

명세서

발명의 명칭: 항-ANG2 항체 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 엔지오포이에틴-2(Angiopoietin-2; Ang-2)에 특이적으로 결합하여 기능을 저해하는 항체와 관련된 것으로, 항-Ang2 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 세포, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법, 이를 포함하는 혈관신생 저해제 및 엔지오포이에틴-2 활성화 및 또는 과생성과 관련된 질병의 치료용 조성물, 및 상기 항체를 포함하는 엔지오포이에틴-2 활성화 및 또는 과생성과 관련된 질병의 진단용 조성물, 상기 항체를 포함하는 안질환, 또는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 Ang2에 결합하는 항체 이외의 조성물과의 병용투여용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 혈관 신생(angiogenesis)은 기존 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 기작을 의미하며, 기관의 형성, 정상적인 생리학적 성장, 상처 치유 등에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 종양의 성장과 전이에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 비정상적인 혈관 신생은 종양의 성장과 전이, 연령 관련 황반변성, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염, 만성 염증과 같은 질병에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [4] 따라서 혈관 신생에 관여하는 인자들이 암 등의 질병의 새로운 치료제의 개발을 위한 중요한 타겟이 되고 있으며, 고령화와 서구화된 식습관으로 당뇨병환 환자수가 급격히 증가됨에 따라 신생혈관 안질환 환자가 급격히 증가하고 있다. 주요 안질환으로서는 연령관련 황반변성증(AMD; Age-related Macular Degeneration, 이하 ‘황반변성증’이라 함), 당뇨병성 망막증(DR; Diabetic Retinopathy), 당뇨병성 황반부종(DME; Diabetic Macular Edema) 등이 있다. 특히 황반변성증과 당뇨병성 망막증은 전 세계적으로 주요 실명 원인질환이다.
- [5] 노인성 황반변성의 진행과 관련한 요인은 여러가지가 있겠으나 산화적 스트레스, 염증반응, 그리고 신생혈관 형성과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 가장 주요한 인자로는 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)가 가장 널리 알려져 있다. 치료제로서 단일클론 항체, 항체 단편, 혹은 융합 단백질을 이용한 VEGF 억제제 개발이 시도돼 왔고, 현재 황반변성 치료제로 널리 쓰이고 있는 대표적인 약물은 아일리아(Aflibercept) 루센티스(Ranibizumab)가 사용되고 있다. 이들 약물의 작용기전은 VEGF 신호 억제에 의한 혈관형성 억제를 유도하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 이들 약물의 투여 환자 가운데 10-15%는 기존 치료법에 반응하지 않는 것으로 알려져 있다. 그 이유로는, 기존의 항 VEGF

치료는 병리적인 혈관형성만을 억제한 반면, 또 다른 경로의 혈관형성 요인이 질병의 진행에 영향을 주기 때문인 것으로 알려져 있다. 엔지오포이에틴 2 (ANG2)는 혈관벽의 내피세포에 있는 Tie2 수용체에 결합하여 신생혈관형성을 촉진하는 사이토카인으로 알려져 있다. 앞서 동물실험과 임상시험등을 통하여 ANG2 신호 억제를 억제함으로써 중앙내 혈관 형성을 억제하여 항암효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다. 더욱이 ANG의 발현은 노인성황반변성 환자안구의 방수액내에서 높게 존재하는 것으로 알려져 있다. 따라서 항 VEGF 치료제와 함께 항-ANG2 치료제의 개발과 병행 요법이 황반변성치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다. 이에 당사는 노인성 황반변성 및 당뇨병성 망막병증의 치료제를 개발하기 위하여 Ang-2에 주목하였다.

