



(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 201026328 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 07 月 16 日

(21)申請案號：098142952

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 15 日

(51)Int. Cl.：

A61K39/395 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

C12N15/13 (2006.01)

A61P27/02 (2006.01)

A61P9/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/12/16 歐洲專利局 08021835.7

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

瑞士

(72)發明人：賓克曼 烏拉奇 BRINKMANN, ULRICH (DE)；蓋瑞普 瑞米可 艾伯特 GRIEP, REMKO ALBERT (NL)；卡路扎 克勞斯 KALUZA, KLAUS (DE)；卡夫立 安尼塔 KAVLIE, ANITA (NO)；克萊 克里斯汀 KLEIN, CHRISTIAN (DE)；瑞古拉 喬傑 湯瑪斯 REGULA, JOERG THOMAS (DE)；舒爾 瓦納 SCHEUER, WERNER (DE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：10 共 125 頁

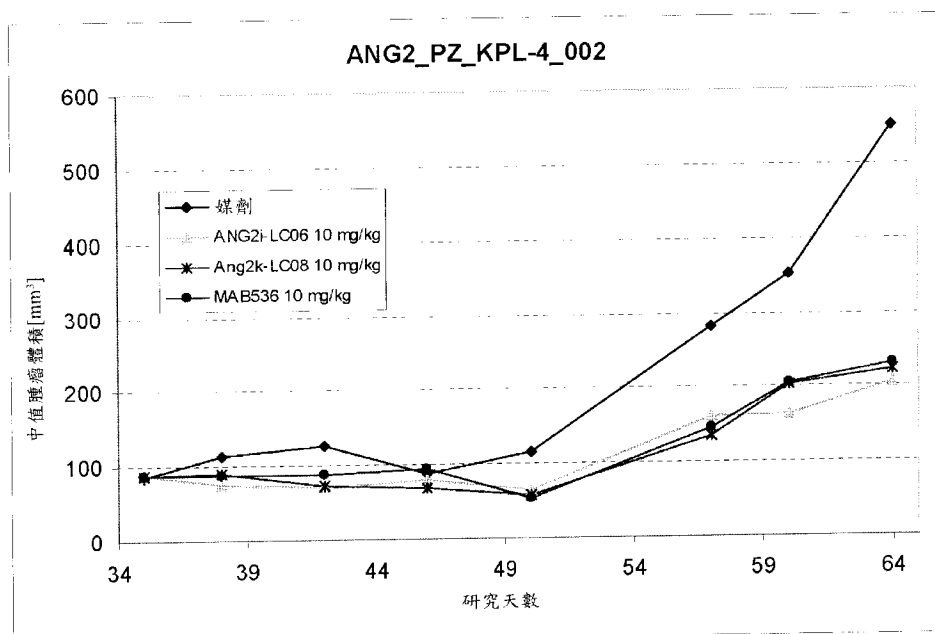
(54)名稱

抗人類血管生成素 2 抗體

ANTIBODIES AGAINST HUMAN ANGIOPOIETIN 2

(57)摘要

本發明係關於抗人類血管生成素 2 抗體(抗 ANG-2 抗體)、其製造方法、含有該等抗體之醫藥組合物、及其用途。





(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 201026328 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 07 月 16 日

(21)申請案號：098142952

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 15 日

(51)Int. Cl.：

A61K39/395 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

C12N15/13 (2006.01)

A61P27/02 (2006.01)

A61P9/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/12/16 歐洲專利局 08021835.7

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

瑞士

(72)發明人：賓克曼 烏拉奇 BRINKMANN, ULRICH (DE)；蓋瑞普 瑞米可 艾伯特 GRIEP, REMKO ALBERT (NL)；卡路扎 克勞斯 KALUZA, KLAUS (DE)；卡夫立 安尼塔 KAVLIE, ANITA (NO)；克萊 克里斯汀 KLEIN, CHRISTIAN (DE)；瑞古拉 喬傑 湯瑪斯 REGULA, JOERG THOMAS (DE)；舒爾 瓦納 SCHEUER, WERNER (DE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：10 共 125 頁

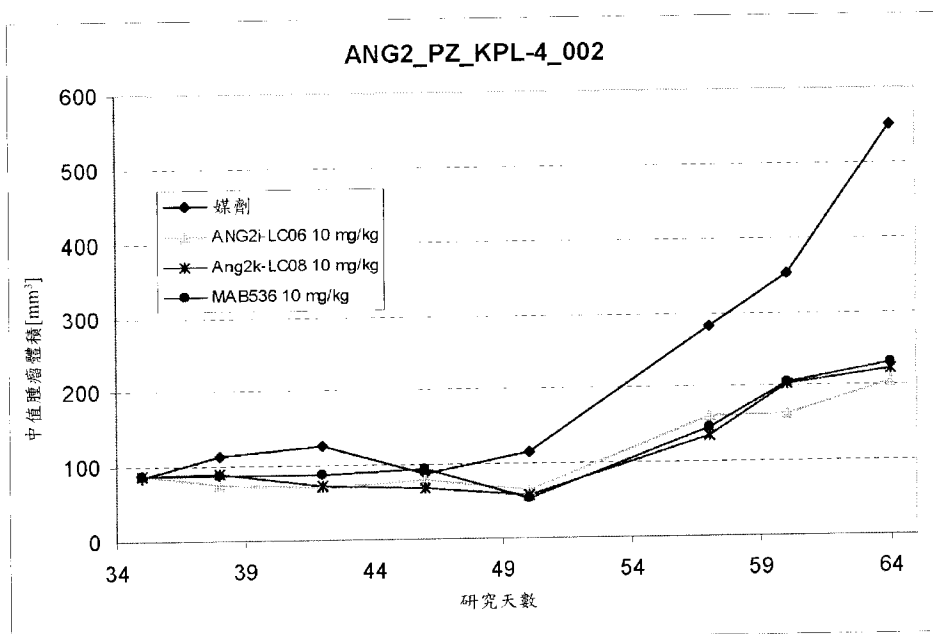
(54)名稱

抗人類血管生成素 2 抗體

ANTIBODIES AGAINST HUMAN ANGIOPOIETIN 2

(57)摘要

本發明係關於抗人類血管生成素 2 抗體(抗 ANG-2 抗體)、其製造方法、含有該等抗體之醫藥組合物、及其用途。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種抗人類血管生成素2抗體(抗ANG-2抗體)、其製造方法、含有該等抗體之醫藥組合物及其用途。

【先前技術】

血管生成涉及於多種病症之發病機制中，包括實體腫瘤、眼內新生血管症候群(諸如增生性視網膜病或年齡相關性黃斑變性(AMD))、類風濕性關節炎及牛皮癬(Folkman, J. 等人, J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M. 等人, Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; 及 Garner, A., Vascular diseases, Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A. 及 Klintworth, G. K. (編), 第2版, Marcel Dekker, New York (1994), 第1625-1710頁)。在實體腫瘤之情況下，新血管生成使腫瘤細胞相較於正常細胞，獲取生長優勢及增殖自主性。因此，觀察到腫瘤切片之微血管密度與患乳癌以及若干其他腫瘤之患者存活率之間存在相關性(Weidner, N. 等人, N. Engl. J. Med. 324 (1991) 1-8; Horak, E.R. 等人, Lancet 340 (1992) 1120-1124; 及 Macchiarini, P. 等人, Lancet 340 (1992) 145-146)。

ANG-2及抗ANG-2抗體

人類血管生成素-2(ANG-2)(或者縮寫為ANGPT2或ANG2)(SEQ ID No: 107)描述於Maisonpierre, P.C. 等人,

Science 277 (1997) 55-60；及Cheung, A.H.等人, Genomics 48 (1998) 389-91中。發現血管生成素-1及血管生成素-2(ANG-1(SEQ ID No: 108)及ANG-2(SEQ ID No: 107))為在血管內皮內選擇性表現之酪胺酸激酶家族Tie之配位體。Yancopoulos, G.D.等人, Nature 407 (2000) 242-48。血管生成素家族現有4個確定的成員。血管生成素-3及血管生成素-4(Ang-3及Ang-4)可代表同一基因座在小鼠及人類中差異很大之對應物。Kim, I.等人, FEBS Lett, 443 (1999) 353-56；Kim, I.等人, J Biol Chem 274 (1999) 26523-28。ANG-1及ANG-2最初在組織培養實驗中分別被鑑別為促效劑及拮抗劑(關於ANG-1, 參看: Davies, S.等人, Cell, 87 (1996) 1161-1169；及關於ANG-2, 參看: Maisonpierre, P.C.等人, Science 277 (1997) 55-60)。所有已知之血管生成素均主要結合Tie2, 且Ang-1與Ang-2均以3 nM(Kd)之親和力結合Tie2。Maisonpierre, P.C.等人, Science 277 (1997) 55-60。Ang-1顯示幫助EC存活並促進內皮完整性(Davis, S.等人, Cell, 87 (1996) 1161-1169；Kwak, H.J.等人, FEBS Lett 448 (1999) 249-53；Suri, C.等人, Science 282 (1998) 468-71；Thurston, G.等人, Science 286 (1999) 2511-14；Thurston, G.等人, Nat. Med. 6 (2000) 460-63), 而ANG-2具有相反作用且在缺乏存活因子VEGF或鹼性纖維母細胞生長因子下促進血管失去穩定性及消退。Maisonpierre, P.C.等人, Science 277 (1997) 55-60。然而, 多項有關ANG-2功能之研究已提出一種更為複雜之情況。ANG-2可能為血管

重塑之複雜調節因子，其在血管萌芽及血管消退中起作用。表現分析揭示，ANG-2連同VEGF一起在成人新生血管萌芽環境中迅速被誘發，而ANG-2在血管消退環境中在缺乏VEGF下被誘發，支持了ANG-2之該等作用。Holash, J. 等人, *Science* 284 (1999) 1994-98；Holash, J. 等人, *Oncogene* 18 (1999) 5356-62。與環境依賴性作用一致，ANG-2與經Ang-1活化之相同內皮細胞特異性受體Tie-2特異性結合，但對其活化具有環境依賴性作用。Maisonpierre, P.C. 等人, *Science* 277 (1997) 55-60。

角膜血管生成檢定顯示，ANG-1與ANG-2具有類似作用，均與VEGF協同作用，促進新血管生長。Asahara, T. 等人, *Circ. Res.*, 83, (1998) 233-40。觀察到在活體外高濃度ANG-2亦可促進血管生成，此提出存在劑量依賴性內皮反應之可能性。Kim, I. 等人, *Oncogene* 19 (2000) 4549-52。在血清剝奪 (serum deprivation) 細胞凋亡期間，高濃度ANG-2藉由經PI-3激酶及Akt路徑活化Tie2來充當內皮細胞之細胞凋亡存活因子。Kim, I. 等人, *Oncogene* 19 (2000) 4549-52。

其他活體外實驗表明，在持續暴露期間，ANG-2之作用可能由充當Tie2之拮抗劑逐漸轉變為充當其促效劑，且在隨後時間點，其可能直接促進血管形成及新血管穩定。Teichert-Kuliszewska, K. 等人, *Cardiovasc. Res.* 49 (2001) 659-70。此外，若在血纖維蛋白凝膠上培養EC，則亦觀察到Tie2經ANG-2活化，可能暗示ANG-2之作用可視EC之分

化狀態而定。Teichert-Kuliszewska, K. 等人, *Cardiovasc. Res.* 49 (2001) 659-70。在三維膠原蛋白凝膠中培養之微血管EC中, ANG-2亦可誘導Tie2活化, 且促進類毛細管結構形成。Mochizuki, Y. 等人, *J. Cell. Sci.* 115 (2002) 175-83。使用三維類球體共培養(3-D spheroidal coculture)作為活體外血管成熟之模型表明, EC與間質細胞之間的直接接觸消除了對VEGF之反應, 而VEGF及ANG-2之存在誘發萌芽。Korff, T. 等人, *Faseb J.* 15 (2001) 447-57。Etoh, T 等人證明, 在組成性表現Tie2之EC中, ANG-2在VEGF存在下高度上調MMP-1、MMP-9及u-PA之表現。Etoh, T. 等人, *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53。Lobov, I.B. 等人利用活體內瞳孔膜模型顯示, ANG-2在內源性VEGF存在下促進毛細管直徑迅速增加、基膜重塑、內皮細胞增殖及遷移, 且刺激新血管萌芽。Lobov, I.B. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11205-10。相比之下, 在缺乏內源性VEGF下, ANG-2促進內皮細胞死亡及血管消退。Lobov, I.B. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11205-10。類似地, Vajkoczy, P. 等人利用活體內腫瘤模型證明, 多細胞聚集體經由宿主及腫瘤內皮同時表現VEGFR-2及ANG-2而引起新生血管萌芽, 從而開啟血管生長。Vajkoczy, P. 等人, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 777-85。此模型說明正在生長之腫瘤中所建立之微血管結構特徵為連續不斷之重塑, 推斷由VEGF及ANG-2之表現所介導。Vajkoczy, M.A. 等人, *J. Clin. Invest.* 09 (2002) 777-85。

Tie-2及血管生成素-1之基因剔除小鼠研究顯示類似表型，且表明血管生成素-1刺激之Tie-2磷酸化介導正在發育之血管的重塑及穩定化，促進血管生成期間血管成熟以及內皮細胞支持之細胞黏附之維持(Dumont, D.J.等人, *Genes & Development*, 8 (1994) 1897-1909 ; Sato, T.N., *Nature*, 376 (1995) 70-74 ; Thurston, G.等人, *Nature Medicine* 6 (2000) 460-463)。認為血管生成素-1之作用在廣泛且組成性表現血管生成素-1之成人中得以保存(Hanahan, D., *Science*, 277 (1997) 48-50 ; Zagzag, D.等人, *Exp Neurology*, 159 (1999) 391-400)。相比之下，血管生成素-2之表現主要侷限於血管重塑位點，在該等位點中認為血管生成素-2之表現阻礙血管生成素-1之組成性穩定或成熟功能，致使血管回復至且保持在可能更易對萌芽信號起反應之可塑狀態(Hanahan, D., 1997 ; Holash, J.等人, *Orzcogerze* 18 (1999) 5356-62 ; Maisonpierre, P.C., 1997)。關於在病理性血管生成中血管生成素-2之表現的研究發現多種腫瘤類型顯示血管中血管生成素-2表現(Maisonpierre, P.C.等人, *Science* 277 (1997) 55-60)。在小鼠異種移植模型中，功能研究表明血管生成素-2涉及於腫瘤血管生成中，且將血管生成素-2之過度表現與腫瘤生長增加相關聯(Ahmad, S.A.等人, *Cancer Res.*, 61 (2001)1255-1259)。其他研究已將血管生成素-2之過度表現與腫瘤高血管性相關聯(Etoh, T.等人, *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53 ; Tanaka, F.等人, *Cancer Res.* 62 (2002) 7124-29)。

近年來，已提出血管生成素-1、血管生成素-2及/或Tie-2作為可能之抗癌治療劑。舉例而言，US 6,166,185、US 5,650,490及US 5,814,464每一者均揭示抗Tie-2配位體及受體抗體。使用可溶性Tie-2之研究據報導會減少齧齒動物中腫瘤之數量及尺寸(Lin, P, 1997 ; Lin, P., 1998) 。 Siemester, G.等人(1999)產生表現Tie-2之細胞外域之人類黑素瘤細胞株，將該等細胞株注射至裸小鼠中，且報導可溶性Tie-2會使腫瘤生長及腫瘤血管生成受到顯著抑制。已知血管生成素-1與血管生成素-2均結合Tie-2，但自此等研究中尚不清楚血管生成素-1、血管生成素-2抑或Tie-2為抗癌療法之關注標靶。然而，吾人認為有效抗血管生成素-2療法有助於治療進程視異常血管生成而定之疾病(諸如癌症)，其中阻斷該過程可預防疾病發展(Folkman, J., Nature Medicine. 1, (1995) 27-31)。

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

關於血管生成素-2病灶性表現之影響的研究顯示，拮抗血管生成素-1/Tie-2信號使緊密之血管結構鬆散，從而使EC暴露於來自血管生成誘導因子(例如VEGF)之活化信號(Hanahan, 1997)。此由血管生成素-1受抑制所引起之促血管生成作用表明抗血管生成素-1療法並非有效抗癌治療。

ANG-2係在發育期間於發生血管重塑之位點表現。

Maisonpierre, P.C.等人, *Science* 277 (1997) 55-60。在成年個體中, ANG-2之表現限於血管重塑位點以及高度血管化之腫瘤中, 包括神經膠質瘤(Osada, H.等人, *Int. J. Oncol.* 18 (2001) 305-09; Koga, K.等人, *Cancer Res.* 61 (2001) 6248-54)、肝細胞癌(Tanaka, S.等人, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 341-45)、胃癌(Etoh, T.等人, *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53; Lee, J.H.等人, *Int. J. Oncol.* 18 (2001) 355-61)、甲狀腺腫瘤(Bunone, G.等人, *Am J Pathol* 155 (1999) 1967-76)、非小細胞肺癌(Wong, M.P.等人, *Lung Cancer* 29 (2000) 11-22)以及結腸癌(Ahmad, S.A.等人, *Cancer* 92 (2001) 1138-43)及前列腺癌(Wurmbach, J.H.等人, *Anticancer Res.* 20 (2000) 5217-20)。發現一些腫瘤細胞表現ANG-2。舉例而言, Tanaka, S.等人, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 341-45在12份人類肝細胞癌(HCC)標本中之10份中偵測到ANG-2 mRNA。Ellis之團隊報導ANG-2在腫瘤上皮中廣泛表現。Ahmad, S.A.等人, *Cancer* 92 (2001) 1138-43。其他研究人員亦報導類似發現。Chen, L.等人, *J. Tongji Med. Univ.* 21 (2001) 228-30, 235 (2001)。藉由偵測存檔之人類乳癌標本中ANG-2 mRNA之含量, Sfilogoi, C等人, *Int. J. Cancer* 103 (2003) 466-74報導ANG-2 mRNA與輔助性淋巴結侵入、短暫無病期及不良總體存活率顯著相關。Tanaka, F.等人, *Cancer Res.* 62 (2002) 7124-29觀察總共236名分別處於病理期第I期至第IIIA期之非小細胞肺癌(NSCLC)患者。使用免疫組織化學, 其發現16.9%之

NSCLC患者為ANG-2陽性。ANG-2陽性腫瘤之微血管密度顯著高於ANG-2陰性。僅當VEGF表現高時見到ANG-2對血管生成之此類作用。此外，ANG-2之陽性表現為預測不良術後存活率之重要因素。Tanaka, F.等人, Cancer Res. 62 (2002) 7124-29。然而，其發現Ang-1表現與微血管密度之間並無顯著關聯。Tanaka, F.等人, Cancer Res. 62 (2002) 7124-29。此等結果表明，ANG-2為患若干類型癌症之患者不良預後之指示。

近來，Yancopoulos之團隊使用ANG-2基因剔除小鼠模型，報導ANG-2為出生後血管生成所需。Gale, N.W.等人, Dev. Cell 3 (2002) 411-23。其顯示在ANG-2基因剔除小鼠中未出現眼中玻璃體血管結構發育漸進式消退，且視網膜血管無法由視網膜中央動脈萌芽。Gale, N.W.等人, Dev. Cell 3 (2002) 411-23。其亦發現ANG-2缺失會導致淋巴管結構之定型(patterning)及功能極其不足。Gale, N.W.等人, Dev. Cell 3 (2002) 411-23。利用Ang-1進行遺傳拯救可醫治淋巴管新生之缺乏，但無法醫治血管生成之缺乏。Gale, N.W.等人, Dev. Cell 3 (2002) 411-23。

Peters及其同事報導在小鼠模型中，當可溶性Tie2以重組蛋白形式遞送或於病毒表現載體中遞送時，其抑制鼠類乳腺癌及黑素瘤之活體內生長。Lin, P.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 8829-34；Lin, P.等人, J. Clin. Invest. 100 (1997) 2072-78。經此處理之腫瘤組織中的血管密度極大地降低。此外，在經腫瘤細胞改良性培養基刺

激之大鼠角膜中，可溶性Tie2阻止血管生成。Lin, P.等人, J. Clin. Invest. 100 (1997) 2072-78。另外，Isner及其小組證明，將ANG-2添加至VEGF中相較於單獨VEGF，促進明顯更長且更廣之新血管分布(neovascularity)。Asahara, T.等人, Circ. Res., 83 (1998) 233-40。過量可溶性Tie2受體阻礙ANG-2對VEGF誘導之新血管生成之調節。Asahara, T.等人, Circ. Res., 83, (1998) 233-40。Siemeister, G.等人, Cancer Res. 59 (1999) 3185-91利用裸小鼠異種移植物顯示，在異種移植物中Flt-1或Tie2之細胞外配位體結合域之過度表現會引起路徑顯著受到抑制，無法由對方來補償，表明VEGF受體路徑及Tie2路徑應視為對於活體內血管生成過程而言必不可少之兩個獨立介體。Siemeister, G.等人, Cancer Res. 59 (1999) 3185-91。這可由White, R.R.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 5028-33之更新公開案所證實。在其研究中，證明在大鼠角膜微囊袋血管生成模型中，與ANG-2特異性結合並對其抑制之抗核酸酶RNA適體顯著抑制bFGF所誘導之新血管生成。

【發明內容】

本發明包含一種與人類血管生成素-2(ANG-2)特異性結合之抗體，其特徵在於包含SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 41或SEQ ID NO: 49之CDR3區作為重鏈可變域CDR3區。

較佳地，該抗體之特徵在於

- a)重鏈可變域包含：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 41或SEQ ID NO: 49之CDR3區；SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 42或SEQ ID NO: 50之CDR2區；及SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 43或SEQ ID NO: 51之CDR1區，及
- b)輕鏈可變域包含：SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 44或SEQ ID NO: 52之CDR3區；SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 45或SEQ ID NO: 53之CDR2區；及SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 46或SEQ ID NO: 54之CDR1區。

