

명세서

발명의 명칭: 변형 항체 및 이의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 용해도가 증가하고 고농도로 농축 가능한 개선된 변형 항체 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 항체의 골격 영역에 위치하는 아미노산이 치환된 변형 항체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 항체는 암, 자가면역 질환 등과 같은 질환을 치료하는데 매우 효과적인 치료제로 사용되고 있다. 항체의 개발가능성 (developability)은 높은 수율, 안정적 제형화, 높은 물리화학적 및 생체 내 안정성, 높은 용해도, PK 특성 등을 고려하여 평가된다 (Next generation antibody drugs: pursuit of the 'high-hanging fruit'. Nat. Rev. Drug Discovery., 2018, 17:197-223.)
- [4] 항체는 단백질 의약품으로 공유결합에서의 변화 등에 의해 화학적으로 불안정하거나, 3차원 공간 구조의 변형 등에 의해 물리적으로 불안정할 수 있다. 항체는 화학적으로 가수분해, 산화, 탈아미드화, 이황화 변형 또는 라세미화 등에 의해 불안정화될 수 있고, 응집, 흡착 또는 폴립 등에 의해 물리적으로 불안정할 수 있다.
- [5] 이러한 항체의 불안정성은 용해도, 효능 등에 영향을 줄 수 있으며, 항체의 안정성과 용해도를 저하시킴으로써 이에 따라 생산성 저하 및 생산 수율 감소가 유도될 뿐 아니라, 응집 성향이 증가하여 면역원성의 위험도가 상승하게 된다.
- [6] 이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 항체의 용해도를 향상시켜 고농도로 농축 가능한 변형 항체를 개발하기 위하여 노력하였다. 그 결과, 특정 위치의 아미노산 치환을 통해 개선된 용해도를 나타내어 고농도로 농축 가능함을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[7]

발명의 요약

- [8] 본 발명의 목적은 항체의 특성이 개선된 변형 항체 또는 이의 단편을 제공하는 데 있다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 상기 변형 항체 또는 이의 단편을 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [10] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 중쇄 가변영역 (heavy chain variable region) 중 13번 위치, 42번 위치 (AHO Numbering에 따름) 및 경쇄 가변영역 (light chain variable region) 중 94번 위치 (AHO Numbering에 따름)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산이 치환된, 변형 항체 또는 이의 단편을 제공한다.
- [11] 본 발명은 또한, 중쇄 가변영역 (heavy chain variable region) 중 13번 위치,
- [12]

42번 위치 (AHO Numbering에 따름) 및 경쇄 가변영역 (light chain variable region) 중 94번 위치 (AHO Numbering에 따름)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산을 치환하는 것을 포함하는, 변형 항체 또는 이의 단편의 제조방법을 제공한다.

[13]

도면의 간단한 설명

[14] 도 1은 항체 구조 모델링 및 핫스팟 분석 결과를 나타낸 것이다.

[15] 도 2는 항체의 핫스팟 중 L11T, V13S, V103S (AHO Numbering에 따름, 이하에서는 L11T, V12S, V93S로 명명)에 대한 발현 테스트 결과를 나타낸 것이다.

[16] 도 3은 항체의 핫스팟 중 N42T, Q77R, N94S (AHO Numbering에 따름, 이하에서는 N35T, Q61R, N76S로 명명)에 대한 발현 테스트 결과를 나타낸 것이다.

[17] 도 4는 항체의 핫스팟 중 V13S, N42T, N94S (AHO Numbering에 따름, 이하에서는 V12S, N35T, N76S로 명명)에 대한 발현 테스트 결과를 나타낸 것이다.

[18] 도 5a 내지 도 5g는 SDS-PAGE를 통한 항체 정제 결과를 나타낸 것이다.

[19] 도 6은 본 발명에 따른 항-Ang2 항체의 열 안정성 분석 결과를 나타낸 것이다.

[20] 도 7a 내지 도 7c는 마우스 CNV (choroidal neovascularization) 모델을 이용하여 본 발명에 따른 항-Ang2 항체의 항-혈관생성 효능을 평가한 결과를 나타낸 것이다.

[21]

발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[22] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[23] 본 출원의 발명자들은 중쇄 가변영역 중 AHO Numbering에 따라 13번 위치 (V12), 42번 위치 (N35) 및 경쇄 가변영역 중 AHO Numbering에 따라 94번 위치 (N76)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산이 치환되는 경우 향상된 용해도를 나타내어 고농도로 농축 가능하고, 생산성이 향상됨을 확인하였다.

[24] 특히, 중쇄 가변영역 중 AHO Numbering에 따라 13번 위치 (V12)가 세린 (S), 42번 위치 (N35)가 트레오닌 (T), 또는 경쇄 가변영역 중 AHO Numbering에 따라 94번 위치 (N76)가 세린 (S)으로 치환되는 경우, 향상된 용해도를 나타내어 고농도로 농축 가능하고, 생산성이 향상됨을 확인하였다.

[25] 이를 바탕으로, 본 발명은 일 관점에서, 중쇄 가변영역 중 13번 위치, 42번 위치 (AHO Numbering에 따름) 및 경쇄 가변영역 중 94번 위치 (AHO Numbering에

- 따름)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산이 치환된, 변형 항체 또는 이의 단편에 관한 것이다.
- [27] 본 발명은 또한, 중쇄 가변영역 중 13번 위치, 42번 위치 (AHO Numbering에 따름) 및 경쇄 가변영역 (light chain variable region) 중 94번 위치 (AHO Numbering에 따름)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산을 치환하는 것을 포함하는, 변형 항체 또는 이의 단편의 제조방법에 관한 것이다.
- [28] 본 발명에서 개시된 항체 또는 이의 단편에 대한 아미노산 위치는 AHO numbering system에 의해 정의 또는 확인될 수 있다. 경우에 따라서, 본 발명에서 개시된 항체 또는 이의 단편에 대한 아미노산 위치는 서열번호 34의 중쇄 가변영역 및 서열번호 32의 경쇄 가변영역의 아미노산 서열 중 N 말단에서 시작되는 아미노산을 1번으로 하여 순차적으로 넘버링된 위치를 의미할 수 있다.
- [29] 하나의 실시예에서, 상기 중쇄 가변영역 13번 위치, 42번 위치 (AHO Numbering에 따름) 및 경쇄 가변영역 94번 위치(AHO Numbering에 따름)는 세린 (S) 또는 트레오닌 (T)으로 치환될 수 있다.
- [30] 구체적 실시예에서, 다음으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 위치(AHO Numbering에 따름)에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [31] 중쇄 가변영역 13번의 발린 (V)을 세린 (S)으로 치환;
- [32] 중쇄 가변영역 42번의 아스파라진 (N)을 트레오닌 (T)으로 치환; 및
- [33] 경쇄 가변영역 94번의 아스파라진 (N)을 세린 (S)으로 치환.
- [34] 본 발명의 구체적 실시예에 따르면, 본 발명에 따르면 다음과 같은 위치(AHO Numbering에 따름)에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다:
- [35] 중쇄 가변영역 13번의 발린 (V)을 세린 (S)으로 치환;
- [36] 중쇄 가변영역 42번의 아스파라진 (N)을 트레오닌 (T)으로 치환;
- [37] 경쇄 가변영역 94번의 아스파라진 (N)을 세린 (S)으로 치환;
- [38] 중쇄 가변영역 13번의 발린 (V)을 세린 (S)으로 치환하고, 중쇄 가변영역 42번의 아스파라진 (N)을 트레오닌 (T)으로 치환;
- [39] 중쇄 가변영역 13번의 발린 (V)을 세린 (S)으로 치환하고, 경쇄 가변영역 94번의 아스파라진 (N)을 세린 (S)으로 치환;
- [40] 중쇄 가변영역 42번의 아스파라진 (N)을 트레오닌 (T)으로 치환하고, 경쇄 가변영역 94번의 아스파라진 (N)을 세린 (S)으로 치환; 또는
- [41] 중쇄 가변영역 13번의 발린 (V)을 세린 (S)으로 치환하고, 중쇄 가변영역 42번의 아스파라진 (N)을 트레오닌 (T)으로 치환하며, 경쇄 가변영역 94번의 아스파라진 (N)을 세린 (S)으로 치환.
- [42] 위와 같은 아미노산 치환에 따라, 항체의 용해도가 개선되어 고농도로 농축할 수 있고, 이에 따라 생산성이 개선됨을 확인하였다.
- [43] 위 아미노산 치환과 달리, 중쇄 가변영역 11번(AHO Numbering에 따름)의 루신을 트레오닌으로 치환하거나, 중쇄 가변영역 103번(AHO Numbering에

따름)의 발린을 세린으로 치환하거나, 경쇄 가변영역 77번(AHO Numbering에 따름)의 글루타민을 알지닌으로 치환한 경우에는 목적하는 용해도 개선 효과를 확인하지 못하였다.