- [6] 안지오포이에틴-2 (Angiopoietin-2; Ang2)는 혈관내피세포에 존재하는 수용체 Tie2의 길항적인 리간드 (antagonistic ligand)로서, Tie2의 작용물질 (agonist)인 안지오포이에틴-1(Angiopoietin-1; Ang1)과 Tie2 결합에 대해 경쟁함으로써 Tie2에 의한 신호전달을 억제하는 작용을 하며, Tie2 수용체를 활성화 시키는 리간드인 Ang1은 혈관내피세포의 장벽 기능(barrier function)을 유지시킴으로써 혈관의 안정화(stabilization)를 유지하는 주요 조절자(key regulator)로 작용한다. VEGF의 과발현 또는 염증(inflammation) 상태에서는 혈관내피세포가 활성화되며, 혈관 투과성(vascular permeability)이 증가한다.
- [7] 이때, Ang1은 혈관내피세포의 접합부통합(junctional integrity)을 촉진함으로써 혈관내피세포의 안정화를 유도하고 혈관 투과성을 감소시키는 반면, 활성화된 혈관내피세포에서 증가된 Ang2는 Tie-2에 결합함으로써 혈관내피세포의 이동과 팁 형성(tip formation)에 관여한다. 결과적으로 신생혈관의 형성을 촉진하게 된다.
- [8] 당뇨병성 망막증의 경우, PDGF 시그널링(signaling)이 혈관주변세포를 조절함으로써 blood-retinal barrier의 형성과 성숙에 필수적임이 규명되었고, 성체 망막 혈관에서 혈관주변세포의 소실이 VEGF-A에 대한 혈관내피세포의 반응성을 증가시켜 FOXO1-Ang2 loop를 활성화시킴으로써 당뇨병성 망막증의 악화시킴이 증명되었다. 즉 Ang2 차단 및 Tie2 활성화를 유도하면 당뇨병성 망막증의 새로운 치료법 개발이 가능할 것으로 판단된다.
- [9] 또한, Ang-2는 암 조직에서의 신생 혈관 형성에도 기여한다. 암 조직에서 신생 혈관 형성을 위해 암세포가 기존의 혈관을 선택하는 혈관공용(cooption)이 발생한다. 그 후, Ang-2 경로에 의해 기존의 혈관의 기능을 파괴시키는 혈관 퇴화가 일어난다. 기존 혈관의 퇴화로 인하여 암 조직내의 환경은 저산소(hypoxia) 환경이 되어 신생 혈관이 형성될 수 있는 조건을 제공한다. 상기 조건 하에서 혈관 내피 세포 성장 인자(VEGF)의 과발현이 유도되어, 앞서 언급한 바와 같이 신생혈관이 유도된다. 이러한 이유로 Ang-2는 혈관신생 억제제를 통한 항암제 개발의 주요 타겟이 되어 왔다.
- [10] 이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 항-Ang2 항체를 개발하기

위하여 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 Ang2에 목적하는 결합력을 나타내는 항-Ang2 항체를 개발하고, 이러한 항-Ang2 항체가 목적하는 면역항암제 또는 안과질환 치료제의 역할을 할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[11]

[12] **발명의 요약**

[13] 본 발명의 목적은 Ang2에 대한 신규 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는 데 있다.

[14] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 제공하는 데 있다.

[15] 본 발명의 다른 목적은 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 세포 및 이의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 혈관신생 저해제 및 엔지오포이에틴-2 활성화 및 또는 과생성과 관련된 질병의 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 혈관신생 저해제 및 엔지오포이에틴-2 활성화 및 또는 과생성과 관련된 질병의 진단용 조성물을 제공하는 데 있다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 안질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 종양 또는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[20] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 Ang2 항체 또는 Ang2 항체와 병용투여하기 위한 조성물을 제공하는 데 있다.

[21] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1, 7, 13, 19 및 25로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR1,

[22] 서열번호 2, 8, 14, 20 및 26으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR2, 및

[23] 서열번호 3, 9, 15, 21, 27, 51, 52 및 53로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및

[24] 서열번호 4, 10, 16, 22, 및 28로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR1,

[25] 서열번호 5, 11, 17, 23 및 29으로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR2, 및

[26] 서열번호 6, 12, 18, 24 및 30로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, Ang2 (Angiopoietin-2)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편을 제공한다.