較佳地，該抗體之特徵在於包含：

- a) SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 47或SEQ ID NO: 55之重鏈可變域；及
- b) SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 48或SEQ ID NO: 56之輕鏈可變域。

較佳地，該抗體之特徵在於該抗體不與血管生成素-

1(ANG-1)特異性結合。

本發明之另一實施例為一種包含本發明抗體之醫藥組合物。

本發明之另一實施例為一種本發明抗體用於製造醫藥組合物之用途。

本發明之另一實施例為一種本發明抗體用於預防癌轉移之用途。

本發明之另一實施例為一種本發明抗體用於治療癌症之用途。

本發明之另一實施例為一種本發明抗體用於治療血管疾病之用途。

本發明之另一實施例為一種本發明抗體用於治療視網膜病之用途。

本發明之另一實施例為一種編碼本發明抗體之重鏈可變域及/或輕鏈可變域的核酸。

本發明另外提供含有本發明核酸之表現載體，其能夠在含有該等載體之原核或真核宿主細胞中表現該核酸以重組產生此類抗體。

本發明另外包含一種包含本發明載體之原核或真核宿主細胞。

本發明另外包含一種產生本發明之重組人類或人類化抗體的方法，其特徵在於在原核或真核宿主細胞中表現本發明核酸，及自該細胞或細胞培養物上清液中回收該抗體。本發明另外包含可藉由此類重組方法獲得之抗體。

本發明抗體特別適用於預防繼發性腫瘤/癌轉移或治療血管疾病，諸如視網膜病。

【實施方式】

本發明包含一種與人類血管生成素-2(ANG-2)特異性結合之抗體，其特徵在於包含SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 41或SEQ ID NO: 49之CDR3區作為重鏈可變域CDR3區。

在本發明之一實施例中，該抗體之特徵在於

- a)重鏈可變域包含：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 41或SEQ ID NO: 49之CDR3區；SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 42或SEQ ID NO: 50之CDR2區；及SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 43或SEQ ID NO: 51之CDR1區，及
- b)輕鏈可變域包含：SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 44或SEQ ID NO: 52之CDR3區；SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 45或SEQ ID NO: 53之CDR2區；及SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO:

38、SEQ ID NO: 46或SEQ ID NO: 54之CDR1區。

較佳地，該抗體之特徵在於包含：

a) SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 47或SEQ ID NO: 55之重鏈可變域；及

b) SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 48或SEQ ID NO: 56之輕鏈可變域。

本發明之另一實施例為一種與人類ANG-2特異性結合之抗體，其特徵在於，該抗體不與血管生成素1(ANG-1)特異性結合。與人類ANG-2特異性結合但不與人類ANG-1特異性結合之典型抗體為例如Ang2s_R3_LC03、Ang2s_LC09、Ang2i_LC06、Ang2i_LC07，或與Ang2s_R3_LC03、Ang2s_LC09、Ang2i_LC06、Ang2i_LC07、Ang2i_LC10結合同一抗原決定基之抗體，較佳為與Ang2i_LC06結合同一抗原決定基之抗體。因此，在本發明之一實施例中，與人類血管生成素-2(ANG-2)特異性結合但不與人類ANG-1特異性結合之抗體與Ang2s_R3_LC03、Ang2s_LC09、Ang2i_LC06、Ang2i_LC07、Ang2i_LC10結合同一抗原決定基，較佳與Ang2i_LC06結合同一抗原決定基。該等與ANG-2特異性結合但不與ANG-1特異性結合之抗體相較於ANG-2及ANG-1特異性抗體，可具有改善之性質，諸如功效、較低毒性、藥物動力學性質。

因此，在本發明之一實施例中，與人類血管生成素-

2(ANG-2)特異性結合但不與人類ANG-1特異性結合之抗體的特徵在於

- a)重鏈可變域包含：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 33或SEQ ID NO: 49之CDR3區；SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 34或SEQ ID NO: 50之CDR2區；及SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 35或SEQ ID NO: 51之CDR1區，及
- b)輕鏈可變域包含：SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 36或SEQ ID NO: 52之CDR3區；SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 37或SEQ ID NO: 53之CDR2區；及SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 38或SEQ ID NO: 54之CDR1區。

較佳地，該與人類血管生成素-2(ANG-2)特異性結合但不與人類ANG-1特異性結合之抗體的特徵在於包含：

- a) SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 39或SEQ ID NO: 55之重鏈可變域；及
- b) SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 40或SEQ ID NO: 56之輕鏈可變域。

在一實施例中，該本發明抗體之特徵在於

- a)重鏈可變域包含：SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 9之CDR3區；SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 10之CDR2區；及SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 11之CDR1區，及

b)輕鏈可變域包含：SEQ ID NO: 4或SEQ ID NO: 12之CDR3區；SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 13之CDR2區；及SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 14之CDR1區。

在一實施例中，該本發明抗體之特徵在於包含：

- a) SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 15之重鏈可變域，及
- b) SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 16之輕鏈可變域。

在一實施例中，該本發明抗體之特徵在於

- a)重鏈可變域包含SEQ ID NO: 1之CDR3區、SEQ ID NO: 2之CDR2區及SEQ ID NO: 3之CDR1區，及
- b)輕鏈可變域包含SEQ ID NO: 4之CDR3區、SEQ ID NO: 5之CDR2區及SEQ ID NO: 6之CDR1區。

在一實施例中，該本發明抗體之特徵在於包含：

- a) SEQ ID NO: 7之重鏈可變域；及
- b) SEQ ID NO: 8之輕鏈可變域。

在一實施例中，該本發明抗體之特徵在於

- a)重鏈可變域包含SEQ ID NO: 17之CDR3區、SEQ ID NO: 18之CDR2區及SEQ ID NO: 19之CDR1區，及
- b)輕鏈可變域包含SEQ ID NO: 20之CDR3區、SEQ ID NO: 21之CDR2區及SEQ ID NO: 22之CDR1區。

在一實施例中，該本發明抗體之特徵在於包含：

- a) SEQ ID NO: 23之重鏈可變域；及
- b) SEQ ID NO: 24之輕鏈可變域。

較佳地，本發明抗體之特徵在於該抗體屬於人類IgG1亞類或人類IgG4亞類。

術語「抗體」涵蓋各種抗體結構形式，包括(但不限於)全抗體及抗體片斷。本發明抗體較佳為人類化抗體、嵌合抗體或經另外基因工程改造之抗體，只要保持本發明之特徵性質即可。

「抗體片段」包含全長抗體之一部分，較佳為其可變域，或至少包含其抗原結合位點。抗體片段之實例包括雙功能抗體、單鏈抗體分子(scFv或scFab)及由抗體片段形成之多特異性抗體(例如雙特異性抗體)。scFv抗體例如描述於Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-88中。此外，抗體片段包含單鏈多肽，其具有V_H結構域之特徵，即能夠與V_L結構域組裝在一起，或具有與ANG-2結合之V_L結構域之特徵，即能夠與V_H結構域組裝在一起，形成功能性抗原結合位點且由此提供特性。可使用例如以下使scFv穩定：a)二硫化物穩定(例如參看WO 94/029350，Rajagopal, V.等人，*Prot. Engin.* (1997) 1453-59；Kobayashi, H.等人，*Nuclear Medicine & Biology*, 第25卷, (1998) 387-393；或Schmidt, M.等人，*Oncogene* (1999) 18 1711-1721)或b)穩定構架(例如參看例如WO 2007/109254特定穩定化構架之特定突變，例如參看US7,258,985，Furrer, F.等人，*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (2009), 第771-778頁，或Ottiger, M.等人，*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (2009), 第779-786頁)。

如本文所使用，術語「單株抗體」或「單株抗體組合物」係指具有單一胺基酸組成之抗體分子製劑。

術語「嵌合抗體」係指包含來自一種來源或物種之可變區(亦即結合區)及源自一種不同來源或物種之恆定區之至少一部分的抗體，通常由重組DNA技術製備。包含鼠類可變區及人類恆定區之嵌合抗體為較佳。本發明所涵蓋之「嵌合抗體」之其他較佳形式為恆定區已自原始抗體修飾或改變以產生本發明之特性(尤其關於C1q結合及/或Fc受體(FcR)結合)者。該等嵌合抗體亦稱為「類別轉換抗體」。嵌合抗體為包含編碼免疫球蛋白可變區之DNA區段及編碼免疫球蛋白恆定區之DNA區段的免疫球蛋白基因之表現產物。產生嵌合抗體之方法包含此項技術中熟知之習知重組DNA及基因轉染技術。例如參看Morrison, S.L.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238及US 5,204,244。

術語「人類化抗體」係指構架或「互補決定區」(CDR)經修飾以包含特異性與親本免疫球蛋白不同之免疫球蛋白CDR的抗體。在一較佳實施例中，將鼠類CDR移植至人類抗體之構架區中，製得「人類化抗體」。例如參看Riechmann, L.等人, Nature 332 (1988) 323-327; 及Neuberger, M.S.等人, Nature 314 (1985) 268-270。尤其較佳之CDR對應於顯示識別上文針對嵌合抗體所述之抗原之序列的CDR。本發明所涵蓋之「人類化抗體」之其他較佳形式為恆定區已自原始抗體另外修飾或改變以產生本發明之特性(尤其關於C1q結合及/或Fc受體(FcR)結合)者。

如本文所使用，術語「人類抗體」意欲包括具有源自人

類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區的抗體。人類抗體在當前技術中為熟知之(van Dijk, M.A.及 van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374)。亦可於轉殖基因動物(例如小鼠)中產生人類抗體，該等轉殖基因動物能夠在免疫後缺乏內源性免疫球蛋白產生下產生人類抗體完全譜系或選擇譜系。將人類生殖系免疫球蛋白基因陣列轉移至此生殖系突變小鼠中將導致在抗原攻毒後產生人類抗體(例如參看Jakobovits, A.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555；Jakobovits, A.等人, Nature 362 (1993) 255-258；Brueggemann, M.等人, Year Immunol. 7 (1993) 33-40)。亦可於噬菌體呈現文庫中產生人類抗體(Hoogenboom, H.R.及 Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388；Marks, J.D.等人, J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597)。Cole等人及 Boerner等人之技術亦可用於製備人類單株抗體(Cole, S.P.C.等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Liss, A.R., (1985) 77-96；及 Boerner, P.等人, J. Immunol. 147 (1991) 86-95)。如本發明針對嵌合抗體及人類化抗體所提及，如本文所使用，術語「人類抗體」亦包含例如藉由「類別轉換」，亦即改變Fc部分或使其突變(例如IgG1至IgG4及/或IgG1/IgG4突變)，對恆定區進行修飾以產生本發明之特性(尤其關於C1q結合及/或FcR結合)的該等抗體。

如本文所使用，術語「重組人類抗體」意欲包括藉由重組方式製備、表現、產生或分離之所有人類抗體，諸如自

轉殖人類免疫球蛋白基因之宿主細胞(諸如NS0或CHO細胞)或動物(例如小鼠)分離之抗體，或使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體表現之抗體。該等重組人類抗體具有重排形式之可變區及恆定區。本發明之重組人類抗體已經活體內體細胞超突變。因此，重組抗體之VH及VL區之胺基酸序列儘管源自且相關於人類生殖系VH及VL序列，但可能並不天然存在於活體內人類抗體生殖系譜系中之序列。

如本文所使用，「可變域」(輕鏈可變域(V_L)、重鏈可變域(V_H))表示直接涉及抗體與抗原結合的成對輕鏈及重鏈域之各域。輕鏈及重鏈可變域具有相同之一般結構，且各域包含四個構架(FR)區，該等構架區序列普遍保守，由三個「高變區」(或互補決定區，CDRs)連接。該等構架區採用β片構形，且CDRs可形成連接β片結構之環。各鏈中之CDRs由該等構架區保持三維結構且與其他鏈之CDRs一起形成抗原結合位點。抗體重鏈及輕鏈CDR3區對本發明抗體之結合特異性/親和力具有特別重要之作用，且因此提供本發明之另一目的。

術語「抗體之抗原結合部分」，當在本文中使用时，係指抗體中負責抗原結合之胺基酸殘基。抗體之抗原結合部分包含「互補決定區」或「CDRs」之胺基酸殘基。「構架」或「FR」區為本文所定義之高變區殘基以外的可變域區。因此，抗體之輕鏈及重鏈可變域自N端至C端包含結構域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。重鏈CDR3尤其為對抗原結合貢獻最大且確定抗體特性之區

域。CDR及FR區係根據Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)之標準定義及/或「高變環」之殘基確定。

如本文所使用, 術語「核酸」或「核酸分子」意欲包括DNA分子及RNA分子。核酸分子可為單鏈或雙鏈, 但較佳為雙鏈DNA。

如本申請案內所使用, 術語「胺基酸」表示天然存在之羧基 α -胺基酸之群, 包含丙胺酸(三字碼: ala; 一字碼: A)、精胺酸(arg, R)、天冬醯胺(asn, N)、天冬胺酸(asp, D)、半胱胺酸(cys, C)、麩胺醯胺(gln, Q)、麩胺酸(glu, E)、甘胺酸(gly, G)、組胺酸(his, H)、異白胺酸(ile, I)、白胺酸(leu, L)、離胺酸(lys, K)、甲硫胺酸(met, M)、苯丙胺酸(phe, F)、脯胺酸(pro, P)、絲胺酸(ser, S)、蘇胺酸(thr, T)、色胺酸(trp, W)、酪胺酸(tyr, Y)及纈胺酸(val, V)。

當一核酸與另一核酸呈功能關係時, 其為「可操作性連接」。舉例而言, 若前序列或分泌前導序列之DNA表現為參與多肽分泌之前蛋白, 則其與該多肽之DNA可操作性連接; 若啟動子或增強子影響編碼序列之轉錄, 則其與該序列可操作性連接; 或若核糖體結合位點經定位以促進轉譯, 則其與編碼序列可操作性連接。一般而言, 「可操作性連接」意謂所連接之DNA序列共線, 且在分泌前導序列之情況下, 其為鄰接的且在閱讀框架中。然而, 增強子不

必為鄰接的。連接藉由在適宜限制性位點處接合來實現。若該等位點不存在，則根據習知做法使用合成寡核苷酸接附子(adaptor)或連接子。

如本文所使用，表述「細胞」、「細胞株」及「細胞培養物」可互換使用且所有該等名稱均包括子代。因此，詞語「轉型體」及「轉型細胞」包括原代受檢細胞及源自其之培養物，不考慮轉移次數。亦應瞭解由於存在有意或無意突變，所以所有子代之DNA含量可能並不準確一致。本發明包括具有與針對原始轉型細胞所篩檢相同之功能或生物活性的變異子代。

如本文所使用，術語「結合」或「特異性結合」係指在活體外檢定中抗體與抗原(ANG-2)抗原決定基之結合，較佳為在電漿共振檢定(BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Sweden)(實例3)中抗體與經純化之野生型ANG-2抗原的結合。結合親和力由術語 k_a (抗體/抗原複合物中抗體之締合速率常數)、 k_D (解離常數)及 $K_D(k_D/k_a)$ 來定義。結合或特異性結合意謂具有 10^{-8} mol/l或低於 10^{-8} mol/l，較佳 10^{-9} M至 10^{-13} mol/l之結合親和力(K_D)。

可由BIAcore檢定(GE-Healthcare Uppsala, Sweden)研究抗體與FcγRIII之結合。結合親和力由術語 k_a (抗體/抗原複合物中抗體之締合速率常數)、 k_D (解離常數)及 $K_D(k_D/k_a)$ 來定義。

如本文所使用，術語「不與ANG-1結合」或「不與ANG-1特異性結合」表示在活體外結合ANG-1之ELISA檢

定中，抗體之EC50值大於8000 ng/ml(根據實例2)。

術語「抗原決定基」包括任何能夠與抗體特異性結合之多肽決定子。在某些實施例中，抗原決定基包括諸如胺基酸、糖側鏈、磷醯基或磺醯基之分子之化學活性表面基團，且在某些實施例中，其可具有特定三維結構特徵及或特定電荷特徵。抗原決定基為抗原結合之抗體區域。

抗體之「Fc部分」不直接涉及抗體與抗原之結合，但展現各種效應功能。「抗體之Fc部分」為熟習此項技術者熟知之術語且根據抗體之番木瓜蛋白酶裂解來定義。視重鏈恆定區之胺基酸序列而定，抗體或免疫球蛋白可分為以下類別：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且該等類別中有若干類可進一步分為亞類(同型)，例如IgG1、IgG2、IgG3及IgG4、IgA1及IgA2。根據重鏈恆定區，不同類別之免疫球蛋白可分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。基於補體活化、C1q結合及Fc受體結合，抗體之Fc部分直接涉及ADCC(抗體依賴性細胞介導之細胞毒性)及CDC(補體依賴性細胞毒性)。補體活化(CDC)由補體因子C1q與大多數IgG抗體亞類之Fc部分的結合引發。雖然抗體對補體系統之影響視特定條件而定，但與C1q之結合由Fc部分中確定之結合位點引起。該等結合位點為當前技術所知，且例如描述於以下中：Boakle, R.J.等人, Nature 282 (1975) 742-743；Lukas, T.J.等人, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560；Brunhouse, R.及Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917；Burton, D.R.等人, Nature 288 (1980) 338-344；Thommesen, J.E.等

人, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E. 等人, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M. 等人, J. Virology 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A. 等人, Immunology 86 (1995) 319-324; EP 0307434。該等結合位點為例如 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331及P329(根據 Kabat 之 EU 索引編號, 參看下文)。亞類 IgG1、IgG2 及 IgG3 之抗體通常顯示補體活化以及 C1q 及 C3 結合, 而 IgG4 不活化補體系統且不結合 C1q 及 C3。

本發明抗體較佳包含人類來源之 Fc 部分, 其為亞類 IgG1 之人類抗體的 Fc 部分。

本發明抗體之特徵在於恆定鏈為人類來源。該等恆定鏈為當前技術中所熟知, 且例如由 Kabat, E.A. 所描述(例如參看 Johnson, G. 及 Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218)。舉例而言, 適用人類重鏈恆定區包含 SEQ ID NO: 57 或 SEQ ID NO: 58 之胺基酸序列。舉例而言, 適用人類輕鏈恆定區包含 SEQ ID NO: 59 之 κ 輕鏈恆定區之胺基酸序列, 或 SEQ ID NO: 60 之 λ 輕鏈恆定區之胺基酸序列。

如本申請案內所使用, 術語「恆定區」表示抗體中除可變區外之結構域的總和。恆定區不直接涉及抗原結合, 但展現各種效應功能。視重鏈恆定區之胺基酸序列而定, 抗體可分為以下類別: IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM, 且該等類別中有若干類可進一步分為亞類, 諸如 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4、IgA1 及 IgA2。對應於不同抗體類別之重鏈恆

定區分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。所有5種抗體類別中可存在之輕鏈恆定區稱為 κ 及 λ 。

如本申請案中所使用，術語「源自人類來源之恆定區」表示亞類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之人類抗體之重鏈恆定區及/或 κ 輕鏈恆定區。該等恆定區為當前技術中所熟知，且例如描述由Kabat, E.A.所描述(例如參看Johnson, G.及Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2785-2788)。

雖然IgG4亞類之抗體顯示減少之Fc受體(Fc γ RIIIa)結合，但其他IgG亞類之抗體顯示高度結合。然而，Pro238、Asp265、Asp270、Asn297(喪失Fc碳水化合物)、Pro329、Leu234、Leu235、Gly236、Gly237、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434及His435為若經改變則亦會減少Fc受體結合之殘基(Shields, R.L等人, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604; Lund, J等人, *FASEB J.* 9 (1995) 115-119; Morgan, A等人, *Immunology* 86 (1995) 319-324; EP 0 307 434)。

在一實施例中，本發明抗體具有比IgG1抗體低之FcR結合，且關於FcR結合，單特異性二價親本抗體屬於IgG4亞類或IgG1或IgG2亞類，具有S228、L234、L235及/或D265之突變，及/或含有PVA236突變。在一實施例中，單特異性二價親本抗體之突變為S228P、L234A、L235A、L235E及/或PVA236。在另一實施例中，單特異性二價親本抗體

之突變在IgG4 S228P以及IgG1 L234A及L235A中。重鏈恆定區顯示為SEQ ID NO: 57及58。在一實施例中，單特異性二價親本抗體之重鏈恆定區具有含突變L234A及L235A之SEQ ID NO: 57。在另一實施例中，單特異性二價親本抗體之重鏈恆定區具有含突變S228P之SEQ ID NO: 58。在另一實施例中，單特異性二價親本抗體之輕鏈恆定區為SEQ ID NO: 59之 κ 輕鏈區，或SEQ ID NO: 60之 λ 輕鏈恆定區。在一本發明實施例中，單特異性二價親本抗體之重鏈恆定區具有SEQ ID NO: 57或具有含突變S228P之SEQ ID NO: 58。

抗體之恆定區直接涉及ADCC(抗體依賴性細胞介導之細胞毒性)及CDC(補體依賴性細胞毒性)。補體活化(CDC)由補體因子C1q與大多數IgG抗體亞類之恆定區的結合引發。C1q與抗體之結合由所謂結合位點處確定之蛋白質-蛋白質相互作用引起。該等恆定區結合位點為當前技術所知，且描述於例如以下中：Lukas, T.J.等人，J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560；Brunhouse, R. 及 Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917；Burton, D.R.等人，Nature 288 (1980) 338-344；Thommesen, J.E.等人，Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004；Idusogie, E.E.等人，J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184；Hezareh, M.等人，J. Virol. 75 (2001) 12161-12168；Morgan, A.等人，Immunology 86 (1995) 319-324；及EP 0 307 434。該等恆定區結合位點之特徵在於例如胺基酸 L234、L235、D270、N297、E318、K320、

K322、P331及P329(根據Kabat之EU索引編號)。

術語「抗體依賴性細胞毒性(ADCC)」係指在效應細胞存在下本發明抗體使人類標靶細胞溶解。較佳藉由在效應細胞(諸如新分離之PBMC)或自白血球層純化之效應細胞(如單核細胞或自然殺手(NK)細胞或持久生長之NK細胞株)存在下，用本發明抗體處理表現CCR5之細胞之製劑來測量ADCC。