- [44] 구체적 실시예에서, 본 발명에 따른 변형 항체 또는 이의 단편은 다음으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 골격 영역을 포함할 수 있다:
- [45] QVQLVESGGGLX₁KPGGSLRLSCAAS (상기 X₁은 S);
- [46] MX₂WVRQAPGKGLEWVSS (상기 X₂는 T); 및
- [47] NLQSGVSSQFSGSGGTDFLTIX₃SLQPEDSATYYC (상기 X₃은 S).
- [48] 구체적으로, 서열번호 34의 중쇄 가변영역 및 서열번호 32의 경쇄 가변영역을 포함하는 항-Ang2 항체 클론인 O4를 대상으로, 중쇄 가변영역 12번 위치, 35번 위치 및 경쇄 가변영역 76번 위치로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산이 각각 세린 (S) 또는 트레오닌 (T)으로 치환될 수 있다.
- [49] 하나의 실시예에서, 서열번호 34의 중쇄 가변영역 및 서열번호 32의 경쇄 가변영역을 포함하는 항-Ang2 항체 클론인 O4 중 다음으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.
- [50] 중쇄 가변영역 12번의 발린 (V)을 세린 (S)으로 치환;
- [51] 중쇄 가변영역 35번의 아스파라진 (N)을 트레오닌 (T)으로 치환; 및
- [52] 경쇄 가변영역 76번의 아스파라진 (N)을 세린 (S)으로 치환.
- [53] 구체적으로, 본 발명에 따르면 다음과 같은 아미노산 치환을 포함할 수 있다:
- [54] 중쇄 가변영역 12번의 발린 (V)을 세린 (S)으로 치환;
- [55] 중쇄 가변영역 35번의 아스파라진 (N)을 트레오닌 (T)으로 치환;
- [56] 경쇄 가변영역 76번의 아스파라진 (N)을 세린 (S)으로 치환;
- [57] 중쇄 가변영역 12번의 발린 (V)을 세린 (S)으로 치환하고, 중쇄 가변영역 35번의 아스파라진 (N)을 트레오닌 (T)으로 치환;
- [58] 중쇄 가변영역 12번의 발린 (V)을 세린 (S)으로 치환하고, 경쇄 가변영역 76번의 아스파라진 (N)을 세린 (S)으로 치환;
- [59] 중쇄 가변영역 35번의 아스파라진 (N)을 트레오닌 (T)으로 치환하고, 경쇄 가변영역 76번의 아스파라진 (N)을 세린 (S)으로 치환; 또는
- [60] 중쇄 가변영역 12번의 발린 (V)을 세린 (S)으로 치환하고, 중쇄 가변영역 35번의 아스파라진 (N)을 트레오닌 (T)으로 치환하며, 경쇄 가변영역 76번의 아스파라진 (N)을 세린 (S)으로 치환.
- [61] 서열번호 34의 중쇄 가변영역 및 서열번호 32의 경쇄 가변영역을 포함하는 항-Ang2 항체 클론인 O4를 대상으로 물성 개선을 수행한 결과, 중쇄 가변영역의 FR1에 QVQLVESGGGLX₁KPGGSLRLSCAAS (상기 X₁은 S)의 서열을 가지는 골격 영역을 포함하거나, FR3에 MX₂WVRQAPGKGLEWVSS (상기 X₂는 T)의 서열을 가지는 골격 영역을 포함하거나, FR1에 QVQLVESGGGLX₁KPGGSLRLSCAAS (상기 X₁은 S) 및 FR3에 MX₂WVRQAPGKGLEWVSS (상기 X₂는 T)의 서열을 가지는 골격 영역을 포함하는

경우, 항체의 용해도가 개선되어 고농도로 농축할 수 있고, 이에 따라 생산성이 개선됨을 확인하였다.

- [62] 또한, 경쇄 가변영역의 FR3에 NLQSGVSSQFSGSGSGTDFLTIX₃SLQPEDSATYYC (상기 X₃은 S)의 서열을 가지는 골격 영역을 포함하는 경우 항체의 용해도가 개선되어 고농도로 농축할 수 있고, 이에 따라 생산성이 개선됨을 확인하였다.
- [63] 더욱이, 중쇄 가변영역의 FR1에 QVQLVESGGGLX1KPGGSLRLSCAAS (상기 X1은 S)의 서열을 가지는 골격 영역을 포함하고, 경쇄 가변영역의 FR3에 NLQSGVSSQFSGSGSGTDFLTIX₃SLQPEDSATYYC (상기 X₃은 S)의 서열을 가지는 골격 영역을 포함하거나,
- [64] 중쇄 가변영역의 FR3에 MX₂WVRQAPGKGLEWVSS (상기 X₂는 T)의 서열을 가지는 골격 영역을 포함하고, 경쇄 가변영역의 FR3에 NLQSGVSSQFSGSGSGTDFLTIX₃SLQPEDSATYYC (상기 X₃은 S)의 서열을 가지는 골격 영역을 포함하거나, 또는
- [65] 중쇄 가변영역의 FR1에 QVQLVESGGGLX1KPGGSLRLSCAAS (상기 X1은 S)의 서열을 가지는 골격 영역을 포함하고, 중쇄 가변영역의 FR3에 MX₂WVRQAPGKGLEWVSS (상기 X₂는 T)의 서열을 가지는 골격 영역을 포함하며, 경쇄 가변영역의 FR3에 NLQSGVSSQFSGSGSGTDFLTIX₃SLQPEDSATYYC (상기 X₃은 S)의 서열을 가지는 골격 영역을 포함하는 경우, 항체의 용해도가 개선되어 고농도로 농축할 수 있고, 이에 따라 생산성이 개선됨을 확인하였다.
- [66] 경우에 따라서, 본 발명에 따른 변형 항체 또는 이의 단편은 Ang2 (Angiopoietin-2)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편일 수 있다.
- [67] 이 때, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편은
- [68] 서열번호 1, 7, 13, 19 및 25로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR1,
- [69] 서열번호 2, 8, 14, 20 및 26으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR2, 및
- [70] 서열번호 3, 9, 15, 21, 27, 43, 44 및 45로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및
- [71] 서열번호 4, 10, 16, 22, 및 28로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR1,
- [72] 서열번호 5, 11, 17, 23 및 29으로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR2, 및
- [73] 서열번호 6, 12, 18, 24 및 30로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[74]

서열명		아미노산서열	서열번호
3	Heavy-chain CDR1	GFSFDDYA	1
	Heavy-chain CDR2	IKDDGSQT	2
	Heavy-chain CDR3	TTEGLMNGLHFDM	3
	Light-chain CDR1	SSNIGAGYD	4
	Light-chain CDR2	GNN	5
	Light-chain CDR3	QSYDSRLGVV	6
4	Heavy-chain CDR1	GYSFTSYW	7
	Heavy-chain CDR2	IYPGNSDT	8
	Heavy-chain CDR3	TTEGLMNGLHFDM	9
	Light-chain CDR1	QSLHSLGDNY	10
	Light-chain CDR2	LGS	11
	Light-chain CDR3	MQSLQTPPYT	12
8	Heavy-chain CDR1	GFTFSSYS	13

[75]

	Heavy-chain CDR2	ISASDGAT	14
	Heavy-chain CDR3	AKILAGYSGPMGGMDV	15
	Light-chain CDR1	RDISNY	16
	Light-chain CDR2	GAS	17
	Light-chain CDR3	QQYYSYPLT	18
41	Heavy-chain CDR1	GFAFGRYE	19
	Heavy-chain CDR2	IDTGGGAK	20
	Heavy-chain CDR3	TTEGLMNGLHFDM	21
	Light-chain CDR1	QAISTW	22
	Light-chain CDR2	TAS	23
	Light-chain CDR3	QQLNSYPYT	24
46	Heavy-chain CDR1	GFTFDDCA	25
	Heavy-chain CDR2	ISGNSKNV	26

[76]

	Heavy-chain CDR3	ARDPAYSQFDY	27
	Light-chain CDR1	SSNVGGYP	28
	Light-chain CDR2	TDY	29
	Light-chain CDR3	ATWDDNLNGYV	30
O4	Heavy-chain CDR3	AKTLAGYSGPMGGMDV	43
O10	Heavy-chain CDR3	AKILVGYS GPMGGMDV	44
O12	Heavy-chain CDR3	AKSLASYSGPMGGMDV	45

[77] 본 명세서에서 사용된 용어, "항체(antibody)"는 Ang2에 특이적으로 결합하는 항-Ang2 항체를 의미한다. 본 발명의 범위에는 Ang2에 특이적으로 결합하는 완전한 항체 형태 뿐 아니라, 상기 항체 분자의 항원 결합 단편도 포함된다.