[27] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 제공한다.

[28] 본 발명은 또한, 상기 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.

[29] 본 발명은 또한, 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[30] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공한다: (a) 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 회수하는 단계.

[31] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 혈관신생 저해제 및 엔지오포이에틴-2 활성화 및 또는 과생성과 관련된 질병의 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 혈관신생 저해제 및 엔지오포이에틴-2 활성화 및 또는 과생성과 관련된 질병의 진단용 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 종양 또는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 안질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 Ang2 항체 또는 Ang2 항체와 병용투여하기 위한 조성물을 제공한다.

[32]

도면의 간단한 설명

[33] 도 1은 선별된 단클론 scFv 파지가 Ang2/Tie2 결합을 저해하는 능력이 있음을 확인한 결과이다.

[34] 도 2는 선별한 항-Ang2 항체를 일시발현 및 정제 후 산물에 대한 환원조건 및 비환원조건에서의 SDS-PAGE 결과이다.

[35] 도 3은 일시발현 및 정제한 항-Ang2 항체의 인간 및 마우스 Ang2 와 Ang1에 대한 결합을 평가한 ELISA 결과이다.

[36] 도 4는 선별된 항-Ang2 항체의 인간 및 마우스 Ang2/Tie2 결합을 중화할 수 있는 능력을 보여주는 결과이다.

[37] 도 5는 선별된 항-Ang2 항체의 Ang2/integrin의 결합을 중화할 수 있는 능력을 보여주는 결과이다.

[38] 도 6은 선별된 항-Ang2 항체가 Ang2/Tie2 신호전달을 저해할 수 있음을 보여주는 결과이다.

[39] 도 7은 선별된 항-Ang2 scFv 항체를 대장균에서 발현하여 정제 단계별 순도를 확인한 결과이다.

[40] 도 8은 대장균에서 발현한 항-Ang2 scFv 항체의 인간 Ang2 단백질에 대한 결합을 평가한 ELISA 결과이다.

[41] 도 9 내지 도 11은 선별된 항-Ang2 ScFv 항체의 in vivo 효능을 CNV mouse 모델에서 확인한 결과이다.

[42] 도 12은 인간 유래 삼중음성유방암 모델을 이용한 항-Ang2 항체의 항종양 효과에 대한 결과이다.

[43]

[44] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

- [45] 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.
- [46] 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1, 7, 13, 19 및 25로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR1,
- [47] 서열번호 2, 8, 14, 20 및 26으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR2, 및
- [48] 서열번호 3, 9, 15, 21, 27, 51, 52 및 53로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및
- [49] 서열번호 4, 10, 16, 22, 및 28로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR1,
- [50] 서열번호 5, 11, 17, 23 및 29으로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR2, 및
- [51] 서열번호 6, 12, 18, 24 및 30로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, Ang2 (Angiopoietin-2)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편에 관한 것이다.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] 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.

- [56] 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.
- [57] 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.
- [58] 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.
- [59] 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.
- [60] "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.
- [61] 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 종 (공여자 항체), 예를 들어 마우스, 랫트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 초가변 영역으로부터의 잔기로 대체시킨 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다.
- [62] 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.

- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] "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.
- [66] 본 발명에 있어, 상기 Ang2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 1의 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 중쇄 CDR2 및 서열번호 3의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 4의 경쇄 CDR1, 서열번호 5의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 6의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [67] 서열번호 7의 중쇄 CDR1, 서열번호 8의 중쇄 CDR2 및 서열번호 9의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 10의 경쇄 CDR1, 서열번호 11의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 12의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [68] 서열번호 13의 중쇄 CDR1, 서열번호 14의 중쇄 CDR2 및 서열번호 15의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 16의 경쇄 CDR1, 서열번호 17의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 18의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [69] 서열번호 19의 중쇄 CDR1, 서열번호 20의 중쇄 CDR2 및 서열번호 21의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 22의 경쇄 CDR1, 서열번호 23의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 24의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [70] 서열번호 25의 중쇄 CDR1, 서열번호 26의 중쇄 CDR2 및 서열번호 27의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 28의 경쇄 CDR1, 서열번호 29의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 30의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [71] 서열번호 13의 중쇄 CDR1, 서열번호 14의 중쇄 CDR2 및 서열번호 51의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 16의 경쇄 CDR1, 서열번호 17의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 18의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
- [72] 서열번호 13의 중쇄 CDR1, 서열번호 14의 중쇄 CDR2 및 서열번호 52의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 16의 경쇄 CDR1, 서열번호 17의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 18의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역, 또는
- [73] 서열번호 13의 중쇄 CDR1, 서열번호 14의 중쇄 CDR2 및 서열번호 53의 중쇄

CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 16의 경쇄 CDR1, 서열번호 17의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 18의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

- [74] "골격 영역" (FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각 가변 도메인은 전형적으로, FR1, FR2, FR3 및 FR4로서 확인된 4개의 FR을 가진다.
- [75] "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.
- [76] "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.
- [77] "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.
- [78] Ang2 항체는 단쇄 또는 이중 쇄를 포함할 수 있다. 기능적으로, Ang2 항체의 결합 친화성은 10^{-5} M 내지 10^{-12} M 범위 내에 있다. 예를 들어, Ang2 항체의 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.
- [79] 상기 Ang2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 32, 36, 40, 44, 48, 55, 57, 59 및 61로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 또한, 상기 Ang2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 34, 38, 42, 46 및 50으로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [80] 특히, 항-Ang2 항체의 생산성 및 고농축 제형 개발을 위하여 생산성 및 용해도 개선을 목표로 중쇄 가변영역의 프레임워크 부분에 돌연변이를 유도하였다. 돌연변이는 중쇄 가변영역 12번 아미노산인 Valine을 Serine으로 변환하여 제작하였다. 이에 따라, 서열번호 61의 중쇄 가변영역을 포함하는 항체를 실험하였다. 그 결과, 향상된 생산성 및 용해도를 나타냄을 확인하였다.
- [81] 본 발명에 따른 구체적 실시예에서, 서열번호 32의 중쇄 가변영역 및 서열번호 34의 경쇄 가변영역;
- [82] 서열번호 36의 중쇄 가변영역 및 서열번호 38의 경쇄 가변영역;
- [83] 서열번호 40의 중쇄 가변영역 및 서열번호 42의 경쇄 가변영역;