術語「補體依賴性細胞毒性(CDC)」表示由補體因子C1q與大多數IgG抗體亞類之Fc部分的結合引發之過程。C1q與抗體之結合由所謂結合位點處確定之蛋白質-蛋白質相互作用引起。該等Fc部分結合位點為當前技術中所知(參看下文)。該等Fc部分結合位點之特徵在於例如胺基酸L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331及P329(根據Kabat之EU索引編號)。亞類IgG1、IgG2及IgG3之抗體通常顯示補體活化，包括C1q及C3結合，而IgG4不活化補體系統且不結合C1q及/或C3。

本發明抗體由重組方式產生。因此，本發明之一態樣為一種編碼本發明抗體之核酸，且另一態樣為一種包含該編碼本發明抗體之核酸的細胞。重組產生方法為當前技術中所熟知，且包含在原核及真核細胞中表現蛋白質，隨後分離抗體，及通常純化達到醫藥學上可接受之純度。為在宿主細胞中表現上述抗體，將編碼各別經修飾輕鏈及重鏈之核酸由標準方法插入表現載體中。在適宜原核或真核宿主細胞，如CHO細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、HEK293細

胞、COS細胞、PER.C6、酵母或大腸桿菌細胞中表現，且自該等細胞(上清液或溶解後之細胞)回收抗體。重組產生抗體之一般方法為當前技術中所熟知且描述於例如 Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202 ; Geisse, S.等人, Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282 ; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161 ; Werner, R.G., J. Drug Res. 48 (1998) 870-880之評論文章中。

本發明抗體適宜藉由習知免疫球蛋白純化程序，諸如蛋白質A-瓊脂糖法、羧磷灰石層析法、凝膠電泳、透析或親和層析法自培養物中分離。編碼單株抗體之DNA及RNA易於使用習知程序來分離及定序。融合瘤細胞可用作該DNA及RNA之來源。分離後，即可將DNA插入表現載體中，隨後轉染至不另外產生免疫球蛋白之宿主細胞(諸如HEK 293細胞、CHO細胞或骨髓瘤細胞)中，以在宿主細胞中合成重組單株抗體。

本發明抗體之胺基酸序列變異體(或突變體)藉由將適當核苷酸變化引入抗體DNA中或藉由核苷酸合成來製備。然而，該等修飾只可在非常有限之範圍內(例如如上文所述)進行。舉例而言，該等修飾不改變上述抗體特徵，諸如IgG同型及抗原結合，但可提高重組產生之產率、蛋白質穩定性，或促進純化。

如本申請案中所使用，術語「宿主細胞」表示可經工程改造以產生本發明抗體之任一類細胞系統。在一實施例

中，使用 HEK293 細胞及 CHO 細胞作為宿主細胞。如本文所使用，表述「細胞」、「細胞株」及「細胞培養物」可互換使用且所有該等名稱均包括子代。因此，詞語「轉型體」及「轉型細胞」包括原代受檢細胞及源自其之培養物，不考慮轉移次數。亦應瞭解由於存在有意或無意突變，所以所有子代之 DNA 含量可能並不準確一致。本發明包括具有與針對原始轉型細胞所篩檢相同之功能或生物活性的變異子代。

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

適於原核生物之控制序列例如包括啟動子、視情況存在之操縱序列、及核糖體結合位點。已知真核細胞利用啟動子、增強子及聚腺苷酸化信號。

當一核酸與另一核酸序列呈功能關係時，其為「可操作性連接」。舉例而言，若前序列或分泌前導序列之 DNA 表

現為參與多肽分泌之前蛋白，則其與該多肽之DNA可操作性連接；若啟動子或增強子影響編碼序列之轉錄，則其與該序列可操作性連接；或若核糖體結合位點經定位以促進轉譯，則其與編碼序列可操作性連接。一般而言，「可操作性連接」意謂所連接之DNA序列為鄰接的，且在分泌前導序列之情況下，其為鄰接的且在閱讀框架中。然而，增強子不必為鄰接的。連接藉由在適宜限制性位點處接合來實現。若該等位點不存在，則根據習知做法使用合成寡核苷酸接附子或連接子。

藉由標準技術，包括鹼/SDS處理、CsCl聯結、管柱層析法、瓊脂糖凝膠電泳及此項技術中熟知之其他技術，純化抗體，以去除細胞組份或其他污染物，例如其他細胞核酸或蛋白質。參看 Ausubel, F. 等人編, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。已充分確立不同方法且廣泛用於蛋白質純化，諸如利用微生物蛋白質之親和層析法(例如蛋白質A或蛋白質G親和層析法)、離子交換層析法(例如陽離子交換(羧甲基樹脂)、陰離子交換(胺基乙基樹脂)及混合模式交換)、嗜硫吸附法(例如利用 β -巰基乙醇及其他SH配位體)、疏水相互作用或芳族吸附層析法(例如利用苯基-瓊脂糖、氮雜親砂性樹脂(aza-arenophilic resin)或間胺基苯基酮酸)、金屬螯合親和層析法(例如利用Ni(II)-及Cu(II)-親和材料)、尺寸排阻層析法及電泳法(諸如凝膠電泳法、毛細電泳法)(Vijayalakshmi, M.A., Appl.

Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102)。

本發明包含一種治療需要療法之患者的方法，其特徵在於向該患者投與治療有效量之本發明抗體。

本發明包含一種本發明抗體用於療法之用途。

本發明包含一種本發明抗體用於製備供預防癌轉移之藥物的用途。

本發明包含一種本發明抗體用於製備供治療癌症之藥物的用途。

本發明之一態樣為一種包含本發明抗體之醫藥組合物。本發明之另一態樣為一種本發明抗體用於製造醫藥組合物之用途。本發明之另一態樣為一種製造包含本發明抗體之醫藥組合物的方法。在另一態樣中，本發明提供一種含有本發明抗體與醫藥載劑調配之組合物，例如醫藥組合物。

本發明之另一態樣為供預防癌轉移之該醫藥組合物。

本發明之另一態樣為一種供預防癌轉移之本發明抗體。

本發明之另一態樣為一種本發明抗體用於製造供預防癌轉移之藥物的用途。

本發明之另一態樣為一種預防罹患原發癌之患者癌轉移的方法，其藉由向需要該預防性治療之患者投與本發明抗體。

可在正位及皮下癌模型中活體內顯示高效預防自發癌轉移/繼發性腫瘤(參看實例9)(與經靜脈注射腫瘤細胞之實驗模型對比)。此類似於細胞自原發性腫瘤散布且轉移至如肺或肝之繼發器官(其中出現繼發性腫瘤)的臨床情形。

本發明之術語「癌轉移」係指癌細胞自原發性腫瘤傳至患者體內一或多個其他位點，隨後形成繼發性腫瘤。此項技術中已知確定癌症是否已轉移之測癌轉移方式(MetastasMeans)，且包括骨骼掃描、胸部X射線、CAT掃描、MRI掃描及腫瘤標誌物測試。

如本文所使用，術語「預防癌轉移」或「預防繼發性腫瘤」具有相同含義，且指針對罹患復發性HER2陽性癌之患者之癌轉移的預防措施，以此方式抑制或減少癌細胞自原發性腫瘤進一步傳至患者體內一或多個其他位點。此意謂原發性腫瘤或癌症之轉移得以預防、延遲或減少，且因此預防、延遲或減少繼發性腫瘤之形成。較佳預防或減少肺部之癌轉移(亦即繼發性腫瘤)，此意謂預防或減少癌細胞自原發性腫瘤轉移性傳至肺部。

本發明之另一態樣為供治療癌症之該醫藥組合物。

本發明之另一態樣為一種供治療癌症之本發明抗體。

本發明之另一態樣為一種本發明抗體用於製造供治療癌症之藥物的用途。

本發明之另一態樣為一種治療罹患癌症之患者的方法，其藉由向需要該治療之患者投與本發明抗體。

如本文所使用，「醫藥學上可接受之載劑」包括生理學上可相容之任何及所有溶劑、分散介質、塗布劑、抗細菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑，及其類似物。載劑較佳適於靜脈內、肌肉內、皮下、非經腸、脊椎或表皮投與(例如藉由注射或輸注)。

本發明組合物可藉由此項技術中已知之多種方法投與。如熟習此項技術者所瞭解，投藥途徑及/或模式將視所需結果而變化。為藉由某些投藥途徑投與本發明化合物，可能需要用防止化合物失活之物質塗布化合物或將化合物與該物質共投與。舉例而言，化合物可於例如脂質體或稀釋劑之適當載劑中投向個體。醫藥學上可接受之稀釋劑包括生理食鹽水及水性緩衝溶液。醫藥載劑包括無菌水性溶液或分散液，及供臨用方製備無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末。該等介質及試劑用於醫藥活性物質之用途為此項技術中已知。

如本文所使用，短語「非經腸投藥」及「非經腸投與」意謂除經腸及局部投藥外之其他投藥模式，通常藉由注射來實現，且包括(不限於)：靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心臟內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊椎內、硬膜外及胸骨內注射及輸注。

如本文所使用，術語癌症係指增生性疾病，諸如淋巴瘤、淋巴球性白血病、肺癌、非小細胞肺(NSCL)癌、細支氣管細胞肺癌、骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭或頸癌、皮膚或眼內黑素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門區域癌、胃癌(stomach cancer/gastric cancer)、結腸癌、乳癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、陰門癌、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌症、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟

組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、膀胱癌、腎癌或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、間皮瘤、肝細胞癌、膽道癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、脊軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、神經鞘瘤、室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、腦膜瘤、鱗狀細胞癌、垂體腺瘤及尤文氏肉瘤(Ewings sarcoma)，包括任何上述癌症之難治癒型式或一或多種上述癌症之組合。

本發明之另一態樣為作為抗血管生成劑之該醫藥組合物。此抗血管生成劑可用於治療癌症，尤其實體腫瘤，及其他血管疾病。

本發明之另一態樣為一種本發明抗體用於製造供治療血管疾病之藥物的用途。

本發明之另一態樣為一種供治療血管疾病之本發明抗體。

一較佳實施例為一種供治療視網膜病之本發明抗體。

一較佳實施例為一種本發明抗體用於製造供治療視網膜病之藥物的用途。

本發明之另一態樣為一種治療罹患血管疾病之患者的方法，其藉由向需要該治療之患者投與本發明抗體。

術語「血管疾病」包括癌症、發炎疾病、動脈粥樣硬化、局部缺血、外傷、敗血症、COPD、哮喘、糖尿病、AMD、視網膜病、中風、肥胖症、急性肺損傷、出血、血管滲漏(例如細胞因子誘發之血管滲漏)、過敏、葛瑞夫茲氏病(Graves' Disease)、橋本氏自體免疫甲狀腺炎

(Hashimoto's Autoimmune Thyroiditis)、特發性血小板減少性紫癜、巨細胞動脈炎、類風濕性關節炎、全身性紅斑性狼瘡症 (SLE)、狼瘡性腎炎、克羅恩氏病 (Crohn's Disease)、多發性硬化症、潰瘍性結腸炎，尤其為實體腫瘤、眼內新生血管症候群(諸如增生性視網膜病或年齡相關性黃斑變性 (AMD))、類風濕性關節炎及牛皮癬 (Folkman, J. 等人, J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M. 等人, Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; 及 Garner, A., Vascular diseases, Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A. 及 Klintworth, G. K. (編), 第2版, Marcel Dekker, New York (1994), 第1625-1710頁)。

此等組合物亦可含有佐劑，諸如防腐劑、濕潤劑、乳化劑及分散劑。上述殺菌程序及藉由包括例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸及其類似物之各種抗細菌劑及抗真菌劑可確保防止存在微生物。組合物中亦可能需要包括諸如糖、氯化鈉及其類似物之等張劑。另外，藉由包括延遲吸收之試劑(諸如單硬脂酸鋁及明膠)可延長可注射醫藥形式之吸收。

不管選擇何種投藥途徑，均可藉由熟習此項技術者已知之習知方法，將本發明化合物(其可以適合之水合形式使用)及/或本發明醫藥組合物調配成醫藥學上可接受之劑型。

本發明醫藥組合物中活性成份之確切劑量可變化，以便

獲得有效實現針對特定患者、組合物及投藥模式之所需治療反應而對患者無毒性的活性成份量。所選劑量將視各種醫藥動力學因素而定，包括：所用本發明之特定組合物之活性；投藥途徑；投藥時間；所用特定化合物之排泄速率；治療持續時間；與所用特定組合物組合使用之其他藥物、化合物及/或物質；所治療之患者之年齡、性別、體重、病狀、一般健康狀況及先前病史；及醫藥技術中熟知之類似因素。

組合物須為無菌的，且在一定程度上為流動的，以使組合物可經由注射器來遞送。除水之外，載劑較佳為經緩衝之等張鹽水溶液。

適當流動性可例如藉由使用諸如卵磷脂之塗層，在分散液情況下藉由維持所需粒徑，及藉由使用界面活性劑來維持。在多種情況下，組合物中較佳包括等張劑，例如糖、多元醇(諸如甘露糖醇或山梨糖醇)及氯化鈉。

如本文所使用，表述「細胞」、「細胞株」及「細胞培養物」可互換使用且所有該等名稱均包括子代。因此，詞語「轉型體」及「轉型細胞」包括原代受檢細胞及源自其之培養物，不考慮轉移次數。亦應瞭解由於存在有意或無意突變，所以所有後代之DNA含量可能並不準確一致。本發明包括具有與針對原始轉型細胞所篩檢相同之功能或生物活性的變異子代。當意欲使用不同名稱時，應自上下文可使人明白該等名稱。

如本文所使用，術語「轉型」係指載體/核酸轉移至宿

主細胞中之過程。若使用不含難以越過之細胞壁障壁的細胞作為宿主細胞，則例如藉由如Graham, F.L.及van der Eb, *Virology* 52 (1973) 456-467所述之磷酸鈣沈澱法進行轉染。然而，亦可使用將DNA引入細胞中之其他方法，諸如核注射或原生質體融合。若使用原核細胞或含有實質細胞壁結構之細胞，則例如一種轉染方法為使用氯化鈣之鈣處理，如Cohen, F. N等人, *PNAS*. 69 (1972) 7110及以後各頁中所述。

如本文所使用，「表現」係指核酸轉錄成mRNA之過程，及/或隨後經轉錄mRNA(亦稱為轉錄物)轉譯成肽、多肽或蛋白質之過程。轉錄物及經編碼多肽統稱為基因產物。若多肽來源於基因組DNA，則在真核細胞中之表現可包括mRNA之剪接。

「載體」為核酸分子，尤其為自我複製之核酸分子，其將插入之核酸分子轉移至宿主細胞中及/或宿主細胞之間。該術語包括：功能主要在於將DNA或RNA插入細胞(例如染色體整合)中之載體；功能主要在於複製DNA或RNA之複製載體；及功能在於轉錄及/或轉譯DNA或RNA之表現載體。亦包括提供一種以上所述功能之載體。

「表現載體」為當引入適宜宿主細胞中時可轉錄並轉譯成多肽之聚核苷酸。「表現系統」通常指包含表現載體之適合宿主細胞，其可用於產生所需表現產物。

提供以下實例、序列表及圖式以幫助理解本發明，本發明之真正範疇闡述於隨附申請專利範圍中。應瞭解，在不

背離本發明精神之情況下，可對所述程序進行修改。

胺基酸序列之描述

SEQ ID NO: 1	重鏈 CDR3， <ANG-2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 2	重鏈 CDR2， <ANG-2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 3	重鏈 CDR1， <ANG-2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 4	輕鏈 CDR3， <ANG-2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 5	輕鏈 CDR2， <ANG-2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 6	輕鏈 CDR1， <ANG-2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 7	重鏈可變域， <ANG-2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 8	輕鏈可變域， <ANG-2>Ang2i_LC06
SEQ ID NO: 9	重鏈 CDR3， <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 10	重鏈 CDR2， <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 11	重鏈 CDR1， <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 12	輕鏈 CDR3， <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 13	輕鏈 CDR2， <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 14	輕鏈 CDR1， <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 15	重鏈可變域， <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 16	輕鏈可變域， <ANG-2>Ang2i_LC07
SEQ ID NO: 17	重鏈 CDR3， <ANG-2>Ang2k_LC08
SEQ ID NO: 18	重鏈 CDR2， <ANG-2>Ang2k_LC08
SEQ ID NO: 19	重鏈 CDR1， <ANG-2>Ang2k_LC08
SEQ ID NO: 20	輕鏈 CDR3， <ANG-2>Ang2k_LC08
SEQ ID NO: 21	輕鏈 CDR2， <ANG-2>Ang2k_LC08
SEQ ID NO: 22	輕鏈 CDR1， <ANG-2>Ang2k_LC08

SEQ ID NO: 23	重鏈可變域， <ANG-2>Ang2k_LC08
SEQ ID NO: 24	輕鏈可變域， <ANG-2>Ang2k_LC08
SEQ ID NO: 25	重鏈 CDR3， <ANG-2>Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 26	重鏈 CDR2， <ANG-2>Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 27	重鏈 CDR1， <ANG-2>Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 28	輕鏈 CDR3， <ANG-2>Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 29	輕鏈 CDR2， <ANG-2>Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 30	輕鏈 CDR1， <ANG-2>Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 31	重鏈可變域， <ANG-2>Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 32	輕鏈可變域， <ANG-2>Ang2s_LC09
SEQ ID NO: 33	重鏈 CDR3， <ANG-2>Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 34	重鏈 CDR2， <ANG-2>Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 35	重鏈 CDR1， <ANG-2>Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 36	輕鏈 CDR3， <ANG-2>Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 37	輕鏈 CDR2， <ANG-2>Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 38	輕鏈 CDR1， <ANG-2>Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 39	重鏈可變域， <ANG-2>Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 40	輕鏈可變域， <ANG-2>Ang2i_LC10
SEQ ID NO: 41	重鏈 CDR3， <ANG-2>Ang2k_LC11
SEQ ID NO: 42	重鏈 CDR2， <ANG-2>Ang2k_LC11
SEQ ID NO: 43	重鏈 CDR1， <ANG-2>Ang2k_LC11
SEQ ID NO: 44	輕鏈 CDR3， <ANG-2>Ang2k_LC11
SEQ ID NO: 45	輕鏈 CDR2， <ANG-2>Ang2k_LC11
SEQ ID NO: 46	輕鏈 CDR1， <ANG-2>Ang2k_LC11

SEQ ID NO: 47	重鏈可變域，<ANG-2>Ang2k_LC11
SEQ ID NO: 48	輕鏈可變域，<ANG-2>Ang2k_LC11
SEQ ID NO: 49	重鏈CDR3，<ANG-2>Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO: 50	重鏈CDR2，<ANG-2>Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO: 51	重鏈CDR1，<ANG-2>Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO: 52	輕鏈CDR3，<ANG-2>Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO: 53	輕鏈CDR2，<ANG-2>Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO: 54	輕鏈CDR1，<ANG-2>Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO: 55	重鏈可變域，<ANG-2>Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO: 56	輕鏈可變域，<ANG-2>Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO: 57	源自IgG1之人類重鏈恆定區
SEQ ID NO: 58	源自IgG4之人類重鏈恆定區
SEQ ID NO: 59	κ輕鏈恆定區
SEQ ID NO: 60	λ輕鏈恆定區
SEQ ID NO: 61	人類Tie-2受體
SEQ ID NO: 62	具有前導序列及His標籤之人類血管生成素-2(ANG-2)
SEQ ID NO: 63	具有前導序列及His標籤之人類血管生成素-1(ANG-1)

實驗程序1

材料及一般方法

有關人類免疫球蛋白輕鏈及重鏈之核苷酸序列的一般信息提供於 Kabat, E.A. 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service,

National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中。抗體鏈之胺基酸根據EU編號來編號及提及(Edelman, G.M.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991))。

重組DNA技術

使用標準方法操作DNA，如 Sambrook, J.等人, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所述。分子生物試劑根據製造商說明來使用。

基因合成

所需基因區段由利用化學合成製得之寡核苷酸製備。藉由寡核苷酸黏接及接合，包括PCR擴增，來組裝側接有單獨限制性核酸內切酶裂解位點之基因區段，且隨後經由所指示之限制性位點(例如 KpnI/SacI或 AscI/PacI)將該等基因區段選殖至基於 pPCRScrip(Stratagene)之 pGA4選殖載體中。藉由DNA定序分析確定經次選殖之基因片段之DNA序列。根據 Geneart(Regensburg, Germany)所給之說明書安排基因合成片段。

DNA序列測定

藉由在 MediGenomix GmbH(Martinsried, Germany)或 Sequiserve GmbH(Vaterstetten, Germany)進行之雙股定序分析來測定DNA序列。

DNA及蛋白質序列分析以及序列資料管理

使用 GCG(Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin)之套裝軟體 10.2 版及 Infomax 之 Vector NT1 Advance套裝 8.0版建立序列、繪圖、分析、註解及說明。

表現載體

為表現所述抗體，應用基於具有CMV-內含子A啟動子之cDNA結構或具有CMV啟動子之基因組結構(例如圖1)進行短暫表現(例如在HEK293 EBNA或HEK293-F細胞中)或穩定表現(例如在CHO細胞中)的表現質體之變異體。

除抗體表現卡匣外，載體亦含有：

- 複製起點，其允許此質體在大腸桿菌中複製，及
- β -內醯胺酶基因，其使大腸桿菌對安比西林(ampicillin)具有抗性。

抗體基因之轉錄單元由以下元件構成：

- 5'端獨特限制性位點，
- 人類細胞巨大病毒之即刻早期增強子及啟動子，
- 在cDNA結構之情況下繼之以內含子A序列，
- 人類抗體基因之5'-非轉譯區，
- 免疫球蛋白重鏈信號序列，
- 呈具有免疫球蛋白外顯子-內含子結構之cDNA或基因組結構的人類抗體鏈(重鏈、經修飾重鏈或輕鏈)，
- 具有聚腺苷酸化信號序列之3'非轉譯區，及
- 3'端獨特限制性位點。