[78] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.

[79] 항체의 항원 결합 단편 또는 항체 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각이다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv, scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의

가변영역과 경쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수도 있다.

- [80] 하나의 실시예에서, 본 발명에 따른 항체는 Fv 형태(예컨대, scFv)이거나, 완전한 항체 형태이다. 또한, 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 또는 엡실론(ϵ) 중의 어느 한 이소타입으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 불변영역은 감마1(IgG1), 감마 3(IgG3) 또는 감마 4(IgG4)이다. 경쇄 불변영역은 카파 또는 람다 형일 수 있다.
- [81] 본 명세서에서 사용되는 용어, "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VH 및 3 개의 불변영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어, "경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VL 및 불변영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.
- [82] 본 발명의 항체는 단일클론 항체, 다특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fvs(scFV), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 다이설파이드-결합 Fvs(sdFV) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 또는 상기 항체들의 에피토프-결합 단편 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [83] 상기 단일클론 항체는 실질적으로 동질적 항체 집단으로부터 수득한 항체, 즉 집단을 차지하고 있는 개개의 항체가 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생적 돌연변이를 제외하고는 동일한 것을 지칭한다. 단일클론 항체는 고도로 특이적이어서, 단일 항원 부위에 대항하여 유도된다. 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 통상의 (폴리클로날) 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다.
- [84] "에피토프"은 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정부위(determinant)를 의미한다. 에피토프는 통상 화학적으로 활성인 표면 분자군, 예를 들어 아미노산 또는 당 측쇄로 구성되며, 일반적으로 특정한 3차원의 구조적 특징뿐만 아니라 특정한 전하 특성을 갖는다. 입체적 에피토프 및 비입체적 에피토프는 변성 용매의 존재하에서 전자에 대한 결합은 소실되지만 후자에 대해서는 소실되지 않는다는 점에서 구별된다.
- [85] 상기 "인간화" 형태의 비-인간(예: 뮤린) 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는, 수용자의 초가변 영역으로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 중(공여자 항체),

예를 들어 마우스, 랫트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 초가변 영역로부터의 잔기로 대체시킨 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다.

- [86] 상기 “인간 항체”는 인간 면역글로불린으로부터 유래하는 분자로서 상보성 결정영역, 구조 영역을 포함한 항체를 구성하는 모든 아미노산 서열 전체가 인간의 면역글로불린으로 구성되어 있는 것을 의미한다.
- [87] 중쇄 및/또는 경쇄 일부가 특별한 종으로부터 유래되거나 특별한 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 나머지 쇠(들)는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 “키메라” 항체(면역글로불린) 뿐 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 상기 항체의 단편이 포함된다.
- [88] 본원에 사용된 바와 같은 “항체 가변 도메인”은 상보성 결정 영역 (CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3), 및 골격 영역 (FR)의 아미노산 서열을 포함하는 항체 분자의 경쇄 및 중쇄 부분을 지칭한다. VH는 중쇄의 가변 도메인을 지칭한다. VL은 경쇄의 가변 도메인을 지칭한다.
- [89] “상보성 결정 영역” (CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3)은 항원 결합을 위해 필요한 존재인, 항체 가변 도메인의 아미노산 잔기를 지칭한다. 각 가변 도메인은 전형적으로, CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 확인된 3개의 CDR 영역을 갖는다. 본 발명은 서열번호 1의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 2의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함한다.
- [90] 본 발명에 있어, 상기 Ang2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 중쇄 CDR2 및 서열번호 3의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 4의 경쇄 CDR1, 서열번호 5의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 6의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [91] 서열번호 7의 중쇄 CDR1, 서열번호 8의 중쇄 CDR2 및 서열번호 9의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 10의 경쇄 CDR1, 서열번호 11의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 12의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [92] 서열번호 13의 중쇄 CDR1, 서열번호 14의 중쇄 CDR2 및 서열번호 15의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 16의 경쇄 CDR1, 서열번호 17의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 18의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [93] 서열번호 19의 중쇄 CDR1, 서열번호 20의 중쇄 CDR2 및 서열번호 21의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 22의 경쇄 CDR1, 서열번호 23의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 24의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [94] 서열번호 25의 중쇄 CDR1, 서열번호 26의 중쇄 CDR2 및 서열번호 27의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 28의 경쇄 CDR1, 서열번호 29의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 30의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [95] 서열번호 31의 중쇄 CDR1, 서열번호 32의 중쇄 CDR2 및 서열번호 33의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 34의 경쇄 CDR1, 서열번호 35의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 36의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,

- 경쇄 CDR2, 및 서열번호 18의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [96] 서열번호 13의 중쇄 CDR1, 서열번호 14의 중쇄 CDR2 및 서열번호 44의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 16의 경쇄 CDR1, 서열번호 17의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 18의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역, 또는
- [97] 서열번호 13의 중쇄 CDR1, 서열번호 14의 중쇄 CDR2 및 서열번호 45의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 16의 경쇄 CDR1, 서열번호 17의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 18의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [98] "골격 영역" (FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각 가변 도메인은 전형적으로, FR1, FR2, FR3 및 FR4로서 확인된 4개의 FR을 가진다. 본 출원의 발명자들은 항체의 생산성 및 고농축 제형 개발을 위하여 생산성 및 용해도 개선을 목표로 골격 영역에 돌연변이를 유도하였다.
- [99] "Fv" 단편은 완전한 항체 인식 및 결합 부위를 함유하는 항체 단편이다. 이러한 영역은 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인이, 예를 들어 scFv로 단단하게 사실상 공유적으로 연합된 이량체로 이루어진다.
- [100] "Fab" 단편은 경쇄의 가변 및 불변 도메인과, 중쇄의 가변 및 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. F(ab')₂ 항체 단편은 일반적으로 그들 사이에 힌지 시스테인에 의해 그들의 카복시 말단 근처에 공유적으로 연결되는 한 쌍의 Fab 단편을 포함한다.
- [101] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는데, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇄 내에 존재한다. Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함할 수 있다.
- [102] 본 발명에 따른 항체는 기능적으로 10⁻⁵M 내지 10⁻¹² M의 결합 친화성을 나타내는 범위 내에 있다. 본 발명에 따른 아미노산 치환에도 불구하고, 항원에 대한 친화도는 저하되거나, 친화도에 부정적 영향을 미치지 않을 수 있다.
- [103] 예를 들어, 변형 항체의 항원에 대한 결합 친화성은 10⁻⁶ M 내지 10⁻¹² M, 10⁻⁷ M 내지 10⁻¹² M, 10⁻⁸ M 내지 10⁻¹² M, 10⁻⁹ M 내지 10⁻¹² M, 10⁻⁵ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻⁶ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻⁷ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻⁸ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻⁹ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻¹⁰ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻⁵ M 내지 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁶ M 내지 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁷ M 내지 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M 내지 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁹ M 내지 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁵ M 내지 10⁻⁹ M, 10⁻⁶ M 내지 10⁻⁹ M, 10⁻⁷ M 내지 10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M 내지 10⁻⁹ M, 10⁻⁵ M 내지 10⁻⁸ M, 10⁻⁶ M 내지 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M 내지 10⁻⁸ M, 10⁻⁵ M 내지 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M 내지 10⁻⁷ M 또는 10⁻⁵ M 내지 10⁻⁶ M이다.
- [104] 본 발명에 따른 변형 항체는 서열번호 31, 33, 36으로 구성되는 군에서 선택되는 중쇄 가변영역을 포함 및/또는 서열번호 35의 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [105] 본 발명에 따른 구체적 실시예에서, 서열번호 31의 중쇄 가변영역 및 서열번호 32의 경쇄 가변영역;

