ 4 恆定區域 (Drug Metab. Dispos.、2010、Vol.38、No.1、p.84-91)。

[0036] 本發明之抗人類 Tie2 抗體之重鏈恆定區域使用人類 Ig γ 4 恆定區域時，較佳為，該人類 Ig γ 4 恆定區域係具有 S228P 及 L235E 之胺基酸變異的人類 Ig γ 4 恆定區域。具有 S228P 及 L235E 之胺基酸變異的人類 Ig γ 4 恆定區域之 CH1 區域、CH2 區域及 CH3 區域，可列舉例如由序列編號 10 之胺基酸編號 350 至 447 之胺基酸序列所構成之 CH1 區域、由序列編號 10 之胺基酸編號 460 至 569 之胺基酸序列所構成之 CH2 區域、及由序列編號 10 之胺基酸編號 570 至 676 之胺基酸序列所構成之 CH3 區域。

[0037] 人類 Ig κ 恆定區域，可列舉例如由序列編號 4 之胺基酸編號 114 至 219 之胺基酸序列所構成之人類 Ig κ 恆定區域。

[0038] 較佳為，本發明之抗人類 Tie2 抗體為串列抗體時，重鏈恆定區域係人類 Ig γ 1 恆定區域或人類 Ig γ 4 恆定區域、輕鏈恆定區域係人類 Ig κ 恆定區域。重鏈恆定區域為人類 Ig γ 1 恆定區域時，較佳為，該人類 Ig γ 1 恆定區域係具有 L234A、L235A、及 P331S 之胺基酸變異的人類 Ig γ 1 恆定區域，或具有 L234A、L235A、P331S 及 I253A 之胺基酸變異的人類 Ig γ 1 恆定區域。重鏈恆定區域為人類 Ig γ 4 恆定區域時，較佳為，該人類 Ig γ 4 恆定區域係具有 S228P 及 L235E 之胺基酸變異的人類 Ig γ 4 恆定區域。

[0039] 本發明之抗人類 Tie2 抗體為串列抗體時，作為連結由重鏈可變區域及 CH1 區域所構成之構造彼此的連結子，只要抗體具有其功能，則可使用任意之胜肽（胜肽連結子）。胜肽連結子之長度及胺基酸序列可由所屬技術領域中具有通常知識者適當選擇。較佳為，胜肽連結子之長度為 5~70 胺基酸。較佳為，胜肽連結子包含絞鏈區域或其一部分之胺基酸序列。絞鏈區域意指存在於抗體之 CH1 區域與 CH2 區域之間的區域，所使用之絞鏈區域，可列舉例如 IgG1 或 IgG3 之絞鏈區域。絞鏈區域之一部分，意指絞鏈區域中之至少連續 5 胺基酸的區域，較佳為意指自絞鏈區域之 N 末端起至少連續 5 胺基酸的區域。絞鏈區域之一部分，例如為 IgG1 之絞鏈區域的情況時，可列舉自 N 末端起連續 5 胺基酸的區域（由序列編號 13 之胺基酸編號 1 至 5 之胺基酸序列所構成）、及為 IgG3 之絞鏈區域的情況時，可列舉自 N 末端起連續 12 胺基酸的區域（由序列編號 14 之胺基酸編號 1 至 12 之胺基酸序列所構成）。於 1 個實施形態中，連結子係包含自絞鏈區域之 N 末端起至少連續 5 胺基酸的區域之胺基酸序列，且該連結子之 C 末端包含胺基酸序列 GlySer。如此之連結子，可列舉由序列編號 13~20 中任一者表示之胺基酸序列所構成之胜肽連結子，較佳為，連結子係由序列編號 13 表示之胺基酸序列構成。

[0040] 於 1 個實施形態中，本發明之抗人類 Tie2 抗體，係具有以下之 i) ~iv) 的任一特徵之抗人類 Tie2 抗

體。

i) 包含 2 個之由序列編號 2 表示之胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

ii) 包含 2 個之由序列編號 6 表示之胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

iii) 包含 2 個之由序列編號 8 表示之胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

iv) 包含 2 個之由序列編號 10 表示之胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

[0041] 將抗體於細胞表現時，已知抗體於轉譯後會受到修飾。轉譯後修飾之例子，可列舉將重鏈 C 末端之離胺酸以羧胺酶切斷、重鏈及輕鏈 N 末端之麩醯胺或麩胺酸之焦麩胺醯基化所致的修飾為焦麩胺酸、醯甘化、氧化、脫醯胺化、糖化等，於各種抗體中，已知會產生如此的轉譯後修飾（Journal of Pharmaceutical Sciences、2008、Vol.97、p.2426-2447）。

[0042] 本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，亦包含受到轉譯後修飾之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段。受到轉譯後修飾之本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段的例子可列舉受到重鏈可變區域 N 末端

之焦麩胺醯基化及/或重鏈 C 末端之離胺酸缺失的抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段。於該領域中已知如此之 N 末端之焦麩胺醯基化或 C 末端離胺酸缺失的轉譯後修飾不會對抗體活性造成影響 (Analytical Biochemistry、2006、Vol.348、p.24-39)。

[0043] 於 1 個實施形態中，本發明之抗人類 Tie2 抗體，為具有以下 (1) ~ (4) 的任一特徵抗人類 Tie2 抗體。

(1) 包含 2 個之由序列編號 2 之胺基酸編號 1 之麩胺酸被修飾為焦麩胺酸及/或序列編號 2 之胺基酸編號 679 之離胺酸缺失的胺基酸序列所構成之重鏈、以及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

(2) 包含 2 個之由序列編號 6 之胺基酸編號 1 之麩胺酸被修飾為焦麩胺酸及/或序列編號 6 之胺基酸編號 679 之離胺酸缺失的胺基酸序列所構成之重鏈、以及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

(3) 包含 2 個之由序列編號 8 之胺基酸編號 1 之麩胺酸被修飾為焦麩胺酸及/或序列編號 8 之胺基酸編號 679 之離胺酸缺失的胺基酸序列所構成之重鏈、以及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

(4) 包含 2 個之由序列編號 10 之胺基酸編號 1 之麩

胺酸被修飾為焦麩胺酸及/或序列編號 10 之胺基酸編號 676 之離胺酸缺失的胺基酸序列所構成之重鏈、以及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

[0044] 於 1 個實施形態中，本發明之抗人類 Tie2 抗體，為具有下述特徵之抗人類 Tie2 抗體。

包含 2 個之由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 678 的胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

[0045] 本發明中，亦包含具有以下特徵之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段。

一種抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其係包含 4 個重鏈可變區域及 4 個輕鏈可變區域之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其中

該重鏈可變區域，包含由序列編號 2 之胺基酸編號 31 至 35 的胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 2 之胺基酸編號 50 至 66 的胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 2 之胺基酸編號 99 至 111 的胺基酸序列所構成之 CDR3，

該輕鏈可變區域，包含由序列編號 4 之胺基酸編號 24 至 39 的胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 4 之胺基酸編號 55 至 61 的胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 4 之胺基酸編號 94 至 102 的胺基酸序列所構成之 CDR3，且

1 個該重鏈可變區域與 1 個該輕鏈可變區域構成 1 個抗原結合部位，該抗體或其抗原結合片段包含 4 個抗原結合部位。

[0046] 又，本發明中，亦包含具有以下特徵之抗人類 Tie2 抗體。

一種抗人類 Tie2 抗體，其包含 2 個重鏈及 4 個輕鏈，

各重鏈係包含 2 個之由包含由序列編號 2 之胺基酸編號 31 至 35 的胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 2 之胺基酸編號 50 至 66 的胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 2 之胺基酸編號 99 至 111 的胺基酸序列所構成之 CDR3 的重鏈可變區域及 CH1 區域所構成之構造，以及包含 CH2 區域及 CH3 區域，一方之該構造的羧基末端係透過連結子與另一方之該構造的胺基末端連結，

各輕鏈係含有包含由序列編號 4 之胺基酸編號 24 至 39 的胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 4 之胺基酸編號 55 至 61 的胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 4 之胺基酸編號 94 至 102 的胺基酸序列所構成之 CDR3 的輕鏈可變區域及輕鏈恆定區域。

[0047] 本發明之抗人類 Tie2 抗體，係結合於人類 Tie2 之抗體。抗體是否結合於人類 Tie2 (Accession No.NP_000450.2)，可使用公知之結合活性測定方法來確認。測定結合活性之方法，可列舉例如 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 等方法。使用 ELISA

時，於例示的方法中，係將融合了人類 Tie2 及人類 Fc 的蛋白質固相化於 ELISA 測定盤，對其添加被驗抗體進行反應。使生物素標識之抗 IgG 抗體等 2 次抗體進行反應，洗淨後，使結合有鹼性磷酸酶等酵素之鏈親和素進行反應。洗淨後，藉由使用檢測該活性之試藥（例如鹼性磷酸酶的情況時，係 Chemiluminescent Ultra Sensitive AP Microwell and/or Membrane Substrate（450nm）（BioFX 公司、APU4-0100-01）等）進行活性測定，可確認被驗抗體是否與人類 Tie2 結合。活性之具體的評估方法，例如可使用如後述實施例 12 記載之方法。

[0048] 本發明之抗人類 Tie2 抗體，只要係結合於人類 Tie2 之抗體，則亦包含除了結合於人類 Tie2 以外，亦結合其他動物由來的 Tie2（例如猴子 Tie2）之抗體。

[0049] 較佳為，本發明之抗人類 Tie2 抗體係結合於人類 Tie2，且對人類 Tie2 表現細胞具有抗細胞凋亡活性。用以評估抗體對人類 Tie2 表現細胞具有抗細胞凋亡活性之具體的方法，例如可使用如後述實施例 4 記載之方法。

[0050] 本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，亦包含 4 價之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其係結合於與包含 2 個之由序列編號 2 表示之胺基酸序列所構成之重鏈及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體或包含 2 個之由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 678 的胺基酸序列所構成之重鏈及 4 個

之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體相同的人類 Tie2 抗原決定位。此處，抗原決定位（epitope）係指抗體所認識之抗原部位。

[0051] 本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，亦包含與包含人類 Tie2（Accession No.NP_000450.2）之胺基酸編號 192、195 及 197 的胺基酸當中之至少 1 個胺基酸的人類 Tie2 抗原決定位結合之 4 價之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段。

[0052] 又，本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，亦包含與包含人類 Tie2（Accession No.NP_000450.2）之胺基酸編號 192、195 及 197 的人類 Tie2 抗原決定位結合之 4 價之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段。

[0053] 結合於與包含 2 個之由序列編號 2 表示之胺基酸序列所構成之重鏈及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體或包含 2 個之由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 678 的胺基酸序列所構成之重鏈及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體相同的人類 Tie2 抗原決定位之 4 價之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，可使用公知之抗原決定位決定方法來取得。決定抗原決定位之方法，可列舉例如氫氘交換質譜分析法、X 射線結晶構造解析、以及使用人類 Tie2 之胺基酸取代變異體或人類 Tie2 部分胜肽等的 ELISA 及表面電漿共振現象等之方法。

[0054] 被驗抗體是否結合於與包含 2 個之由序列編

號 2 表示之胺基酸序列所構成之重鏈及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體或包含 2 個之由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 678 的胺基酸序列所構成之重鏈及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體相同的人類 Tie2 抗原決定位，可使用上述之公知抗原決定位決定方法來確認。使用氫氙交換質譜分析法時，係將於被驗抗體非存在下經氙取代之人類 Tie2 與於被驗抗體存在下經氙取代之人類 Tie2 分別分解為胜肽，測定各胜肽之分子量藉以算出氙取代之比例。由被驗抗體之有無所致之人類 Tie2 之氙取代的比例之差，可決定被驗抗體之人類 Tie2 抗原決定位。使用 ELISA 時，係製作人類 Tie2 之點突變體。將變異體人類 Tie2 固相化，對其添加被驗抗體進行反應。反應後，使生物素標識抗人類 kappa 輕鏈抗體等之二次抗體進行反應後洗淨。之後，使鹼性磷酸酶標識鏈親和素（Thermo Fisher Scientific 公司、21324）進行反應後洗淨。然後藉由使用 Chemiluminescent Ultra Sensitive AP Microwell and/or Membrane Substrate（450nm）等進行活性測定，可確認被驗抗體是否結合於該變異體人類 Tie2。藉由評估對各種變異體人類 Tie2 之結合活性，可決定被驗抗體之抗原決定位。當被驗抗體之抗原決定位，包含至少 1 個之包含 2 個之由序列編號 2 表示之胺基酸序列所構成之重鏈及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體或包含 2 個之由序列編號 2 之

胺基酸編號 1 至 678 的胺基酸序列所構成之重鏈及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體之抗原決定位中的 1 個胺基酸的情況時，可判斷被驗抗體，會結合於與包含 2 個之由序列編號 2 表示之胺基酸序列所構成之重鏈及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體或包含由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 678 的胺基酸序列所構成之重鏈及由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體相同之人類 Tie2 抗原決定位。

[0055] 本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，可基於本說明書揭示的本發明之抗體之重鏈可變區域及輕鏈可變區域的序列資訊，使用該領域公知之方法由所屬技術領域中具有通常知識者容易地製作。本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，並無特殊限定，例如可遵照後述之<本發明之生產抗人類 Tie2 抗體之方法及由該方法所生產之抗人類 Tie2 抗體>中記載的方法來製造。

[0056] 本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，可依需要進一步純化後，遵照一般方法予以製劑化，而使用於糖尿病網膜症、糖尿病黃斑部水腫、敗血症、急性肝障礙、急性腎障礙、急性肺障礙、全身性發炎反應症候群、末梢動脈阻塞症或重症下肢缺血等之血管關聯疾病的預防或治療。

[0057]

<本發明之聚核苷酸>

本發明之聚核苷酸，係包含了包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸、及包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸。

[0058] 於 1 個實施形態中，包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸，係包含編碼由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 122 的胺基酸序列所構成之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸。

[0059] 包含編碼序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 122 的胺基酸序列所示之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸，可列舉例如包含序列編號 1 之鹼基編號 1 至 366 之鹼基序列的聚核苷酸。

[0060] 於較佳之實施形態中，包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸，係包含編碼由序列編號 2 表示之胺基酸序列所構成之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸、包含編碼由序列編號 6 表示之胺基酸序列所構成之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸、包含編碼由序列編號 8 表示之胺基酸序列所構成之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸、或包含編碼由序列編號 10 表示之胺基酸序列所構成之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸。

[0061] 包含編碼由序列編號 2 表示之胺基酸序列所構成之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸，可列舉例如包含序列

編號 1 表示之鹼基序列的聚核苷酸。包含編碼由序列編號 6 表示之胺基酸序列所構成之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸，可列舉例如包含序列編號 5 表示之鹼基序列的聚核苷酸。包含編碼由序列編號 8 表示之胺基酸序列所構成之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸，可列舉例如包含序列編號 7 表示之鹼基序列的聚核苷酸。包含編碼由序列編號 10 表示之胺基酸序列所構成之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸，可列舉例如包含序列編號 9 表示之鹼基序列得聚核苷酸。

[0062] 於 1 個實施形態中，包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸，係包含編碼由序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列所構成之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸。

[0063] 包含編碼序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列表示之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸，可列舉例如包含序列編號 3 之鹼基編號 1 至 339 之鹼基序列的聚核苷酸。

[0064] 於較佳之實施形態中，包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸，係包含編碼由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸。

[0065] 包含編碼由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸，可列舉例如包含序列編號 3 表示之鹼基序列的聚核苷酸。

[0066] 本發明之聚核苷酸，可基於其鹼基序列，使用該領域公知之方法，由所屬技術領域中具有通常知識者容易地製作。例如，本發明之聚核苷酸，可利用該領域公知之基因合成方法來合成。如此之基因合成方法，可使用 WO90/07861 記載之抗體基因的合成方法等之所屬技術領域中具有通常知識者公知之各種方法。又，一旦取得本發明之聚核苷酸，則藉由於此聚核苷酸之特定部位導入變異，亦可取得本發明之其他聚核苷酸。如此之變異導入方法，可使用部位特異性變異誘發法（Current Protocols in Molecular Biology edit.、1987、John Wiley & Sons Section 8.1-8.5）等之所屬技術領域中具有通常知識者公知的各種方法。

[0067]

<本發明之表現載體>

本發明之表現載體，包含一種表現載體，其係含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸及/或包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸。於該領域，各種形式之 4 價抗體及其生產方法係為公知，本發明之表現載體，可遵照此等之生產方法，依照所表現之 4 價抗體的形式，由所屬技術領域中具有通常知識者容易地構築。

[0068] 較佳之本發明之表現載體，可列舉含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核

苷酸的表現載體、含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體、或含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體。

[0069] 用以表現本發明之聚核苷酸的表現載體，只要係可於真核細胞（例如動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞、酵母）及/或原核細胞（例如大腸菌）之各種宿主細胞中表現包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸及/或包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸，且藉此產生所編碼之多肽者，則無特殊限制。如此之表現載體，可列舉例如質體載體、病毒載體（例如腺病毒、腺病毒相關病毒、反轉錄病毒、仙台病毒）等，較佳可使用 pEE6.4 或 pEE12.4（Lonza 公司）。又，亦可使用 AG- γ 1 或 AG- κ （例如參照 WO94/20632）等之預先具有人類 Ig 恆定區域基因之表現載體來表現抗體基因。

[0070] 本發明之表現載體，可含有與本發明之聚核苷酸以可作用之方式連結的啟動子。作為用以於動物細胞表現本發明之聚核苷酸的啟動子，可列舉例如 CMV、RSV、SV40 等之病毒來源的啟動子、肌動蛋白啟動子、EF（elongation factor）1 α 啟動子、熱休克啟動子等。作為用以於細菌（例如大腸菌屬菌）表現之啟動子，可列舉

例如 trp 啟動子、lac 啟動子、 λ PL 啟動子、tac 啟動子等。又，作為用以於酵母表現之啟動子，可列舉例如 GAL1 啟動子、GAL10 啟動子、PH05 啟動子、PGK 啟動子、GAP 啟動子、ADH 啟動子等。