藉由PCR及/或基因合成來產生如下所述之包含所選抗體

重鏈序列之融合基因，且利用已知之重組方法及技術，藉由例如使用基因組重鏈載體中之獨特NsiI及EcoRI位點連接相應核酸區段進行組裝。藉由DNA定序分析驗證經次選殖之核酸序列。藉由質體製劑由經轉型大腸桿菌培養物製備大量質體用於短暫及穩定轉染(Nucleobond AX, Macherey-Nagel)。

細胞培養技術

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

HEK293-F系統之短暫轉染

根據製造商說明，使用HEK293-F系統(Invitrogen)，藉由使分別編碼重鏈或經修飾重鏈及相應輕鏈之兩種質體進行短暫轉染，來產生抗體。簡言之，利用兩種各別表現質體與293fectin或fectin轉染試劑(Invitrogen)之混合物轉染在搖瓶中或在經攪拌發酵罐中於無血清FreeStyle 293表現培養基(Invitrogen)中懸浮生長的HEK293-F細胞(Invitrogen)。對於例如2 L搖瓶(Corning)，以 1.0×10^6 個細胞/毫升(共600 mL)之密度接種HEK293-F細胞，且在120 rpm、8% CO₂下培育。次日，用約42 mL以下混合物轉染細胞密度為約 1.5×10^6 個細胞/毫升之細胞：A)20 mL Opti-MEM(Invitrogen)與600 µg等莫耳比率之分別編碼重鏈或經修飾重鏈及相應輕鏈之總質體DNA(1 µg/mL)的混合物；

及B)20 ml Opti-MEM+1.2 mL 293 fectin或fectin轉染試劑(2 μ l/mL)。根據葡萄糖消耗，在發酵過程中添加葡萄糖溶液。5-10天後收集含有所分泌抗體之上清液，且自上清液中直接純化抗體，或將上清液冷凍並儲存。

蛋白質測定

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

上清液中抗體濃度之測定

藉由利用蛋白質 A 瓊脂糖-珠粒(Roche)進行之免疫沈澱法估算細胞培養物上清液中抗體及衍生物之濃度。在 TBS-NP40(50 mM Tris(pH 7.5)、150 mM NaCl、1% Nonidet-P40)中洗滌 60 μ L 蛋白質 A 瓊脂糖珠粒 3 次。隨後，將 1-15 mL 細胞培養物上清液施加至在 TBS-NP40 中預先平衡之蛋白質 A 瓊脂糖珠粒中。在室溫下培育 1 小時後，在 Ultrafree-MC-過濾管柱(Amicon)上用 0.5 mL TBS-NP40 洗滌珠粒 1 次，用 0.5 mL 2 $\times$ 磷酸鹽緩衝鹽水(2 $\times$ PBS, Roche)洗滌 2 次，且用 0.5 mL 100 mM 檸檬酸鈉(pH 5.0)簡單洗滌 4 次。藉由添加 35 μ l NuPAGE® LDS 樣本緩衝液溶離結合之抗體。將一半樣本分別與 NuPAGE® 樣本還原劑組合或保持未還原，且在 70°C 下加熱 10 分鐘。隨後，施加 20 μ l 至 4-12% NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE(Invitrogen)(對於非還原性 SDS-PAGE，利用 MOPS 緩衝液；及對於還原性 SDS-

PAGE，利用具有 NuPAGE® 抗氧化劑電泳緩衝液添加劑 (Invitrogen) 之 MES 緩衝液) 中，且用考馬斯藍 (Coomassie Blue) 染色。

藉由蛋白質 A-HPLC 層析法測量細胞培養物上清液中抗體及衍生物之濃度。簡言之，將含有結合蛋白質 A 之抗體及衍生物的細胞培養物上清液隨 50 mM K_2HPO_4 、300 mM NaCl (pH 7.3) 施加至 HiTrap 蛋白質 A 管柱 (GE Healthcare)，且在 Dionex HPLC 系統上利用 50 mM 乙酸 (pH 2.5) 自基質溶離。藉由 UV 吸光度及峰面積積分定量所溶離之蛋白質。使用經純化之標準 IgG1 抗體作為標準物。

或者，藉由夾心式 IgG-ELISA 測量細胞培養物上清液中抗體及衍生物之濃度。簡言之，在室溫下用每孔 100 μ L 之 0.1 μ g/mL 經生物素標記之抗人類 IgG 捕捉分子 F(ab')₂<hFcy>BI (Dianova) 塗布 StreptaWell 高結合抗生蛋白鏈菌素 A (High Bind Streptavidin A)-96 孔微量滴定盤 (Roche) 並保持 1 小時，或者在 4°C 下塗布並保持隔夜，且隨後用 200 微升/孔 PBS、0.05% Tween (PBST, Sigma) 洗滌 3 次。將 100 微升/孔含有各別抗體之細胞培養物上清液於 PBS (Sigma) 中之連續稀釋液添加至各孔中，且在室溫下於微量滴定盤震盪器上培育 1-2 小時。用 200 微升/孔 PBST 洗滌各孔 3 次，且在室溫下於微量滴定盤震盪器上，使用 100 μ l 0.1 μ g/mL 之 F(ab')₂<hFcy>POD (Dianova) 作為偵測抗體來偵測結合之抗體，歷時 1-2 小時。用 200 微升/孔 PBST 洗滌 3 次，洗去未結合之偵測抗體，且藉由添加每孔 100 微升 ABTS 偵測經結

合偵測抗體。在Tecan Fluor分光計上，於405 nm之測量波長(參比波長492 nm)下測定吸光度。

蛋白質純化

參照標準方案，自經過濾之細胞培養物上清液中純化蛋白質。簡言之，施加抗體至蛋白質A瓊脂糖管柱(GE Healthcare)且用PBS洗滌。在酸性pH值下溶離抗體，隨後立即中和樣本。藉由尺寸排阻層析法(Superdex 200, GE Healthcare)，在20 mM組胺酸、140 mM NaCl(pH 6.0)中使聚集蛋白質與單體抗體分離。彙集單體抗體溶離份，視需要使用例如MILLIPORE Amicon Ultra(30 MWCO)離心濃縮器濃縮，且儲存於-80°C下。一部分樣本用於隨後例如藉由SDS-PAGE、尺寸排阻層析法、質譜法及內毒素測定法進行蛋白質分析及分析表徵(參看圖2)。

SDS-PAGE

根據製造商說明，使用NuPAGE®預製凝膠系統(Pre-Cast gel system)(Invitrogen)。詳言之，使用4-20% NuPAGE® Novex® TRIS-甘胺酸預製凝膠及Novex® TRIS-甘胺酸SDS電泳緩衝液。(例如參看圖1)。藉由在凝膠上跑膠之前添加NuPAGE®樣本還原劑來還原樣本。

分析型尺寸排阻層析

利用HPLC層析法進行尺寸排阻層析以測定抗體之聚集及寡聚狀態。簡言之，將經蛋白質A純化之抗體隨300 mM NaCl、50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.5)施加至Dionex HPLC系統上之Tosoh TSKgel G3000SW管柱中，或將其隨

2×PBS施加至Dionex HPLC系統上之Superdex 200管柱(GE Healthcare)中。藉由UV吸光度及峰面積積分定量經溶離蛋白質。使用BioRad凝膠過濾標準物151-1901作為標準物。

質譜法

經由電噴霧電離質譜法(ESI-MS)測定並證實抗體之總去糖基化重量。簡言之，在37°C下，在100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7)中用50 mU N-糖苷酶F(PNGaseF, ProZyme)使100 µg蛋白質濃度高達2 mg/ml之經純化抗體脫去糖基，歷時12-24小時，且隨後在Sephadex G25管柱(GE Healthcare)上經由HPLC去鹽。在脫去糖基及還原後，利用ESI-MS測定各別重鏈及輕鏈之質量。簡言之，用60 µl 1M TCEP及50 µl 8 M鹽酸胍培育50 µg抗體(115 µl)，隨後去鹽。在裝備有NanoMate源之Q-Star Elite MS系統上，經由ESI-MS測定總質量及經還原重鏈及輕鏈之質量。

ANG-1及ANG-2結合ELISA

在ELISA檢定中，利用全長血管生成素-2-His蛋白質(R&D Systems #623-AN/CF，或實驗室自製物質)或血管生成素-1-His(R&D systems #923-AN)來評估針對ANGPT(血管生成素1或2)之抗體的結合特性。因此，在室溫下用100 µl 1 µg/mL重組人類血管生成素-1或血管生成素-2(無載劑)之PBS(Sigma)溶液塗布96孔盤(Falcon聚苯乙烯透明增強型微量滴定盤或Nunc Maxisorb)並保持2小時，或在4°C下塗布並保持隔夜。用300 µl PBST(0.2% Tween 20)洗滌各孔3次，且在室溫下用200 µl 2% BSA、0.1% Tween 20阻斷30

分鐘，且隨後用 300 μ l PBST洗滌3次。將100微升/孔針對<ANG-2>之經純化測試抗體於PBS中之連續稀釋液(40 pM-0.01 pM)及作為參比物之Mab536(Oliner, J.等人, Cancer Cell. 11月6日 (2004) 507-16, US 2006/0122370)於PBS中之連續稀釋液添加至各孔中，且在室溫下於微量滴定盤震盪器上培育1小時。用300 μ l PBST(0.2% Tween 20)洗滌各孔3次，且在室溫下，於微量滴定盤震盪器上，使用每孔100微升之於2% BSA、0.1% Tween 20中的0.1 μ g/ml F(ab')₂-HRP(POD(Biozol目錄號206005)作為偵測抗體來偵測經結合抗體，歷時1小時。用300微升/孔PBST洗滌3次，洗去未結合之偵測抗體，且藉由每孔添加100微升ABTS來偵測經結合偵測抗體。在Tecan Fluor分光計上，於405 nm之測量波長(參比波長492 nm)下測定吸光度。

ANG-2結合BIACORE

使用BIACORE T100儀(GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden)，藉由表面電漿共振法研究抗體與抗原(例如人類ANG-2)之結合。簡言之，為測量親和力，經由胺偶合將山羊 α -IgG-Fc γ 多株抗體固定於CM4晶片上以呈現針對人類ANG-2之抗體。在25 $^{\circ}$ C下於HBS緩衝液(HBS-P(10 mM HEPES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20, pH 7.4))中測量結合。添加在0.41 nM與200 nM之間的各種濃度之經純化ANG-2-His(R&D systems或實驗室自純化)溶液。藉由經3分鐘注射ANG-2來測量締合；藉由用HBS緩衝液洗滌晶片表面5分鐘來測量解離，且使用1:1朗繆爾結

合模型(Langmuir binding model)估算KD值。由於ANG-2製劑非均質，所以未觀察到1:1結合；因此，KD值僅為相對估算值。自樣本曲線中減去陰性對照資料(例如緩衝液曲線)以修正系統固有之基線漂移且減少雜訊。使用Biacore T100評估軟體1.1.1版分析感測器圖譜並計算親和力數據。或者，可經由經胺偶合固定於CM5晶片(無BSA)上之PentaHis抗體(無BSA之PentaHis-抗體，Qiagen編號34660)以2000-1700 RU之捕捉程度來捕捉Ang-2(參看下文)。

抑制 huANG-2 與 Tie-2 結合 (ELISA)

在室溫下在384孔微量滴定盤(MicroCoat, DE, 目錄號464718)上進行相互作用ELISA。各培育步驟後，用PBST洗滌各盤3次。用0.5 µg/ml Tie-2蛋白(R&D Systems, UK, 目錄號313-TI)塗布ELISA盤，保持至少2小時(h)。此後，用補充有0.2% Tween-20及2% BSA(Roche Diagnostics GmbH, DE)之PBS阻斷各孔1小時。在室溫下，將經純化抗體於PBS中之稀釋液與0.2 µg/ml人類血管生成素-2(R&D Systems, UK, 目錄號623-AN)一起培育1小時。洗滌後，添加0.5 µg/ml生物素標記之抗血管生成素-2純系BAM0981(R&D Systems, UK)與1:3000稀釋之抗生蛋白鏈菌素HRP(Roche Diagnostics GmbH, DE, 目錄號11089153001)的混合物，保持1小時。此後用PBST洗滌各盤6次。在室溫下，用新製ABTS試劑(Roche Diagnostics GmbH, DE, 緩衝液#204 530 001, 錠劑#11 112 422 001)顯現培養盤，歷時30分鐘。在405 nm下測量吸光度。

抑制 huANG-1與 Tie-2結合 (ELISA)

在室溫下在384孔微量滴定盤(MaxiSorb Nunc#442768)上進行相互作用ELISA。各培育步驟後，用PBST洗滌各盤3次。用0.5 µg/ml Tie-2蛋白(R&D Systems, UK, 目錄號313-TI, 或實驗室自製物質)塗布ELISA盤，保持至少2小時(h)。此後，用補充有0.2% Tween-20及2% BSA(Roche Diagnostics GmbH, DE)之PBS阻斷各孔1小時。在室溫下，將經純化抗體於PBS中之稀釋液與0.2 µg/ml人類血管生成素-1(R&D Systems #923-AN/CF, 或實驗室自製物質)一起培育1小時。洗滌後，添加0.5 µg/ml生物素標記之抗血管生成素-1純系(R&D Systems #BAF923)與1:3000稀釋之抗生蛋白鏈菌素HRP(Roche Diagnostics GmbH, DE, 目錄號11089153001)的混合物，保持1小時。此後用PBST洗滌各盤6次。在室溫下，用新製ABTS試劑(Roche Diagnostics GmbH, DE, 緩衝液#204 530 001, 錠劑#11 112 422 001)顯現培養盤，歷時30分鐘。在405 nm下測量吸光度。

產生 HEK293-Tie2細胞株

為測定血管生成素-2抗體對ANGPT2刺激之Tie2磷酸化及ANGPT2與細胞上Tie2之結合的干擾，產生重組HEK293-Tie細胞株。簡言之，使用Fugene(Roche Applied Science)作為轉染試劑，將在CMV啟動子及新黴素(Neomycin)抗性標誌物控制下編碼全長人類Tie2(SEQ ID 61)之基於pcDNA3之質體(RB22-pcDNA3 Topo hTie2)轉染至HEK293細胞(ATCC)中，且在含10% FCS、500 µg/ml

G418之DMEM中選擇抗性細胞。經由選殖柱分離個別純系，且隨後利用FACS分析Tie2表現。純系22被鑑別為甚至在無G418下仍具有高且穩定之Tie2表現的純系(HEK293-Tie2純系22)。隨後使用HEK293-Tie2純系22進行細胞檢定：ANGPT2誘導之Tie2磷酸化及ANGPT2細胞配位體結合檢定。

ANGPT2誘導之Tie2磷酸化的檢定

根據以下檢定原理，測量ANGPT2抗體對ANGPT2誘導之Tie2磷酸化的抑制。在ANGPT2抗體不存在或存在下，用ANGPT2刺激HEK293-Tie2純系22歷時5分鐘，且由夾心式ELISA定量P-Tie2。簡言之，使每孔 2×10^5 個HEK293-Tie2純系22細胞在塗布聚D-離胺酸之96孔微量滴定盤上於100 μ l含10% FCS、500 μ g/ml遺傳黴素(Geneticin)之DMEM中生長隔夜。次日，在微量滴定盤中製備一滴定列之ANGPT2抗體(4倍濃縮，每孔75 μ l最終體積，一式兩份)，且與75 μ l ANGPT2(R&D systems # 623-AN)稀釋液(3.2 μ g/ml，4倍濃縮溶液)混合。抗體及ANGPT2在室溫預培育15分鐘。100 μ l混合物加入HEK293-Tie2純系22細胞(與1 mM NaV_3O_4 ，Sigma #S6508一起預培育5分鐘)中，且在37°C培育5分鐘。隨後，用每孔200 μ l冰冷PBS+1 mM NaV_3O_4 洗細胞，且在冰上由每孔添加120 μ l溶解緩衝液(20 mM Tris(pH 8.0)、137 mM NaCl、1% NP-40、10%甘油、2 mM EDTA、1 mM NaV_3O_4 、1 mM PMSF及10 μ g/ml抑肽酶(Aprotinin))溶解。在4°C在微量滴定盤震盪器上溶

解細胞30分鐘，且不預先離心及不測定總蛋白質，將100 μ l溶解產物直接轉移至p-Tie2 ELISA微量滴定盤(R&D Systems, R&D #DY990)中。根據製造商說明定量P-Tie2之量，且使用Excel之XLfit4分析插件(XLfit4 analysis plugin)(劑量反應單點分析模型205)測定抑制之IC50值。可比較一個實驗內之IC50值，但其可隨各實驗而變化。

ANGPT1誘導之Tie2磷酸化的檢定

根據以下檢定原理，測量ANGPT1抗體對ANGPT1誘導之Tie2磷酸化的抑制。在ANGPT1抗體不存在或存在下，用ANGPT1刺激HEK293-Tie2純系22歷時5分鐘，且由夾心式ELISA定量P-Tie2。簡言之，使每孔 2×10^5 個HEK293-Tie2純系22細胞在塗布聚D-離胺酸之96孔微量滴定盤上於100 μ l含10% FCS、500 μ g/ml遺傳黴素之DMEM中生長隔夜。次日，在微量滴定盤中製備一滴定列之ANGPT1抗體(4倍濃縮，每孔75 μ l最終體積，一式兩份)，且與75 μ l ANGPT1(R&D systems # 923-AN)稀釋液(0.8 μ g/ml，4倍濃縮溶液)混合。抗體及ANGPT1在室溫預培育15分鐘。添加100 μ l混合物至HEK293-Tie2純系22細胞(與1 mM NaV_3O_4 , Sigma #S6508一起預培育5分鐘)中，且在37°C下培育5分鐘。隨後，用每孔200 μ l冰冷PBS+1 mM NaV_3O_4 洗滌細胞，且藉由在冰上每孔添加120 μ l溶解緩衝液(20 mM Tris(pH 8.0)、137 mM NaCl、1% NP-40、10%甘油、2 mM EDTA、1 mM NaV_3O_4 、1 mM PMSF及10 μ g/ml抑肽酶)進行溶解。在4°C下，在微量滴定盤震盪器上溶解細胞30分

鐘，且在不預先離心及不測定總蛋白質之情況下，將100 μ l溶解產物直接轉移至p-Tie2 ELISA微量滴定盤(R&D Systems, R&D #DY990)中。根據製造商說明來定量P-Tie2之量，且使用Excel之XLfit4分析插件(劑量反應單點分析模型205)測定抑制之IC50值。可比較一個實驗內之IC50值，但其可隨實驗不同而變化。

實例1

單株 <ANG-2> 抗體 Ang2i-LC06、Ang2i-LC07及 Ang2k-LC08之表現及純化

如上所述，在表現載體中構築相應抗體Ang2i-LC06、Ang2i-LC07及Ang2k-LC08之輕鏈及重鏈。將重鏈及 κ 輕鏈選殖至基因組表現卡匣中，而選殖具有內含子A之 λ 輕鏈作為cDNA(圖1B)。在大腸桿菌中擴增質體，純化且隨後轉染至HEK293-F細胞(利用Invitrogen之FreeStyle 293系統)中以短暫表現重組蛋白。7天後，收穫HEK 293-F細胞上清液，過濾且藉由蛋白質A及尺寸排阻層析來純化抗體。藉由在非還原及還原條件下進行之SDS-PAGE，及分析型尺寸排阻層析來確定所有抗體之均質性。在還原條件下(圖1)，<ANG-2>抗體之多肽重鏈在SDS-PAGE後顯示約50 kDa之表觀分子尺寸，類似於所計算之分子量；多肽輕鏈顯示25 kDa之表觀分子質量(根據其預計尺寸)。質譜確定經純化抗體一致。藉由蛋白質A HPLC分析所有構築體之表現量。

經純化抗體之尺寸排斥層析分析。類似於所述程序，製

備所有抗體並分析表徵。相應抗體之SEC資料概述於下表中。

	抗體鏈	理論質量(Da)	實驗質量(Da)	主峰SEC(%)
<ANG-2>Ang-2i_LC07	HC	50343	50325(焦麩胺酸)	99.7%
	LC	22738	22720(焦麩胺酸)	
<ANG-2>Ang-2i_LC06	HC	50343	50325(焦麩胺酸)	99.8%
	LC	22620	22605(焦麩胺酸)	
<ANG-2>Ang-2k_LC08	HC	49544	49527(焦麩胺酸)	99.8%
	LC	22685	22667(焦麩胺酸)	

實例 2

結合人類 ANG-1 及人類 ANG-2 之 ELISA 結合檢定

如上所述，在 ANG-1 或 ANG-2 結合 ELISA 中測定 <ANG-2> 抗體 Ang2i-LC06、Ang2i-LC07 及 Ang2k-LC08 與人類 ANG-1 及人類 ANG-2 之結合。簡言之，ELISA 型檢定係基於將人類野生型血管生成素-1 或-2 固定於微量滴定盤中。經由結合 POD 之 <人類 Fc> (抗 IgG) 抗體測量針對經固定 ANG-1 或 ANG-2 之抗體之結合。<ANG-2> 抗體之連續稀釋液允許測定 EC50 濃度。使用人類抗 ANG-2 抗體 <ANG-2> 抗體 Mab536 (Oliner 等人, Cancer Cell. 11 月 6 日 (2004) 507-16, US 2006/0122370) 作為參照物。所測定之 EC50 濃度概述於下表中。

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

所有抗體均與 ANG-2 特異性結合。MAb536 及 Ang2k-LC08 亦顯示與 ANG-1 特異性結合，而由於 Ang2i-LC06 及 Ang2i-LC07 具有高於 8000 ng/ml(偵測界限)之 EC50 值，故其不與 ANG-1 特異性結合。