- [106] 서열번호 33의 중쇄 가변영역 및 서열번호 32의 경쇄 가변영역;
- [107] 서열번호 34의 중쇄 가변영역 및 서열번호 35의 경쇄 가변영역;
- [108] 서열번호 36의 중쇄 가변영역 및 서열번호 32의 경쇄 가변영역;
- [109] 서열번호 31의 중쇄 가변영역 및 서열번호 35의 경쇄 가변영역;
- [110] 서열번호 33의 중쇄 가변영역 및 서열번호 35의 경쇄 가변영역; 또는
- [111] 서열번호 36의 중쇄 가변영역 및 서열번호 35의 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [112] 본 발명의 변형 항체 또는 이의 단편은 목적하는 기능을 유지하는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 항체의 서열뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물도 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [113] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 항체 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열번호에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 열라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)은 NCBI 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [114] 이에 기초하여, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 명세서에 기재된 명시된 서열 또는 전체와 비교하여 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상의 상동성을 가질 수 있다. 이러한 상동성은 당업계에 공지된 방법에 의한 서열 비교 및/또는 정렬에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어,

- 서열 비교 알고리즘(즉, BLAST 또는 BLAST 2.0), 수동 정렬, 육안 검사를 이용하여 본 발명의 핵산 또는 단백질의 퍼센트 서열 상동성을 결정할 수 있다.
- [115] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 변형 항체 또는 이의 단편을 코딩하는 핵산에 관한 것이다.
- [116] 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 분리하여 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 재조합적으로 생산할 수 있다. 핵산을 분리하고, 이를 복제 가능한 벡터 내로 삽입하여 추가로 클로닝하거나 (DNA의 증폭) 또는 추가로 발현시킨다. 이를 바탕으로, 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [117] "핵산"는 DNA(gDNA 및 cDNA) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analog)도 포함한다. 본 발명의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산의 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.
- [118] 본 발명에 따른 구체적 실시예에서, 상기 핵산은
- [119] 서열번호 37의 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열 및 서열번호 38의 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열;
- [120] 서열번호 39의 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열 및 서열번호 38의 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열;
- [121] 서열번호 40의 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열 및 서열번호 41의 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열;
- [122] 서열번호 42의 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열 및 서열번호 38의 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열;
- [123] 서열번호 37의 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열 및 서열번호 41의 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열;
- [124] 서열번호 39의 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열 및 서열번호 41의 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열; 또는
- [125] 서열번호 42의 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열 및 서열번호 41의 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열을 포함할 수 있다.
- [126] 상기 항체를 암호화하는 DNA는 통상적인 과정을 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄와 경쇄를 암호화하는 DNA와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리 또는 합성한다. 많은 벡터가 입수 가능하다. 벡터 성분에는 일반적으로, 다음 중의 하나 이상이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 증강인자 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.
- [127] 본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터; 코즈미드 벡터; 박테리오파지 벡터,

아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다. 상기 벡터에서 항체를 코딩하는 핵산은 프로모터와 작동적으로 연결되어 있다.

- [128] “작동적으로 연결”은 핵산 발현조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [129] 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lacUV5* 프로모터, *lpp* 프로모터, *pLλ* 프로모터, *pRλ* 프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, *SP6* 프로모터, *trp* 프로모터 및 *T7* 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 또한, 예를 들어, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터, β -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, *SV40* 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 *tk* 프로모터, 마우스 유방종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [130] 경우에 따라서, 벡터는 그로부터 발현되는 항체의 정제를 용이하게 하기 위하여 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은, 예컨대 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(IBM, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다.
- [131] 상기 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [132] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 언급된 벡터로 형질전환된 세포에 관한 것이다. 본 발명의 항체를 생성시키기 위해 사용된 세포는 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [133] 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*)(예를 들면, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)), 프로테우스미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 및 스탕필로코쿠스(*Staphylococcus*)(예를 들면, 스탕필로코쿠스 카르노수스(*Staphylococcus carnosus*))와 같은 원핵 숙주세포를 이용할 수 있다.

- [134] 다만, 동물 세포에 대한 관심이 가장 크며, 유용한 숙주 세포주의 예는 COS-7, BHK, CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U20S, 또는 HT1080일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [135] 본 발명은 또 다른 관점에서, 중쇄 가변영역 (heavy chain variable region) 중 12번 위치 또는 35번 위치, 및/또는 경쇄 가변영역 (light chain variable region) 중 76번 위치의 아미노산을 각각 세린 (S) 또는 트레오닌 (T)으로 치환하는 것을 포함하는 변형 항체 또는 이의 절편의 제조방법에 관한 것이다.
- [136] 상기 변형 항체 또는 이의 절편을 코딩하는 핵산을 세포에 도입할 수 있다. 상기 세포는 각종 배지에서 배양할 수 있다. 시판용 배지 중 제한없이 배양 배지로서 사용할 수 있다. 당업자에게 공지되어 있는 기타 모든 필수 보충물이 적당한 농도로 포함될 수도 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등이 발현을 위해 선별된 숙주 세포와 함께 이미 사용되고 있고, 이는 당업자에게 명백할 것이다.
- [137] 상기 항체 또는 이의 단편을 회수하는 방법은 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 불순물을 제거하고, 그 결과물을 예를 들어 친화 크로마토그래피 등을 이용하여 정제할 수 있다. 추가의 기타 정제 기술 예를 들어 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피 등이 사용될 수 있다.
- [138] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항체 또는 이의 단편을 유효성분으로 포함하는 종양의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 항체는 IgG 또는 가변영역을 포함한 단편 즉 ScFv 또는 Fab일 수 있다. 또한 중쇄의 가변영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 일 수 있다.
- [139] 본 발명은 예를 들어, (a) 본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 안질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물일 수 있다. 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 종양 환자에 투여하는 단계를 포함하는 안질환의 예방 또는 치료방법일 수 있다. 본 발명은 더욱이, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 Ang2의 기작 방해 용도 및 이를 통한 안질환의 예방 또는 치료 용도일 수 있다.
- [140] 안질환과 관련하여, 각막은 무혈관 조직으로 시력보존을 위해 항상 투명성을 유지해야 한다. 그러나, 신생혈관 생성은 눈에서도 나타나 안구의 신생혈관 관련 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다. 즉, 각막에서의 신생혈관 생성은 안구의 투명성을 저해하여 시력의 손실을 가져오게 하며, 망막에서의 신생혈관 생성은 비정상적인 혈관이 생성됨으로써 혈액의 삼출현상이 일어나 망막세포의 변성을 통한 실명을 유도한다.
- [141] 이를 바탕으로, 본 발명은 안질환 예를 들어, 미숙아 망막병증, 각막신생혈관생성증, 당뇨병성 망막증, 맥락막 신생혈관 질환, 황반변성 (예컨대, 연령 관련 황반변성)등의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

- [142] 본 발명은 예를 들어, (a) 본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편의 억제학적 유효량; 및 (b) 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 종양의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물일 수 있다. 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 종양 환자에 투여하는 단계를 포함하는 종양의 예방 또는 치료방법일 수 있다. 본 발명은 더욱이, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 Ang2의 기작 방해 용도 및 이를 통한 종양의 예방 또는 치료 용도일 수 있다.
- [143] 상기 조성물에 적용되는 질환인 종양은 전형적으로 Ang2를 과발현하는 종양 또는 암, 및 Ang2를 과발현하지 않은 종양 또는 암을 포함한다. 치료용으로 바람직한 종양 또는 암의 비-제한적인 예는 흑색종(예를 들면, 전이성 악성 흑색종), 신장암(예를 들면, 투명세포암종), 전립선암(예를 들면, 호르몬 불응 전립선샘암종), 췌장샘암종, 유방암 (경우에 따라서 삼중음성 유방암 (Triple-Negative Breast Cancer), 결장암, 폐암(예를 들면, 비-소세포 폐암), 식도암, 두경부편평세포암종, 간암, 난소암, 자궁경부암, 갑상샘암, 아교모세포종, 신경아교종, 백혈병, 림프종, 및 기타 신생물암종을 포함한다. 추가로, 본 발명은 본 발명의 항체를 사용하여 치료할 수 있는 불응 또는 재발암을 포함한다.
- [144] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항체 또는 이의 단편을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 저해용 약학 조성물에 관한 것이다. 또 다른 예는 상기 항체 또는 이의 단편을 유효성분으로 포함하는 Ang2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [145] 본 발명은 예를 들어, 상기 항체 또는 이의 단편의 치료적 유효량을 혈관신생 저해를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 혈관신생 저해 방법이 제공된다. 상기 혈관신생 저해 방법은 상기 투여 단계 이전에 혈관신생 저해를 필요로 하는 환자를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 상기 항체 또는 이의 단편의 치료적 유효량을 Ang2활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, Ang2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 예방 및/또는 치료 방법이 제공된다. 상기 예방 및/또는 치료 방법은 상기 투여 단계 이전에 Ang2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [146] 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 담체는 약물의 제제화에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학 조성물은 또한 약학 조성물 제조에 통상적으로 사용되는 희석제, 부형제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유효제, 현탁제, 보존제 으로 이루어진 군에서

선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.