- [84] 서열번호 44의 중쇄 가변영역 및 서열번호 46의 경쇄 가변영역;
- [85] 서열번호 48의 중쇄 가변영역 및 서열번호 50의 경쇄 가변영역;
- [86] 서열번호 55의 중쇄 가변영역 및 서열번호 42의 경쇄 가변영역;
- [87] 서열번호 57의 중쇄 가변영역 및 서열번호 42의 경쇄 가변영역;
- [88] 서열번호 59의 중쇄 가변영역 및 서열번호 42의 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 61의 중쇄 가변영역 및 서열번호 42의 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [89] "파지 디스플레이"는 변이체 폴리펩티드를 파지, 예를 들어 섬유상 파지 입자의 표면 상에 외피 단백질의 적어도 일부와의 융합 단백질로서 디스플레이하는 기술이다. 파지 디스플레이의 유용성은 무작위화 단백질 변이체의 큰 라이브러리를 대상으로 하여, 표적 항원과 고 친화도로 결합하는 서열을 신속하고도 효율적으로 분류할 수 있다는 사실에 있다. 펩티드 및 단백질 라이브러리를 파지 상에 디스플레이하는 것은 특이적 결합 특성을 지닌 폴리펩티드를 알아보기 위해 수 백만개의 폴리펩티드를 스크리닝하는데 사용되어 왔다.
- [90] 파지 디스플레이 기술은 특정 리간드 (예: 항원)와 결합하는 신규 단백질을 생성 및 선별하기 위한 강력한 도구를 제공하였다. 파지 디스플레이 기술을 사용하여, 단백질 변이체의 큰 라이브러리를 생성시키고, 표적 항원과 고 친화성으로 결합하는 서열을 신속하게 분류할 수 있다. 변이체 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 바이러스성 외피 단백질, 예를 들어 유전자 III 단백질 또는 유전자 VIII 단백질을 암호화하는 핵산 서열과 융합시킨다. 단백질 또는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 유전자 III 단백질의 일부를 암호화하는 핵산 서열과 융합시킨 1가 파지 디스플레이 시스템이 개발되었다. 1가 파지 디스플레이 시스템에서는, 유전자 융합물이 저 수준으로 발현되고 야생형 유전자 III 단백질이 또한 발현되어 입자 감염성이 유지된다.
- [91] 섬유상 파지 표면 상에서의 펩티드의 발현과 *E. coli*의 주변세포질에서의 기능성 항체 단편의 발현을 입증하는 것이 항체 파지 디스플레이 라이브러리를 개발하는 데에 있어 중요하다. 항체 또는 항원 결합성 폴리펩티드의 라이브러리는 수 많은 방식, 예를 들어 무작위 DNA 서열을 삽입함으로써 단일 유전자를 변경시키는 방법 또는 관련 유전자 계열을 클로닝하는 방법으로 제조하였다. 라이브러리를 대상으로 하여, 목적하는 특징을 수반한 항체 또는 항원 결합성 단백질의 발현에 관하여 스크리닝할 수 있다.
- [92] 파지 디스플레이 기술은 목적하는 특징을 지닌 항체를 제조하기 위한 통상적인 하이브리도마 및 재조합 방법에 비해 몇 가지 이점을 지니고 있다. 이러한 기술은 동물을 사용하지 않고서도 짧은 시간에 다양한 서열을 지닌 큰 항체 라이브러리를 생성시킬 수 있도록 한다. 하이브리도마의 제조나 인간화 항체의 제조는 수 개월의 제조기간을 필요로 할 수 있다. 또한, 면역이 전혀 요구되지 않기 때문에, 파지 항체 라이브러리는 독성이거나 항원성이 낮은 항원에 대해서도 항체를 생성시킬 수 있다. 파지 항체 라이브러리를 또한 사용하여

신규한 치료적 항체를 생성 및 확인할 수 있다.