實例 3：

經由 Biacore 測定與 ANG-2 之結合

如上文所述，利用 Biacore 檢定檢查與人類 ANGPT2 結合之親和力。簡言之，在此檢定中，將捕捉抗體(抗Fc)固定於 Biacore 晶片表面，其捕捉並呈現相應抗體(例如 Ang2i-LC06)。自溶液中捕捉配位體(此處為 ANGPT2)。假定 1:1 相互作用，測定此相互作用之親和力。在一般方法部分中可瞭解此實驗之詳情。所測定之關於 ANGPT2 結合之親和力(KD)概述於下表中。

hAng-2	實驗1			實驗2			平均值 (由1+2得到)	
	KD (pM)	kd(1/s)	t _(1/2) 解離 (min)	KD (pM)	kd(1/s)	t _(1/2) 解離 (min)	KD(pM)	t _(1/2) 解離 (min)
Ang2i-LC06	11	7.16E-05	161	21	1.14E-04	102	16	132
Ang2k-LC08	16	1.61E-04	72	27	2.28E-04	51	22	61
MAb536	29	1.44E-04	80	29	1.25E-04	92	29	86

抗體 Ang2i-LC06及 Ang2k以高親和力與 ANGPT2結合。

實例 4：

中和 ANGPT1/2-Tie2之相互作用(人類)

利用受體相互作用 ELISA 顯示對人類 ANGPT1/2/人類 Tie2之相互作用的阻斷。在室溫下，用 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 人類 Tie2(R&D Systems, UK, 目錄號 313-TI, 或實驗室自製物質)塗布 384孔 Maxisorp 盤(Nunc)並保持 2 小時，且在室溫下，於震盪下，用補充有 0.2% Tween-20及 2% BSA(Roche Diagnostics GmbH, DE)之 PBS 阻斷 1 小時。同時，在室溫下將經純化抗體於 PBS 中之稀釋液與 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 人類血管生成素-1/2(R&D Systems #923-AN/CF, R&D Systems, UK, 目錄號 623-AN, 或實驗室自製物質)一起培育 1 小時。洗滌後，添加 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 生物素標記之抗血管生成素-1/2純系(R&D Systems #BAF923, BAM0981 R&D Systems, UK)與 1:3000 稀釋之抗生蛋白鏈菌素 HRP(Roche Diagnostics GmbH, DE, 目錄號 11089153001)的混合物，保持 1 小時。此後用 PBST 洗滌培養盤 6 次。在室溫下，用新製 ABTS 試劑(Roche Diagnostics GmbH, DE, 緩衝液 #204 530 001, 錠劑 #11 112 422 001)顯現培養盤，歷時 30 分鐘。在 405 nm 下測量吸光度。

所得抑制濃度概述於下表中。

抗體	ANGPT1/Tie2 相互作用 ELISA	ANGPT2/Tie2 相互作用 ELISA
Ang2i-LC06	>100 nM	0.1 nM
Ang2k-LC08	11 nM	0.17 nM
MAb536	無數據	0.15 nM

上表顯示兩種抗體 Ang2i-LC06 及 Ang2k-LC08 之不同選擇性概況。在對 ANGPT1/2 Tie2 相互作用之抑制中，Ang2i-LC06 具 ANGPT2 選擇性，而 Ang2k-LC08 具 ANGPT1/2 交叉反應性。

實例 5：

Tie2 磷酸化

在如上所述之 ANGPT2 及 ANGPT1 誘導之 Tie2 磷酸化檢定中檢驗經鑑別 ANGPT2 抗體干擾 ANGPT2 及 ANGPT1 介導之 Tie2 磷酸化的能力。檢定設置之示意圖描述於圖 3 中。

如圖 4 中所示，抗體 Ang2i-LC06 與 Ang2k-LC08 顯示對 ANGPT2 刺激之 Tie2 磷酸化之劑量依賴性干擾，且其 IC₅₀ 值相當。Ang2i-LC06 以約 508 ng/ml 之 IC₅₀ 值干擾 ANGPT2 刺激之 Tie2 磷酸化，且 Ang2k-LC08 以約 499 ng/ml 之 IC₅₀ 值干擾 ANGPT2 刺激之 Tie2 磷酸化。相比之下，僅 Ang2k-LC08 以約 391 ng/ml 之 IC₅₀ 值干擾 ANGPT1 刺激之 Tie2 磷酸化，而在相同測試濃度範圍中，Ang2i-LC06 不干擾 ANGPT2 刺激之 Tie2 磷酸化(圖 5)。

實例 6：活體內功效

抗 ANGPT 抗體對 Colo205 異種移植物生長之影響

在分期皮下 Colo205 異種移植物模型中 <ANGPT2> 抗體 Ang2i-LC06 及 Ang2k-LC08 相較於 <ANGPT2> Mab536 之活體內功效

在雌性 Scid 米色小鼠之分期皮下 Colo205 異種移植物模型 (Ang2_PZ_Colo205_006) 中，將經純化 Ang2i-LC06 及

Ang2k-LC08抗體與抗體Mab536相比較。

抗體：Mab536以於20 mM組胺酸、140 mM NaCl(pH 6.0)中之冷凍儲備溶液($c=4.5$ mg/mL)形式提供，Ang2i-LC06及Ang2k-LC08以於20 mM組胺酸、140 mM NaCl(pH 6.0)中之冷凍儲備溶液($c=1$ mg/mL)形式提供。注射前視需要要用PBS適當稀釋來自儲備溶液之抗體溶液，且PBS用作媒劑。人類化IgG1抗IgE抗體柯耐爾(Xolair)(奧馬珠單抗(Omalizumab))用作陽性對照且自藥房購得。

細胞株及培養條件：Colo205人類結腸直腸癌細胞最初自ATCC獲得，且在擴增後寄存於Roche Penzberg之內部細胞庫中。在37°C下於含5% CO₂之濕潤氛圍中，在補充有10%胎牛血清(PAA Laboratories, Austria)及2 mM L-麩胺醯胺之RPMI 1640培養基(PAA, Laboratories, Austria)中常規培養腫瘤細胞株。第3代用於移植。

動物：根據約定準則(GV-Solas; Felasa; TierschG)，在無特定病原體之條件下，利用12小時白天/12小時黑夜之日循環維持雌性SCID米色小鼠(購自Charles River Germany)。實驗研究方案經當地政府審查並獲得批准。動物到達後，維持在動物設施之檢疫區中1週以使其適應新環境且進行觀察。持續定期監測健康狀況。提供飲食(Provimi Kliba 3337)及水(酸性，pH 2.5-3)，讓其隨意取食。研究開始時，小鼠年齡為約12-14週。

監測：每日針對臨床症狀及副作用偵測對動物進行控制。為監測整個實驗過程，記錄動物體重且在分期後利用

測徑規測量腫瘤體積。

腫瘤細胞注射：注射當天，離心 Colo205細胞，洗滌1次且再懸浮於PBS中。再用PBS洗滌之後，使用細胞計數器及分析系統(Vi-CELL, Beckman Coulter)測定細胞濃度及細胞尺寸。對於Colo205細胞之注射，將最終滴定濃度調至 5.0×10^7 個細胞/毫升，生存率為約90%。隨後，將100 μ l相當於每隻動物 2.5×10^6 個細胞之此懸浮液經皮下(s.c.)注射至小鼠右肋中。

動物處理：動物處理始於隨機選擇當天，即細胞移植(研究 Ang2_PZ_Colo205_006)後16天平均腫瘤體積為178 mm^3 時。

研究 Ang2_PZ_Colo205_006之給藥時程：

組	動物數目	化合物	劑量 (mg/kg)	投藥途徑/模式	處理 數目	累積劑量 (mg/kg)
1	10	媒劑		腹膜內，每週一次	5	
2	10	柯耐爾	10	腹膜內，每週一次	5	50
3	10	Ang2i-LC06	10	腹膜內，每週一次	5	50
5	10	Ang2k-LC08	10	腹膜內，每週一次	5	50
6	10	MAB536	10	腹膜內，每週一次	5	50

至第50天時腫瘤生長之抑制顯示於圖6中。資料顯示ANGPT2選擇性抗體Ang2i-LC06為最具活性之抗體(腫瘤控制率(TCR)值為0.39)。Ang2i-LC06抑制腫瘤生長比抗體MAB536(TCR值為0.47)及ANGPT2選擇性之ANGPT1交叉反應性抗體Ang2k-LC08(TCR值為0.46)有效。

抗 ANGPT 抗體對 KPL-4 異種移植物生長之影響

在分期正位 KPL-4 異種移植物模型中 <ANGPT2> 抗體 Ang2i-LC06 及 Ang2k-LC08 相較於 <ANGPT2> Mab536 之活體內功效

在雌性 Scid 米色小鼠之分期正位 KPL-4 異種移植物模型 (Ang2_PZ_KPL-4_002) 中，將經純化 Ang2i-LC06 及 Ang2k-LC08 抗體與抗體 Mab536 相比較。

抗體：Mab536 以於 20 mM 組胺酸、140 mM NaCl (pH 6.0) 中之冷凍儲備溶液 (c=4.5 mg/mL) 形式提供，Ang2i-LC06 及 Ang2k-LC08 以於 20 mM 組胺酸、140 mM NaCl (pH 6.0) 中之冷凍儲備溶液 (c=1 mg/mL) 形式提供。注射前視需要用 PBS 適當稀釋來自儲備溶液之抗體溶液，且 PBS 用作媒劑。

細胞株及培養條件：KPL-4 人類乳癌細胞最初自出現發炎性皮膚轉移之乳癌患者的惡性胸腔積液產生。KPL-4 細胞由 J. Kurebayashi 教授 (Kawasaki Medical School, Kurashiki, Japan) 友情提供。在 37°C 下於含 5% CO₂ 之濕潤氛圍中，在補充有 10% 胎牛血清 (PAN Biotech, Germany) 及 2 mM L-麩胺醯胺 (PAN Biotech, Germany) 之 DMEM 培養基 (PAN Biotech, Germany) 中常規培養腫瘤細胞。利用胰蛋白酶/EDTA 1x (PAN) 進行繼代培養，每週分裂三次。

動物：根據約定準則 (GV-Solas; Felasa; TierschG)，在無特定病原體之條件下，利用 12 小時白天/12 小時黑夜之日循環維持雌性 SCID 米色小鼠 (購自 Charles River

Germany)。實驗研究方案經當地政府審查並獲得批准。動物到達後，維持在動物設施之檢疫區中1週以使其適應新環境且進行觀察。持續定期監測健康狀況。提供飲食(Provimi Kliba 3337)及水(酸性，pH 2.5-3)，讓其隨意取食。研究開始時，小鼠年齡為約12週。

監測：每日針對臨床症狀及副作用偵測對動物進行控制。為監測整個實驗過程，記錄動物體重且在分期後利用測徑規測量腫瘤體積。

腫瘤細胞注射：注射當天，自培養瓶(Greiner TriFlask)中收穫腫瘤細胞(胰蛋白酶-EDTA)，並轉移至50 ml培養基中，洗滌1次且再懸浮於PBS中。再用PBS進行洗滌步驟並過濾(細胞濾網；Falcon™；100 μ m)後，將最終細胞滴定濃度調至 1.5×10^8 個細胞/毫升。用移液吸管小心地混合腫瘤細胞懸浮液以避免細胞聚集。在密閉循環系統中，使用具有預培育室(譜萊玻璃(plexiglas))、個別小鼠鼻罩(矽)及不易燃或爆炸之麻醉化合物異氟醚(Pharmacia-Upjohn, Germany)的供小動物用之斯蒂芬吸入單元(Stephens's inhalation unit)進行麻醉。注射前之2天，剔去動物毛皮。對於腹位乳房脂肪墊(i.m.f.p.)注射，將體積為20 μ l(3×10^6 個細胞/動物)之細胞正位注射至各麻醉小鼠之右側倒數第二個腹位乳房脂肪墊中。對於正位移植，使用Hamilton微升注射器及30Gx1/2"針經由乳頭下之皮膚注射細胞懸浮液。

動物處理始於隨機選擇60-180 mm³範圍內之腫瘤當天，

即細胞移植(研究 Ang2_PZ_KPL-4_002)後35天平均腫瘤體積為約 90 mm³時。

研究 Ang2_PZ_KPL-4_002之給藥時程：

組	動物數目	化合物	劑量(mg/kg)	投藥途徑/模式	處理數目	累積劑量(mg/kg)
1	10	媒劑		腹膜內，每週一次	5	
2	10	柯耐爾	10	腹膜內，每週一次	5	50
3	10	Ang2i-LC06	10	腹膜內，每週一次	5	50
5	10	Ang2k-LC08	10	腹膜內，每週一次	5	50
6	10	MAB536	10	腹膜內，每週一次	5	50

至第64天時腫瘤生長之抑制顯示於圖7中。資料顯示ANGPT2選擇性抗體 Ang2i-LC06為KPL-4模型中最具活性之抗體(TCR值為0.55)。Ang2i-LC06抑制腫瘤生長比抗體MAb536(TCR值為0.57)及ANGPT2選擇性之ANGPT1交叉反應性抗體 Ang2k-LC08(TCR值為0.57)有效。

實例7：

經由Biacore測定與ANG-1之結合

利用Biacore檢定檢查與人類ANG-1結合之親和力：使用胺偶合化學將huAng-1固定於CM5生物感測晶片上。以5 µl/min之流速注射於乙酸鈉(pH 4.5)中10 µg/ml之蛋白質，歷時20分鐘。此產生約20000 RU之表面密度。在相同條件下固定BSA作為參考流槽。用HBS-P將抗體稀釋至100 nM且經3分鐘注射(締合期)。用電泳緩衝液洗滌3分鐘(解離期)後，藉由以5 µl/min經1分鐘注射10 mM氫氧化鈉來恢

復表面。結果顯示於圖8中：Ang2k_LC08具有約50秒之複合物解離半衰期，Ang2i_LC06為約5秒，且Ang2i_LC10未顯示與ANG-1結合。

實例8：預防具有原發性腫瘤之活體內癌轉移/繼發性腫瘤

a)預防異種移植原發性Colo205腫瘤之小鼠體內之癌轉移/繼發性腫瘤

細胞株及培養條件：

Colo205人類結腸直腸癌細胞最初自ATCC獲得，且在擴增後寄存於Roche Penzberg之內部細胞庫中。在37°C下於含5% CO₂之濕潤氛圍中，在補充有10%胎牛血清(PAA Laboratories, Austria)及2 mM L-麩胺鹽胺之RPMI 1640培養基(PAA, Laboratories, Austria)中常規培養腫瘤細胞株。第3代用於移植。

動物：

根據約定準則(GV-Solas; Felasa; TierschG)，在無特定病原體之條件下，利用12小時白天/12小時黑夜之日循環維持到達時4-5週齡之雌性SCID米色小鼠(購自Charles River Germany)。實驗研究方案經當地政府審查並獲得批准。動物到達後，維持在動物設施之檢疫區中1週以使其適應新環境且進行觀察。持續定期監測健康狀況。提供飲食(Provimi Kliba 3337)及水(酸性，pH 2.5-3)，讓其隨意取食。研究開始時，小鼠年齡為約10週。

腫瘤細胞注射：

注射當天，自培養瓶(Greiner)中收穫(胰蛋白酶 -

EDTA)Colo205腫瘤細胞，並轉移至50 ml培養基中，洗滌1次且再懸浮於PBS中。再用PBS進行洗滌步驟並過濾(細胞濾網；Falcon™；100 μm)後，將最終細胞滴定濃度調至 2.5×10^7 個細胞/毫升。用移液吸管小心地混合腫瘤細胞懸浮液以避免細胞聚集。此後，使用粗針(1.10×40 mm)將細胞懸浮液裝填至1.0 ml結核菌素注射器(tuberculin syringe)(Braun Melsungen)中；注射時，改變針尺寸(0.45×25 mm)，且每次注射均使用新針。在密閉循環系統中，使用具有預培育室(譜萊玻璃)、個別小鼠鼻罩(矽)及不易燃或爆炸之麻醉化合物異氟醚(cp-pharma)的供小動物用之斯蒂芬吸入單元進行麻醉。注射前之2天，剔去動物毛皮，並在細胞注射時，利用解剖用鑷子小心地提起麻醉動物之皮膚，且將100 μl細胞懸浮液(= 2.5×10^6 個細胞)皮下注射至動物右肋中。監測原發性腫瘤之腫瘤生長(資料未圖示)。

藉由人類Alu序列定量來監測例如肺中繼發性腫瘤

研究結束(第103天)時，自所有動物組收集肺。簡言之，將樣本立即轉移至液氮中。在另一步驟中，根據製造商說明，利用MagNA Pure LC儀自樣本中分離出全部DNA。選擇人類Alu特異性引子以藉由定量PCR(LightCycler儀)選擇性擴增Alu序列。(T. Schneider等人, Clin. Exp. Metas. 2002; 19: 571-582)。

動物處理

用阿瓦斯丁(Avastin)(10 mg/kg，每週一次經腹膜內投

與)處理動物始於細胞移植(研究Ang2_PZ_Colo205_008)後14天平均腫瘤體積為340 mm³時。7週後，隨機選擇小鼠，隨後在第51天開始利用下表所列之化合物進行二次處理。二次處理始於研究Ang2_PZ_Colo205_008第51天時。

組	動物數目	化合物	劑量(mg/kg)	投藥途徑/模式	處理數目	累積劑量(mg/kg)
1	10	阿瓦斯丁	10 mg/kg	腹膜內，每週一次	11	110
2	10	LC06+ 阿瓦斯丁	10 mg/kg 10 mg/kg	腹膜內，每週一次 腹膜內，每週一次	6 11	60 110
3	10	LC06	10 mg/kg	腹膜內，每週一次	6	60

預防癌轉移/繼發性腫瘤(肺中)之結果列於下表中且顯示於圖9A中

表1：定量經不同抗體處理後，最初具有原發性Colo205腫瘤之小鼠之肺中的人類ALU DNA

	阿瓦斯丁		阿瓦斯丁+Ang2i-LC06		Ang2i-LC06	
	101	0.0264	201	0.0042	301	0.0047
	102	5.6740	202	0.0044	302	0.0055
	103	0.0307	203	0.0065	303	0.0050
	104	0.0203	204	0.0081	304	0.0064
	105	0.0215	205	0.0063	305	0.0062
	106	0.0338	206	0.0061	306	0.0066
	107	0.0075	207	0.0053	307	0.0250
	108	0.0113	208	0.0506	308	0.0062
	109	0.0087	209	0.0065	309	0.0067
	110	0.0587	210	0.0160	310	0.0064
平均值		0.5893		0.0114		0.0079
中值		0.0240		0.0064		0.0063

結果表明ANG2i-LC06對繼發性腫瘤/癌轉移之預防相較於阿瓦斯丁明顯改良。

b)預防異種移植原發性KPL-4腫瘤之小鼠體內之癌轉移/繼發性腫瘤

腫瘤細胞株

人類乳癌細胞株KPL-4(由J. Kurebayashi教授友情提供)已自出現發炎性皮膚轉移之乳癌患者的惡性胸腔積液產生。在37°C下於含5% CO₂之濕潤氛圍中，在補充有10%胎牛血清(PAN Biotech, Germany)及2 mM L-麩胺鹽胺(PAN Biotech, Germany)之DMEM培養基(PAN Biotech, Germany)中常規培養腫瘤細胞。利用胰蛋白酶/EDTA 1x(PAN)繼代培養，每週分裂三次。

小鼠

雌性SCID米色小鼠(10-12週齡；體重18-20 g；Charles River, Sulzfeld, Germany)到達後，維持在動物設施之檢疫區中1週，以使其適應新環境且進行觀察。持續監測健康狀況。根據國際準則(GV-Solas; Felasa; TierschG)，在SPF條件下利用12小時白天/12小時黑夜之日循環保持小鼠。提供飲食(Kliba Provimi 3347)及水(經過濾)，讓其隨意取食。實驗研究方案經當地政府審查並獲得批准(Regierung von Oberbayern；登記號211.2531.2-22/2003)。

腫瘤細胞注射

注射當天，自培養瓶(Greiner TriFlask)中收穫(胰蛋白酶-EDTA)腫瘤細胞，且轉移至50 ml培養基中，洗滌1次且再懸浮於PBS中。再用PBS進行洗滌步驟並過濾(細胞濾網；Falcon™；100 μm)後，將最終細胞滴定濃度調至

1.5×10^8 個細胞/毫升。用移液吸管小心地混合腫瘤細胞懸浮液以避免細胞聚集。在密閉循環系統中，使用具有預培育室(譜萊玻璃)、個別小鼠鼻罩(矽)及不易燃或爆炸之麻醉化合物異氟醚(Pharmacia-Upjohn, Germany)的供小動物用之斯蒂芬吸入單元進行麻醉。注射前之2天，剔去動物之皮毛。對於腹位乳房脂肪墊注射，將體積為20 μ l之細胞正位注射至各麻醉小鼠之右側倒數第二個腹位乳房脂肪墊中。對於正位移植，使用Hamilton微升注射器及30Gx1/2"針經由乳頭下之皮膚注射細胞懸浮液。監測原發性腫瘤之腫瘤生長(資料未圖示)。

藉由人類Alu序列定量來監測例如肺中繼發性腫瘤

研究結束(第103天)時，自所有動物組收集肺。簡言之，將樣本立即轉移至液氮中。在另一步驟中，根據製造商說明，利用MagNA Pure LC儀自樣本中分離出全部DNA。選擇人類Alu特異性引子以藉由定量PCR (LightCycler儀)選擇性擴增Alu序列。(T. Schneider等人, Clin. Exp. Metas. 2002; 19: 571-582)

動物處理

動物處理始於細胞移植後35天平均腫瘤體積為60-160 mm^3 時。化合物及給藥時程列於下表中。

組	動物 數目	化合物	劑量 (mg/kg)	投藥途徑/模式	處理 數目	累積劑量 (mg/kg)
4	10	媒劑		腹膜內，每週一次	5	
5	10	柯耐爾	10	腹膜內，每週一次	5	50
6	10	Ang2i_LC06	10	腹膜內，每週一次	4	40
7	10	Ang2i_LC07	10	腹膜內，每週一次	4	40
8	10	Ang2k_LC08	10	腹膜內，每週一次	4	40