[0071] 宿主細胞使用動物細胞、昆蟲細胞、或酵母時，本發明之表現載體可含有開始密碼子及終止密碼子。此時，本發明之表現載體，亦可含有增強子序列、編碼本發明之抗體或其重鏈可變區域或輕鏈可變區域的基因之 5' 側及 3' 側之非轉譯區域、分泌訊息序列、剪接（splicing）接合部、多腺苷酸化（polyadenylation）部位、或可複製之單位等。宿主細胞使用大腸菌時，本發明之表現載體可含有開始密碼子、終止密碼子、終止子區域、及可複製之單位。此時，本發明之表現載體，亦可依目的而含有通常使用之選擇標記（例如四環黴素抗性基因、安比西林抗性基因、康黴素抗性基因、新黴素抗性基因、二氫葉酸還原酵素基因）。

[0072]

<本發明之經轉形的宿主細胞>

本發明之經轉形的宿主細胞，係包含選自由以下之（a）～（d）所成之群的經本發明之表現載體轉形之宿主細胞。

（a）經含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序

列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

(b) 經含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體與含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

(c) 經含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；及

(d) 經含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞。

[0073] 於 1 個實施形態中，本發明之經轉形之宿主細胞，係選自由以下之 (a) ~ (d) 所成之群的經本發明之表現載體轉形的宿主細胞。

(a) 經含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

(b) 經含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體與含有包含編碼該抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

(c) 經含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；及

(d) 經含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞。

[0074] 較佳之本發明之經轉形之宿主細胞，可列舉經含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞、以及經含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體與含有包含編碼該抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞。

[0075] 所轉形之宿主細胞，只要係適合於所使用之表現載體，經該表現載體轉形而可表現抗體者，則無特殊限定。所轉形之宿主細胞，可列舉例如於本發明之技術領域中通常使用之天然細胞或人工建立之細胞等各種細胞（例如動物細胞（例如 CHO-K1SV 細胞）、昆蟲細胞（例如 Sf9）、細菌（大腸菌屬菌等）、酵母（酵母菌屬、畢赤酵母菌屬等）等），較佳可使用 CHO 細胞（CHO-K1SV 細胞、CHO-DG44 細胞等）、293 細胞、NS0 細胞等之培養細胞。

[0076] 將宿主細胞轉形之方法並無特殊限定，例如可使用磷酸鈣法、電穿孔法等。

[0077]

<本發明之生產抗人類 Tie2 抗體之方法及由該方法所生產之抗人類 Tie2 抗體>

本發明之生產抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之

方法，係包含一種生產抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之方法，其係包含培養選自由以下之 (a) ~ (c) 所成之群的宿主細胞，使 4 價之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段表現之步驟。

(a) 經含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

(b) 經含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體與含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；以及

(c) 經含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞、及經含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞。

[0078] 於 1 個實施形態中，本發明之生產抗人類 Tie2 抗體之方法，係包含一種生產抗人類 Tie2 抗體之方法，其係包含培養選自由以下之 (a) ~ (c) 所成之群的宿主細胞，使抗人類 Tie2 抗體表現之步驟。

(a) 經含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈的鹼基

序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

(b) 經含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體與含有包含編碼該抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；以及

(c) 經含有包含編碼本發明之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞、及經含有包含編碼該抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞。

[0079] 本發明之生產抗人類 Tie2 抗體之方法，只要係包含培養本發明之經轉形之宿主細胞，使抗人類 Tie2 抗體表現之步驟，則無特殊限定。該方法中所使用之較佳宿主細胞，可列舉前述之較佳的本發明之經轉形之宿主細胞。

[0080] 經轉形之宿主細胞的培養可藉由公知之方法進行。培養條件，例如溫度、培養基之 pH 及培養時間，係適當選擇。宿主細胞為動物細胞時，培養基例如可使用含有約 5~20% 之胎牛血清的 MEM 培養基 (Science、1959、Vol.130、No.3373、p.432-7)、DMEM 培養基 (Virology、1959、Vol.8、p.396)、RPMI1640 培養基 (J.Am. Med. Assoc.、1967、Vol.199、p.519)、199 培養基 (Exp. Biol. Med.、1950、Vol.73、p.1-8) 等。培養基之 pH 較佳為約 6~8，培養係依需要在一邊通氣或攪拌下，一邊通常於約 30~40℃ 進行約 15~72 小時。宿主細胞

為昆蟲細胞時，培養基例如可使用含有胎牛血清之 Grace's 培養基（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1985、Vol.82、p.8404）等。培養基之 pH 較佳為約 5~8，培養係依需要在一邊通氣或攪拌下，一邊通常於約 20~40℃ 進行約 15~100 小時。宿主細胞為大腸菌或酵母時，培養基例如以含有營養源之液體培養基為適當。營養培養基較佳為含有經轉形之宿主細胞的生長所必需的碳源、無機氮源或有機氮源。碳源可列舉例如葡萄糖、葡聚糖、可溶性澱粉、蔗糖等，無機氮源或有機氮源可列舉例如銨鹽類、硝酸鹽類、胺基酸、玉米浸液、蛋白腴、酪蛋白、肉萃取物、大豆粕、馬鈴薯萃取液等。亦可依期望含有其他營養素（例如無機鹽（例如氯化鈣、磷酸二氫鈉、氯化鎂）、維生素類、抗生素（例如四環黴素、新黴素、安比西林、康黴素等）等）。培養基之 pH 較佳為約 5~8。宿主細胞為大腸菌時，較佳之培養基例如可使用 LB 培養基、M9 培養基（Mol.Clo.、Cold Spring Harbor Laboratory、Vol.3、A2.2）等。培養係依需要在一邊通氣或攪拌下，一邊通常於約 14~39℃ 進行約 3~24 小時。宿主細胞為酵母時，培養基例如可使用 Burkholder 最小培養基（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1980、Vol.77、p.4505）等。培養係依需要在一邊通氣或攪拌下，一邊通常於約 20~35℃ 進行約 14~144 小時。藉由如上述之培養，可使本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段表現。

[0081] 本發明之生產抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合

片段之方法，除了培養本發明之經轉形之宿主細胞，使抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段表現之步驟以外，可進一步包含由該經轉形之宿主細胞回收，較佳為單離或純化抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之步驟。單離或純化方法可列舉例如鹽析、溶劑沈澱法等利用溶解度之方法；透析、超微過濾、凝膠過濾等利用分子量之差的方法；離子交換層析、羥基磷灰石層析等利用電荷之方法；親和性層析等之利用特異親和性之方法；逆相高速液體層析等利用疏水性之差的方法；等電點電泳等之利用等電點之差的方法等。較佳為，培養上清液中所累積之抗體，可藉由各種層析，例如使用蛋白質 A 管柱或蛋白質 G 管柱之管柱層析來純化。

[0082] 本發明之抗人類 Tie2 抗體，亦包含以本發明之生產抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之方法所生產之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段。

[0083]

<本發明之醫藥組成物>

本發明之醫藥組成物，係包含含有本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段及藥學上容許之賦形劑的醫藥組成物。本發明之醫藥組成物，可使用該領域中通常使用之賦形劑，亦即藥劑用賦形劑或藥劑用載體等，藉由通常使用之方法來配製。此等醫藥組成物之劑型的例子，可列舉例如注射劑、點滴用劑等之非經口劑，可藉由靜脈內投與、皮下投與、眼內投與等來投與。製劑化時，可於藥學

上容許之範圍，使用因應此等劑型之賦形劑、載體、添加劑等。

[0084] 本發明之醫藥組成物，可含有複數種之本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段。例如，含有未受到轉譯後修飾之抗體或其抗原結合片段、及藉由該抗體或其抗原結合片段的轉譯後修飾所產生之抗體或其抗原結合片段的醫藥組成物亦包含在本發明中。

[0085] 於 1 個實施形態中，含有抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之本發明之醫藥組成物，亦包含下述記載之醫藥組成物。

一種醫藥組成物，其係含有抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，該抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段係包含 4 個重鏈可變區域及 4 個輕鏈可變區域之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，且係該重鏈可變區域由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 122 的胺基酸序列所構成、該輕鏈可變區域由序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列所構成，1 個該重鏈可變區域與 1 個該輕鏈可變區域構成 1 個抗原結合部位，該抗體或其抗原結合片段包含 4 個抗原結合部位之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段、以及，藉由該抗體或其抗原結合片段的轉譯後修飾所產生之抗體或其抗原結合片段。

[0086] 於 1 個實施形態中，含有抗人類 Tie2 抗體之本發明之醫藥組成物，亦包含下述記載之醫藥組成物。

一種醫藥組成物，其係含有抗人類 Tie2 抗體，該抗

人類 Tie2 抗體係包含 2 個重鏈及 4 個輕鏈，各重鏈係包含 2 個之由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 122 的胺基酸序列所構成之重鏈可變區域及 CH1 區域所構成之構造、以及包含 CH2 區域及 CH3 區域，一方之該構造的 C 末端係透過連結子與另一方之該構造的 N 末端連結，且各輕鏈係包含由序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列所構成之輕鏈可變區域及輕鏈恆定區域的抗人類 Tie2 抗體、以及，藉由該抗體的轉譯後修飾所產生之抗體。

[0087] 本發明之醫藥組成物，亦包含含有重鏈 C 末端離胺酸之缺失抗體、受到 N 末端轉譯後修飾之抗體或其抗原結合片段、重鏈 C 末端離胺酸缺失且受到 N 末端轉譯後修飾之抗體、及/或具有重鏈 C 末端離胺酸且未受到 N 末端轉譯後修飾之抗體之醫藥組成物。

[0088] 於 1 個實施形態中，含有抗人類 Tie2 抗體之本發明之醫藥組成物，亦包含含有下述 (1) ~ (4) 當中之 2 種以上之抗人類 Tie2 抗體的醫藥組成物。

(1) 包含 2 個之由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 678 的胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

(2) 包含 2 個之由序列編號 2 表示之胺基酸序列所構成，且胺基酸編號 1 之麩胺酸被修飾為焦麩胺酸之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

(3) 包含 2 個之由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至

678 的胺基酸序列所構成，且胺基酸編號 1 之麩胺酸被修飾為焦麩胺酸之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

(4) 包含 2 個之由序列編號 2 表示之胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

[0089] 於 1 個實施形態中，含有抗人類 Tie2 抗體之本發明之醫藥組成物，亦包含含有下述 (1) ~ (4) 當中之 2 種以上之抗人類 Tie2 抗體的醫藥組成物。

(1) 包含 2 個之由序列編號 6 之胺基酸編號 1 至 678 的胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

(2) 包含 2 個之由序列編號 6 表示之胺基酸序列所構成，且胺基酸編號 1 之麩胺酸被修飾為焦麩胺酸之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

(3) 包含 2 個之由序列編號 6 之胺基酸編號 1 至 678 的胺基酸序列所構成，且胺基酸編號 1 之麩胺酸被修飾為焦麩胺酸之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

(4) 包含 2 個之由序列編號 6 表示之胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

[0090] 於 1 個實施形態中，含有抗人類 Tie2 抗體之

本發明之醫藥組成物，亦包含含有下述（1）～（4）當中之2種以上之抗人類 Tie2 抗體的醫藥組成物。

（1）包含 2 個之由序列編號 8 之胺基酸編號 1 至 678 的胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

（2）包含 2 個之由序列編號 8 表示之胺基酸序列所構成，且胺基酸編號 1 之麩胺酸被修飾為焦麩胺酸之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

（3）包含 2 個之由序列編號 8 之胺基酸編號 1 至 678 的胺基酸序列所構成，且胺基酸編號 1 之麩胺酸被修飾為焦麩胺酸之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

（4）包含 2 個之由序列編號 8 表示之胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

[0091] 於 1 個實施形態中，含有抗人類 Tie2 抗體之本發明之醫藥組成物，亦包含含有下述（1）～（4）當中之2種以上之抗人類 Tie2 抗體的醫藥組成物。

（1）包含 2 個之由序列編號 10 之胺基酸編號 1 至 675 的胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

（2）包含 2 個之由序列編號 10 表示之胺基酸序列所構成，且胺基酸編號 1 之麩胺酸被修飾為焦麩胺酸之重

鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

(3) 包含 2 個之由序列編號 10 之胺基酸編號 1 至 675 的胺基酸序列所構成，且胺基酸編號 1 之麩胺酸被修飾為焦麩胺酸之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

(4) 包含 2 個之由序列編號 10 表示之胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體。

[0092] 於 1 個實施形態中，含有抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之本發明之醫藥組成物，亦包含下述記載之醫藥組成物。

一種醫藥組成物，其係含有：包含 2 個之由序列編號 2 表示之胺基酸序列所構成之重鏈及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體、包含 2 個之由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 678 的胺基酸序列所構成之重鏈及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈的抗人類 Tie2 抗體、以及藥學上容許之賦形劑。

[0093] 製劑化時本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段的添加量，雖依患者之症狀程度或年齡、所使用之製劑劑型、或抗體之結合力價等而異，但例如可使用 0.001mg/kg~100mg/kg 左右。

[0094] 本發明之醫藥組成物，可使用作為血管關聯

疾病，例如糖尿病網膜症、糖尿病黃斑部水腫、敗血症、急性肝障礙、急性腎障礙、急性肺障礙、全身性發炎反應症候群、末梢動脈阻塞症或重症下肢缺血等之預防或治療劑。

[0095] 本發明係包含含有本發明之抗人類 Tie2 抗體的糖尿病黃斑部水腫、糖尿病網膜症或重症下肢缺血之預防或治療用醫藥組成物。又，本發明包含預防或治療糖尿病黃斑部水腫、糖尿病網膜症或重症下肢缺血之方法，其係包含投與本發明之抗人類 Tie2 抗體之治療有效量的步驟。又，本發明包含本發明之抗人類 Tie2 抗體，其係使用於預防或治療糖尿病黃斑部水腫、糖尿病網膜症或重症下肢缺血。進一步地，本發明包含本發明之抗人類 Tie2 抗體之使用，其係用於製造糖尿病黃斑部水腫、糖尿病網膜症或重症下肢缺血之預防或治療用醫藥組成物。

[0096]

<融合抗體及修飾抗體>

若為所屬技術領域中具有通常知識者，可使用該領域公知之方法，以融合有其他胜肽或蛋白質之融合抗體的形式來製作抗體或其抗原結合片段、或亦可以結合有修飾劑之修飾抗體的形式來製作抗體或其抗原結合片段。本發明之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，亦包含如此之融合體或修飾體形態之抗體或抗原結合片段。例如，包含 4 個重鏈可變區域及 4 個輕鏈可變區域之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，該重鏈可變區域係由序列編號 2 之胺

基酸編號 1 至 122 的胺基酸序列所構成、該輕鏈可變區域係由序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列所構成，1 個該重鏈可變區域與 1 個該輕鏈可變區域構成 1 個抗原結合部位，該抗體或其抗原結合片段包含 4 個抗原結合部位的抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段中，亦包含與其他胜肽或蛋白質融合之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段、或結合有修飾劑之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段。本發明之抗體或其抗原結合片段，只要係以融合抗體的形式具有與人類 Tie2 之結合活性，則融合所用之其他胜肽或蛋白質並無特殊限定，可列舉例如人類血清白蛋白、各種標籤胜肽、人工螺旋基序胜肽、麥芽糖結合蛋白質、麩胱甘肽 S 轉移酶、各種毒素、其他可促進多聚體化之胜肽或蛋白質等。本發明之抗體或其抗原結合片段只要係以修飾抗體的形式具有與人類 Tie2 之結合活性，則修飾所用之修飾劑並無特殊限定，可列舉例如聚乙二醇、糖鏈、磷脂質、微脂體、低分子化合物等。

[0097] 以上已綜合記載了本發明，此處提供為了更進一步得到理解而參照之特定的實施例，但此等係為例示目的者，並非限定本發明者。

〔實施例〕

[0098] 關於使用了市售之套組或試藥等的部分，若無特別指明，係遵照添附之實驗指南（protocol）進行實驗。又，為了方便，將濃度 mol/L 以 M 表示。例如，1M

氫氧化鈉水溶液意指 1mol/L 之氫氧化鈉水溶液。

[0099]

(實施例 1：抗人類 Tie2 抗體產生融合瘤之製作)

使用人類單株抗體開發技術「VelocImmune」(VelocImmune antibody technology：Regeneron 公司(美國專利 6596541 號))小鼠來製作抗體。對 VelocImmune 小鼠，以引起免疫反應之佐劑與重組人類 Tie2-Fc 嵌合體蛋白質(R&D 公司、313-TI-100)誘發免疫。遵照一般方法，摘出經誘發免疫之小鼠淋巴節，回收淋巴球，將之與小鼠由來骨髓瘤細胞 SP2/0(ATCC：CRL-1581)進行細胞融合，藉以製作融合瘤。進行融合瘤之單株化，對於各殖株，以無血清培養基之 CD 融合瘤培養基(Invitrogen 公司)培養。由所得之培養上清液中使用蛋白質 G 管柱(GE Healthcare 公司)純化抗體。藉由 VelocImmune 技術所得到之抗體，係具有人類抗體之可變區域與小鼠抗體之恆定區域的抗體(亦稱為嵌合體抗體)。

[0100]

(實施例 2：細胞 ELISA 分析)

為了測定抗體之抗原結合活性，係藉由使用了人類 Tie2 表現 CHO 細胞、猴子 Tie2 表現 CHO 細胞、大鼠 Tie2 表現 CHO 細胞及小鼠 Tie2 表現 CHO 細胞的細胞 ELISA 分析，來評估對人類、猴子、大鼠及小鼠 Tie2 之抗體的結合。

[0101]

（實施例 3：使用 Ang-1 改變體之拮抗活性評估）

為了評估抗體之 Ang-2 拮抗活性，係評估 Ang-1 改變體（Proc. Natl. Acad. Sci.、2004、Vol.101、p.5547-5552。亦稱為 COMP-Ang1）與 Tie2 之結合阻礙。COMP-Ang1 係改變了與對 Tie2 之結合無關之部位的 Ang-1 改變體，由對 Tie2 之結合能力得到保持（Proc. Natl. Acad. Sci.、2004、Vol.101、p.5547-5552）及 Ang-1 與 Ang-2 係對 Tie2 之相同部位以相同程度之親和性結合（Science、1997、Vol.277、p.55-60）來看，藉由評估對 COMP-Ang1 之拮抗作用，可評估對 Ang-2 之拮抗作用。