- [147] 상기 약학 조성물, 또는 상기 항체 또는 이의 항원결합단편의 유효량은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [148] 상기 약학 조성물 내의 항체 또는 이의 단편의 함유량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 간격, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 예컨대, 상기 항체 또는 이의 단편의 1일 투여량은 0.001 내지 1000 mg/kg, 구체적으로 0.01 내지 100 mg/kg, 보다 구체적으로 0.1 내지 50 mg/kg, 더욱 구체적으로 0.1 내지 20 mg/kg 범위일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 1일 투여량은 단위 용량 형태로 하나의 제제로 제제화되거나, 적절하게 분량하여 제제화되거나, 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [149] 상기 약학 조성물은 다른 혈관신생 저해제 또는 Ang2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 치료제와 같은 다른 약물과 병용 투여 가능하며, 그 투여량, 투여 방법 및 다른 약물의 종류는 환자의 상태에 따라서 적절하게 처방될 수 있다.
- [150] 상기 약학적 조성물은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 등의 형태로 제형화될 수 있으며, 제형화를 위하여 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [151] 특히, 상기 항체 또는 이의 단편을 포함하는 약학 조성물은 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하므로, 면역 리포솜으로 제형화될 수 있다. 항체를 포함하는 리포솜은 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 면역 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 폴리에틸렌글리콜-유도체화된 포스파티딜에탄올아민을 포함하는 지질 조성물로서 역상 증발법에 의해 제조될 수 있다(한국공개특허 제10-2015-0089329호). 예를 들어, 항체의 Fab' 단편은 디설파이드-교체 반응을 통해 리포솜에 접합될 수 있다.
- [152] 한편, 상기 항체 또는 이의 단편은 Ang2에 특이적으로 결합하므로, 이를 이용하여 Ang2의 활성화 및/또는 과생성 여부를 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명의 또 다른 예는 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 Ang2 활성화 및/또는 과생성 및/또는 Ang2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 진단용 약학 조성물을 제공한다. 또 다른 예에서, 환자로부터 얻어진 생물 시료에 상기 항체 또는 이의 단편을 처리하는 단계; 항원-항체 반응 여부를 확인하는 단계; 및 항원-항체 반응이 탐지되는 경우 상기 환자를 Ang2 활성화 및/또는 과생성 증상이 존재하거나, Ang2의 활성화 및/또는 과생성 관련 질병을

갖는 것으로 판단하는 단계를 포함하는, 진단 방법 또는 진단에 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 상기 생물 시료는 환자로부터 얻어진 세포, 조직, 체액 등으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

- [153] 상기 항원-항체 반응 여부를 확인하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 수행할 수 있다. 예컨대, 통상적인 효소 반응, 형광, 발광 및/또는 방사선 검출을 통하여 하여 측정될 수 있으며, 구체적으로, 면역크로마토그래피(Immunochromatography), 역조직화학염색(Immunohistochemistry), 효소결합 면역흡착 분석(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay: RIA), 효소 면역분석(enzymeimmunoassay: EIA), 형광면역분석(Fluorescence immunoassay: FIA), 발광면역분석(luminescence immunoassay: LIA), 웨스턴블라팅(Western blotting) 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의하여 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [154] 상기 약학 조성물의 투여 또는 진단 대상 환자는 인간, 원숭이 등을 포함하는 영장류, 마우스, 래트 등을 포함하는 설치류 등을 포함하는 포유류일 수 있다.
- [155] 상기 Ang2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병은 암; 암전이; 미숙아 망막병증, 각막신생혈관생성증, 당뇨병성 망막증, 맥락막 신생혈관 질환, 황반변성 (예컨대, 연령 관련 황반변성) 등의 안질환; 천식; 류마티스성 관절염; 건선; 폐렴, 만성 염증 등의 염증성 질환; 고혈압, 동맥경화 등의 심혈관질환 또는 패혈증 등일 수 있다. 상기 암은 Ang2를 과발현하는 것일 수 있고, 고형암 또는 혈액암일 수 있으며, 이에 제한되지 않지만, 편평상피세포암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐의 선암, 폐의 편평상피암, 복막암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 간세포암, 위장암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암 (경우에 따라서 삼중음성 유방암 (Triple-Negative Breast Cancer), 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁암, 침샘암, 신장암, 간암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 간암, 두경부암, 뇌암, 골육종 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 암은 원발성 암 또는 전이성 암일 수 있다.
- [156]
- [157] 실시예
- [158] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [159]
- [160] 항-Ang2 항체를 안구질환에 적용하여 많은 양의 항-Ang2 항체를 주사하여 보다 나은 효과가 기대된다. 안구에 주사 가능한 볼륨이 한정적이었기 때문에

기준에 물질보다 고농축 조건에서 안정적인 제제를 필요로 하였다. 기준 항-Ang2 항체보다 고농축 제제를 만들기 위하여 항체 구조를 바탕으로 한 핫스팟 분석 (Hot Spot Analysis) 및 제형화 버퍼 (Formulation Buffer) 사용으로 고농도 제제를 만드는데 성공하였다.

[161]

[162] 실시예 1. 물성 개선을 위한 변이체 제작

[163]

[164] 항-Ang2 항체 클론인 O4 (서열번호 34의 중쇄 가변영역 및 서열번호 32의 경쇄 가변영역 포함)의 물성 개선을 수행하였다.

[165]

[166] [표1]

클론	항체	서열	서열번호
O4	중쇄가변영역	CAGGTGCAGCTGGTAGAGTCTGGGGGAGG CCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTC AGTAGCTATAGCATGAACTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCT CATCCATTAGTGCTAGTGATGGTGCCACA TACTACGCAGACTCCGTGAGGGGCCGGTTC ACCATCTCCAGAGACAATCCAGGAGCAC ACTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGC CGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGA AAACTCTCGCGGGATATAGTGGCCCAAT GGGTGGCATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA	40
		QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS YSMNWVRQAPGKLEWVSSISASDGATYY ADSVRGRFTISRDNRSRSTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKTLAGYSGPMGGMDVWGQGT TVSS	34
	경쇄가변영역	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCA CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC ATCACTTGTCGGGCGAGTCGGGACATTAG CAACTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACC AGGGAAGCCCCCTAAGTCCCTGATCTATGG AGCATCCAATTTACAAAGTGGGGTCTCATC ACAGTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAG ATTTCACCCTCACCATCAACAGCCTGCAGC CTGAAGATTCTGCAACTTATTACTGTCAAC AGTACTATAGTTACCCGCTCACTTTTGGC GGAGGGACCAAGGTGGATATCAAACGT	38
		DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASRDISNY LAWYQQKPGKAPKSLIYGASNLQSGVSSQF SGSGSGTDFTLTINSLQPEDSATYYCQYYYS YPLTFGGGTKVDIKR	32

[167] 항 Ang2 항체의 응집현상을 일으킬 가능성이 높은 아미노산을 Discovery Studio(BIOBIA) 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. VH에 Leu 11, Val 12, Asn 35, Val 93, VL에 Gln 61, Asn 76 아미노산이 물성에 영향을 주는 Hot Spot으로

분석되었다. (도 1, 표 2) 핫스팟 (hot spot)으로 분석된 아미노산을 변이시켜 물성이 개선된 변이체 중 발현하여 선별하였다.