預防癌轉移/繼發性腫瘤(肺中)之結果列於下表中且顯示於圖9B中

表2：定量經不同抗體處理後，最初具有原發性KPL4腫瘤之小鼠之肺中的人類ALU DNA

	媒劑		柯耐爾		Ang2i_LC06		Ang2i_LC07		Ang2i_LC08	
	101	0.0098	201	0.0157			401	0.0273	501	0.0069
	102	0.0090	202	0.0516	302	0.0076	402	0.0060	502	0.0261
	103	0.0119	203	0.0108	303	0.0413	403	0.0046	503	0.0067
	104	0.0405	204	0.0148	304	0.0042	404	0.0164	504	0.0044
			205	0.0020	305	0.0041	405	0.0040	505	0.0039
	106	0.0381	206	0.0340	306	0.0093	406	0.0044	506	0.0051
	107	0.0281	207	0.0141	307	0.0038	407	0.0060	507	0.0037
			208	0.0422	308	0.0044	408	0.0174	508	0.0037
	109	0.0121	209	0.0227	309	0.0036	409	0.0314	509	0.0051
	110	0.0143	210	0.0383	310	0.0094	410	0.0083	540	0.0200
中值		0.0132		0.0192		0.0044		0.0072		0.0051
平均值		0.0205		0.0246		0.0098		0.0126		0.0086

結果表明 ANG2i-LC06、ANG2i-LC07、ANG2k-LC08 均非常有效地預防繼發性腫瘤/癌轉移。

實例9：治療視網膜病之作用

方法

C57/B16幼畜由CD1哺乳母畜交叉哺育且P7至P12時暴露於75%氧(PRO-OX 110腔室氧控制器；Biospherix Ltd,

Redfield, NY), 此將誘發視網膜中央血管破裂及毛細管中斷。將幼畜及哺乳母畜置於正常空氣中, 導致相對缺氧且誘導新血管生成。P13時, 使用異氟醚(5%誘導, 3%與1.5%氧組合用於維持)麻醉幼小鼠並暴露眼睛, 且使用配備有35號規格針之Nanofil注射器(WPI, Sarasota, FL)將1 μ l 經眼內注射至左眼中。P17時, 剝離雙眼, 固定於4°C下4%三聚甲醛中4小時, 且剝離視網膜。將視網膜浸於含有0.5% Triton X-100及1%牛血清白蛋白之PBS中滲透之, 用PBS(pH 6.8; 1% Triton-X100、0.1 mM CaCl_2 、0.1 mM MgCl_2)中20 $\mu\text{g/ml}$ 生物素標記之同工凝集素B4(isolectin B4)(Sigma Aldrich, Gillingham, UK), 隨後20 $\mu\text{g/ml}$ ALEXA 488-抗生蛋白鏈菌素(Molecular Probes, Eugene, OR)染色, 且平鋪於Vectashield(Vector Laboratories, Burlingame, CA)中。使用Nikon落射螢光顯微鏡以4倍放大倍率使視網膜成像。使用Photoshop CS3以及Image J(NIH)以不知情方式定量新血管及局部缺血面積, 且表示為佔總視網膜面積(=正常+局部缺血+新血管)之百分數。

結論

圖10A顯示藉由同工凝集素染色而可見之具有視網膜血管結構之代表性平鋪視網膜。中央局部缺血區藉由上調血管生成誘導因子來誘導視網膜血管之新血管生成及再生長。新血管前緣為高增生性的, 產生呈不規則血管圖案之彎曲血管。最外側之區域含有未受影響之正常血管。視網膜鋪片之定量顯示, 利用阿瓦斯丁抑制VEGF如所預期,

減少視網膜新血管生成(參看圖 10B，未注射 $36.7 \pm 1.8\%$ 相對於經注射 $22.4 \pm 3.0\%$)。使用抗體 LC06 或 LC08 抑制 Ang2 亦引起新血管生成減少 ($31.5 \pm 1.1\%$ 相對於 $18.8 \pm 1.3\%$ 及 $34.0 \pm 3.1\%$ 相對於 $25.4 \pm 3.4\%$)。作為對照之人類 IgG 注射對新血管生成無影響(參看圖 10B， $38.3 \pm 1.1\%$ 相對於 $38.3 \pm 0.8\%$)。

【圖式簡單說明】

圖 1 供短暫表現之 IgG 選殖至表現載體中短暫表現：
A) Ang2i-LC06(圖 1A)；B) Ang2i-LC06(圖 1B)。

圖 2 經純化之抗 ANG-2 抗體 Ang2i-LC06、Ang2i-LC07 及 Ang2k-LC08 之 SDS-PAGE 凝膠。

圖 3 血管生成素-Tie2 相互作用 ELISA。

圖 4 Ang2i-LC06 及 Ang2k-LC08 對 ANG-2 與 Tie2 之結合的抑制。

圖 5 Ang2i-LC06 及 Ang2k-LC08 對 ANG-1 與 Tie2 之結合的抑制。

圖 6 測試抗 ANG-2 抗體之活體內功效的 Colo205 異種移植模型。

圖 7 測試抗 ANG-2 抗體之活體內功效的 KPL-4 異種移植模型。

圖 8 經由 Biacore 感測器圖譜測試 ANG-1 結合。

圖 9 藉由本發明抗體預防原發性結腸腫瘤異種移植物 (9A) 及原發性乳房異種移植物 (9B) 之肺轉移/繼發性腫瘤。

圖 10 本發明抗體抑制視網膜病。

序列表

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司

<120> 抗人類血管生成素 2 抗體

<130> 25688

<140> 098142952

<141> 2009-12-15

<150> EP 08021835.7

<151> 2008-12-16

<160> 63

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR3，<ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 1

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

Ala Phe Asp Ile
20

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR2，<ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 2

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

Gly

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR1，<ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 3

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈CDR3，<ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 4

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

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈CDR2，<ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 5

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈CDR1，<ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 6

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

<210> 7
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈可變域，<ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 7

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

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

Ser

<210> 8
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈可變域，<ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 8

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

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

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

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

<210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工

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

<400> 9

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

Ala Phe Asp Ile
20

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

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

<400> 10

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

Gly

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

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

<400> 11

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈CDR3，<ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 12

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

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈CDR2，<ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 13

Asp Asp Ser Glu Arg Pro Ser
1 5

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈CDR1，<ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 14

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

<210> 15
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈可變域，<ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 16
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈可變域，<ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 16

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

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

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

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

201026328

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

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

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

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR3，<ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 17

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

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR2，<ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 18

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

Gly

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈CDR1，<ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 19

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR3，<ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 20

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

<210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR2，<ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 21

Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 22
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR1，<ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 22

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

<210> 23
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈可變域，<ANG-2> Ang2k_LC08

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 24
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈可變域，<ANG-2> Ang2k_LC08

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

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

<400> 25

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val
 1 5

<210> 26
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工

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

<400> 26

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

Val Lys Gly

<210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工

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

<400> 27

Asn Ala Trp Met Ser
 1 5

<210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

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

<400> 28

Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro
1 5

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

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

<400> 29

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 30
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工

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

<400> 30

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

<210> 31
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈可變域, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 31

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈可變域，<ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

<210> 33
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR3，<ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 33

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

Ala	Phe	Asp	Ile
			20

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR2，<ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 34

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

Gly

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR1，<ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 35

Gly	Tyr	Tyr	Met	His
1				5

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR3，<ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 36

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

<210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR2，<ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 37

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 1 5

<210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈CDR1，<ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 38

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

<210> 39
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈可變域，<ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 39

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

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

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

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

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

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

85

90

95

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

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

Ser

<210> 40
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈可變域，<ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 40

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105

<210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR3，<ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 41

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

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR2，<ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 42

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

Gly

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈CDR1，<ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 43

Ser	Tyr	Gly	Met	His
1			5	

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR3，<ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 44

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

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 46

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

<210> 47

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈可變域, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 48
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈可變域，<ANG-2> Ang2k_LC11

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

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

<400> 48

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

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

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

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

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

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

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

<210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

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

<400> 49

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val
1 5

<210> 50
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

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

<400> 50

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

Val Lys Gly

<210> 51
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

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

<400> 51

Asn Ala Trp Met Ser
1 5

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工

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

<400> 52

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

<210> 53
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR2，<ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 53

His Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈CDR1，<ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 54

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

<210> 55

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈可變域，<ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 55

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 56
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工

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

<400> 56

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 57
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 57

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

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

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

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

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

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

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260

265

270

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

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

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

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

<210> 58
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 58

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

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

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

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

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

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

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

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

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

130	135	140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp 145 150 155 160		
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 165 170 175		
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 180 185 190		
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu 195 200 205		
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 210 215 220		
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys 225 230 235 240		
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 245 250 255		
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 260 265 270		
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser 275 280 285		
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser 290 295 300		
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser 305 310 315 320		
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys 325		
<210> 59		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 59		
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		

1	5	10	15												
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
	20							25					30		
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
	35						40					45			
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
	50					55					60				
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
65					70					75					80
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
				85					90					95	
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
			100					105							
<210>	60														
<211>	104														
<212>	PRT														
<213>	智人														
<400>	60														
Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu
1				5					10					15	
Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr
			20					25					30		
Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Lys
	35						40					45			
Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr
	50					55					60				
Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His
65					70					75					80
Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys
				85					90					95	
Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser								

100

<210> 61
 <211> 1124
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 61

Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Gly Thr Val Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu
 20 25 30

Pro Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly
 35 40 45

Trp Arg Pro His Glu Pro Ile Thr Ile Gly Arg Asp Phe Glu Ala Leu
 50 55 60

Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg
 65 70 75 80

Glu Trp Ala Lys Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile
 85 90 95

Asn Gly Ala Tyr Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg
 100 105 110

Ile Arg Thr Met Lys Met Arg Gln Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr
 115 120 125

Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn Ile Ser Phe Lys
 130 135 140

Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser
 145 150 155 160

Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val
 165 170 175

His Leu Pro His Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg
 180 185 190

Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val

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

Val Glu Lys Pro Phe Asn Ile Ser Val Lys Val Leu Pro Lys Pro Leu
435 440 445

Asn Ala Pro Asn Val Ile Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Val Ile Asn
450 455 460

Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Pro Ile Lys Ser Lys Lys
465 470 475 480

Leu Leu Tyr Lys Pro Val Asn His Tyr Glu Ala Trp Gln His Ile Gln
485 490 495

Val Thr Asn Glu Ile Val Thr Leu Asn Tyr Leu Glu Pro Arg Thr Glu
500 505 510

Tyr Glu Leu Cys Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly Gly Glu Gly
515 520 525

His Pro Gly Pro Val Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro
530 535 540

Pro Pro Arg Gly Leu Asn Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Thr Leu Asn
545 550 555 560

Leu Thr Trp Gln Pro Ile Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Val
565 570 575

Glu Val Glu Arg Arg Ser Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys
580 585 590

Val Pro Gly Asn Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu His Pro Arg
595 600 605

Glu Gln Tyr Val Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu
610 615 620

Trp Ser Glu Asp Leu Thr Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro
625 630 635 640

Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val
645 650 655

Ile Ser Trp Thr Ile Leu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Thr Ile
660 665 670

Arg Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Val Asp Val Lys
 675 680 685

Ile Lys Asn Ala Thr Ile Thr Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro
 690 695 700

Glu Thr Ala Tyr Gln Val Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser
 705 710 715 720

Ser Asn Pro Ala Phe Ser His Glu Leu Val Thr Leu Pro Glu Ser Gln
 725 730 735

Ala Pro Ala Asp Leu Gly Gly Gly Lys Met Leu Leu Ile Ala Ile Leu
 740 745 750

Gly Ser Ala Gly Met Thr Cys Leu Thr Val Leu Leu Ala Phe Leu Ile
 755 760 765

Ile Leu Gln Leu Lys Arg Ala Asn Val Gln Arg Arg Met Ala Gln Ala
 770 775 780

Phe Gln Asn Val Arg Glu Glu Pro Ala Val Gln Phe Asn Ser Gly Thr
 785 790 795 800

Leu Ala Leu Asn Arg Lys Val Lys Asn Asn Pro Asp Pro Thr Ile Tyr
 805 810 815

Pro Val Leu Asp Trp Asn Asp Ile Lys Phe Gln Asp Val Ile Gly Glu
 820 825 830

Gly Asn Phe Gly Gln Val Leu Lys Ala Arg Ile Lys Lys Asp Gly Leu
 835 840 845

Arg Met Asp Ala Ala Ile Lys Arg Met Lys Glu Tyr Ala Ser Lys Asp
 850 855 860

Asp His Arg Asp Phe Ala Gly Glu Leu Glu Val Leu Cys Lys Leu Gly
 865 870 875 880

His His Pro Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Glu His Arg Gly
 885 890 895

Tyr Leu Tyr Leu Ala Ile Glu Tyr Ala Pro His Gly Asn Leu Leu Asp
 900 905 910

Phe Leu Arg Lys Ser Arg Val Leu Glu Thr Asp Pro Ala Phe Ala Ile
 915 920 925

Ala Asn Ser Thr Ala Ser Thr Leu Ser Ser Gln Gln Leu Leu His Phe
 930 935 940

Ala Ala Asp Val Ala Arg Gly Met Asp Tyr Leu Ser Gln Lys Gln Phe
 945 950 955 960

Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn Tyr
 965 970 975

Val Ala Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ser Arg Gly Gln Glu Val Tyr
 980 985 990

Val Lys Lys Thr Met Gly Arg Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Ile Gl
 995 1000 1005

Ser Leu Asn Tyr Ser Val Tyr Thr Thr Asn Ser Asp Val Trp Ser
 1010 1015 1020

Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Val Ser Leu Gly Gly Thr Pro
 1025 1030 1035

Tyr Cys Gly Met Thr Cys Ala Glu Leu Tyr Glu Lys Leu Pro Gln
 1040 1045 1050

Gly Tyr Arg Leu Glu Lys Pro Leu Asn Cys Asp Asp Glu Val Tyr
 1055 1060 1065

Asp Leu Met Arg Gln Cys Trp Arg Glu Lys Pro Tyr Glu Arg Pro
 1070 1075 1080

Ser Phe Ala Gln Ile Leu Val Ser Leu Asn Arg Met Leu Glu Glu
 1085 1090 1095

Arg Lys Thr Tyr Val Asn Thr Thr Leu Tyr Glu Lys Phe Thr Tyr
 1100 1105 1110

Ala Gly Ile Asp Cys Ser Ala Glu Glu Ala Ala
 1115 1120

<210> 62

<211> 504
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> 具有前導序列及His標籤之人類血管生成素-2 (ANG-2)

<400> 62

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Glu His Ser Leu Ser Thr Asn Lys Leu Glu Lys Gln Ile Leu Asp
 165 170 175

Gln Thr Ser Glu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Lys Asn Ser Phe Leu Glu
 180 185 190

Lys Lys Val Leu Ala Met Glu Asp Lys His Ile Ile Gln Leu Gln Ser
 195 200 205

```

Ile Lys Glu Glu Lys Asp Gln Leu Gln Val Leu Val Ser Lys Gln Asn
 210                      215                      220

Ser Ile Ile Glu Glu Leu Glu Lys Lys Ile Val Thr Ala Thr Val Asn
225                      230                      235                      240

Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln His Asp Leu Met Glu Thr Val Asn
                      245                      250                      255

Asn Leu Leu Thr Met Met Ser Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asp Pro Thr
                      260                      265                      270

Val Ala Lys Glu Glu Gln Ile Ser Phe Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe
                      275                      280                      285

Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn
290                      295                      300

Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly Gly
305                      310                      315                      320

Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln
                      325                      330                      335

Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu
                      340                      345                      350

Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg
                      355                      360                      365

Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr
370                      375                      380

Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg
385                      390                      395                      400

Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile
                      405                      410                      415

Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys
                      420                      425                      430

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

```

435

440

445

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

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

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

Ser Gly His His His His His His
 500

<210> 63

<211> 506

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 具有前導序列及His標籤之人類血管生成素-1 (ANG-1)

<400> 63

Met Thr Val Phe Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Ala Ile Leu Thr His
 1 5 10 15

Ile Gly Cys Ser Asn Gln Arg Arg Ser Pro Glu Asn Ser Gly Arg Arg
 20 25 30

Tyr Asn Arg Ile Gln His Gly Gln Cys Ala Tyr Thr Phe Ile Leu Pro
 35 40 45

Glu His Asp Gly Asn Cys Arg Glu Ser Thr Thr Asp Gln Tyr Asn Thr
 50 55 60

Asn Ala Leu Gln Arg Asp Ala Pro His Val Glu Pro Asp Phe Ser Ser
 65 70 75 80

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

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

Ala Gln Ile Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr Met Leu
 115 120 125

Glu Ile Gly Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys
 130 135 140

Leu Thr Asp Val Glu Thr Gln Val Leu Asn Gln Thr Ser Arg Leu Glu
 145 150 155 160

Ile Gln Leu Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln
 165 170 175

Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser
 180 185 190

Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu
 195 200 205

Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr
 210 215 220

Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala
 225 230 235 240

Thr Thr Asn Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu Met Asp
 245 250 255

Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu
 260 265 270

Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp
 275 280 285

Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile
 290 295 300

Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn
 305 310 315 320

Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp
 325 330 335

Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser
 340 345 350

Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln

355

360

365

Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg
 370 375 380

Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn
 385 390 395 400

Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser
 405 410 415

Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn
 420 425 430

Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp
 435 440 445

Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala
 450 455 460

Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys
 465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu
 485 490 495

Asp Phe Ser Gly His His His His His His
 500 505

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98142952

※申請日：98.12.15

※IPC 分類：~~C07K~~ A61K^{39/395}

一、發明名稱：(中文/英文)

抗人類血管生成素2抗體

ANTIBODIES AGAINST HUMAN ANGIOPOIETIN 2

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61P 27/2 (2006.01)

A61P 9/06 (2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明係關於抗人類血管生成素2抗體(抗ANG-2抗體)、其製造方法、含有該等抗體之醫藥組合物、及其用途。

三、英文發明摘要：

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

七、申請專利範圍：

1. 一種與人類血管生成素-2(ANG-2)特異性結合之抗體，
其特徵在於包含SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 9、SEQ ID
NO: 17、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO:
41或SEQ ID NO: 49之CDR3區為重鏈可變域CDR3區。
2. 如請求項1之抗體，其特徵在於
 - a)該重鏈可變域包含：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:
9、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 33、
SEQ ID NO: 41或SEQ ID NO: 49之CDR3區；SEQ ID
NO: 2、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO:
26、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 42或SEQ ID NO: 50之
CDR2區；及SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID
NO: 19、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO:
43或SEQ ID NO: 51之CDR1區，及
 - b)該輕鏈可變域包含：SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO:
12、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 36、
SEQ ID NO: 44或SEQ ID NO: 52之CDR3區；SEQ ID
NO: 5、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO:
29、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 45或SEQ ID NO: 53之
CDR2區；及SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 14、SEQ ID
NO: 22、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO:
46或SEQ ID NO: 54之CDR1區。
3. 如請求項1之抗體，其特徵在於包含
 - a) SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 23、

SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 47或SEQ ID NO: 55之重鏈可變域；及

b) SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 48或SEQ ID NO: 56之輕鏈可變域。

4. 如請求項1之抗體，其特徵在於

a)該重鏈可變域包含SEQ ID NO: 1之CDR3區、SEQ ID NO: 2之CDR2區及SEQ ID NO: 3之CDR1區，及

b)該輕鏈可變域包含SEQ ID NO: 4之CDR3區、SEQ ID NO: 5之CDR2區及SEQ ID NO: 6之CDR1區。

5. 如請求項4之抗體，其特徵在於包含

a) SEQ ID NO: 7之重鏈可變域；及

b) SEQ ID NO: 8之輕鏈可變域。

6. 如請求項1之抗體，其特徵在於

a)該重鏈可變域包含SEQ ID NO: 17之CDR3區、SEQ ID NO: 18之CDR2區及SEQ ID NO: 19之CDR1區，及

b)該輕鏈可變域包含SEQ ID NO: 20之CDR3區、SEQ ID NO: 21之CDR2區及SEQ ID NO: 22之CDR1區。

7. 如請求項6之抗體，其特徵在於包含

a) SEQ ID NO: 23之重鏈可變域；及

b) SEQ ID NO: 24之輕鏈可變域。

8. 如請求項1至7中任一項之抗體，其特徵在於

該抗體不與人類血管生成素1(ANG-1)結合。

9. 如請求項1至7中任一項之抗體，其特徵在於該抗體屬於

人類IgG4亞類或屬於人類IgG1亞類。

10. 一種醫藥組合物，其特徵在於包含如請求項1至8中任一項之抗體或片段。
11. 如請求項1至7中任一項之抗體，其用於預防轉移。
12. 一種如請求項1至8中任一項之抗體的用途，其係用於製造供預防轉移之藥物。
13. 如請求項1至7中任一項之抗體，其係用於治療癌症。
14. 一種如請求項1至8中任一項之抗體的用途，其係用於製造供治療癌症之藥物。
15. 如請求項1至7中任一項之抗體，其係用於治療血管疾病。
16. 一種如請求項1至8中任一項之抗體的用途，其係用於製造供治療血管疾病之藥物。
17. 如請求項1至7中任一項之抗體，其係用於治療血管疾病。
18. 如請求項1至7中任一項之抗體，其係用於治療視網膜病。
19. 一種如請求項1至8中任一項之抗體的用途，其係用於製造供治療視網膜病之藥物。
20. 一種編碼與人類血管生成素-2(ANG-2)特異性結合之抗體之重鏈的核酸，其特徵在於該抗體包含如請求項1所述之可變域。
21. 一種表現載體，其特徵在於包含如請求項20之核酸，其用於在原核或真核宿主細胞中表現與人類血管生成素-2