[0102] 將 COMP-Ang1 之表現載體導入 HEK293 細胞。由該 HEK293 細胞之培養上清液中純化 COMP-Ang1，以生物素標識。於以重組人類 Tie2-Fc 嵌合體蛋白質固相化之試驗盤上，混合並添加上述經生物素標識之 COMP-Ang1 與實施例 1 中得到之純化抗體。使用鏈親和素標識 HRP 來檢測結合之生物素標識 COMP-Ang1。添加 TMB 顯色試藥（Dako 公司、S1599）並靜置後，添加 2M 硫酸使反應停止，測定 450nm 之吸光度。藉此，評估抗體之對 COMP-Ang1 之拮抗作用。

[0103]

（實施例 4：使用人類 Tie2 表現 BaF3 細胞之抗細胞凋亡活性評估）

遵照 Immunity、1998、Vol.9、p.677-686 記載之方法，藉由將含有序列編號 21 表示之人類 Tie2 基因的質體

以電穿孔導入該細胞，來製作穩定表現人類 Tie2 之 mouse pro B 細胞株 BaF3 細胞（以下稱為人類 Tie2 表現 BaF3 細胞）。以後，使用同細胞，評估抗體之抗細胞凋亡活性。

[0104] 將人類 Tie2 表現 BaF3 細胞以 2×10^5 cells/mL 懸浮於含有 0.05% 胎牛血清之 RPMI1640 培養基（Life Technologies 公司），於浮游細胞用 96 孔盤（住友 Bakelite 公司、MS-8096R）每 1 孔播種 80 μ L。之後，添加 20 μ L 實施例 1 中得到之純化抗體或 Ang-1。於設定為 37°C 之 CO₂ 培養箱中培養 72 小時後，將細胞懸浮液 50 μ L 移至白色 96 孔盤（Nunc 公司、236108）。遵照細胞內 ATP 定量套組 CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay（Promega 公司），於細胞懸浮液中添加以添附之緩衝液稀釋的基質溶液 50 μ L，藉以測定細胞之生存能力。藉由測定生存能力來評估抗細胞凋亡活性。

[0105] 實施例 2~4 之結果，發現複數個具有對人類、猴子、大鼠及小鼠 Tie2 之結合活性、COMP-Ang1 拮抗活性、以及抗細胞凋亡活性的抗體。含有後述之命名為 2-16 之抗人類 Tie2 抗體的純化抗體溶液，於實施例 4 中，雖顯示與 Ang-1 相同程度之抗細胞凋亡活性，但含有小鼠抗人類 Tie2 抗體 15B8（專利文獻 1）的純化抗體溶液，僅顯示了 Ang-1 之 60% 左右的最大活性。

[0106]

（實施例 5：使用尺寸篩除層析及電泳之純化抗體溶液的

解析)

以尺寸篩除層析解析於前述實施例 2~4 中鑑定之純化抗體溶液。其結果，由各純化抗體溶液中檢測出 3 個區分 (fraction)。以電泳來解析各區分溶液的結果，明顯可知各區分中分別含有抗體之單體、2 聚體、及 3 聚體以上之多聚體。

[0107] 接著對於各區分溶液，以實施例 4 所示之方法評估抗細胞凋亡活性。其結果，於含有 2 聚體之區分及含有 3 聚體以上之多聚體的區分當中，觀察到強力的抗細胞凋亡活性。另一方面，於含有單體的區分當中，幾乎觀察不到抗細胞凋亡活性。15B8 亦與上述相同地經尺寸篩除層析解析之結果，雖檢測出顯示 2 聚體以上之多聚體的區分，但幾乎檢測不到單體之區分。

[0108] 由以上明顯可知，於實施例 2~4 鑑定之所有抗體，均於含有 2 聚體以上之多聚體化抗體的區分當中包含強力的抗細胞凋亡活性。形成 2 聚體之抗體係成為 4 價抗體，因而其暗示了具有 4 價以上之價數的抗體係具有透過人類 Tie2 活性化之強力的抗細胞凋亡活性。

[0109]

(實施例 6：交聯抗體所致之抗細胞凋亡活性評估)

由實施例 5 之探討，可認為抗人類 Tie2 抗體之價數為 4 價以上，就透過 Tie2 來誘導抗細胞凋亡活性而言係重要的。因而，藉由以抗小鼠 IgG 抗體交聯，來評估多聚化之抗人類 Tie2 抗體之抗細胞凋亡活性。細胞係使用人

類 Tie2 表現 BaF3 細胞及內在性表現人類 Tie2 之人類血管內皮細胞 HUVEC。

[0110] 人類 Tie2 表現 BaF3 細胞係於 RPMI1640 培養基培養、HUVEC 係於 EBM-2 無血清培養基（Lonza 公司）培養，添加含有於實施例 2~4 鑑定之抗人類 Tie2 抗體的純化抗體溶液。進一步地，添加抗小鼠 IgG 抗體，使抗體交聯。使用 CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay 測定細胞之生存能力。藉由測定生存能力來評估抗細胞凋亡活性。

[0111] 其結果，發現了命名為 2-16 之抗人類 Tie2 抗體（嵌合體抗體）的交聯抗體，對人類 Tie2 具有強力的抗細胞凋亡活性。

[0112]

（實施例 7：2 價抗人類 Tie2 抗體之序列決定）

由產生抗人類 Tie2 抗體 2-16 之融合瘤中選殖編碼抗體之重鏈及輕鏈的基因，決定序列。

[0113] 抗體之序列決定後，為了提高抗體之物性及安定性，係將 2-16 之輕鏈及重鏈的框架區域（FR）與其他人類抗體之 FR 取代，製作改變型之抗人類 Tie2 抗體 2-16A2 的可變區域。

[0114] 於 2-16A2 之重鏈可變區域基因的 5'側連接編碼訊息序列（Protein Engineering、1987、Vol.1、No.6、p.499-505）之基因、且於 3'側連接人類 Igγ1 恆定區域基因（由序列編號 11 之鹼基編號 367 至 1356 之鹼基序列所

構成)，將該重鏈基因插入 GS 載體 pEE6.4。又，於輕鏈可變區域基因之 5' 側連接編碼訊息序列 (Protein Engineering、1987、Vol.1、No.6、p.499-505) 之基因、且於 3' 側連接人類 κ 鏈之恆定區域基因 (由序列編號 3 之鹼基編號 340 至 657 之鹼基序列所構成)，將該輕鏈基因插入 GS 載體 pEE12.4。將所製作之抗體之重鏈基因序列及輕鏈基因序列以定序器解析。

[0115] 所製作之 2-16A2 的完全人類型抗體 (完全人類型 2-16A2) 之重鏈鹼基序列示於序列編號 11、由其所編碼之胺基酸序列示於序列編號 12、該抗體之輕鏈的鹼基序列示於序列編號 3、由其所編碼之胺基酸序列示於序列編號 4。序列編號 12 表示之重鏈可變區域，係由序列編號 12 之胺基酸編號 1 至 122 的胺基酸序列所構成、序列編號 4 表示之輕鏈可變區域，係由序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列所構成。

[0116] 使用分別插入有完全人類型 2-16A2 之重鏈與輕鏈之基因的前述 GS 載體，以短暫性 (transient) 表現及恆常性表現之 2 種方法進行抗體表現。關於短暫性表現，係對以 FreeStyle 293 Expression medium (Invitrogen 公司) 培養至約 100 萬 cells/mL 的 FreeStyle 293 細胞 (Invitrogen 公司)，使用基因導入試藥 293 fectin (Invitrogen 公司) 轉染前述之重鏈及輕鏈之兩表現載體，培養 5 日。或者，對以 Expi293 Expression medium (Invitrogen 公司) 培養至約 300 萬 cells/mL 之 Expi293 細胞

(Invitrogen 公司)，使用基因導入套組 ExpiFectamine293 Transfection Kit (Invitrogen 公司) 轉染前述之重鏈及輕鏈之兩表現載體，培養 7 日。或者，對以 CD-CHO medium (Invitrogen 公司) 培養至約 1000 萬 cells/mL 之 CHO-K1SV 細胞 (Lonza 公司)，使用電穿孔法轉染前述之重鏈及輕鏈之兩表現載體，培養 7 日。將各培養上清液使用蛋白質 A 管柱或蛋白質 G 管柱 (GE Healthcare 公司) 純化，得到完全人類型抗體之純化抗體。關於恆常性表現，係將分別插入有抗體之重鏈與輕鏈之基因的前述 GS 載體以 NotI 與 PvuI 進行限制酵素切斷，使用接合 (ligation) 用套組 Ligation-Convenience Kit (NIPPONGENE 公司) 或接合試藥 Ligation high Ver.2 (TOYOBO 公司) 進行接合，構築插入有重鏈與輕鏈之兩基因的 GS 載體。藉由將該表現載體對 CHO-K1SV 細胞轉染，使抗體表現。將培養上清液以蛋白質 A 管柱、蛋白質 G 管柱或 MabSelect SuRe (GE Healthcare 公司、17-5438-02) 純化，得到完全人類型抗體之純化抗體。

[0117]

(實施例 8：4 價之抗人類 Tie2 抗體之製作)

製作 4 價之抗人類 Tie2 抗體。本實施例中製作之 4 價抗體，係包含 2 個重鏈及 4 個輕鏈。各重鏈係包含 2 個之由重鏈可變區域及 CH1 區域所構成之構造、以及包含 CH2 區域及 CH3 區域，一方之由該重鏈可變區域及 CH1 區域所構成之構造的 C 末端係透過連結子與另一方之該構

造的 N 末端連結。各輕鏈係包含輕鏈可變區域及輕鏈恆定區域。本 4 價抗體的形式係如圖 1 所示。

[0118] 製作編碼由完全人類型 2-16A2 之重鏈可變區域及 CH1 區域所構成之構造（由序列編號 12 之胺基酸編號 1 至 220 之胺基酸序列所構成）的 C 末端，透過由序列編號 13 表示之胺基酸序列所構成之連結子，與完全人類型 2-16A2 重鏈之 N 末端連結的 4 價抗人類 Tie2 抗體重鏈之基因。於該重鏈基因之 5'側連接編碼訊息序列（Protein Engineering、1987、Vol.1、No.6、p.499-505）之基因，插入 GS 載體 pEE6.4。組合該重鏈載體與實施例 7 中製作之插入有完全人類型 2-16A2 之輕鏈基因的 GS 載體 pEE12.4，使用與實施例 7 記載之抗體的表現及純化法相同之方法，製作 4 價之抗人類 Tie2 抗體。該抗人類 Tie2 抗體稱為 TIE-1-Ig γ 1-WT。

[0119] 製作編碼將 TIE-1-Ig γ 1-WT 之重鏈的恆定區域，取代為導入了 S228P 及 L235E 之胺基酸變異的人類 Ig γ 4 恆定區域（由序列編號 10 之胺基酸編號 123 至 220 之胺基酸序列、及序列編號 10 之胺基酸編號 350 至 676 之胺基酸序列所構成）之 4 價之抗人類 Tie2 抗體重鏈的基因。於該重鏈基因之 5'側連接編碼訊息序列（Protein Engineering、1987、Vol.1、No.6、p.499-505）之基因，插入 GS 載體 pEE6.4。組合該重鏈載體與實施例 7 中製作之插入有完全人類型 2-16A2 之輕鏈基因的 GS 載體 pEE12.4，使用與實施例 7 記載之抗體的表現及純化法相

同之方法，製作 4 價之抗人類 Tie2 抗體。該抗人類 Tie2 抗體稱為 TIE-1-Ig γ 4-PE。

[0120] TIE-1-Ig γ 1-WT 之重鏈之鹼基序列示於序列編號 7、由其所編碼之胺基酸序列示於序列編號 8。TIE-1-Ig γ 4-PE 之重鏈的鹼基序列示於序列編號 9、由其所編碼之胺基酸序列示於序列編號 10。兩抗體之輕鏈係與完全人類型 2-16A2 之輕鏈相同，該抗體之輕鏈之鹼基序列示於序列編號 3、由其所編碼之胺基酸序列示於序列編號 4。

[0121] 使用同樣之方法，製作於 TIE-1-Ig γ 1-WT 之重鏈恆定區域導入了 L234A、L235A、及 P331S 之胺基酸變異的 4 價之抗人類 Tie2 抗體（稱為 TIE-1-Ig γ 1-LALA）、以及於 TIE-1-Ig γ 1-WT 之重鏈恆定區域導入了 L234A、L235A、P331S、及 I253A 之胺基酸變異的 4 價之抗人類 Tie2 抗體（稱為 TIE-1-Ig γ 1-I253A）。

[0122] TIE-1-Ig γ 1-LALA 之重鏈之鹼基序列示於序列編號 1、由其所編碼之胺基酸序列示於序列編號 2。TIE-1-Ig γ 1-I253A 之重鏈鹼基序列示於序列編號 5、由其所編碼之胺基酸序列示於序列編號 6。兩抗體之輕鏈係與完全人類型 2-16A2 之輕鏈相同，該抗體之輕鏈之鹼基序列示於序列編號 3、由其所編碼之胺基酸序列示於序列編號 4。

[0123] 序列編號 2、序列編號 6、序列編號 8 及序列編號 10 表示之前述 4 種之 4 價抗人類 Tie2 抗體重鏈的可

變區域係共通的，由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 120 之胺基酸序列所構成，該重鏈可變區域之 CDR1、CDR2、CDR3，分別由序列編號 2 之胺基酸編號 31 至 35、50 至 66、99 至 111 之胺基酸序列所構成。

[0124] 序列編號 4 表示之前述 4 種 4 價抗人類 Tie2 抗體之輕鏈可變區域，係由序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列所構成，該輕鏈可變區域之 CDR1、CDR2、CDR3，係分別由序列編號 4 之胺基酸編號 24 至 39、55 至 61、94 至 102 之胺基酸序列所構成。

[0125] 分析經純化之 TIE-1-Ig γ 1-LALA 之胺基酸修飾的結果，純化抗體之大部分，產生重鏈 C 末端之離胺酸缺失。

[0126] 進一步地，使用相同之方法，關於 TIE-1-Ig γ 1-WT 及 TIE-1-Ig γ 4-PE，製作將連結子（由序列編號 13 表示之胺基酸序列所構成）分別取代為其他連結子（關於 TIE-1-Ig γ 1-WT 係由序列編號 17~20 表示之胺基酸序列所構成之 4 種連結子、關於 TIE-1-Ig γ 4-PE 係由序列編號 14~20 表示之胺基酸序列所構成之 7 種連結子）的 4 價之抗人類 Tie2 抗體（合計 11 種）。探討具有 7 個胺基酸（由序列編號 13 表示之胺基酸序列所構成之連結子）至 64 胺基酸（由序列編號 20 表示之胺基酸序列所構成之連結子）的長度之連結子。

[0127] 遵照實施例 4 之方法，評估 TIE-1-Ig γ 1-WT、TIE-1-Ig γ 4-PE、及取代了連結子之 11 種抗體的結果，明

顯可知所有的抗人類 Tie2 抗體均顯示同程度之抗細胞凋亡活性。

[0128]

（實施例 9：2 價之抗人類 Tie2 抗體及 4 價之抗人類 Tie2 抗體的抗細胞凋亡作用評估）

由實施例 5 之結果，暗示了具有 4 價以上之價數的抗體係具有透過人類 Tie2 活性化之強力的抗細胞凋亡活性。因而，以對人類 Tie2 表現 BaF3 細胞之抗細胞凋亡作用為指標，比較了 2 價之抗人類 Tie2 抗體及 4 價之抗人類 Tie2 抗體之藥效。

[0129] 遵照實施例 4 之方法，使用 2 價抗體之完全人類型 2-16A2 及 4 價抗體之 TIE-1-Ig γ 1-WT，評估對人類 Tie2 表現 BaF3 細胞之抗細胞凋亡作用。被驗抗體之完全人類型 2-16A2 及 TIE-1-Ig γ 1-WT，係以 MabSelect SuRe 純化後，以尺寸篩除層析區分為單體區分，分別取得為 99.98%及 99.74%之單體純度。將各抗體以磷酸緩衝生理食鹽水（PBS）由 5ng/mL 至 5000ng/mL 以約 3 倍公比進行 7 階段稀釋，每 1 孔添加 20 μ L。作為控制組，分別準備添加了 PBS、或以 PBS 稀釋之 Ang-1（R&D 公司、923-AN-025/CF。最終濃度由 1ng/mL 至 1000ng/mL 以約 3 倍公比進行 7 階段稀釋）之孔，以取代被驗抗體。算出被驗抗體於各濃度之抗細胞凋亡活性時，係以添加了 PBS 以取代被驗抗體之孔的測定值設定為 0%，分別添加了 300ng/mL 及 1000ng/mL 之 Ang-1 以取代被驗抗體之孔

的測定值之平均值設定為 100%。解析所算出之抗細胞凋亡活性，藉由 Sigmoid-Emax 模式非線形回歸分析，算出被驗抗體之 EC₅₀ 值。

表 1：2 價之抗人類 Tie2 抗體及 4 價之抗人類 Tie2 抗體的抗細胞凋亡活性
【表 1】

	EC ₅₀ 值	抗細胞凋亡活性之最大活性
TIE-1-Igγ1-WT	7.10 ng/mL	104%
完全人類型 2-16A2	37.6 ng/mL	22%

[0130] 其結果，明顯可知 4 價抗體之 TIE-1-Igγ1-WT 具有強力的抗細胞凋亡作用。由以上明顯可知，4 價抗體相較於 2 價抗體而言，具有更優良之抗細胞凋亡活性。

[0131]

（實施例 10：2 價之抗人類 Tie2 抗體及 4 價之抗人類 Tie2 抗體的大鼠血管透過性阻礙作用評估）

芥子油誘發之血管透過性模式，係對廣泛使用作為血漿漏出評估系統的 Miles assay（J.Physiol.、1952、Vol.118、p.228-257）施加變更者，於本模式中被報告了 Ang-1 會阻礙血管透過性亢進（Nature Medicine、2000、Vol.6、p.460-463）。因而，為了比較 2 價之抗人類 Tie2 抗體及 4 價之抗人類 Tie2 抗體的血管透過性阻礙作用，係使用本模式，評估完全人類型 2-16A2 及 TIE-1-Igγ1-WT。

[0132] 對 SD 大鼠（雄、4-5 週齡、日本 Charles River 公司）皮下投與經 PBS 稀釋之完全人類型 2-16A2 或 TIE-1-Igγ1-WT。處置群係如以下般設定。

[處置群 (各群 6 隻)]

Vehicle 群：

投與 PBS 以取代抗體之群

完全人類型 2-16A2 投與群：

投與完全人類型 2-16A2 之群 (0.3mg/kg)