[168]

[169] [표2]

항체	변이	AHO Numbering
Heavy chain	L11T	L11T
	V12S	V13S
	N35T	N42T
	V93S	V103S
Light chain	Q61R	Q77R
	N76S	N94S

[170]

[171] 실시예 2. 물성 개선을 위한 변이체 제작

[172]

[173] 항 Ang2 항체 (O4)의 물성을 개선하기 위해 핫스팟 분석 (Hot spot analysis)으로 선별된 아미노산을 치환하였다. 아미노산이 변경된 컨스트럭트 (construct)의 발현 테스트를 진행하였다. 항Ang2 항체 (O4) 유전자에 PCR 기법을 이용하여 점 변이 (point mutation)된 클론을 증폭하였다. 증폭된 유전자를 발현벡터(Merck Millipore, pET 22b(+))에 삽입하여 클로닝을 완료하였다. 클로닝이 완료된 플라스미드(plasmid)를 발현 숙주세포 (Host cell (Merck Millipore, BL21(DE3)))에 삽입하여 형질변환 하였다. 발현 테스트는 2XYT배지 100 µg/ml 농도의 Ampicillin을 첨가하고 형질변환된 cell을 접종하고 8시간 37°C 조건에서 배양하였다. 25°C로 온도를 낮춘 후 0.5 mM IPTG를 넣어 유도 (induction)하고 18시간 배양하였다. 8000 rpm 10분 원심분리하여 세포를 수확하였다. 침전된 세포를 50 mM Tris, 150 mM NaCl pH7.4 버퍼 (buffer)로 부유시키고 초음파를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 셀을 13000 rpm, 1시간 원심분리하여 상층액과 분리시키고 SDS-PAGE 으로 발현을 확인하였다. (도 2, 도 3 및 도 4)

[174]

[175] 실시예 3. 최적화된 항Ang2 항체의 ScFv 생산

[176]

[177] 물성이 개선된 항 Ang2 항체를 대장균에서 발현시키기 위하여 pET-22b 벡터(Novagen)에 클로닝하였다. BL21(DE3)에 형질전환하여 생성된 콜로니를 선별하여 LB(Lysogeny broth)배지에 100 µg/ml 앰피실린 (ampicillin)을 첨가하여 37°C, 200rpm 조건에서 전배양한 대장균을 100 µg/ml의 앰피실린 항생제를 포함한 LB배지에 1% 접종하였다. 37°C, 200rpm조건에서 배양하여 OD600=0.6-0.8에 이르면 배양기의 온도를 20°C으로 내리고 0.5 mM IPTG을 첨가하여 16시간 배양하였다.

[178] 배양한 대장균을 8000rpm, 10min 원심분리하여 집균하였다. 배지를 제거한 후

50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride)의 용해 버퍼 (lysis buffer)을 세포 무게 g당 10 ml 버퍼를 이용하여 재서스펜션 (resuspension) 하였다. 초음파 파쇄기를 사용하여 Power: 20W, rest: 3Sec, Work: 3Sec, Time: 10Min조건에서 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 cell을 13000rpm에서 1시간 원심분리 하여 상층액과 침전된 물질을 분리하였다.

- [179] ScFv는 불용성 (insoluble) 형태로 발현되어 재접힘 (refolding)을 진행하기 위해 펠렛 워시 (pellet wash)를 진행하였다. 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl 버퍼를 이용하여 호모지나이저 (homogenizer)로 균질화 시킨 후 13000rpm, 1h 원심분리하는 방법으로 펠렛 (pellet)을 2번 워싱하였다. 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 M Urea, 0.5% Triton X-100 버퍼를 이용하여 펠렛 내에 남아있는 대장균 유래의 물질들을 제거하였고 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl 버퍼로 3번 워싱을 반복하였다. 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 8 M 유리아 (urea), 10 mM DTT 버퍼로 봉입체 (inclusion body)를 재서스펜션 (resuspension) 시킨 후 30 min정도 반응시켜 ScFv를 폴딩되지 않은 (unfolded) 형태로 만들고 13000rpm, 1h 원심분리하여 침전물질과 분리하였다.
- [180] ScFv 항체를 단계적 투석 (step dialysis)를 통해 유리아 (urea)를 제거하여 재폴딩 (refolding)을 유도하였다. 투석 버퍼 (dialysis buffer)는 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl를 기본으로 하여 유리아 (urea) 농도를 1/2씩 낮춰가면서 진행하였다. 구조가 대부분 형성되는 4-2-1 M Urea 농도 구간에서 0.1 M L-아르기닌과 10% 글리세롤 (glycerol)을 첨가하여 응집 (aggregation) 형성을 억제하여 재접힘 (refolding)을 진행하였다. 재접힘 (refolding)이 완료된 scFv 항체는 HisTrap과 Capto L 컬럼을 이용하여 분리정제 진행하였다.
- [181] 분리 정제는 다음과 같은 순서로 진행하였다. AKTA Purifier(GE healthcare) 시스템을 이용하여 정제하였으며, 5 ml HisTrap 패킹 컬럼 (packing column)을 사용하였다. 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM 이미다졸 (Imidazole) pH 7.4 버퍼로 HisTrap 컬럼 부피의 10 배가 되는 컬럼 부피로 흘려 평형화 시킨 후, ScFv 항체 샘플을 3 ml/min의 유속으로 HisTrap 컬럼에 흐르게 하여 컬럼 내 레진 (resin)과 결합시켰다. 50 mM Tris, 400 mM NaCl, 10 mM 이미다졸 pH 7.4 버퍼로 레진에 존재하는 비특이적인 결합 물질을 제거해주기 위해 컬럼 부피의 약 10 배가 되는 컬럼 부피로 흘려준 후, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 400 mM 이미다졸 pH 7.4 버퍼를 농도 그래디언트 (gradient)하게 흘려 scFv 항체가 용출 (elution)되어 나오게 하였다. 용출 된 항체시료는 5 ml Capto L 컬럼을 이용하여 다음 정제를 진행하였다. 50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7.4 버퍼로 Capto L 컬럼을 평형화 시킨 후, 샘플을 3 ml/min의 유속으로 Capto L 컬럼에 흐르게 하여 Column내 Resin과 결합시킨다. PBS 버퍼를 컬럼 부피의 약 10 배가 되는 컬럼 부피로 흘려 비특이적 결합 물질을 제거하였다. PBS 버퍼로 제거하지 못한 비특이적 결합 물질은 50 mM Mes, 400 mM NaCl, 0.2% tween20 pH 5.5 버퍼를 10CV 흘려 제거하였다. 0.1 M Glycine, 50 mM NaCl pH 2.5 버퍼를 컬럼 부피의 약

10 배가 되는 컬럼 부피로 흘려 scFv 항체가 용출되어 나오게 하였다. 1 M Tris pH7.4 버퍼로 용출 샘플의 pH를 중성화 하였다. 도 5a 내지 도 5g는 최종적으로 정제 후 얻은 단백질을 SDS-PAGE를 수행한 결과이다. 그 결과 순도가 높은 ScFv 항체를 얻을 수 있었다.

[182] 물성이 개선된 항 Ang2 항체의 구체적 서열은 다음과 같다.

[183]

[184] [표3]

변이	항체	서열	번호
V12S	VH	1 QVQLVESGGG LSKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA 41 PGKGLEWVSS ISASDGATYY ADSVRGRFTI SRDNSRSTLY 81 LQMNSLRAED TAVYYCAKTL AGYSGPMGGM DVWGQGTTVT 121 VSS	31
	VL	1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASDIS NYLAWYQQKP 41 GKAPKSLIYG ASNLQSGVSS QFSGSGSGTD FTLTINSLQP 81 EDSATYYCQQ YYSYPLTFGG GTKVDIKR	32
N35T	VH	1 QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMTWVRQA 41 PGKGLEWVSS ISASDGATYY ADSVRGRFTI SRDNSRSTLY 81 LQMNSLRAED TAVYYCAKTL AGYSGPMGGM DVWGQGTTVT 121 VSS	33
	VL	1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASDIS NYLAWYQQKP 41 GKAPKSLIYG ASNLQSGVSS QFSGSGSGTD FTLTINSLQP 81 EDSATYYCQQ YYSYPLTFGG GTKVDIKR	32
N76S	VH	1 QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA 41 PGKGLEWVSS ISASDGATYY ADSVRGRFTI SRDNSRSTLY 81 LQMNSLRAED TAVYYCAKTL AGYSGPMGGM DVWGQGTTVT 121 VSS	34
	VL	1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASDIS NYLAWYQQKP 41 GKAPKSLIYG ASNLQSGVSS QFSGSGSGTD FTLTISSLQP 81 EDSATYYCQQ YYSYPLTFGG GTKVDIKR	35
V12S/N35T	VH	1 QVQLVESGGG LSKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMTWVRQA 41 PGKGLEWVSS ISASDGATYY ADSVRGRFTI SRDNSRSTLY 81 LQMNSLRAED TAVYYCAKTL AGYSGPMGGM DVWGQGTTVT 121 VSS	36

[185]