(ANG-2)特異性結合之抗體。

22. 一種原核或真核宿主細胞，其包含如請求項21之載體。

八、圖式：

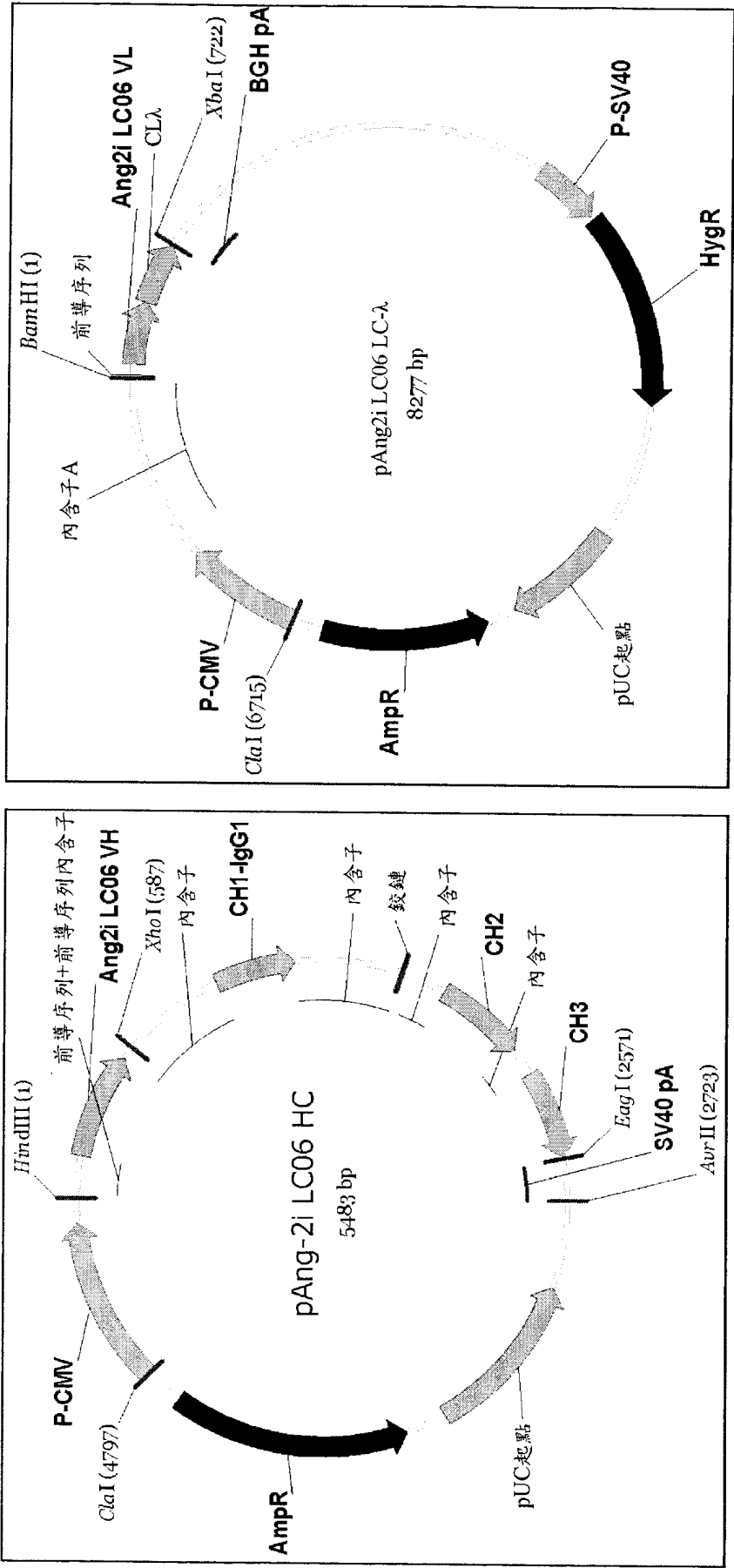


圖1A

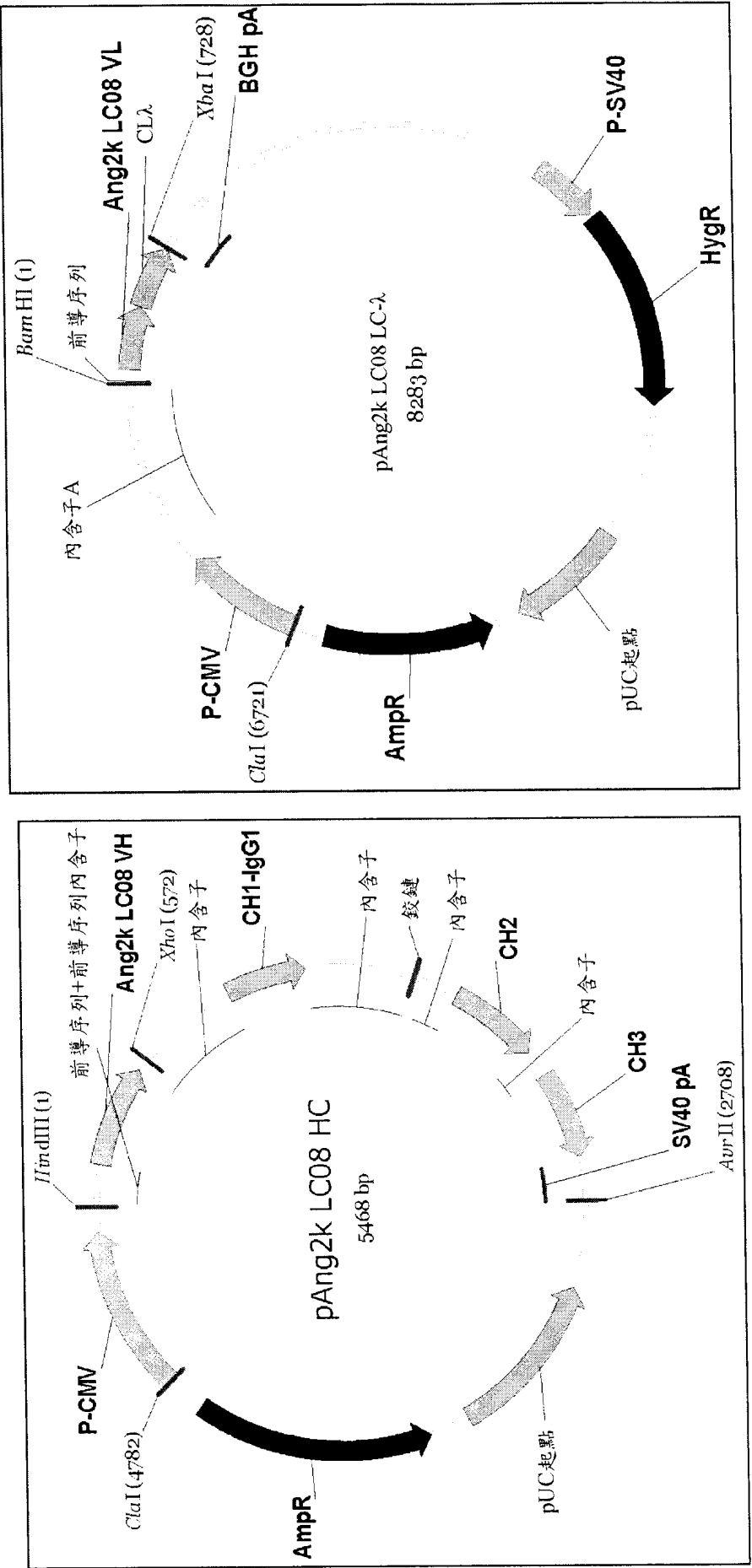


圖1B

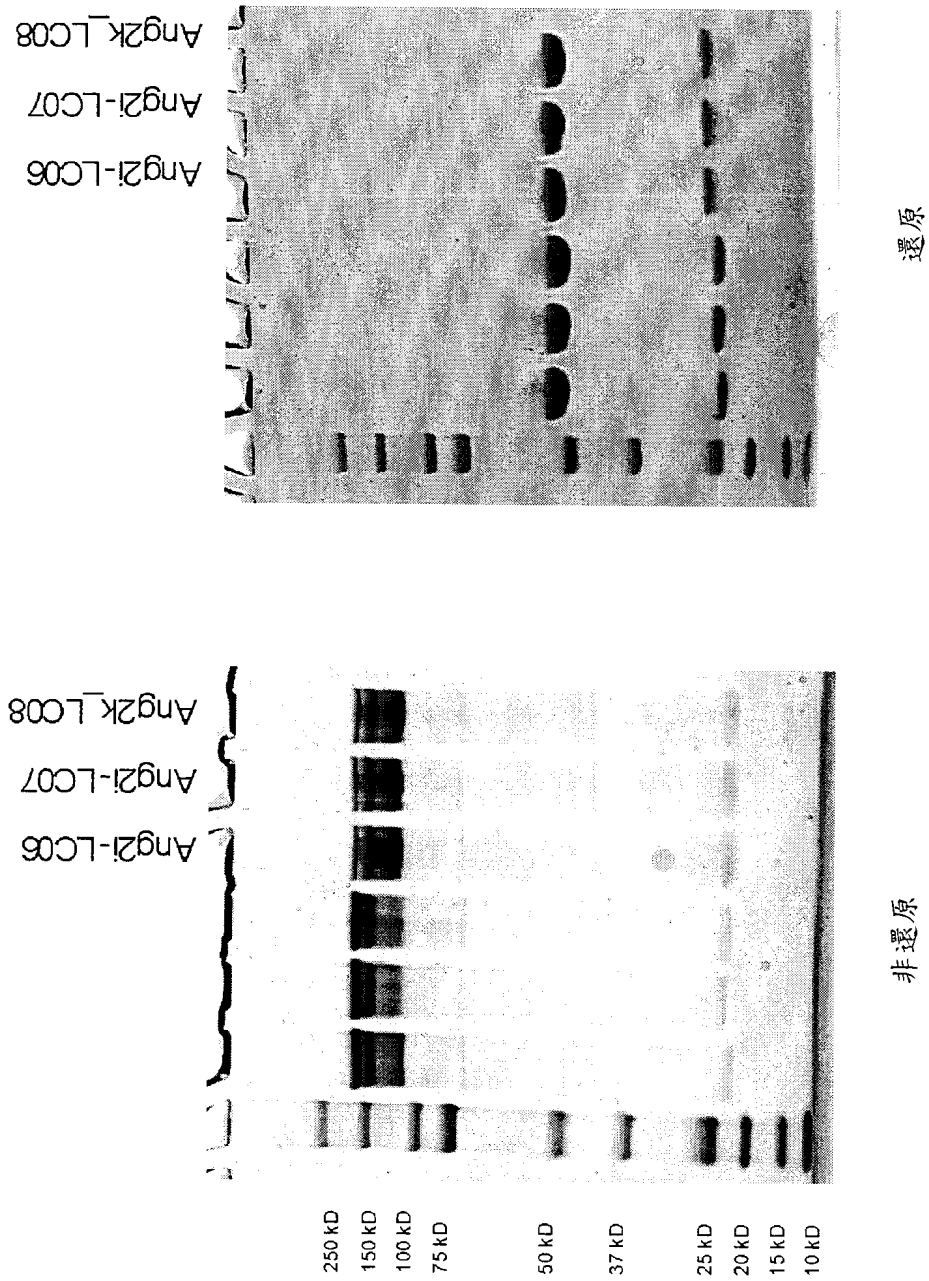


圖2

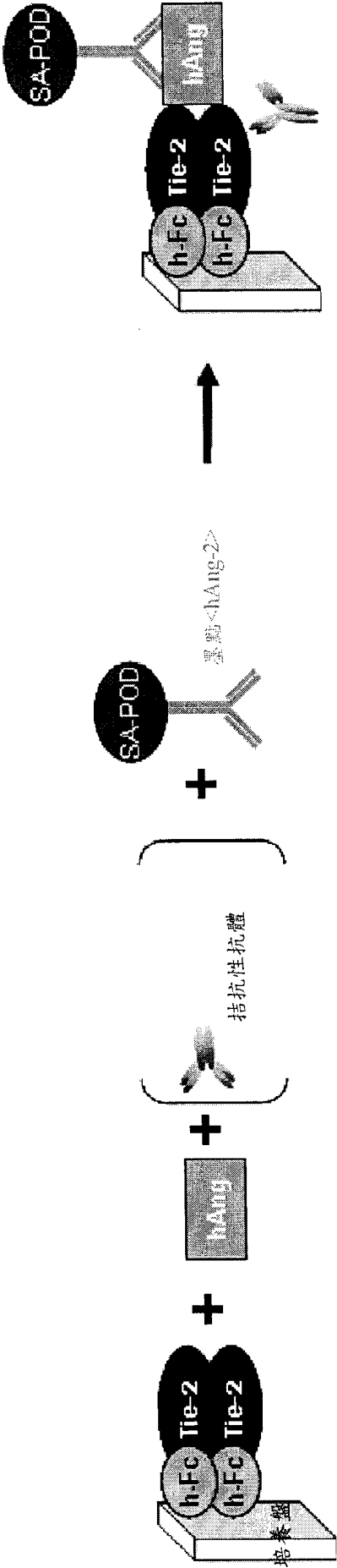


圖3

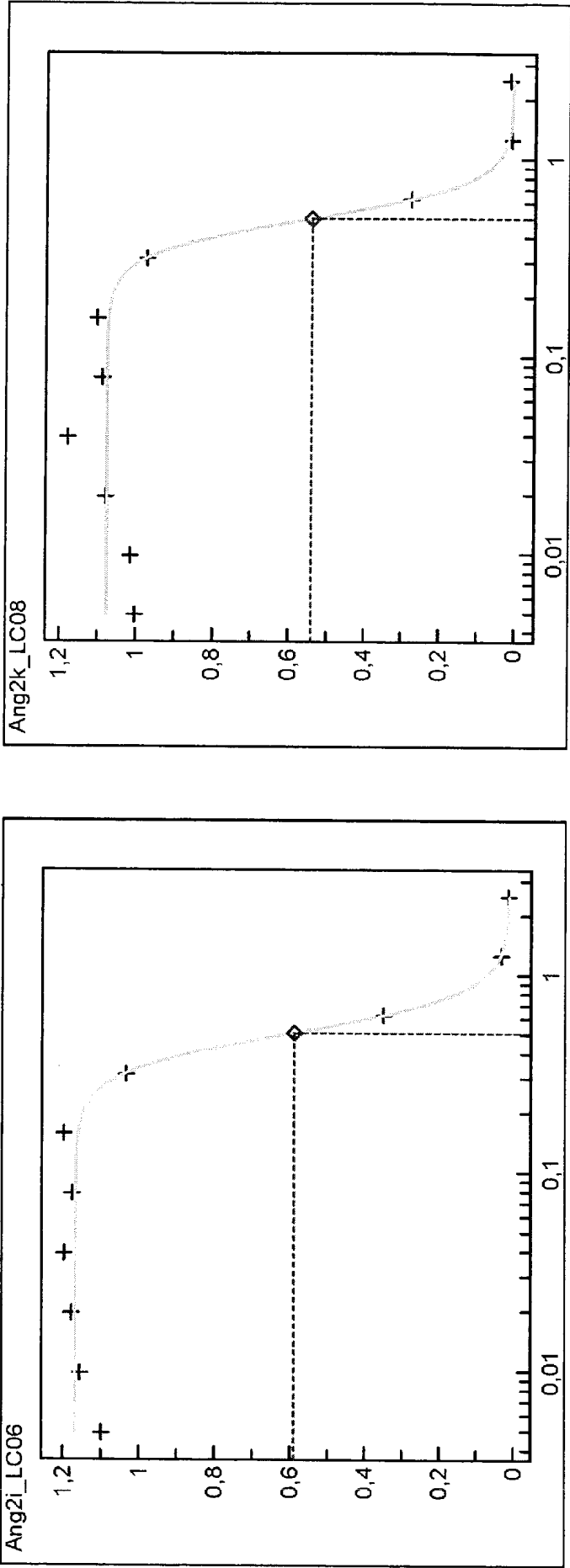


圖4

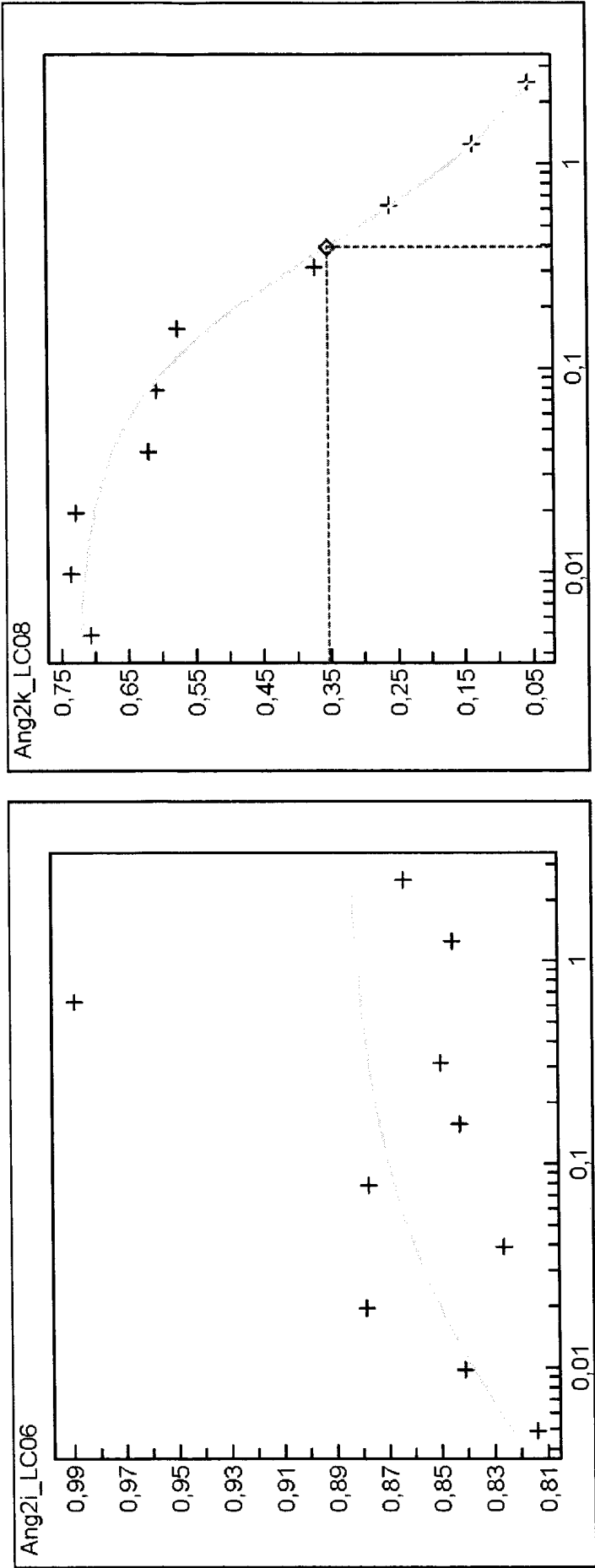


圖 5

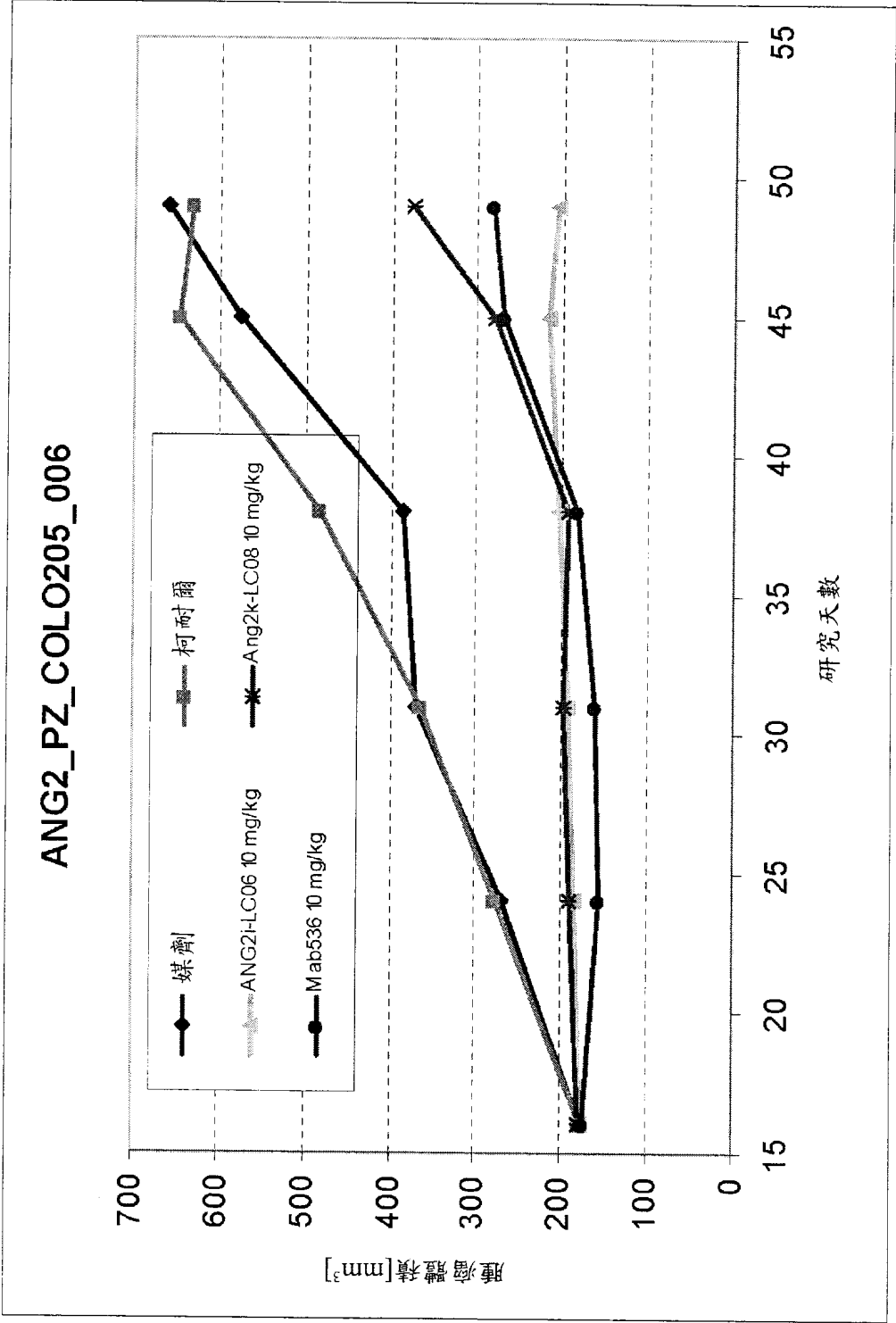


圖6