TIE-1-Ig γ 1-WT 投與群：

投與 TIE-1-Ig γ 1-WT 之群 (0.3mg/kg)

[0133] 於抗體投與 48 小時後，靜脈內投與溶解於生理食鹽水之伊凡氏藍色素 (45mg/kg、Sigma-Aldrich 公司、E2129)，之後立即於單耳塗佈經礦物油 (Sigma-Aldrich 公司、M8410) 稀釋為 5% 之異硫氰酸烯丙酯 (亦稱為芥子油。Nacalai Tesque 公司、01415-92) 20 μ L、於對側耳塗佈礦物油 20 μ L。30 分鐘後採集兩耳，測定重量後，浸漬於 1mL 之甲醯胺，於 70 $^{\circ}$ C 培置 (incubate) 一晚，藉以萃取耳組織中之伊凡氏藍色素。由萃取液之吸光度 (測定波長 620nm、對照波長 740nm) 求得伊凡氏藍色素濃度，算出萃取液中之伊凡氏藍色素量。之後，藉由將伊凡氏藍色素量除以耳重量，算出單位耳重量之色素漏出量。將同一個體之芥子油塗佈耳的伊凡氏藍色素漏出量減去礦物油塗佈耳之伊凡氏藍色素漏出量的值，作為最終之各個體的伊凡氏藍色素漏出量而算出。使用該伊凡氏藍色素漏出量作為血管透過性之指標。結果如圖 2 所示。

[0134] 求出各群之平均值及標準誤差。Vehicle 群與

各抗體投與群之間的顯著性檢定係使用 Student 之 t 檢定。p<0.05 時視為有顯著差異。

[0135] 如圖 2 所示，相較於 Vehicle 群，2 價抗體之完全人類型 2-16A2 未阻礙色素漏出，但 4 價抗體之 TIE-1-Ig γ 1-WT 顯著地阻礙了色素漏出。明顯可知 4 價抗體之 TIE-1-Ig γ 1-WT 會阻礙血管透過性亢進。由以上明顯可知 4 價抗體相較於 2 價抗體而言，具有更優良之血管透過性亢進阻礙作用。

[0136] 由實施例 9 及 10 之結果，明顯可知 4 價之抗 Tie2 抗體會強力誘導透過 Tie2 之作用。

[0137]
(實施例 11：4 價之抗人類 Tie2 抗體之抗細胞凋亡作用評估 (2))

對於 TIE-1-Ig γ 1-LALA 及 TIE-1-Ig γ 1-I253A，遵照實施例 9 之方法，評估對人類 Tie2 表現 BaF3 細胞之抗體的抗細胞凋亡活性。於與實施例 9 相同之抗體濃度範圍來進行各 4 價抗人類 Tie2 抗體之評估。惟係以分別添加 Ang-1 之 100、300 及 1000ng/mL 之孔的測定值之平均值作為 100%，來評估各抗體之 EC₅₀ 值及抗細胞凋亡活性之最大活性。

表 2：各 4 價抗人類 Tie2 抗體之抗細胞凋亡活性

【表 2】

	EC ₅₀ 值	抗細胞凋亡活性之最大活性
TIE-1-Ig γ 1-LALA	3.65 ng/mL	88%
TIE-1-Ig γ 1-I253A	5.06 ng/mL	94%

[0138] 其結果明顯可知，TIE-1-Ig γ 1-LALA 及 TIE-1-Ig γ 1-I253A 均顯示與 Ang-1 相同程度之抗細胞凋亡活性。

[0139]

(參考例 1：15B8 之抗細胞凋亡作用評估)

對於 15B8，遵照實施例 9 之方法，評估對人類 Tie2 表現 BaF3 細胞之抗細胞凋亡活性。於與實施例 9 相同之抗體濃度範圍來進行 15B8 (專利文獻 1) 之評估。Ang-2 (R&D 公司、623-AN-025) 係與 Ang-1 相同地進行評估。惟係以添加 Ang-1 之 1000ng/mL 的孔之測定值的平均值作為 100%，來評估 EC₅₀ 值及抗細胞凋亡活性之最大活性。

表 3：15B8 之抗細胞凋亡活性

【表 3】

	EC ₅₀ 值	抗細胞凋亡活性之最大活性
15B8	26.6 ng/mL	64%
Ang-2	39.3 ng/mL	67%

[0140] 其結果明顯可知 15B8 之抗細胞凋亡活性為 Ang-1 之 64%左右，係與 Ang-2 相同程度之活性。

[0141] 配合實施例 11 之結果時，明顯可知 TIE-1-Ig γ 1-LALA 係顯示與 Ang-1 相同程度之抗細胞凋亡活性，相對於此，15B8 僅顯示與 Ang-2 相同程度之部分的抗細胞凋亡活性。

[0142]

(實施例 12：TIE-1-Ig γ 1-LALA 對 Tie2 之結合活性評估)

對於 TIE-1-Ig γ 1-LALA，評估對各種 Tie2 蛋白質之結合活性。將重組人類 Tie2-Fc 嵌合體蛋白質（R&D 公司、313-TI-100）、重組猴子 Tie2-Fc 嵌合體蛋白質（Sino Biological 公司、90292-C02H）、重組大鼠 Tie2-Fc 嵌合體蛋白質（R&D 公司、3874-T2-100）或重組小鼠 Tie2-Fc 嵌合體蛋白質（R&D 公司、762-T2-100），以 PBS 配製為 1 μ g/mL，對白色 Maxisorp 384 孔盤（Nunc 公司、460372）每 1 孔添加 20 μ L，藉由於 4 $^{\circ}$ C 培置一晚來進行固相化。翌日去除固相液，每 1 孔添加 50 μ L 之含有 20%之 BlockingOne（Nacalai Tesque 公司、03953-95）的 Tris 緩衝生理食鹽水（TBS）-0.05%Tween（Wako 公司、310-7375）（以下稱為 TBS-T 溶液），於室溫靜置 1 小時。作為被驗抗體，係將 TIE-1-Ig γ 1-LALA 使用含 5%之 BlockingOne 的 TBS-T 溶液由 0.03ng/mL 至 100ng/mL 以約 3 倍公比進行 8 階段稀釋，每 1 孔添加 20 μ L。作為控制組，係準備添加 TBS-T 溶液以取代被驗抗體之孔。於室溫培置 1.5 小時後，以 TBS-T 溶液洗淨。作為 2 次抗體，係將經生物素標識之抗人類 kappa 輕鏈抗體（免疫生物研究所、17249）以含 5%之 BlockingOne 的 TBS-T 溶液稀釋為 0.1 μ g/mL，每 1 孔添加 20 μ L。於室溫培置 1 小時後，以 TBS-T 溶液洗淨，以由含 5%之 BlockingOne 的 TBS-T 溶液稀釋為 0.1 μ g/mL 之鹼性磷酸酶標識鏈親和素（Thermo Fisher Scientific 公司、21324）作為檢測試藥，每 1 孔添加 20 μ L。於室溫培置 1 小時後，以 TBS-T 溶液

洗淨，以經含有 1mM MgCl₂ 之 20mM TBS (pH9.8) 稀釋 5 倍之 Chemiluminescent Ultra Sensitive AP Microwell and/or Membrane Substrate (450nm) (BioFX 公司、APU4-0100-01) 作為基質，添加 20μL。於室溫培置 30 分鐘後，以 EnVision™ Multilabel Counter (PerkinElmer 公司) 測定發光強度。解析所算出之結合活性，藉由 Sigmoid-Emax 模式非線形回歸分析來算出被驗抗體之 EC₅₀ 值。

表 4：TIE-1-Igγ1-LALA 之結合活性

【表 4】

	EC ₅₀ 值 (ng/mL)			
	人類	猴子	大鼠	小鼠
TIE-1-Igγ1-LALA	0. 565	0. 545	0. 633	0. 696

[0143] 其結果明顯可知，TIE-1-Igγ1-LALA 對人類、猴子、大鼠及小鼠 Tie2 具有相同程度之高的結合活性。

[0144]

(參考例 2：15B8 對 Tie2 之結合活性評估)

遵照實施例 12 之方法，評估 15B8 對各種 Tie2 蛋白質之結合活性。惟，作為 2 次抗體係使用 HRP 標識抗小鼠 kappa 輕鏈抗體 (SouthernBiotech 公司、1050-05)、作為基質係使用 TMB 顯色試藥、作為測定器係使用 ARVO Multilabel Reader (PerkinElmer 公司)，來測定 450nm 之吸光度。又，作為被驗抗體係使用 15B8，抗體濃度係由 1000ng/mL 至 0.3ng/mL 以約 3 倍公比 (8 階段稀釋) 來實施。解析所算出之結合活性，藉由 Sigmoid-

Emax 模式非線形回歸分析來算出被驗抗體之 EC₅₀ 值（表 5）。

表 5：15B8 之結合活性
【表 5】

	EC ₅₀ 值 (ng/mL)			
	人類	猴子	大鼠	小鼠
15B8	218.7	224.3	>1000	>1000

[0145] 其結果明顯可知，15B8 雖觀察到對人類及猴子 Tie2 之結合活性，但對大鼠及小鼠 Tie2 之結合活性極弱。

[0146] 由實施例 12 之結果，TIE-1-Ig γ 1-LALA 對人類、猴子、大鼠及小鼠 Tie2，觀察到無物種差之高的結合活性。另一方面，15B8 於結合活性觀察到物種差。由以上，暗示了 TIE-1-Ig γ 1-LALA 之人類 Tie2 抗原決定位與 15B8 之抗原決定位相異。

[0147]

（實施例 13：TIE-1-Ig γ 1-LALA 之大鼠血管透過性阻礙作用評估）

遵照實施例 10 之方法，評估 TIE-1-Ig γ 1-LALA 之大鼠血管透過性阻礙作用。惟作為被驗抗體係使用 TIE-1-Ig γ 1-LALA，且抗體投與用量係以 0.1 及 0.3mg/kg 來實施。結果如圖 3 所示。

[0148] 求出各群之平均值及標準誤差。Vehicle 群與各抗體投與群之間的顯著性檢定係使用 Dunnett 之多重比較檢定。p<0.05 時視為有顯著差異。

[0149] 如圖 3 所示，相較於 Vehicle 群，TIE-1-Ig γ 1-LALA 顯著地阻礙了色素漏出。由以上明顯可知 TIE-1-Ig γ 1-LALA 會阻礙血管透過性亢進。

[0150]

（實施例 14：對外被細胞脫落小鼠網膜水腫之阻礙作用）

於糖尿病性網膜症患者之網膜血管，外被細胞之脫落係特徵性病變之一（Retina、2013、Fifth edition、p.925-939）。於糖尿病網膜症研究上，廣泛使用鏈佐黴素誘發糖尿病大鼠模式，但由於至觀察到外被細胞脫落為止需要數個月期間、或未觀察到外被細胞之脫落被視為其成因之一的毛細血管瘤、外被細胞與內皮細胞之比例與人類相異（Retina、2013、Fifth edition、p.925-939）、及未觀察到明顯的網膜水腫等，可知此模式之有用性有一定的極限（Diabetes Metab.J.、2013、Vol.37、p.217-224）。另一方面，於具有藉由抗 PDGF 受體 β （PDGFR β ）抗體投與而使外被細胞脫落之網膜血管的小鼠中，雖非高血糖，但觀察到網膜血管之擴張或網膜之水腫、出血等與糖尿病網膜症及糖尿病黃斑部水腫類似的病變，因此被報告了外被細胞之脫落與糖尿病網膜症及糖尿病黃斑部水腫中之血管脆弱化的關聯（J.Clin.Invest.、2002、Vol.110、p.1619-1628）。因此，為了評估對糖尿病網膜症及糖尿病黃斑部水腫之有效性，使用呈現了糖尿病網膜症患者的特徵性病變即外被細胞脫落之病態模式，來評估對網膜水腫之阻礙

作用，係有用的。

[0151] 外被細胞脫落誘發網膜水腫，係將 J. Clin. Invest.、2002、Vol.110、p.1619-1628 所報告之方法一部分改變來誘導。亦即，對生後 2 日齡 C57BL/6J 小鼠（日本 Charles River 公司）皮下投與經 PBS 稀釋之抗 PDGFR β 單株抗體 1B3（國際公開第 2008/130704 號）25mg/kg，誘發網膜血管外被細胞之脫落。

〔處置群〕

Control 群（亦稱為 Cont.群）：17 隻

未投與抗 PDGFR β 抗體，且投與 PBS 之群

Vehicle 群（亦稱為 Veh.群）：24 隻

投與抗 PDGFR β 抗體，且投與 PBS 以取代 TIE-1-Ig γ 1-LALA 之群

TIE-1-Ig γ 1-LALA 群（0.1、0.3 及 1mg/kg）：分別為 23、21 及 21 隻

投與抗 PDGFR β 抗體，且投與各用量之 TIE-1-Ig γ 1-LALA 之群

[0152] 於抗 PDGFR β 抗體投與 90 分鐘前，皮下投與 0.1、0.3 及 1mg/kg 之經 PBS 稀釋之 TIE-1-Ig γ 1-LALA。抗體投與 1 週後評估網膜水腫。具體而言，係摘出眼球，以含有 1%戊二醛及 2.5%甲醛之溶液固定後，製作石蠟包埋薄切切片。將經蘇木素/曙紅染色之標本以 virtual slide scanner（NanoZoomer XR、Hamamatsu Photonics 公司）

轉換為影像數據。由於本病態模式中報告了於網膜神經纖維層（NFL）之網膜水腫（J. Clin. Invest.、2002、Vol.110、p.1619-1628），故藉由以 NPD view 2（Hamamatsu Photonics 公司）測定 NFL 及鄰接於其之網膜神經節細胞層之面積，而作為網膜水腫來定量化。結果如圖 4 所示。

[0153] 求出各群之平均值及標準誤差。Veh.群與 TIE-1-Ig γ 1-LALA 群之間的顯著性檢定係使用 Dunnett 之多重比較檢定。Cont.群與 Veh.群之間的顯著性檢定係使用 Student 之 t 檢定。不管何種情況均以 $p < 0.05$ 時視為有顯著差異。

[0154] 如圖 4 所示，明顯可知相較於 Veh.群，TIE-1-Ig γ 1-LALA 群（1mg/kg）係顯著地阻礙了具有外被細胞脫落之網膜血管的網膜水腫。TIE-1-Ig γ 1-LALA 會阻礙由外被細胞脫落之網膜血管所產生之網膜水腫，故暗示了對糖尿病黃斑部水腫及糖尿病網膜症為有效。

[0155]

（實施例 15：後肢缺血小鼠缺血肢血流改善作用）

後肢缺血模式係藉由將單側後肢之血管予以結紮及摘出，來引起後肢組織之缺血的模式，其係評估缺血症狀之改善的代表模式（J. Vasc. Surg.、2012、Vol.56、p.1669-1679）。

[0156] 對 10 週齡 C57BL/6J 小鼠（日本 CLEA 公司）結紮左後肢之大腿動靜脈之鼠蹊部及隱動靜脈。進一

步地，將其間之分枝血管結紮後，摘出結紮部間之血管。手術係於戊巴比妥鈉（60mg/kg、東京化成工業）麻醉下實施。血管摘出 1 週後，於戊巴比妥麻醉下，使用雷射都卜勒血流影像化裝置 MoorLDI2（Moor Instruments 公司），測定後肢之血流。確認施術肢之血流降低後，如以下方式來設定處置群。

〔處置群（各群 10 隻）〕

對照群：

投與 PBS 以取代抗體之群

TIE-1-Ig γ 1-LALA 群（1mg/kg）：

投與 TIE-1-Ig γ 1-LALA 之群

[0157] 將經 PBS 稀釋之 TIE-1-Ig γ 1-LALA 皮下投與 1mg/kg，測定抗體投與 1 週後之正常肢及缺血肢之皮膚血流量。具體而言，係將戊巴比妥鈉（60mg/kg）予以腹腔內投與，置於保溫台上，於麻醉投與 15 分鐘後測定足部的皮膚血流。將以足底部為注意區域（Region of interest：ROI）計測血流量之結果示於圖 5。

[0158] 求出各群之平均值及標準誤差。對照群與 TIE-1-Ig γ 1-LALA 群之間的顯著性檢定係使用 Student 之 t 檢定。p<0.05 時視為有顯著差異。

[0159] 如圖 5 所示，明顯可知相較於對照群，TIE-1-Ig γ 1-LALA 群顯著改善了正常肢及缺血肢之血流量。因此，暗示了 TIE-1-Ig γ 1-LALA 對重症下肢缺血等之末梢動

脈疾病的有效性。

[0160]

(實施例 16：TIE-1-Ig γ 1-LALA 之抗原決定位評估：氫氘交換質譜分析)

為了鑑定 TIE-1-Ig γ 1-LALA 之認識抗原決定位，係製作實施例 7 中製作之完全人類型 2-16A2 之 Fab (以下稱為完全人類型 2-16A2-Fab)。完全人類型 2-16A2-Fab 因具有與 TIE-1-Ig γ 1-LALA 相同之可變區域，因此此等之抗體係認識相同之抗原決定位。製作由 Accession No.NP_000450.2 之胺基酸編號 1 至 452 所構成之人類 Tie2 蛋白質 (以下稱為人類 Tie2(1-452))，作為抗原。該胺基酸序列係鑑定 Ang-2 之 Tie2 結合部位時所用的部位 (Nat.Struct.Mol.Biol.、Vol.13、p.524-532)。

[0161] 具體而言，完全人類型 2-16A2-Fab 之製作，係組合插入有編碼由完全人類型 2-16A2 之重鏈可變區域及 CH1 區域所構成之構造 (由序列編號 12 之胺基酸編號 1 至 221 之胺基酸序列所構成) 的重鏈基因之 GS 載體 pEE6.4、與插入有完全人類型 2-16A2 之輕鏈基因的 GS 載體 pEE12.4，使用與實施例 7 記載之抗體表現方法及純化方法相同的方法，製作完全人類型 2-16A2-Fab。

[0162] 為了得到人類 Tie2(1-452)，首先製作以凝血酶認識序列 (由序列編號 22 表示之胺基酸序列所構成) 為連結子，使人類 Tie2(1-452)與人類 Fc (由序列編號 23 表示之胺基酸序列所構成) 融合的蛋白質 (以下稱為人類

Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質)。具體而言，將編碼人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質之基因插入 GS 載體 pEE12.4，使用與實施例 7 記載之表現方法及純化方法相同的方法，製作人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質。接著，將所製作之人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質，於 22℃ 與凝血酶 (GE Healthcare 公司、27-0846-01) 培置 16 小時，藉由 Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow (high sub) (GE Healthcare 公司) 及 MabSelect SuRe，去除凝血酶及人類 Fc，切斷 Fc 部分，藉以製作人類 Tie2(1-452)。

[0163] 以鑑定抗原決定位部位為目的，使用 NanoAQUITY UPLC HDX 系統 (Waters 公司)，實施氫氘交換質譜分析 (以下稱為 H/D 交換質譜分析。Anal. Bional. Chem.、2010、Vol.397、p.967-979)。

[0164] 具體而言，使用含有 120mM 氯化鈉之 20mM 檸檬酸緩衝液 (pH6) 來配製完全人類型 2-16A2-Fab 及人類 Tie2(1-452)混合液 (終濃度分別為 50 μ M 及 25 μ M)，於 37℃ 靜置一晚。準備以含有 120mM 氯化鈉之 20mM 檸檬酸緩衝液 (pH6) 配製僅有人類 Tie2(1-452)而得的溶液，作為對照。之後，添加於以重水 (關東化學) 配製之 PBS 緩衝溶液，分別靜置 20 秒、1 分鐘、10 分鐘、60 分鐘及 120 分鐘，藉以實施氘化。接著於 0℃ 添加含有 100mM 二硫蘇糖醇 (Nacalai) 及 4M 胍鹽酸鹽 (和光純藥) 之水溶液 (pH2.5) 後，使用胃蛋白酶管柱

(Prozyme (註冊商標) Immobilized Pepsin Cartridge、Applied Biosystems 公司) 實施消化，以捕捉管柱 (ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m VanGuard Pre-Column、Waters 公司) 捕捉消化之胜肽。接著以使用了 C18 管柱 (AQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m、Waters 公司) 之逆相層析進行分離，以質譜分析器 (SynaptG2-Si、Waters 公司) 測定分子量。算出所檢測之全部的胜肽之重心值，與進行過氙取代之僅有人類 Tie2(1-452)之重心值比較，以各自之氙化時間的形式算出發生氙取代之變化量。

[0165] H/D 交換質譜分析之結果，顯示 Accession No.NP_000450.2 之胺基酸編號 27~37、29~37、29~38、43~60、82~100、98~107、111~124、116~125、116~129、119~129、189~198 及 190~198 之胜肽，於抗體共存下，氙化被抑制。整理此等之胜肽的重複區域，又，亦加上氙化未被抑制之胜肽的資訊，進一步地，考慮到 N 末端側之 2 個胺基酸於測定中容易發生逆交換 (Proteins、1993、Vol.17、75-86)，則作為氙取代被抑制之區域、亦即抗原決定位候選者部位，係發現了 Accession No.NP_000450.2 之胺基酸編號 29~38、84~102、113~120、126~129 及 191~198 的 5 個。再者，H/D 交換質譜分析之結果，顯示 TIE-1-Ig γ 1-LALA 會與由此等 5 個胺基酸區段所構成之區域相互作用、或藉由抗體結合所致之立體構造變化或異位效應的產生，會保護此等之殘基免於氫/氙交換。

[0166]

(實施例 17：TIE-1-Ig γ 1-LALA 之抗原決定位評估：表面電漿共振現象解析及 ELISA)

由實施例 16 之 H/D 交換質譜分析，鑑定 TIE-1-Ig γ 1-LALA 對人類 Tie2 之抗原決定位候選者。為了更詳細地推測抗原決定位部分，係製作人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質之胺基酸變異體，使用表面電漿共振現象解析 (surface plasmon resonance：SPR 解析) 及 ELISA 來評估結合活性。

[0167] 基於 H/D 交換質譜分析之結果、以及 Ang-1 及 Ang-2 與 Tie2 結合之區域的報告 (Nat. Struct. Mol. Biol.、2006、Vol.13、p.524-532。Proc. Natl. Acad. Sci. USA、2013、Vol.110、7205-7210)，作為人類 Tie2(1-452)之胺基酸變異體，係製作人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質當中，人類 Tie2(1-452)之 1 個至 4 個胺基酸取代為丙胺酸 (一部分為麩胺酸) 之胺基酸變異體 23 種 (表 6)。各種變異體係以與製作實施例 16 中製作之人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質之方法相同的方法製作。

表 6：變異體人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質

【表 6】

變異體名稱	胺基酸變異部位
人類T i e 2 (1－4 5 2) r 1－F c	R 1 6 7 A、H 1 6 8 A、E 1 6 9 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) r 2－F c	D 1 7 2 A、I 1 7 3 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) r 3－F c	R 1 6 7 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) r 4－F c	H 1 6 8 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) r 5－F c	E 1 6 9 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) r 6－F c	D 1 7 2 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) r 7－F c	I 1 7 3 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) g 1－F c	I 1 9 4 A、N 1 9 7 A、L 1 9 8 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) g 2－F c	R 1 9 2 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) g 3－F c	I 1 9 4 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) g 4－F c	G 1 9 5 E
人類T i e 2 (1－4 5 2) g 5－F c	N 1 9 7 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) g 6－F c	L 1 9 8 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) m 1－F c	W 8 2 A、K 8 4 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) m 3－F c	S 9 4 A、K 9 5 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) y 1－F c	D 3 7 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) c 1－F c	R 5 0 A、H 5 2 A、E 5 3 A、P 5 4 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) A 1－F c	E 1 5 1 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) A 2－F c	V 1 5 4 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) A 3－F c	Y 1 5 6 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) A 4－F c	F 1 6 1 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) A 5－F c	S 1 6 4 A
人類T i e 2 (1－4 5 2) A 6－F c	P 1 6 6 A

[0168] 為了評估所製作之人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質及 23 種變異體與完全人類型 2-16A2-Fab 之結合活性，係實施 SPR 解析。

[0169] SPR 解析係使用 Biacore T200 (GE Healthcare 公司)。於 CM5 感測晶片上固定 Anti-human IgG (Fc) antibody (Human Antibody Capture Kit、GE Healthcare 公司)。將經 HBS-EP+緩衝液 (GE Healthcare 公司) 稀釋為 5µg/mL 之人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質及其變異

體分別固相化，計測捕捉量。之後，添加經 HBS-EP+緩衝液稀釋為 50nM 之完全人類型 2-16A2-Fab，測定與人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質及 23 種變異體之結合量。而藉由將結合量除以捕捉量，算出每單位固相化抗原之抗體結合量（以下稱為結合比率）。將 3 次試行之算術平均及以人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質之結合比率為 100% 時，各變異體之結合比率的相對值示於表 7。又，代表性的測定數據如圖 6 所示。Biacore 中，相對比較結合量之方法，例如記載於 *Analytical Biochemistry*、2003、Vol.312、p.113-124。

[0170] 其結果，完全人類型 2-16A2-Fab，明顯可知相較於人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質而言，於人類 Tie2(1-452)g1-Fc、人類 Tie2(1-452)g2-Fc、人類 Tie2(1-452)g3-Fc、人類 Tie2(1-452)g4-Fc、人類 Tie2(1-452)g5-Fc、人類 Tie2(1-452)m3-Fc、人類 Tie2(1-452)A1-Fc、人類 Tie2(1-452)A2-Fc、人類 Tie2(1-452)A3-Fc 及人類 Tie2(1-452)A4-Fc 結合降低。

表 7：SPR 解析結果

【表 7】

	結合比率	相對值(%)
人類Tie2(1-452)-Fc嵌合體蛋白質	0.29	100
人類Tie2(1-452)r1-Fc	0.29	102
人類Tie2(1-452)r2-Fc	0.28	98
人類Tie2(1-452)r3-Fc	0.34	119
人類Tie2(1-452)r4-Fc	0.33	113
人類Tie2(1-452)r5-Fc	0.29	99
人類Tie2(1-452)r6-Fc	0.29	100
人類Tie2(1-452)r7-Fc	0.30	106
人類Tie2(1-452)g1-Fc	0.00	0
人類Tie2(1-452)g2-Fc	0.03	9
人類Tie2(1-452)g3-Fc	0.06	23
人類Tie2(1-452)g4-Fc	0.02	7
人類Tie2(1-452)g5-Fc	0.03	9
人類Tie2(1-452)g6-Fc	0.38	131
人類Tie2(1-452)m1-Fc	0.31	107
人類Tie2(1-452)m3-Fc	0.04	12
人類Tie2(1-452)y1-Fc	0.25	87
人類Tie2(1-452)c1-Fc	0.54	189
人類Tie2(1-452)A1-Fc	0.10	34
人類Tie2(1-452)A2-Fc	0.08	29
人類Tie2(1-452)A3-Fc	0.17	59
人類Tie2(1-452)A4-Fc	0.13	44
人類Tie2(1-452)A5-Fc	0.39	135
人類Tie2(1-452)A6-Fc	0.31	109

[0171] 為了評估 TIE-1-Ig γ 1-LALA 與人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質及 23 種變異體的結合活性，以與實施例 12 相同之方法進行 ELISA。

[0172] 將人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質及 23 種變異體以 PBS 稀釋為 1 μ g/mL，於白色 Maxisorp 384 孔盤中，每 1 孔添加 20 μ L，藉由於 4℃ 培置一晚進行固相化。翌日去除固相液，以 TBS-T 溶液洗淨，添加 Blocker™

Casein in TBS (Thermo Fisher Scientific 公司、37532) 50 μ L，藉由培置 60 分鐘進行阻隔 (blocking)。以 TBS-T 溶液洗淨，每 1 孔添加 20 μ L 之使用含有 0.05%Tween20 (Nacalai Tesque 公司、28353-85) 之 BlockerTM Casein in TBS 由 0.03ng/mL 至 100ng/mL 之 8 階段稀釋的 TIE-1-Ig γ 1-LALA。於室溫培置 90 分鐘後，以 TBS-T 溶液洗淨 3 次，添加 20 μ L 之使用含有 0.05%Tween20 之 BlockerTM Casein in TBS 稀釋為 0.1 μ g/mL 的生物素標識抗人類 kappa 輕鏈抗體。於室溫培置 60 分鐘後，以 TBS-T 溶液洗淨 3 次，添加 20 μ L 之使用含有 0.05%Tween20 之 BlockerTM Casein in TBS 稀釋為 0.1 μ g/mL 的鹼性磷酸酶標識鏈親和素。於室溫培置 60 分鐘後，以 TBS-T 溶液洗淨 3 次，添加 50 μ L 之經含有 1mM MgCl₂ 之 20mM TBS (pH9.8) 稀釋 5 倍之 Chemiluminescent Ultra Sensitive AP Microwell and/or Membrane Substrate (450nm) 作為基質。於遮光室溫下培置 40 分鐘後，以 EnVisionTM Multilabel Counter 測定發光強度。算出對人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質及 23 種變異體之 TIE-1-Ig γ 1-LALA 的 EC₅₀ 值。又，算出以 TIE-1-Ig γ 1-LALA 結合於人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質時的收斂值為 100%時，最大適用濃度之 100ng/mL TIE-1-Ig γ 1-LALA 結合於人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質及 23 種之各變異體時的發光強度之相對值 (表 8 及表 9)。再者，EC₅₀ 值及收斂值係藉由 Sigmoid-Emax 模式非線形回歸分析算出。圖示於圖

7。

[0173] 其結果，相較於人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質，變異體之 Tie2(1-452)g1-Fc、Tie2(1-452)g2-Fc 及 Tie2(1-452)g4-Fc 中，觀察到發光強度之相對值的大幅降低。又，相較於人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質，於 Tie2(1-452)g5-Fc，觀察到發光強度之相對值降低及 EC_{50} 值之增大。由以上明顯可知，TIE-1-Ig γ 1-LALA 相較於人類 Tie2(1-452)-Fc 嵌合體蛋白質，其對 Tie2(1-452)g1-Fc、Tie2(1-452)g2-Fc、Tie2(1-452)g4-Fc 及 Tie2(1-452)g5-Fc 之結合活性降低。再者，對於 Tie2(1-452)A1-Fc，雖觀察到發光強度之相對值的降低，但於 EC_{50} 值未觀察到差異，因而判斷結合活性無變化。

表 8：ELISA 結果

【表 8】

	發光強度之 相對值 (%)	EC ₅₀ 值 (ng/mL)
人類Tie2 (1-452) -Fc嵌合體蛋白質	97	1.1
人類Tie2 (1-452) r1-Fc	97	1.1
人類Tie2 (1-452) r2-Fc	96	0.9
人類Tie2 (1-452) r3-Fc	102	1.0
人類Tie2 (1-452) r4-Fc	101	1.0
人類Tie2 (1-452) r5-Fc	102	1.0
人類Tie2 (1-452) r6-Fc	100	1.0
人類Tie2 (1-452) r7-Fc	100	1.1
人類Tie2 (1-452) g1-Fc	3	12.3
人類Tie2 (1-452) g2-Fc	72	5.5
人類Tie2 (1-452) g3-Fc	96	1.1
人類Tie2 (1-452) g4-Fc	53	18
人類Tie2 (1-452) g5-Fc	91	2.2
人類Tie2 (1-452) g6-Fc	105	1.3
人類Tie2 (1-452) m1-Fc	104	1.0
人類Tie2 (1-452) m3-Fc	103	1.0
人類Tie2 (1-452) y1-Fc	109	1.0
人類Tie2 (1-452) c1-Fc	104	1.0

表 9：ELISA 結果

【表 9】

	發光強度之 相對值 (%)	EC ₅₀ 值 (ng/mL)
人類Tie2 (1-452) -Fc嵌合體蛋白質	98	1.0
人類Tie2 (1-452) A1-Fc	90	1.3
人類Tie2 (1-452) A2-Fc	95	1.3
人類Tie2 (1-452) A3-Fc	98	1.0
人類Tie2 (1-452) A4-Fc	100	1.0
人類Tie2 (1-452) A5-Fc	98	0.9
人類Tie2 (1-452) A6-Fc	99	1.1

[0174] 實施 ELISA 法與 SPR 解析法之獨立的 2 種評估的結果，於兩方之實驗均鑑定到 Tie2(1-452)g1-Fc、Tie2(1-452)g2-Fc、Tie2(1-452)g4-Fc 及 Tie2(1-452)g5-Fc，作為結合活性降低之變異體。因此，可認為於此等之

變異體導入變異之胺基酸，亦即胺基酸編號 192、194、195、197 及 198，對 TIE-1-Ig γ 1-LALA 之結合係非常重要的抗原決定位候選者。其中，具有 I194A、N197A 及 L198A 之胺基酸變異的 Tie2(1-452)g1-Fc，於 ELISA 法觀察到結合降低，但具有 I194A 之胺基酸變異的 Tie2(1-452)g3-Fc，於 ELISA 法未見到結合降低。又，具有 L198A 之胺基酸變異的 Tie2(1-452)g6-Fc，於 ELISA 法與 SPR 解析法兩方，未見到結合降低。由此等之結果，可認為對 Tie2(1-452)g1-Fc 之結合降低做出貢獻的是胺基酸編號 197。由以上明顯可知，TIE-1-Ig γ 1-LALA 係結合 Accession No.NP_000450.2 之胺基酸編號 192、195 及 197 之胺基酸，作為抗原決定位。

〔產業上之可利用性〕

[0175] 本發明之抗人類 Tie2 抗體，係有用於各種血管關聯疾病之預防或治療。又，本發明之聚核苷酸、表現載體、經轉形之宿主細胞及生產抗體之方法，係有用於生產前述抗人類 Tie2 抗體。

〔序列表自由文本〕

[0176] 以下之序列表的數字標題 <223>，係記載「Artificial Sequence」之說明。具體而言，序列表之序列編號 1 表示之鹼基序列，係 TIE-1-Ig γ 1-LALA 之重鏈的鹼基序列，序列編號 2 表示之胺基酸序列，係由序列編號 1

所編碼之重鏈的胺基酸序列。序列表之序列編號 3 表示之鹼基序列，係 TIE-1-Ig γ 1-LALA、TIE-1-Ig γ 1-I253A、TIE-1-Ig γ 1-WT、TIE-1-Ig γ 4-PE、及完全人類型 2-16A2 之輕鏈的鹼基序列，序列編號 4 表示之胺基酸序列，係由序列編號 3 所編碼之輕鏈的胺基酸序列。序列表之序列編號 5 表示之鹼基序列，係 TIE-1-Ig γ 1-I253A 之重鏈的鹼基序列，序列編號 6 表示之胺基酸序列，係由序列編號 5 所編碼之重鏈的胺基酸序列。序列表之序列編號 7 表示之鹼基序列，係 TIE-1-Ig γ 1-WT 之重鏈的鹼基序列，序列編號 8 表示之胺基酸序列，係由序列編號 7 所編碼之重鏈的胺基酸序列。序列表之序列編號 9 表示之鹼基序列，係 TIE-1-Ig γ 4-PE 之重鏈的鹼基序列，序列編號 10 表示之胺基酸序列，係由序列編號 9 所編碼之重鏈的胺基酸序列。序列表之序列編號 11 表示之鹼基序列，係完全人類型 2-16A2 之重鏈的鹼基序列，序列編號 12 表示之胺基酸序列，係分別由序列編號 11 所編碼之重鏈的胺基酸序列。序列編號 13~20 表示之胺基酸序列，係連結子的胺基酸序列。序列編號 22 表示之胺基酸序列，係凝血酶認識部位。

序 列 表

<110> Astellas Pharma Inc.
<120> 新穎抗人類Tie2抗體
<130> A15017A00
<150> JP2014-145135
<151> 2014-07-15
<160> 23
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 2037
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> H-chain of anti-human Tie2 antibody

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2037)

<400> 1	
gaa gtg cag ctg gtg gaa tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct ggc gga	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
tct ctg aga ctg tct tgt gcc gcc tcc ggc ttc acc ttc gac gac tac	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr	
20 25 30	
gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct ggc aag gga ctg gaa tgg gtg	144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gcc ggc atc tcc tgg aac tcc ggc tct atc gtg tac gcc gac tcc gtg	192
Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac aac tcc aag aac acc ctg tac	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctg cag atg aac tcc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gct aag gac atc cgg gaa cag ctg gtg gaa gat gcc ttc gac atc tgg	336
Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp	