	VL	1 DIQMTQSPSS LSASVGDRV ITCRASRDIS NYLAWYQQKP 41 GKAPKSLIYG ASNLQSGVSS QFSGSGSGTD FTLTINSLQP 81 EDSATYYCQQ YYSYPLTFGG GTKVDIKR	32
V12S/N76S	VH	1 QVQLVESGGG LSKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA 41 PGKGLEWVSS ISASDGATYY ADSVRGRFTI SRDNSRSTLY 81 LQMNSLRAED TAVYYCAKTL AGYSGPMGGM DVWGQGTTVT 121 VSS	31
	VL	1 DIQMTQSPSS LSASVGDRV ITCRASRDIS NYLAWYQQKP 41 GKAPKSLIYG ASNLQSGVSS QFSGSGSGTD FTLTISSLQP 81 EDSATYYCQQ YYSYPLTFGG GTKVDIKR	35
N35T/N76S	VH	1 QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMTWVRQA 41 PGKGLEWVSS ISASDGATYY ADSVRGRFTI SRDNSRSTLY 81 LQMNSLRAED TAVYYCAKTL AGYSGPMGGM DVWGQGTTVT 121 VSS	33
	VL	1 DIQMTQSPSS LSASVGDRV ITCRASRDIS NYLAWYQQKP 41 GKAPKSLIYG ASNLQSGVSS QFSGSGSGTD FTLTISSLQP 81 EDSATYYCQQ YYSYPLTFGG GTKVDIKR	35
V12S/N35T/N76S	VH	1 QVQLVESGGG LSKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMTWVRQA 41 PGKGLEWVSS ISASDGATYY ADSVRGRFTI SRDNSRSTLY 81 LQMNSLRAED TAVYYCAKTL AGYSGPMGGM DVWGQGTTVT 121 VSS	36
	VL	1 DIQMTQSPSS LSASVGDRV ITCRASRDIS NYLAWYQQKP 41 GKAPKSLIYG ASNLQSGVSS QFSGSGSGTD FTLTISSLQP 81 EDSATYYCQQ YYSYPLTFGG GTKVDIKR	35

[186]

[187] 실시예 4. 최적화된 항Ang2 항체의 ScFv 농축

[188]

[189] 응집 현상이 나타나지 않는 최고농도의 분석을 위하여 원심분리를 사용하여 농축하였다. 정제된 항-Ang2 항체를 PBS와 상용화 제품에 사용된 제형 조성을

포함하는 제형화 버퍼 (10 mM Sodium Phosphate, 40 mM NaCl, 0.03% Polysorbate, 5% Sucrose pH 6.2)로 투석 (Dialysis)해서 Buffer 교환시킨다. Viva Spin Turbo 5,000 MWCO PEG 튜브(Sartorius)에 PBS 또는 제형화 버퍼 10 ml을 넣고 3400g, 10분 원심분리하여 평형화시킨다. Buffer 교환된 샘플을 튜브에 10 ml 넣고 3400g, 10분, 4°C로 원심분리하여 농축시킨다. NanoDrop(Thermo)으로 흡광도를 측정하여 농도를 측정하였다 (표 4).

[190]

[191] [표4]

Sample	ScFv PBS	ScFv 제형화 버퍼	V12S PBS	V12S 제형화 버퍼
최대 농도	43.4 mg/ml	57.25 mg/ml	92.1 mg/ml	137.97 mg/ml
sample	N35T PBS	N35T 제형화 버퍼	N76S PBS	N76S 제형화 버퍼
최대 농도	55.88 mg/ml	87.12	107.35 mg/ml	167.32 mg/ml
sample	V12S/N35T PBS	V12S/N76S PBS	N35T/N76S PBS	V12S/N35T/N76S PBS
최대 농도	95.64 mg/ml	95.99	96.31 mg/ml	99.86 mg/ml

[192]

[193] 실시예 5. 최적화된 항Ang2 ScFv 항체의 결합 특이성 분석

[194]

[195] 결합 특이성 분석에는 Octet system (Pall Fortebio LLC. US)을 사용하여 결합상수를 측정하였다.

[196] 정제된 ScFv 항체의 인간 Ang2 및 마우스 Ang2에 대한 결합력을 Octet system (Fortebio Inc. US)를 사용하여 측정하였다. AR2G biosensor를 20분 수화 (hydration) 시켰다. AR2G 바이오 센서 (biosensor)를 90% 3차 증류수에 5% s-NHS, 5% EDC 첨가한 용액을 사용하여 활성화 하였다. 항-Ang2 항체를 AR2G 센서에 1 µg/ml 농도로 고정화 하였다. 1 M 에탄올아민 (ethanolamine)으로 퀸칭 (quenching) 하였다. PBS으로 평형화하고 인간 Ang2의 농도 50, 40, 30, 20 nM별 결합 동역학을 측정하여 결합 속도 상수 (k_a), 해리 속도 상수 (k_{dis}) 및 결합 상수 (K_D)를 산출하였다 (표 5).

[197]

[198] [표5]

sample	ka (1/Ms)	kd(1/s)	KD (M)
ScFv N76S (hAng2)	5.49E+05	1.72E-04	1.13E-10
ScFv N76S (mAng2)	7.33E+05	1.69E-04	2.31E-10

[199]

[200] 실시예 6: 항-Ang2 scFv 항체의 열 안정성 (Thermal stability) 분석

[201]

[202] 항-Ang2 scFv 항체의 열 안정성을 분석하기 위해 RT-PCR 방법을 이용하여 T_m을 측정하였다. 분석 시료는 5 ul의 프로틴 터멀 시프트 버퍼 (Protein Thermal Shift Buffer : Thermo Fisher), 12.5 ul의 항-Ang2 scFv 항체 (1 mg/ml in PBS pH 7.4 buffer), 2.5 ul의 8X 프로틴 터멀 시프트 다이 (Protein Thermal Shift Dye)의 조성으로 두 번의 반복 실험이 가능하도록 준비하였다. T_m 분석은 Quantastudio 5 Thermocycler (Thermo Fisher)에 내장되어 있는 용융 곡선 실험법 (Melt Curve Experiment Method)을 사용하여 25 °C에서 99 °C까지 1.6 °C/s의 속도로 온도를 증가시키고, 0.05 °C/s마다 형광 강도 (fluorescence intensity) (흡광도a (580±10 nm)- 흡광도b (623±14 nm)) 측정하였고 프로틴 터멀 시프트 소프트웨어 (Protein Thermal Shift Software (Thermo Fisher))를 사용하여 T_m값을 계산하였다. 볼츠만 식 (Boltzmann equation)으로 계산된 항-Ang2 scFv 항체의 T_m B값은 77.31 °C로 기술적 변형 전 보다 T_m이 7 °C이상 증가하였고, 이는 기술적 변형으로 인해 열 안정성이 크게 개선되었음을 보여주었다 (도 6).

[203]

[204] 실시예 7: 마우스 CNV 모델을 이용한 항-Ang2 scFv 항체의 항혈관생성 효능 평가

[205]

[206] 항-Ang2 scFv 항체의 신생혈관형성의 억제효능이 있는지를 확인하기 위하여, 레이저 유도 맥락막 혈관 신생 마우스 (laser-induced choroidal neovascularization mouse) 모델에서 약효시험을 실시하였다. 그 효력은 상용약물인 애플리버셉트 (aflibercept)을 대조군으로 시험하였다. 마우스를 케타민으로 전신 마취시킨 후, 마취 점안제를 안구에 점안하여 추가 국소마취시키고, 산동제를 점안하여 산동 유도하였다. 마우스를 제물대 위에 올려놓고 Micron-IV를 이용하여 CNV 유도조건(wavelength 532 nm, diameter 50 µm, duration 80 mS, power level 200 mW)에 따라 레이저 화상 (laser burn)을 유도하여 브런치 맴브레인 (Bruch's membrane)을 파괴시켰다. 레이저 화상 유도 과정에서 버블링 (bubbling)이 관찰되지 않은 병변은 실패한 레이저 화상 (unsuccessful laser burn)으로 분류하고

Gong Y. 등이 제안한 기준을 변형 (modification) 한 제외 기준 (exclusion criteria)에 근거하여 결과분석 및 통계처리 과정에서 제외하였다.

[207]

[208] CNV 유도 및 약물에 의한 혈관신생 (angiogenesis) 억제 효과를 확인하기 위해 CNV 유도 후 10일에 마우스를 케타민으로 전신 마취시킨 후, 형광 조영제를 복강 주사하였다. 마취 점안제를 안구에 점안하여 추가 국소 마취를 시킨 후, 산동제를 점안하여 산동을 유도하였다. 마우스를 제물대 위에 올려놓고 Micron-IV의 이미징 카메라 (imaging camera)로 안저 (fundus)에 영상을 맞춘 후, 해당 안구에 윤활젤을 점안한 뒤 OCT의 렌즈를 마우스의 각막과 접촉시켰다. FFA/OCT 촬영을 실시한 후 마우스 안구에 항생제 점안액을 한 방울 점안하였다. FFA 및 OCT 이미지에 대한 분석은 'Image-J' 프로그램을 이용하여 실시하였다.