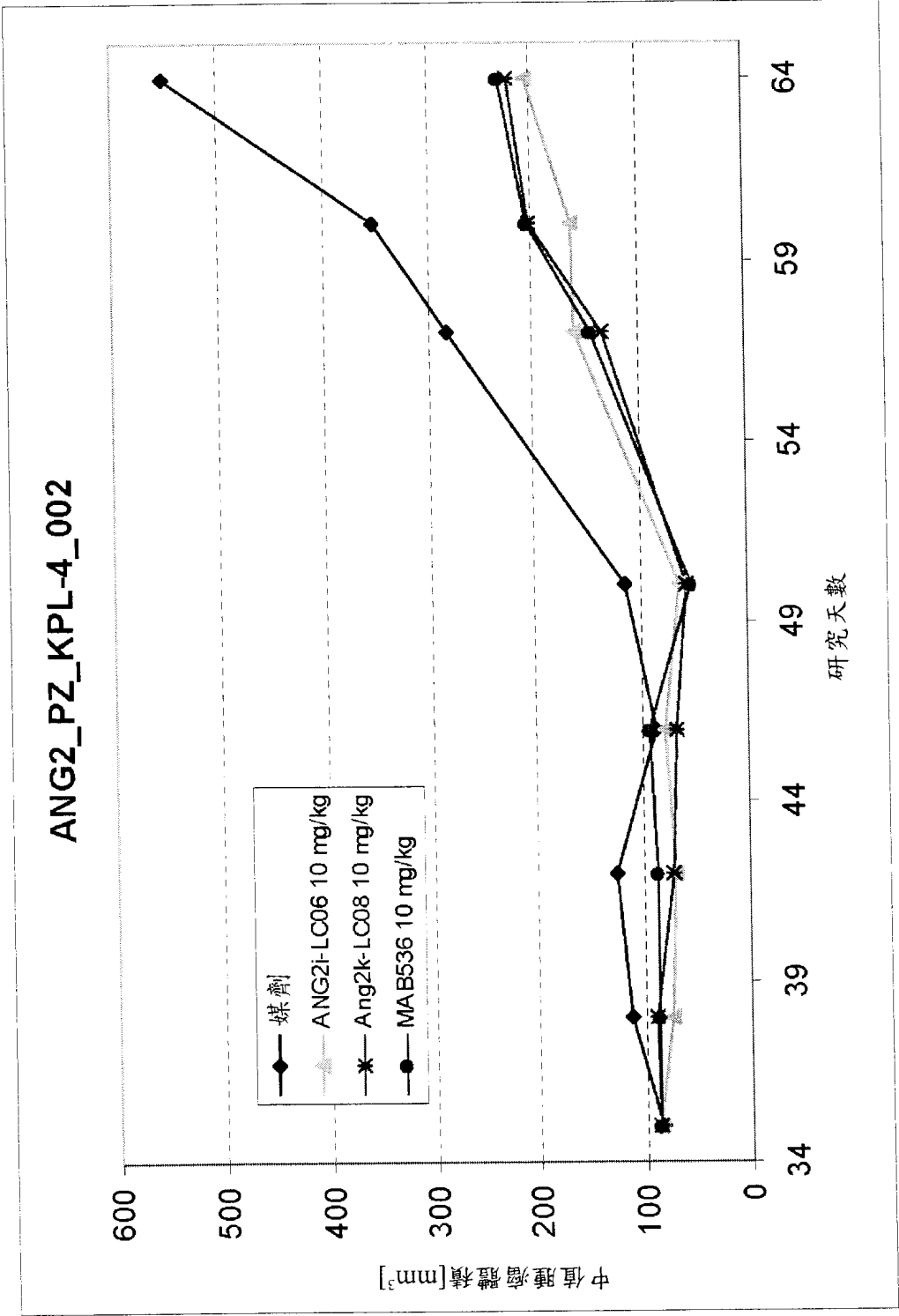


圖7

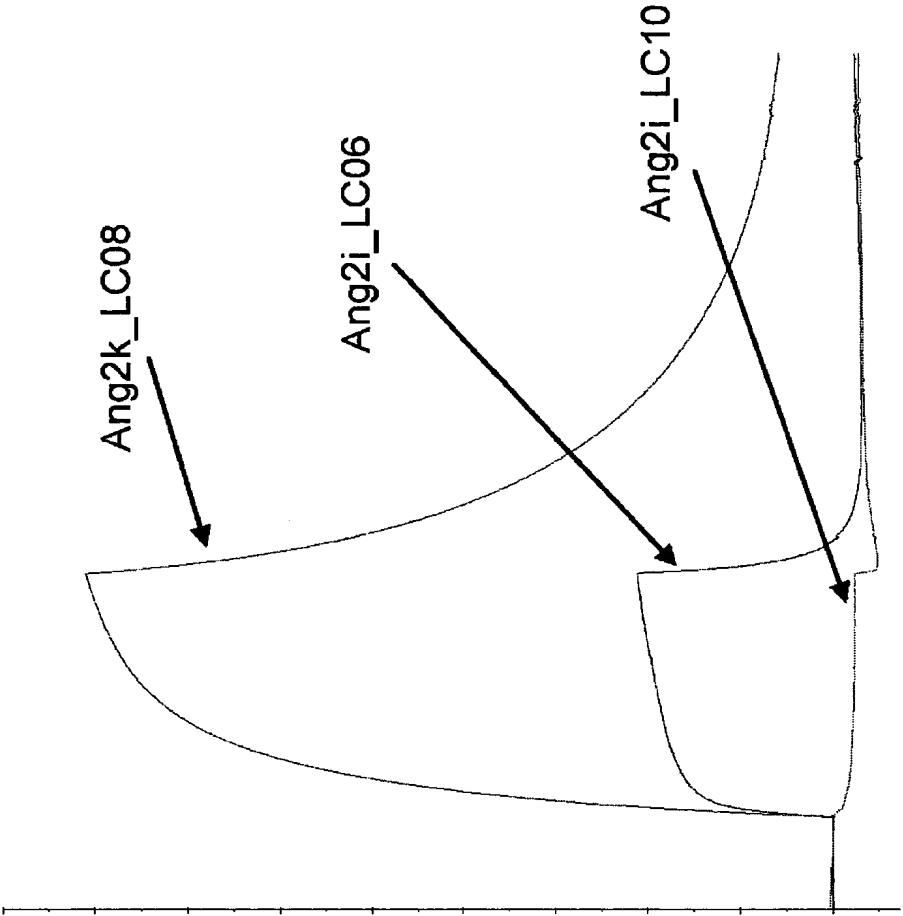


圖 8

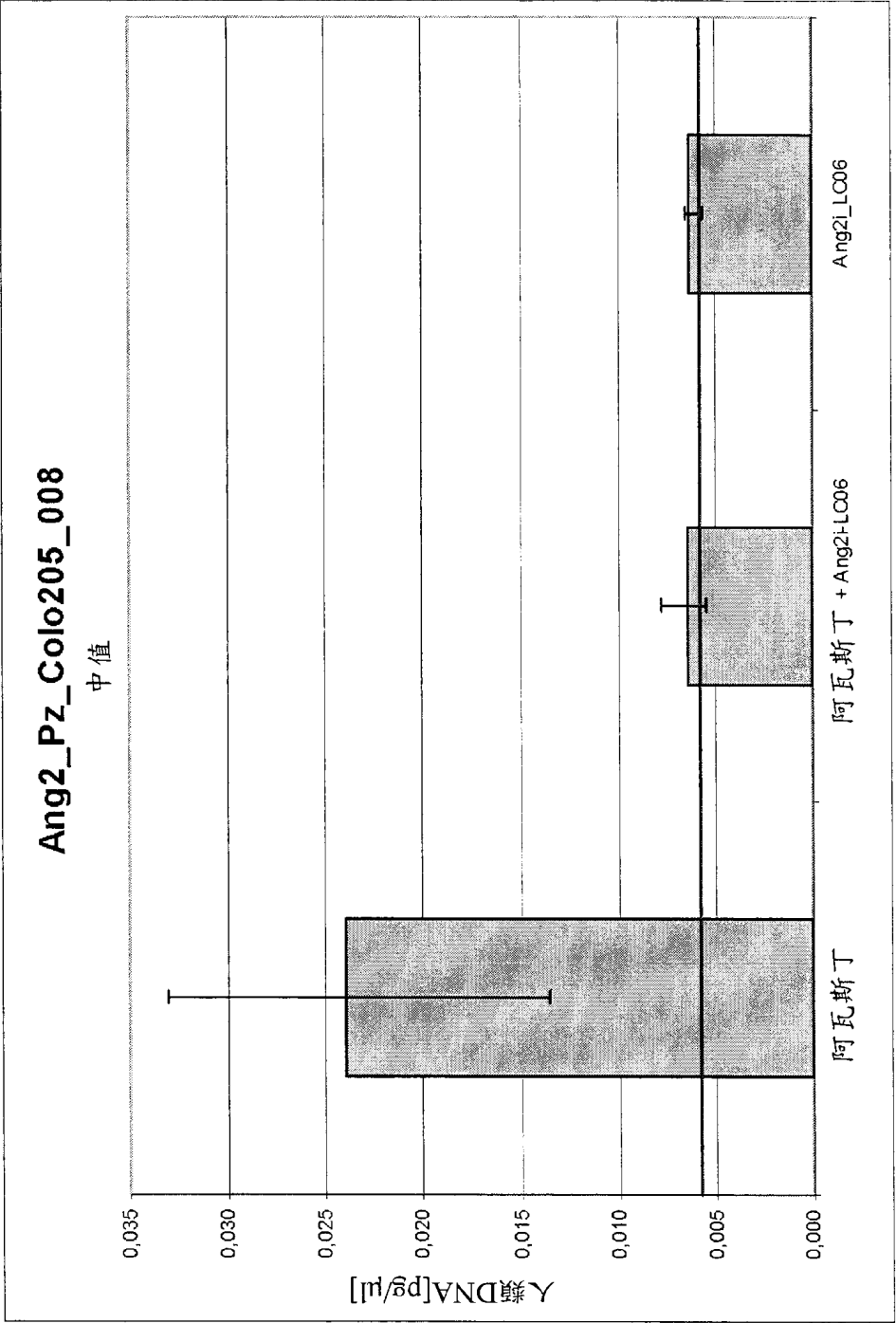


圖9A

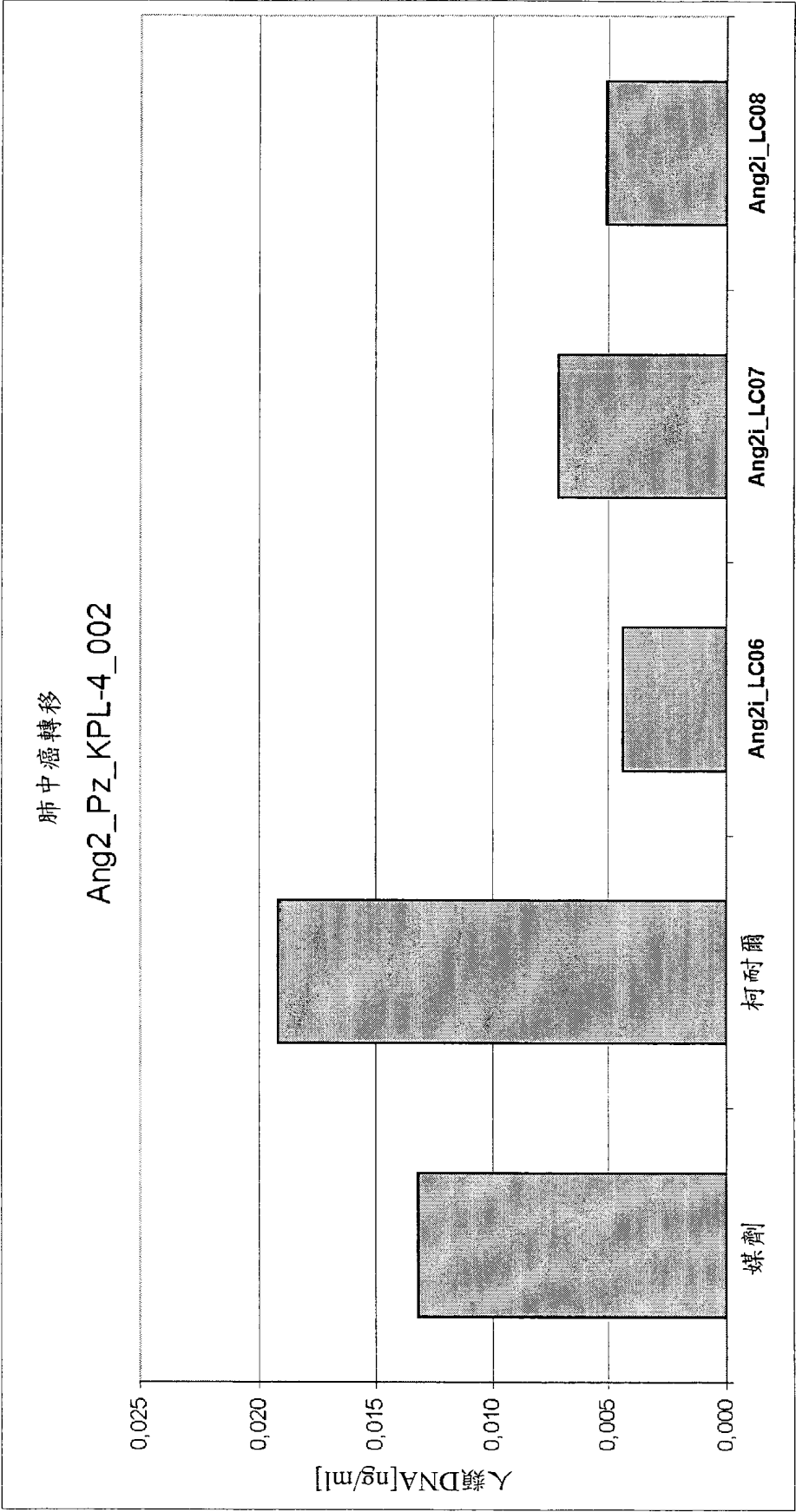


圖9B

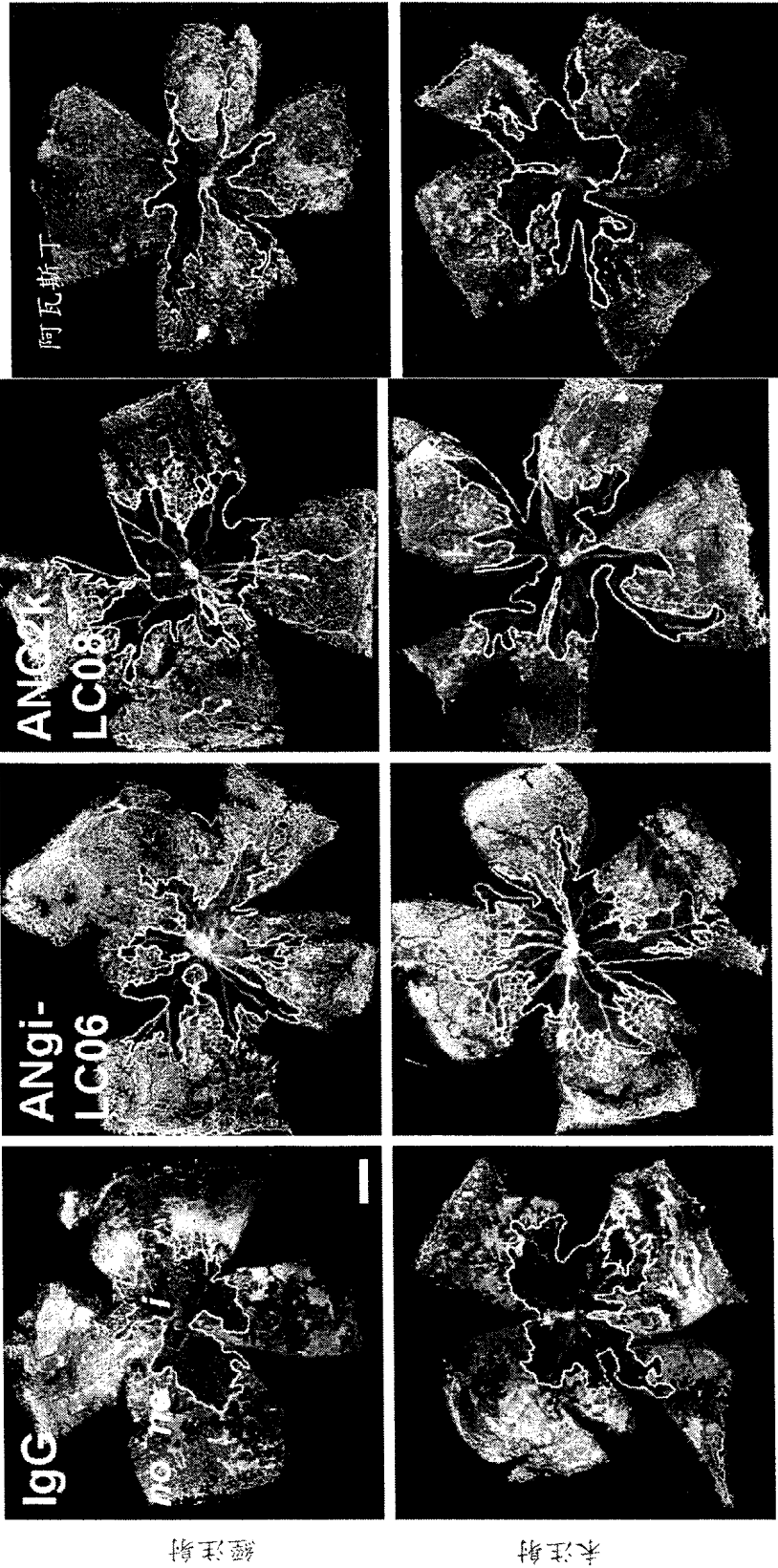


圖 10A

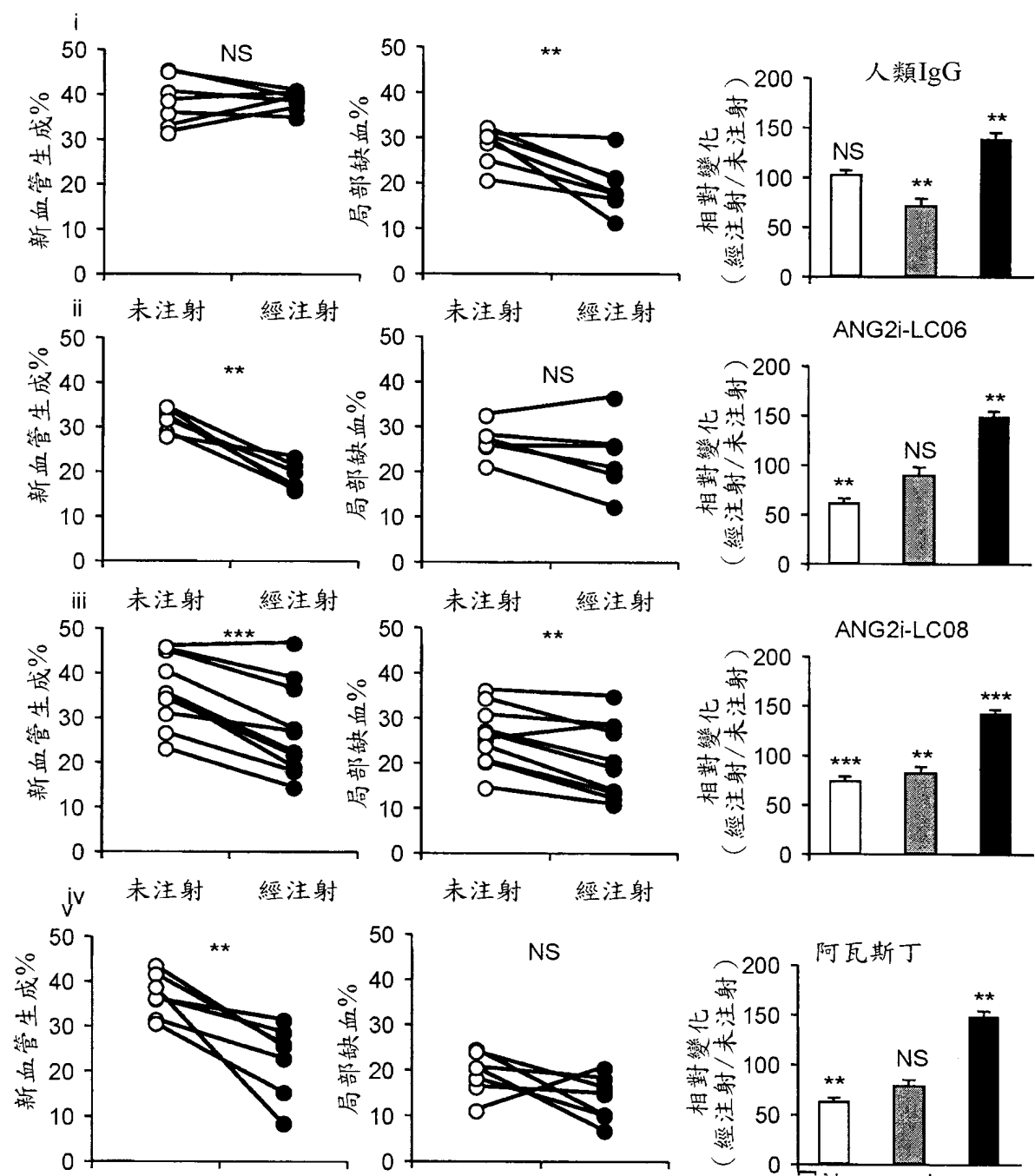


圖10B

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (7) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)