100	105	110	
ggc cag ggc acc ctc gtg acc gtg tcc tct gct tct acc aag ggc ccc Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 115 120 125			384
tcc gtg ttc cct ctg gcc cct tcc agc aag tct acc tct ggc ggc aca Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr 130 135 140			432
gcc gct ctg ggc tgc ctc gtg aag gac tac ttc ccc gag ccc gtg aca Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr 145 150 155 160			480
gtg tct tgg aac tct ggc gcc ctg aca tct ggc gtg cac acc ttc cct Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 165 170 175			528
gct gtg ctg cag tcc tcc ggc ctg tac tcc ctg tcc tcc gtc gtg act Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 180 185 190			576
gtg ccc tcc agc tct ctg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aac Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195 200 205			624
cac aag ccc tcc aac acc aag gtg gac aag aag gtg gaa ccc aag tcc His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser 210 215 220			672
tgc ggc agc gag gtg cag ctg gtg gaa agt ggg gga ggc ctg gtg cag Cys Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln 225 230 235 240			720
cca ggt gga agc ctg aga ctg agc tgc gcc gct tct ggc ttt acc ttt Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe 245 250 255			768
gat gat tat gcc atg cat tgg gtg cgc cag gct cca ggg aaa ggc ctg Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu 260 265 270			816
gaa tgg gtg gca ggg atc agc tgg aac agc ggc agc atc gtg tat gct Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala 275 280 285			864
gat agc gtg aag ggg cgc ttt aca atc agc aga gac aac agc aag aat Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn 290 295 300			912
act ctg tac ctg cag atg aat agc ctg cgc gct gag gat aca gct gtg Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val 305 310 315 320			960
tat tac tgt gcc aag gat att cgc gag cag ctg gtg gaa gat gct ttt			1008

Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Asp	Ile	Arg	Glu	Gln	Leu	Val	Glu	Asp	Ala	Phe	
				325					330					335		
gat	att	tgg	ggg	cag	ggt	aca	ctc	gtg	aca	gtg	tct	agc	gcc	tcc	acc	1056
Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	
			340					345					350			
aag	ggc	cca	agc	gtg	ttc	cca	ctg	gct	ccc	agc	tcc	aag	agc	acc	tcc	1104
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	
		355					360					365				
ggt	gga	act	gct	gcc	ctg	ggc	tgt	ctc	gtg	aaa	gat	tat	ttt	cct	gag	1152
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	
	370					375					380					
cct	gtg	act	gtg	tcc	tgg	aat	agc	ggc	gct	ctg	acc	agc	gga	gtg	cat	1200
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	
385					390					395					400	
acc	ttt	cca	gcc	gtg	ctg	cag	agc	agc	ggc	ctg	tat	agc	ctg	tcc	agc	1248
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	
			405						410					415		
gtc	gtg	acc	gtg	cct	tcc	tct	agc	ctg	gga	aca	cag	aca	tat	atc	tgt	1296
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	
			420					425					430			
aat	gtg	aat	cat	aag	ccc	agt	aat	acc	aaa	gtg	gat	aag	aaa	gtg	gaa	1344
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	
		435					440					445				
cct	aag	agc	tgc	gac	aag	acc	cac	acc	tgt	ccc	cct	tgt	cct	gcc	cct	1392
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
	450					455					460					
gaa	gct	gct	ggc	ggc	cct	tct	gtg	ttt	ctg	ttc	ccc	cca	aag	cct	aag	1440
Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
465					470				475					480		
gac	acc	ctg	atg	atc	tcc	cgg	acc	ccc	gaa	gtg	acc	tgc	gtg	gtg	gtg	1488
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
				485					490					495		
gat	gtg	tcc	cac	gag	gac	cct	gaa	gtg	aag	ttc	aat	tgg	tac	gtg	gac	1536
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
			500					505					510			
ggc	gtg	gaa	gtg	cac	aac	gcc	aag	acc	aag	cct	aga	gag	gaa	cag	tac	1584
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	
		515					520					525				
aac	tcc	acc	tac	cgg	gtg	gtg	tcc	gtg	ctg	aca	gtg	ctg	cat	cag	gac	1632
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
	530					535					540					

tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac aag gcc ctg Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu 545 550 555 560	1680
ccc gcc tcc atc gaa aag acc atc tcc aag gcc aag ggc cag ccc cgg Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 565 570 575	1728
gaa ccc cag gtg tac aca ctg ccc cct agc agg gac gag ctg acc aag Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys 580 585 590	1776
aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg aag ggc ttc tac ccc tcc gat Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 595 600 605	1824
atc gcc gtg gaa tgg gag tcc aac ggc cag cct gag aac aac tat aag Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 610 615 620	1872
acc acc ccc cct gtg ctg gac tcc gac ggc tca ttc ttt ctg tac tcc Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser 625 630 635 640	1920
aag ctg acc gtg gac aag tcc cgg tgg cag cag ggc aac gtg ttc tcc Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser 645 650 655	1968
tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc cag aag tcc Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser 660 665 670	2016
ctg tcc ctg agc ccc ggc aaa Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 675	2037

- <210> 2
- <211> 679
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Synthetic Construct
- <400> 2

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Cys Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
225 230 235 240

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
245 250 255

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
260 265 270

Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala
275 280 285

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
290 295 300

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
305 310 315 320

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe
325 330 335

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
340 345 350

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
355 360 365

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
370 375 380

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
385 390 395 400

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
405 410 415

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
420 425 430

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
435 440 445

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
450 455 460

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
465 470 475 480

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
485 490 495

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
500 505 510

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
515 520 525

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
530 535 540

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
545 550 555 560

Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
565 570 575

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
580 585 590

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
595 600 605

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
610 615 620

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
625 630 635 640

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
645 650 655

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
660 665 670

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
675

<210> 3

<211> 657
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> L-chain of anti-human Tie2 antibody

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(657)

<400> 3
 gac ata caa atg acc cag tct cca tcc tca ctt agt gcc tct gtt ggc 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gat aga gta act atc aca tgc cgg tcc tcc caa tct ctg ctg cat tcc 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 cac cgc tac aac tac ctg gac tgg tat cag cag aaa ccc ggc aaa gct 144
 His Arg Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 ccc aag ctc ttg att tac ctg ggg tct aat agg gca agc ggt gtc cca 192
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 agt cga ttc agc gga agc ggg agc ggc aca gat ttt aca ctc act atc 240
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 agt tca gtg cag cct gag gac ttc gcc acc tat tat tgt atg cag act 288
 Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Met Gln Thr
 85 90 95
 ctg cag acc cct ctg acc ttt ggt cag gga acc aag gtg gaa atc aag 336
 Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag 384
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc 432
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa 480
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc 528
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

	165		170		175	
acc tac agc ctg agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag						576
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu						
	180		185		190	
aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg						624
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser						
	195		200		205	
ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt						657
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys						
	210		215			

<210> 4
<211> 219
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

His Arg Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 5
<211> 2037
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> H-chain of anti-human Tie2 antibody

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2037)

<400> 5
gaa gtg cag ctg gtg gaa tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct ggc gga 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tct ctg aga ctg tct tgt gcc gcc tcc ggc ttc acc ttc gac gac tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

gct atg cac tgg gtg cga cag gcc cct ggc aag gga ctg gaa tgg gtg 144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gcc ggc atc tcc tgg aac tcc ggc tct atc gtg tac gcc gac tcc gtg 192
Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac aac tcc aag aac acc ctg tac Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80	240
ctg cag atg aac tcc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
gct aag gac atc cgg gaa cag ctg gtg gaa gat gcc ttc gac atc tgg Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp 100 105 110	336
ggc cag ggc acc ctc gtg acc gtg tcc tct gct tct acc aag ggc ccc Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 115 120 125	384
tcc gtg ttc cct ctg gcc cct tcc agc aag tct acc tct ggc ggc aca Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr 130 135 140	432
gcc gct ctg ggc tgc ctc gtg aag gac tac ttc ccc gag ccc gtg aca Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr 145 150 155 160	480
gtg tct tgg aac tct ggc gcc ctg aca tct ggc gtg cac acc ttc cct Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 165 170 175	528
gct gtg ctg cag tcc tcc ggc ctg tac tcc ctg tcc tcc gtc gtg act Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 180 185 190	576
gtg ccc tcc agc tct ctg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aac Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195 200 205	624
cac aag ccc tcc aac acc aag gtg gac aag aag gtg gaa ccc aag tcc His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser 210 215 220	672
tgc ggc agc gag gtg cag ctg gtg gaa agt ggg gga ggc ctg gtg cag Cys Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln 225 230 235 240	720
cca ggt gga agc ctg aga ctg agc tgc gcc gct tct ggc ttt acc ttt Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe 245 250 255	768
gat gat tat gcc atg cat tgg gtg cgc cag gct cca ggg aaa ggc ctg Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu 260 265 270	816
gaa tgg gtg gca ggg atc agc tgg aac agc ggc agc atc gtg tat gct Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala	864

275	280	285	
gat agc gtg aag ggg cgc ttt aca atc agc aga gac aac agc aag aat Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn 290 295 300			912
act ctg tac ctg cag atg aat agc ctg cgc gct gag gat aca gct gtg Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val 305 310 315 320			960
tat tac tgt gcc aag gat att cgc gag cag ctg gtg gaa gat gct ttt Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe 325 330 335			1008
gat att tgg ggg cag ggt aca ctc gtg aca gtg tct agc gcc tcc acc Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 340 345 350			1056
aag ggc cca agc gtg ttc cca ctg gct ccc agc tcc aag agc acc tcc Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser 355 360 365			1104
ggt gga act gct gcc ctg ggc tgt ctc gtg aaa gat tat ttt cct gag Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 370 375 380			1152
cct gtg act gtg tcc tgg aat agc ggc gct ctg acc agc gga gtg cat Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 385 390 395 400			1200
acc ttt cca gcc gtg ctg cag agc agc ggc ctg tat agc ctg tcc agc Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 405 410 415			1248
gtc gtg acc gtg cct tcc tct agc ctg gga aca cag aca tat atc tgt Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 420 425 430			1296
aat gtg aat cat aag ccc agt aat acc aaa gtg gat aag aaa gtg gaa Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu 435 440 445			1344
cct aag agc tgc gac aag acc cac acc tgt ccc cct tgt cct gcc cct Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 450 455 460			1392
gaa gct gct ggc ggc cct tct gtg ttt ctg ttc ccc cca aag cct aag Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 465 470 475 480			1440
gac acc ctg atg gcc tcc cgg acc ccc gaa gtg acc tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 485 490 495			1488
gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg aag ttc aat tgg tac gtg gac			1536

Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp		
			500					505					510				
ggc	gtg	gaa	gtg	cac	aac	gcc	aag	acc	aag	cct	aga	gag	gaa	cag	tac		1584
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr		
		515					520					525					
aac	tcc	acc	tac	cgg	gtg	gtg	tcc	gtg	ctg	aca	gtg	ctg	cat	cag	gac		1632
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
	530					535					540						
tgg	ctg	aac	ggc	aaa	gag	tac	aag	tgc	aag	gtg	tcc	aac	aag	gcc	ctg		1680
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu		
545					550					555					560		
ccc	gcc	tcc	atc	gaa	aag	acc	atc	tcc	aag	gcc	aag	ggc	cag	ccc	cgg		1728
Pro	Ala	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg		
				565				570						575			
gaa	ccc	cag	gtg	tac	aca	ctg	ccc	cct	agc	agg	gac	gag	ctg	acc	aag		1776
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys		
			580					585					590				
aac	cag	gtg	tcc	ctg	acc	tgt	ctc	gtg	aag	ggc	ttc	tac	ccc	tcc	gat		1824
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp		
		595					600					605					
atc	gcc	gtg	gaa	tgg	gag	tcc	aac	ggc	cag	cct	gag	aac	aac	tat	aag		1872
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys		
	610					615					620						
acc	acc	ccc	cct	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tca	ttc	ttt	ctg	tac	tcc		1920
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser		
625					630				635						640		
aag	ctg	acc	gtg	gac	aag	tcc	cgg	tgg	cag	cag	ggc	aac	gtg	ttc	tcc		1968
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser		
				645				650						655			
tgc	agc	gtg	atg	cac	gag	gcc	ctg	cac	aac	cac	tac	acc	cag	aag	tcc		2016
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser		
			660					665					670				
ctg	tcc	ctg	agc	ccc	ggc	aaa											2037
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys											
			675														

- <210> 6
- <211> 679
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Synthetic Construct

<400> 6

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

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

Cys Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
225 230 235 240

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
245 250 255

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
260 265 270

Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala
275 280 285

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
290 295 300

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
305 310 315 320

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe
325 330 335

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
340 345 350

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
355 360 365

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
370 375 380

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
385 390 395 400

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
405 410 415

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
420 425 430

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
435 440 445

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
450 455 460

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
465 470 475 480

Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
485 490 495

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
500 505 510

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
515 520 525

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
530 535 540

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
545 550 555 560

Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
565 570 575

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
580 585 590

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
595 600 605

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
610 615 620

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
625 630 635 640

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
645 650 655

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
660 665 670

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
675

$\langle 210 \rangle$	7
$\langle 211 \rangle$	2037
$\langle 212 \rangle$	DNA
$\langle 213 \rangle$	Artificial Sequence

<220>
<223> H-chain of anti-human Tie2 antibody

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2037)

<400> 7																
gag	gtg	cag	ctg	gtg	gaa	tcc	ggc	gga	ggc	ctg	gtg	cag	cct	ggc	ggc	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
tct	ctg	aga	ctg	tcc	tgt	gcc	gcc	tcc	ggc	ttc	acc	ttc	gac	gac	tac	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	
			20					25					30			
gcc	atg	cac	tgg	gtc	cga	cag	gcc	cct	ggc	aag	ggc	ctg	gaa	tgg	gtg	144
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
gcc	ggc	atc	tcc	tgg	aac	tcc	ggc	tcc	atc	gtg	tac	gcc	gac	tcc	gtg	192
Ala	Gly	Ile	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Ile	Val	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
aag	ggc	cgg	ttc	acc	atc	tcc	cgg	gac	aac	tcc	aag	aac	acc	ctg	tac	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65				70						75				80		
ctg	cag	atg	aac	tcc	ctg	cgg	gcc	gag	gac	acc	gcc	gtg	tac	tac	tgc	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gcc	aag	gac	atc	aga	gag	cag	ctg	gtc	gag	gac	gcc	ttc	gac	atc	tgg	336
Ala	Lys	Asp	Ile	Arg	Glu	Gln	Leu	Val	Glu	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	
			100					105					110			
ggc	cag	ggc	acc	ctg	gtc	acc	gtg	tcc	tca	gcc	tcc	acc	aag	ggc	cca	384
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	
		115					120					125				

tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr 130 135 140	432
gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr 145 150 155 160	480
gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 165 170 175	528
gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctt agt agc gtg gtg acc Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 180 185 190	576
gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195 200 205	624
cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser 210 215 220	672
tgt gga tcc gag gtg cag ctg gtg gaa tcc ggc gga ggc ctg gtg cag Cys Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln 225 230 235 240	720
cct ggc ggc tct ctg aga ctg tcc tgt gcc gcc tcc ggc ttc acc ttc Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe 245 250 255	768
gac gac tac gcc atg cac tgg gtc cga cag gcc cct ggc aag ggc ctg Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu 260 265 270	816
gaa tgg gtg gcc ggc atc tcc tgg aac tcc ggc tcc atc gtg tac gcc Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala 275 280 285	864
gac tcc gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac aac tcc aag aac Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn 290 295 300	912
acc ctg tac ctg cag atg aac tcc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val 305 310 315 320	960
tac tac tgc gcc aag gac atc aga gag cag ctg gtc gag gac gcc ttc Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe 325 330 335	1008
gac atc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtg tcc tca gcc tcc acc Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 1056	

340	345	350	
aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser 355 360 365			1104
ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 370 375 380			1152
ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 385 390 395 400			1200
acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctt agt agc Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 405 410 415			1248
gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys 420 425 430			1296
aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu 435 440 445			1344
ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 450 455 460			1392
gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 465 470 475 480			1440
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 485 490 495			1488
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp 500 505 510			1536
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 515 520 525			1584
aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 530 535 540			1632
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu 545 550 555 560			1680
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga			1728

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
565 570 575

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag 1776
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
580 585 590

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac 1824
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
595 600 605

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag 1872
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
610 615 620

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc 1920
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
625 630 635 640

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca 1968
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
645 650 655

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc 2016
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
660 665 670

ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa 2037
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
675

<210> 8
<211> 679
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 8

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

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

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

Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala Asp Ser Val

50						55						60			
Lys 65	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile 70	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser 75	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr 80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser 85	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp 90	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys
Ala	Lys	Asp	Ile 100	Arg	Glu	Gln	Leu	Val 105	Glu	Asp	Ala	Phe	Asp 110	Ile	Trp
Gly	Gln	Gly 115	Thr	Leu	Val	Thr	Val 120	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr 125	Lys	Gly	Pro
Ser	Val 130	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro 135	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr 140	Ser	Gly	Gly	Thr
Ala 145	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu 150	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe 155	Pro	Glu	Pro	Val	Thr 160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser 165	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser 170	Gly	Val	His	Thr	Phe 175	Pro
Ala	Val	Leu	Gln 180	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr 185	Ser	Leu	Ser	Ser	Val 190	Val	Thr
Val	Pro	Ser 195	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr 200	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys 205	Asn	Val	Asn
His 210	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys 215	Val	Asp	Lys	Lys	Val 220	Glu	Pro	Lys	Ser
Cys 225	Gly	Ser	Glu	Val	Gln 230	Leu	Val	Glu	Ser	Gly 235	Gly	Gly	Leu	Val	Gln 240
Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala 250	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr 255	Phe
Asp	Asp	Tyr	Ala 260	Met	His	Trp	Val	Arg 265	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys 270	Gly	Leu

Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala
275 280 285

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
290 295 300

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
305 310 315 320

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe
325 330 335

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
340 345 350

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
355 360 365

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
370 375 380

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
385 390 395 400

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
405 410 415

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
420 425 430

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
435 440 445

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
450 455 460

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
465 470 475 480

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
485 490 495

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
500 505 510

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
515 520 525

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
530 535 540

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
545 550 555 560

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
565 570 575

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
580 585 590

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
595 600 605

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
610 615 620

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
625 630 635 640

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
645 650 655

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
660 665 670

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
675

- <210> 9
- <211> 2028
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>

<223> H-chain of anti-human Tie2 antibody

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2028)