[209]

[210] 시신경 회복효과를 확인하기 위해 망막전위도 (ERG) 검사를 진행하였다. 마우스는 ERG 평가 12시간 전부터 암실에서 암순응을 유도하였다. 평가 당일(CNV 유도 후 11일)에 럼폰®과 케타민®으로 전신 마취시킨 후, 알카인®을 안구에 점안하여 추가 국소마취를 유도하고 산동제를 점안하여 산동을 유도하였다. 마우스를 ERG 제물대 위에 올려놓고 ERG의 프로브 (probe)를 각각 꼬리, 머리 및 각막에 접촉시켰다. ERG는 단일 flash 자극($0.9 \log \text{cds/m}^2$ ($10 \text{ responses/intensity}$))에 대한 망막 전위도 변화로 측정하였다. ERG 평가가 종료되면 마우스 안구에 토브렉스를 한 방울 점안하였다. ERG 분석은 'LabScribeERG (iWorx DataAcquisition Software)' 프로그램을 이용하여 실시하였다.

[211]

[212] 애플리버셉트 (aflibercept)는 멸균 PBS로 희석하여 $20 \mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{eye}$ 용량으로, 항-Ang2 scFv 항체의 경우 $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{eye}$, $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{eye}$ 및 $20 \mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{eye}$ 용량으로 CNV 유도 다음 날 IVT (intravitreal injection) 경로를 통하여 단회 투여하였다. CNV 유도 후 10일째에 FFA (fundus fluorescein angiography) 및 OCT (optical coherence tomography)를 이용한 망막영상평가를 실시하였으며, 이를 바탕으로 CNV 병변의 크기 및 단면적을 각각 측정하여 비교·평가하였다. 또한 CNV 유도 후 11일째에 야간 (scotopic) ERG (electroretinogram)에서 mono-flash ($0.9 \log \text{cds/m}^2$) 자극에 대한 망막 전위도의 변화를 A-wave에서부터 B-wave까지의 진폭 (amplitude)으로 정리하여 비교·평가하였다. 그 결과, FFA상에서 측정한 CNV 병변의 크기에 있어서 애플리버셉트 (aflibercept) 투여군 ($P<0.01$)과 $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{eye}$ 및 $20 \mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{eye}$ 의 항-Ang2 scFv항체 투여군의 병변 크기가 부형제 투여군의 병변 크기보다 통계적으로 유의하게 감소한 것을 확인하였다 (각각 $P<0.05$) (도 7a). 또한, OCT 상에서 측정한 CNV 병변의 부피 측정 결과에서도 항-Ang2 scFv항체를 $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{eye}$ 및 $20 \mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{eye}$ 투여한 군의 CNV 병변 부피가 통계적으로 유의하게 감소한 것을 확인하였다 (각각 $P<0.01$ 및 $P<0.001$) (도 7b).

ERG 상에서의 망막 전위도를 부형제 투여군과 비교하였을 때 애플리버셉트 (aflibercept) 투여군 및 항-Ang2 scFv 항체 투여군 모두 (G3, G4 및 G5)에서 망막 전위도가 CNV 대조군인 G1군 보다 유의성 있게 증가한 것을 확인하였다 (각각 $P<0.0001$, $P<0.0001$, $P<0.0001$ 및 $P<0.01$) (도 7c).

[213]

산업상 이용가능성

[214] 본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편은 골격 영역에 돌연변이를 포함함으로써, 용해도가 개선되어 고농도로 농축 가능하며, 이에 따라 항체 생산성이 향상될 수 있다.

[215]

[216]

[217] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[218]

[219]

서열목록 Free Text

[220] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] 중쇄 가변영역 (heavy chain variable region) 중 13번 위치, 42번 위치 (AHO Numbering에 따름) 및 경쇄 가변영역 (light chain variable region) 중 94번 위치 (AHO Numbering에 따름)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산이 치환된, 변형 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 중쇄 가변영역 13번 위치, 42번 위치 (AHO Numbering에 따름) 및 경쇄 가변영역 94번 위치 (AHO Numbering에 따름)는 세린 (S) 또는 트레오닌 (T)으로 치환된, 변형 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 다음으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 위치 (AHO Numbering에 따름)에서 아미노산 치환을 포함하는 변형 항체 또는 이의 단편:
중쇄 가변영역 13번의 발린 (V)을 세린 (S)으로 치환;
중쇄 가변영역 42번의 아스파라진 (N)을 트레오닌 (T)으로 치환; 및
경쇄 가변영역 94번의 아스파라진 (N)을 세린 (S)으로 치환.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 아미노산 치환된 중쇄 가변영역은 QVQLVESGGGLX₁KPGGSLRLSCAAS (상기 X₁은 S) 및/또는 MX₂WVRQAPGKGLEWVSS (상기 X₂는 T)의 서열을 가지는 골격 영역을 포함하는 변형 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 아미노산 치환된 경쇄 가변영역은 NLQSGVSSQFSGSGSGTDFTLTIX₃SLQPEDSATYYC (상기 X₃은 S)의 서열을 가지는 골격 영역을 포함하는 변형 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 다음으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 골격 영역을 포함하는 변형 항체 또는 이의 단편:
QVQLVESGGGLX₁KPGGSLRLSCAAS (상기 X₁은 S);
MX₂WVRQAPGKGLEWVSS (상기 X₂는 T); 및
NLQSGVSSQFSGSGSGTDFTLTIX₃SLQPEDSATYYC (상기 X₃은 S).
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
서열번호 1, 7, 13, 19 및 25로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR1,
서열번호 2, 8, 14, 20 및 26으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR2, 및
서열번호 3, 9, 15, 21, 27, 43, 44 및 45로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 및
서열번호 4, 10, 16, 22, 및 28로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR1,
서열번호 5, 11, 17, 23 및 29으로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR2, 및
서열번호 6, 12, 18, 24 및 30로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 변형 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 서열번호 31, 33, 36으로 구성되는 군에서 선택되는 중쇄

- 가변영역을 포함하는 변형 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 서열번호 35의 경쇄 가변영역을 포함하는 변형 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
 서열번호 31의 중쇄 가변영역 및 서열번호 32의 경쇄 가변영역;
 서열번호 33의 중쇄 가변영역 및 서열번호 32의 경쇄 가변영역;
 서열번호 34의 중쇄 가변영역 및 서열번호 35의 경쇄 가변영역;
 서열번호 36의 중쇄 가변영역 및 서열번호 32의 경쇄 가변영역;
 서열번호 31의 중쇄 가변영역 및 서열번호 35의 경쇄 가변영역;
 서열번호 33의 중쇄 가변영역 및 서열번호 35의 경쇄 가변영역; 또는
 서열번호 36의 중쇄 가변영역 및 서열번호 35의 경쇄 가변영역을
 포함하는 변형 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 11] 중쇄 가변영역 (heavy chain variable region) 중 13번 위치, 42번 위치 (AHO Numbering에 따름) 및 경쇄 가변영역 (light chain variable region) 중 94번 위치 (AHO Numbering에 따름)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산을 치환하는 것을 포함하는, 변형 항체 또는 이의 단편의 제조방법.
- [청구항 12] 제10항에 있어서, 상기 중쇄 가변영역 13번 위치, 42번 위치(AHO Numbering에 따름) 및 경쇄 가변영역 94번 위치(AHO Numbering에 따름)를 세린 (S) 또는 트레오닌 (T)으로 치환하는 것을 포함하는, 제조방법.
- [청구항 13] 제11항에 있어서, 다음으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 위치(AHO Numbering에 따름)에서 아미노산을 치환하는 것을 포함하는 제조방법:
 중쇄 가변영역 13번 의 발린 (V)을 세린 (S)으로 치환;
 중쇄 가변영역 42번 (AHO Numbering에 따름)의 아스파라진 (N)을 트레오닌 (T)으로 치환; 및
 경쇄 가변영역 94번 (AHO Numbering에 따름)의 아스파라진 (N)을 세린 (S)으로 치환.
- [청구항 14] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 변형 항체 또는 이의 단편을 코딩하는 핵산.
- [청구항 15] 제14항의 핵산을 포함하는 발현벡터.
- [청구항 16] 제15항의 발현벡터로 형질전환된 세포.
- [청구항 17] 다음 단계를 포함하는 변형 항체 또는 이의 단편을 제조하는 방법:
 (a) 제16항의 세포를 배양하는 단계; 및
 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계.