<400> 9

gag gtg cag ctg gtg gaa tcc ggc gga ggc ctg gtg cag cct ggc ggc	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
tct ctg aga ctg tcc tgt gcc gcc tcc ggc ttc acc ttc gac gac tac	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr	
20 25 30	
gcc atg cac tgg gtc cga cag gcc cct ggc aag ggc ctg gaa tgg gtg	144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gcc ggc atc tcc tgg aac tcc ggc tcc atc gtg tac gcc gac tcc gtg	192
Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac aac tcc aag aac acc ctg tac	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctg cag atg aac tcc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcc aag gac atc aga gag cag ctg gtc gag gac gcc ttc gac atc tgg	336
Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp	
100 105 110	
ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtg tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca	384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro	
115 120 125	
tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca	432
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr	
130 135 140	
gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg	480
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr	
145 150 155 160	
gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg	528
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro	
165 170 175	
gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctt agt agc gtg gtg acc	576
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr	
180 185 190	

gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195 200 205	624
cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser 210 215 220	672
tgt gga tcc gag gtg cag ctg gtg gaa tcc ggc gga ggc ctg gtg cag Cys Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln 225 230 235 240	720
cct ggc ggc tct ctg aga ctg tcc tgt gcc gcc tcc ggc ttc acc ttc Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe 245 250 255	768
gac gac tac gcc atg cac tgg gtc cga cag gcc cct ggc aag ggc ctg Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu 260 265 270	816
gaa tgg gtg gcc ggc atc tcc tgg aac tcc ggc tcc atc gtg tac gcc Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala 275 280 285	864
gac tcc gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac aac tcc aag aac Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn 290 295 300	912
acc ctg tac ctg cag atg aac tcc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val 305 310 315 320	960
tac tac tgc gcc aag gac atc aga gag cag ctg gtc gag gac gcc ttc Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe 325 330 335	1008
gac atc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtg tcc tca gcc agc acc Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 340 345 350	1056
aag ggg ccc tct gtg ttt ccc ctt gcc cct tgc agt agg tct acc agc Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser 355 360 365	1104
gaa agt act gcc gcc ctt ggc tgt ctg gtg aaa gat tat ttt cct gaa Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 370 375 380	1152
cct gtc acc gtg tcc tgg aac tcc ggt gct ttg act tct ggc gtt cat Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 385 390 395 400	1200
act ttt cct gca gtc ctg caa agt tct ggc ctg tac agc ctt agc tcc Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	1248

405								410					415					
gtg	gta	act	gtg	cct	tcc	tct	tct	ctg	ggg	acc	aaa	acc	tat	acc	tgc	1296		
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys			
			420				425						430					
aat	gtg	gac	cac	aaa	cct	tct	aat	act	aag	gtc	gac	aag	agg	gtg	gag	1344		
Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu			
			435				440						445					
tct	aag	tac	gga	cca	cct	tgt	cct	cca	tgc	ccc	gcc	ccc	gag	ttc	gag	1392		
Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu			
			450				455						460					
ggc	ggg	cct	agt	gtg	ttc	ctg	ttc	cct	cca	aag	ccc	aag	gac	acc	ttg	1440		
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu			
			465				470						475			480		
atg	ata	agc	agg	act	cct	gag	gtg	aca	tgt	gtg	gtt	gta	gac	gtc	tct	1488		
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser			
			485				490						495					
cag	gag	gat	ccc	gaa	gtg	cag	ttt	aat	tgg	tac	gtg	gat	gga	gtc	gag	1536		
Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu			
			500				505						510					
gtg	cac	aac	gcc	aaa	acc	aaa	ccc	cgc	gag	gag	caa	ttc	aac	tcc	acc	1584		
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr			
			515				520						525					
tat	cgc	gtg	gtg	tct	gtc	ctg	acc	gtc	ctg	cac	caa	gat	tgg	ctg	aac	1632		
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn			
			530				535						540					
gga	aaa	gaa	tat	aag	tgt	aaa	gta	agc	aat	aag	ggc	ctg	cct	tca	tcc	1680		
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser			
			545				550						555			560		
att	gag	aag	aca	atc	agc	aag	gca	aag	ggc	cag	cct	aga	gaa	ccc	caa	1728		
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln			
			565				570						575					
gtg	tac	acc	ctc	cca	ccc	tct	cag	gag	gaa	atg	acc	aag	aat	cag	gtt	1776		
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val			
			580				585						590					
agc	ctt	act	tgt	ctc	gta	aag	ggg	ttc	tac	cct	agc	gac	att	gct	gtc	1824		
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val			
			595				600						605					
gag	tgg	gaa	agc	aat	gga	cag	cct	gag	aat	aac	tat	aaa	acc	act	ccc	1872		
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro			
			610				615						620					
cca	gtg	ctt	gac	tca	gat	ggc	tct	ttt	ttc	ctt	tac	tcc	cgc	ttg	aca	1920		

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
625 630 635 640

gtc gac aag agt aga tgg caa gag ggg aac gtg ttc agc tgc agt gtt 1968
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
645 650 655

atg cac gag gca ctc cat aac cat tat act cag aaa tcc ttg agc ctg 2016
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
660 665 670

tcc ctt gga aag 2028
Ser Leu Gly Lys
675

<210> 10
<211> 676
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

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

115	120	125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
130	135	140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
145	150	155
160		
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
165	170	175
180		
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
185		190
195		
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
195	200	205
210		
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
210	215	220
225		
Cys Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln		
225	230	235
240		
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
245	250	255
260		
Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
260	265	270
275		
Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala		
275	280	285
290		
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn		
290	295	300
305		
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
305	310	315
320		
Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe		
325	330	335

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
340 345 350

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
355 360 365

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
370 375 380

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
385 390 395 400

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
405 410 415

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
420 425 430

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
435 440 445

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu
450 455 460

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
465 470 475 480

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
485 490 495

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
500 505 510

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
515 520 525

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
530 535 540

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
545 550 555 560

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
565 570 575

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
580 585 590

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
595 600 605

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
610 615 620

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
625 630 635 640

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
645 650 655

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
660 665 670

Ser Leu Gly Lys
675

- <210> 11
- <211> 1356
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> H-chain of anti-human Tie2 antibody

- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1356)

<400> 11
gag gtg cag ctg gtg gaa tcc ggc gga ggc ctg gtg cag cct ggc ggc 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tct ctg aga ctg tcc tgt gcc gcc tcc ggc ttc acc ttc gac gac tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

gcc atg cac tgg gtc cga cag gcc cct ggc aag ggc ctg gaa tgg gtg Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45	144
gcc ggc atc tcc tgg aac tcc ggc tcc atc gtg tac gcc gac tcc gtg Ala Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Val Tyr Ala Asp Ser Val 50 55 60	192
aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac aac tcc aag aac acc ctg tac Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80	240
ctg cag atg aac tcc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
gcc aag gac atc aga gag cag ctg gtc gag gac gcc ttc gac atc tgg Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp 100 105 110	336
ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtg tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 115 120 125	384
tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr 130 135 140	432
gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr 145 150 155 160	480
gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 165 170 175	528
gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctt agt agc gtg gtg acc Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 180 185 190	576
gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195 200 205	624
cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser 210 215 220	672
tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu 225 230 235 240	720
ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 245 250 255	768

atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 260 265 270	816
cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 275 280 285	864
gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 290 295 300	912
tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 305 310 315 320	960
ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro 325 330 335	1008
atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 340 345 350	1056
gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 355 360 365	1104
agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 370 375 380	1152
gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 385 390 395 400	1200
ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 405 410 415	1248
gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 420 425 430	1296
atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 435 440 445	1344
tct ccg ggt aaa Ser Pro Gly Lys 450	1356

<210> 12

<211> 452
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 12

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Ile Arg Glu Gln Leu Val Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

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

405410415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

420425430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

435440445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> linker

<400> 13

Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser
15

<210> 14
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> linker

<400> 14

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Gly Ser
1510

<210> 15
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> linker

<400> 15

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Gly Gly Gly Gly
151015

Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20

<210> 16
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> linker

<400> 16

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 17
<211> 42
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> linker

<400> 17

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40

<210> 18
<211> 52
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> linker

<400> 18

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
35 40 45
Gly Gly Gly Ser
50

<210> 19
<211> 62
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> linker

<400> 19

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
35 40 45
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
50 55 60

<210> 20
<211> 64
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> linker

<400> 20

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Ser Pro Arg Ser
1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp Thr Pro Pro Pro Ser Pro Arg Ser Pro
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Thr Pro Pro Pro Ser Pro Arg Ser Pro Glu
35 40 45

Pro Lys Ser Ser Asp Thr Pro Pro Pro Ser Pro Arg Ser Pro Gly Ser
50 55 60

<210> 21
<211> 3369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 21
atggactcct tagccagcct agttctctgt ggagtcagct tgctcctttc tggaactgtg 60
gaagggtgcca tggacttgat ctgatcaat tccctacctc ttgtatctga tgctgaaaca 120
tctctcacct gcattgcctc tgggtggcgc ccccatgagc ccatcaccat aggaagggac 180
tttgaagcct taatgaacca gcaccaggat ccgctggaag ttactcaaga tgtgaccaga 240
gaatgggcta aaaaagttgt ttggaagaga gaaaaggcta gtaagatcaa tggtgcttat 300
ttctgtgaag ggcgagttcg aggagaggca atcaggatac gaacatgaa gatgcgtcaa 360
caagcttcct tctaccagc tactttaact atgactgtgg acaagggaga taacgtgaac 420
atatctttca aaaaggtatt gactaaagaa gaagatgcag tgatttaca aaatgggttc 480
ttcatccatt cagtgcctcg gcatgaagta cctgatattc tagaagtaca cctgcctcat 540
gtcagcccc aggatgctgg agtgactcg gccaggata taggaggaaa cctcttcacc 600
tcggccttca ccaggctgat agtccggaga tgtgaagccc agaagtgggg acctgaatgc 660
aaccatctct gtactgcttg tatgaacaat ggtgtctgcc atgaagatac tggagaatgc 720
atttgccctc ctgggtttat gggaaggacg tgtgagaagg ctigtgaact gcacacgttt 780
ggcagaactt gtaaagaaag gtgcagtgga caagagggat gcaagtctta tgtgttctgt 840
ctccctgacc cctatgggtg ttctgtgcc acaggctgga aggtctgca gtgcaatgaa 900
gcatgccacc ctggttttta cgggccagat tgtaagctta ggtgcagctg caacaatggg 960
gagatgtgtg atcgcttcca aggatgtctc tgctctccag gatggcaggg gctccagtgt 1020
gagagagaag gcataccgag gatgacccca aagatagtgg atttgccaga tcatatagaa 1080

gtaaacagtg gtaaatttaa tcccatttgc aaagcttctg gctggccgct acctactaat	1140
gaagaaatga ccctggtgaa gccggatggg acagtgtcc atccaaaaga ctttaacat	1200
acggatcatt tctcagtagc catattcacc atccaccgga tcctccccc tgactcagga	1260
gtttgggtct gcagtgtgaa cacagtggct gggatgggtg aaaagccctt caacatttct	1320
gttaaagttc ttccaaagcc cctgaatgcc ccaaacgtga ttgacactgg acataacttt	1380
gctgtcatca acatcagctc tgagccctac ttgggggatg gaccaatcaa atccaagaag	1440
cttctataca aacccggttaa tcactatgag gcttggcaac atattcaagt gacaaatgag	1500
attgttacac tcaactattt ggaacctcgg acagaatatg aactctgtgt gcaactggtc	1560
cgtcgtggag aggggtgggga agggcatcct ggacctgtga gacgcttcac aacagcttct	1620
atcggactcc ctctccaag aggtctaaat ctctgccta aaagtcagac cactctaaat	1680
ttgacctggc aaccaatatt tccaagctcg gaagatgact ttatgttga agtggagaga	1740
aggtctgtgc aaaaaagtga tcagcagaat attaaagttc caggcaactt gacttcggtg	1800
ctacttaaca acttacatcc cagggagcag tacgttggtc gagctagagt caacaccaag	1860
gcccaggggg aatggagtga agatctcact gcttggacct ttagtgacat tcttctctct	1920
caaccagaaa acatcaagat ttccaacatt acacactcct cagctgtgat ttcttggaca	1980
atattggatg gctattctat ttcttctatt actatccgtt acaaggttca aggcaagaat	2040
gaagaccagc acgttgatgt gaagataaag aatgccacca tcactcagta tcagctcaag	2100
ggcctagagc ctgaaacagc ataccagggtg gacatttttg cagagaacaa catagggtca	2160
agcaaccag ctttttctca tgaactgggtg accctccag aatctcaagc accagcggac	2220
ctcggagggg ggaagatgct gcttatagcc atccttggct ctgctggaat gacctgcctg	2280
actgtgctgt tggcctttct gatcatattg caattgaaga gggcaaagt gcaaaggaga	2340
atggcccaag ctttccaaaa cagggaagaa ccagctgtgc agttcaactc agggactctg	2400
gccctaaaca ggaagggtcaa aaacaacca gatcctacaa ttatccagt gcttgactgg	2460
aatgacatca aatttcaaga tgtgattggg gagggcaatt ttggccaagt tcttaaggcg	2520
cgcatcaaga aggatgggtt acggatggat gctgccatca aaagaatgaa agaatatgcc	2580
tcxaaagatg atcacaggga ctttgcagga gaactggaag ttctttgtaa acttggacac	2640
catccaaaca tcatcaatct cttaggagca tgtgaacatc gaggctactt gtacctggcc	2700

attgagtacg cgccccatgg aaaccttctg gacttccttc gcaagagccg tgtgctggag 2760
acggacccag catttgccat tgccaatagc accgcgtcca cactgtcctc ccagcagctc 2820
cttcacttcg ctgccgacgt ggccccggggc atggactact tgagccaaaa acagtttata 2880
cacaggggatc tggctgccag aaacatttta gttggtgaaa actatgtggc aaaaatagca 2940
gattttggat tgtcccgagg tcaagagggtg tatgtgaaaa agacaatggg aaggctccca 3000
gtgcgctgga tggccatcga gtcactgaat tacagtgtgt acacaaccaa cagtgatgta 3060
tggctcctatg gtgtgttact atgggagatt gttagcttag gaggcacacc ctactgcgga 3120
atgacttgtg cagaactcta cgagaagctg ccccagggct acagactgga gaagcccctg 3180
aactgtgatg atgagggtga tgatctaata agacaatgct ggccgggagaa gccttatgag 3240
aggccatcat ttgccagat attggtgtcc ttaaacagaa tgttagagga gcgaaagacc 3300
tacgtgaata ccacgcttta tgagaagttt acttatgcag gaattgactg ttctgctgaa 3360
gaagcggcc 3369

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> thrombin cleavage site

<400> 22

Leu Val Pro Arg Gly Ser
1 5

<210> 23
<211> 231
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
1 5 10 15

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
130 135 140

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

申請專利範圍

1. 一種抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其係包含 4 個重鏈可變區域及 4 個輕鏈可變區域之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其中

該重鏈可變區域，係包含由序列編號 2 之胺基酸編號 31 至 35 的胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 2 之胺基酸編號 50 至 66 的胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 2 之胺基酸編號 99 至 111 的胺基酸序列所構成之 CDR3，

該輕鏈可變區域，係包含由序列編號 4 之胺基酸編號 24 至 39 的胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 4 之胺基酸編號 55 至 61 的胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 4 之胺基酸編號 94 至 102 的胺基酸序列所構成之 CDR3，且

1 個該重鏈可變區域與 1 個該輕鏈可變區域構成 1 個抗原結合部位，該抗體或其抗原結合片段包含 4 個抗原結合部位。

2. 如請求項 1 之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其係由以下之 (1) 或 (2) 中選擇：

(1) 抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其係包含 4 個重鏈可變區域及 4 個輕鏈可變區域之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其中

該重鏈可變區域係由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 122 的胺基酸序列所構成，

該輕鏈可變區域係由序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列所構成，且

1 個該重鏈可變區域與 1 個該輕鏈可變區域構成 1 個抗原結合部位，該抗體或其抗原結合片段包含 4 個抗原結合部位；以及

(2) 抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其係藉由如 (1) 之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段的轉譯後修飾而產生之抗體或其抗原結合片段。

3. 一種抗人類 Tie2 抗體，其係如請求項 1 記載之抗人類 Tie2 抗體，且該抗體係含有 2 個重鏈及 4 個輕鏈，

各重鏈係包含 2 個之由包含由序列編號 2 之胺基酸編號 31 至 35 的胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 2 之胺基酸編號 50 至 66 的胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 2 之胺基酸編號 99 至 111 的胺基酸序列所構成之 CDR3 的重鏈可變區域及 CH1 區域所構成之構造、以及包含 CH2 區域及 CH3 區域，一方之該構造的羧基末端 (C 末端) 係透過連結子與另一方之該構造的胺基末端 (N 末端) 連結，

各輕鏈係包含：包含由序列編號 4 之胺基酸編號 24 至 39 的胺基酸序列所構成之 CDR1、由序列編號 4 之胺基酸編號 55 至 61 的胺基酸序列所構成之 CDR2、及由序列編號 4 之胺基酸編號 94 至 102 的胺基酸序列所構成之 CDR3 的輕鏈可變區域及輕鏈恆定區域。

4. 如請求項 3 之抗人類 Tie2 抗體，其係由以下之

(1) 或 (2) 中選擇：

(1) 抗人類 Tie2 抗體，其係包含 2 個重鏈及 4 個輕鏈，

各重鏈係包含 2 個之由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 122 的胺基酸序列所構成之重鏈可變區域及 CH1 區域所構成之構造、以及包含 CH2 區域及 CH3 區域，一方之該構造的 C 末端係透過連結子與另一方之該構造的 N 末端連結，

各輕鏈係包含由序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列所構成之輕鏈可變區域及輕鏈恆定區域；以及

(2) 抗人類 Tie2 抗體，其係藉由如 (1) 之抗人類 Tie2 抗體的轉譯後修飾而產生之抗體。

5. 一種抗人類 Tie2 抗體，其係如請求項 4 記載之抗人類 Tie2 抗體，且該抗人類 Tie2 抗體係包含 2 個重鏈及 4 個輕鏈，

各重鏈係包含 2 個之由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 122 的胺基酸序列所構成之重鏈可變區域及 CH1 區域所構成之構造、以及包含 CH2 區域及 CH3 區域，一方之該構造的 C 末端係透過連結子與另一方之該構造的 N 末端連結，

各輕鏈係包含由序列編號 4 之胺基酸編號 1 至 113 的胺基酸序列所構成之輕鏈可變區域及輕鏈恆定區域。

6. 一種抗人類 Tie2 抗體，其係藉由如請求項 5 之抗人類 Tie2 抗體的轉譯後修飾而產生之抗體。

7. 如請求項 6 之抗人類 Tie2 抗體，其中轉譯後修飾，為重鏈可變區域 N 末端之焦麩胺醯基化及/或重鏈 C 末端之離胺酸缺失。

8. 如請求項 4 之抗人類 Tie2 抗體，其係包含 2 個之由序列編號 2 表示之胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

9. 如請求項 4 之抗人類 Tie2 抗體，其係包含 2 個之由序列編號 6 表示之胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

10. 如請求項 4 之抗人類 Tie2 抗體，其係包含 2 個之由序列編號 10 表示之胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

11. 一種抗人類 Tie2 抗體，其係藉由如請求項 8~10 中任一項之抗人類 Tie2 抗體的轉譯後修飾而產生之抗體。

12. 如請求項 11 之抗人類 Tie2 抗體，其中轉譯後修飾，為重鏈可變區域 N 末端之焦麩胺醯基化及/或重鏈 C 末端之離胺酸缺失。

13. 如請求項 11 之抗人類 Tie2 抗體，其係包含 2 個之由序列編號 2 之胺基酸編號 1 至 678 的胺基酸序列所構成之重鏈、及 4 個之由序列編號 4 表示之胺基酸序列所構成之輕鏈。

14. 一種 4 價之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其係結合於與如請求項 8 或 13 之抗人類 Tie2 抗體相

同之人類 Tie2 抗原決定位。

15. 如請求項 14 之 4 價之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其中人類 Tie2 抗原決定位，為包含 Accession No.NP_000450.2 之胺基酸編號 192、195 及 197 之胺基酸的人類 Tie2 抗原決定位。

16. 一種聚核苷酸，其係包含編碼如請求項 2 之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列。

17. 一種聚核苷酸，其係包含編碼如請求項 2 之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列。

18. 一種聚核苷酸，其係包含編碼如請求項 8~10 中任一項之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列。

19. 一種聚核苷酸，其係包含編碼如請求項 8~10 中任一項之抗人類 Tie2 抗體之輕鏈的鹼基序列。

20. 一種表現載體，其係含有如請求項 16 及/或 17 之聚核苷酸。

21. 一種表現載體，其係含有如請求項 18 及/或 19 之聚核苷酸。

22. 一種經如請求項 20 之表現載體轉形之宿主細胞，其係選自由以下之 (a) ~ (d) 所成之群：

(a) 經含有包含編碼如請求項 2 之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼

基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

(b) 經含有包含編碼如請求項 2 之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體與含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

(c) 經含有包含編碼如請求項 2 之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；及

(d) 經含有包含編碼如請求項 2 之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞。

23. 一種經如請求項 21 之表現載體轉形之宿主細胞，其係選自由以下之 (a) ~ (d) 所成之群：

(a) 經含有包含編碼如請求項 8~10 中任一項之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

(b) 經含有包含編碼如請求項 8~10 中任一項之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體與含有包含編碼該抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

(c) 經含有包含編碼如請求項 8~10 中任一項之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉

形之宿主細胞；及

(d) 經含有包含編碼如請求項 8~10 中任一項之抗人類 Tie2 抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞。

24. 一種生產抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之方法，其係包含培養選自由以下之 (a) ~ (c) 所成之群的宿主細胞，使 4 價之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段表現之步驟：

(a) 經含有包含編碼如請求項 2 之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

(b) 經含有包含編碼如請求項 2 之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體與含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；以及

(c) 經含有包含編碼如請求項 2 之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之重鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞、及經含有包含編碼該抗體或其抗原結合片段之輕鏈可變區域的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞。

25. 一種生產抗人類 Tie2 抗體之方法，其係包含培養選自由以下之 (a) ~ (c) 所成之群的宿主細胞，使抗

人類 Tie2 抗體表現之步驟：

(a) 經含有包含編碼如請求項 8~10 中任一項之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸與包含編碼該抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；

(b) 經含有包含編碼如請求項 8~10 中任一項之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體與含有包含編碼該抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞；以及

(c) 經含有包含編碼如請求項 8~10 中任一項之抗人類 Tie2 抗體之重鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞、及經含有包含編碼該抗人類 Tie2 抗體之輕鏈的鹼基序列之聚核苷酸的表現載體轉形之宿主細胞。

26. 一種抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其係以如請求項 24 之方法生產。

27. 一種抗人類 Tie2 抗體，其係以如請求項 25 之方法生產。

28. 一種醫藥組成物，其係含有如請求項 1~13、26 及 27 中任一項之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段及藥學上容許之賦形劑。

29. 一種醫藥組成物，其係含有如請求項 5 之抗人類 Tie2 抗體、如請求項 6 之抗人類 Tie2 抗體、及藥學上容許之賦形劑。

30. 一種醫藥組成物，其係含有如請求項 8 之抗人類

Tie2 抗體、如請求項 13 之抗人類 Tie2 抗體、及藥學上容許之賦形劑。

31. 如請求項 28~30 中任一項之醫藥組成物，其係糖尿病黃斑部水腫、糖尿病網膜症或重症下肢缺血之預防或治療用醫藥組成物。

32. 一種預防或治療糖尿病黃斑部水腫、糖尿病網膜症或重症下肢缺血之方法，其係包含投與如請求項 1~13、26 及 27 中任一項之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段的治療有效量之步驟。

33. 如請求項 1~13、26 及 27 中任一項之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段，其係使用於糖尿病黃斑部水腫、糖尿病網膜症或重症下肢缺血之預防或治療。

34. 一種如請求項 1~13、26 及 27 中任一項之抗人類 Tie2 抗體或其抗原結合片段之使用，其係用於製造糖尿病黃斑部水腫、糖尿病網膜症或重症下肢缺血之預防或治療用醫藥組成物。

圖式

圖 1

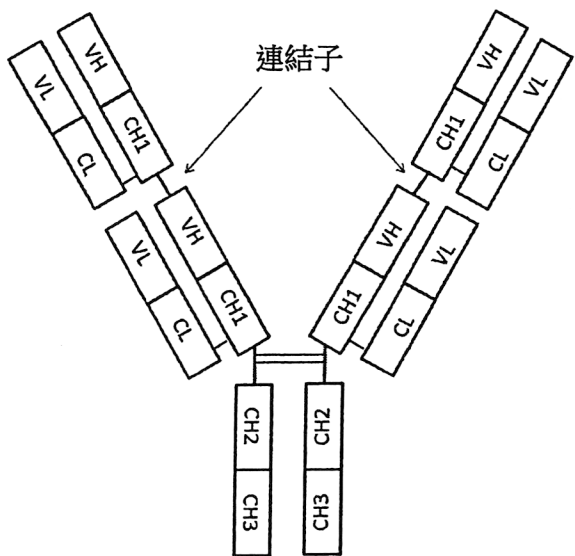


圖 2

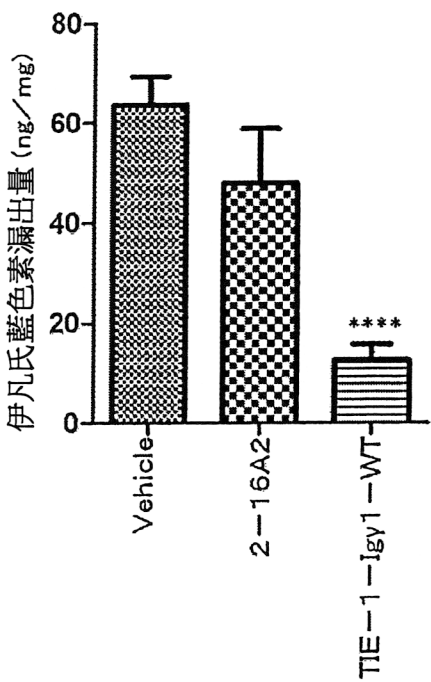


圖 3

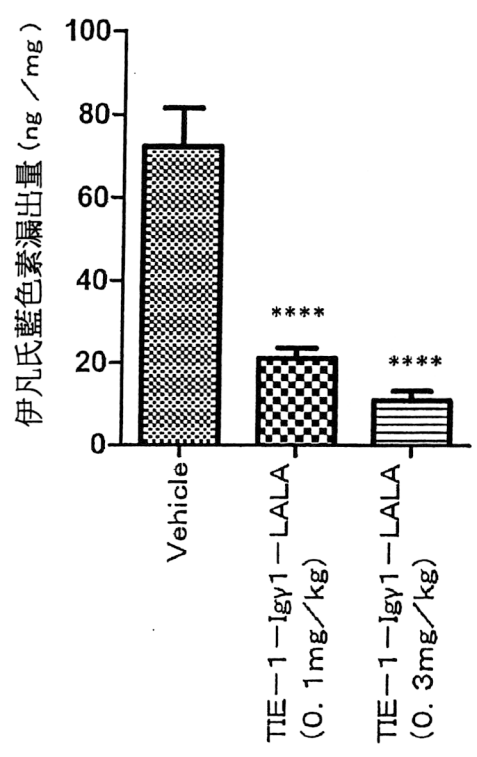


圖 4

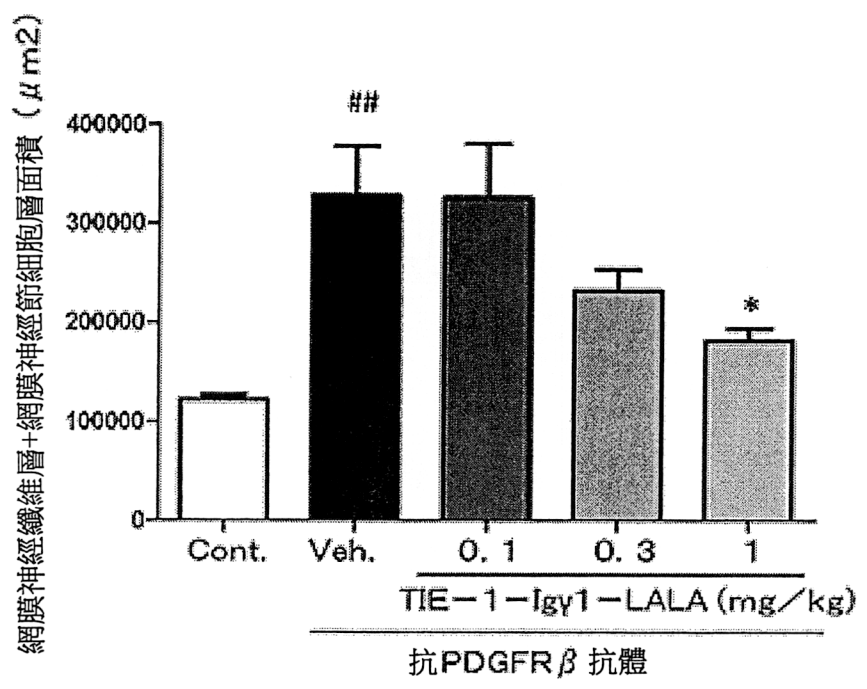


圖 5

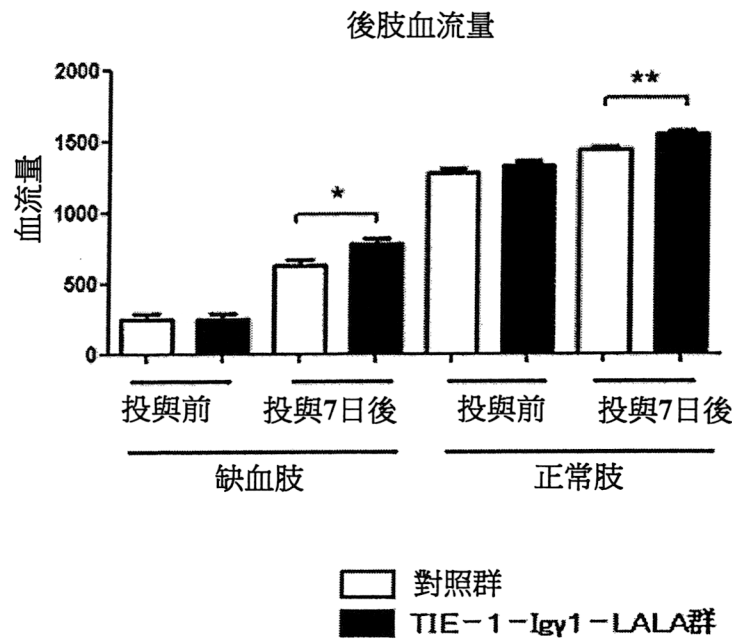
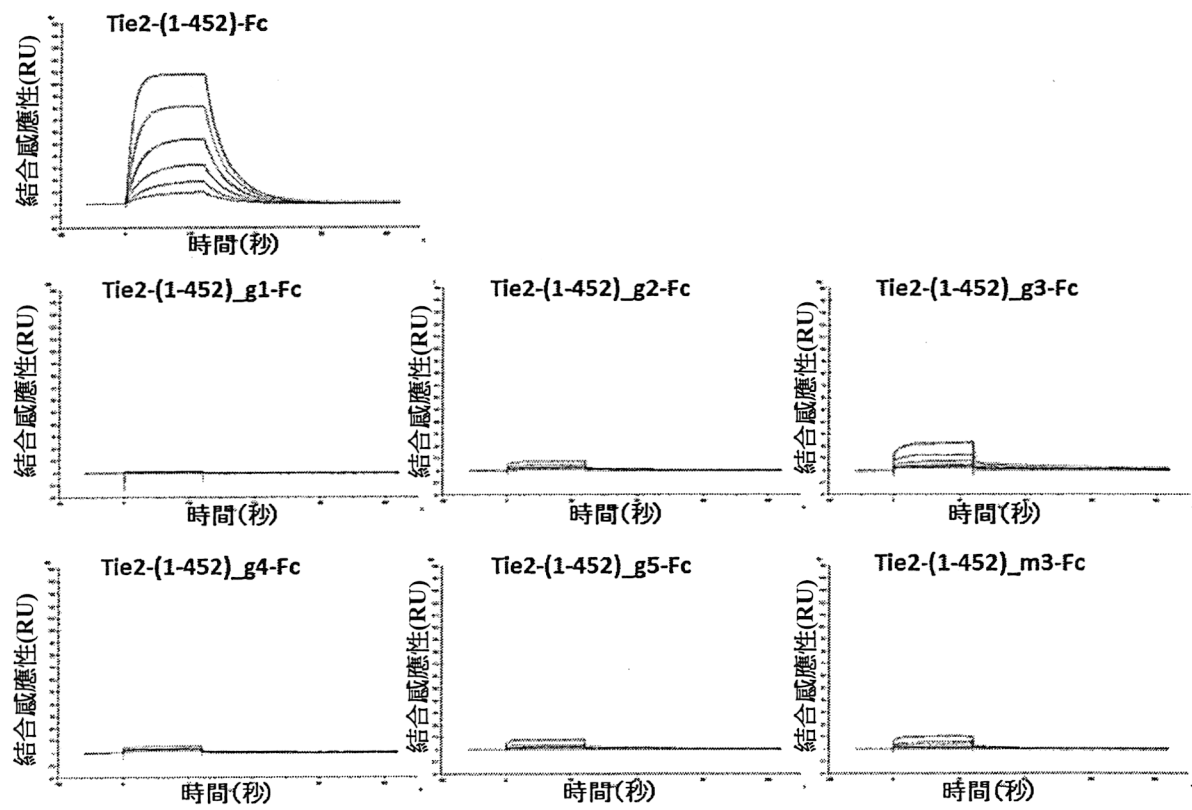


圖 6



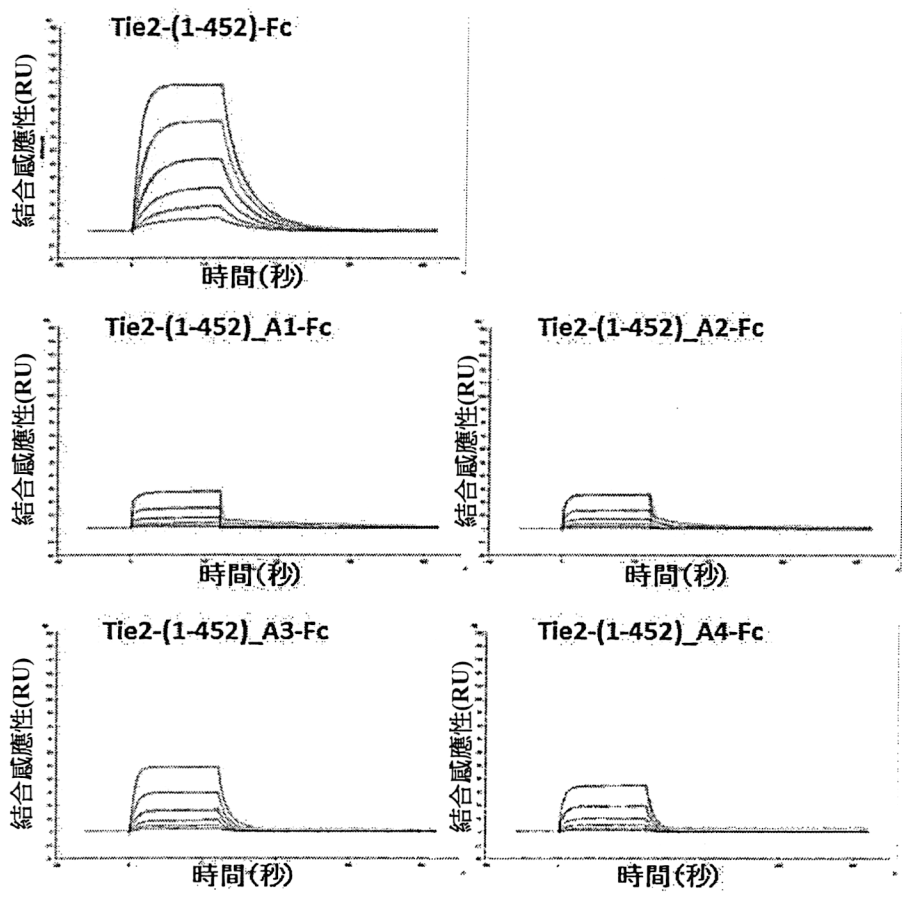


圖 7