- [93] 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 면역시킨, 비-면역시킨 인간, 생식세포계 서열, 또는 미감작 B 세포 Ig 레퍼토리 (repertory)로부터 인간 항체를 생성시키는 기술을 사용할 수 있다. 각종 림프계 조직을 사용하여, 미감작 또는 비면역 항원 결합성 라이브러리를 제조할 수 있다.
- [94] 파지 디스플레이 라이브러리로부터 고친화성 항체를 확인 및 분리할 수 있는 기술은 치료용 신규 항체 분리에 중요하다. 라이브러리로부터 고친화성 항체를 분리하는 것은 라이브러리의 크기, 세균성 세포 중에서의 생산 효율 및 라이브러리의 다양성에 좌우될 수 있다. 라이브러리의 크기는 항체 또는 항원 결합성 단백질의 부적절한 폴딩과 정지 코돈의 존재로 인한 비효율적 생산에 의해 감소된다. 세균성 세포에서의 발현은 항체 또는 항원 결합성 도메인이 적절하게 폴딩되지 않는 경우에는 억제될 수 있다. 발현은 가변/불변 계면의 표면이나 선별된 CDR 잔기에서의 잔기를 교대로 돌연변이시킴으로써 개선시킬 수 있다. 골격 영역의 서열은 세균성 세포에서 항체 파지 라이브러리를 생성시키는 경우에 적절한 폴딩을 제공하기 위한 하나의 요소이다.
- [95] 고 친화성 항체 분리에서 항체 또는 항원 결합성 단백질의 다양한 라이브러리를 생성시키는 것이 중요하다. CDR3 영역은 이들이 종종 항원 결합에 참여하는 것으로 밝혀졌다. 중쇄 상의 CDR3 영역은 크기, 서열 및 구조적 입체 형태 면에서 상당히 다양하므로, 이를 이용하여 다양한 라이브러리를 제조할 수 있다.
- [96] 또한, 각 위치에서 20개 아미노산 모두를 사용하여 가변 중쇄 및 경쇄의 CDR 영역을 무작위화함으로써 다양성을 발생시킬 수 있다. 20개의 모든 아미노산을 사용하면 다양성이 큰 변이체 항체 서열이 생성되고 신규한 항체를 확인할 기회가 증가할 수 있다.
- [97] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 Ang2를 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 본 발명의 항-Ang2 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.
- [98] 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 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 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 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)은 NCBI 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastn, 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.

- [99] 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.
- [100] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산에 관한 것이다.
- [101] 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.
- [102] "핵산"은 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(analogue)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.
- [103] 본 발명에 따른 구체적 실시예에서, 상기 핵산은 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 31, 35, 39, 43, 47, 54, 56, 58, 60로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 또한, 상기 핵산은 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 33, 37, 41, 45 및 49로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [104] 구체적으로, 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 31의 핵산 및 경쇄

- 가변영역을 코딩하는 서열번호 33의 핵산;
- [105] 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 35의 핵산 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 37의 핵산;
- [106] 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 39의 핵산 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 41의 핵산;
- [107] 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 43의 핵산 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 45의 핵산;
- [108] 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 47의 핵산 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 49의 핵산;
- [109] 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 54의 핵산 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 41의 핵산;
- [110] 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 56의 핵산 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 41의 핵산;
- [111] 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 58의 핵산 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 41의 핵산; 또는
- [112] 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 60의 핵산 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 41의 핵산을 포함할 수 있다.
- [113] 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.
- [114] 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.
- [115] "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.
- [116] 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, SV40프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 물로니 바이러스의 프로모터엡스타인바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

- [117] 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(ABI, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다.
- [118] 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.
- [119] 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.
- [120] 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 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)(예를 들면, 스태필로코쿠스 카르노수스(*Staphylococcus carnosus*))와 같은 원핵 숙주세포를 이용할 수 있다.
- [121] 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.
- [122] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법에 관한 것이다.
- [123] 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.

- [124] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 회수는 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.
- [125] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항체를 유효성분으로 포함하는 종양의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 항체는 IgG 또는 가변영역을 포함한 단편 즉 ScFv, Fab일 수 있다. 또한 중쇄의 가변영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 일 수 있다.
- [126] 본 발명은 예를 들어, (a) 본 발명에 따른 Ang2에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 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.
- [127] 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.
- [128] 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.
- [129] 본 발명은 예를 들어, (a) 본 발명에 따른 Ang2에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 종양 또는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물일 수 있다. 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 종양 또는 암 환자에 투여하는 단계를 포함하는 종양 또는 암의 예방 또는 치료방법일 수 있다. 본 발명은 더욱이, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 Ang2의 기작 방해 용도 및 이를 통한 종양 또는 암의 예방 또는 치료 용도일 수 있다.
- [130] 상기 조성물에 적용되는 질환인 종양 또는 암은 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.

- [131] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항-Ang2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 저해용 약학 조성물에 관한 것이다. 또 다른 예는 상기 항-Ang2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [132] 본 발명은 예를 들어, 상기 항-Ang2 항체 또는 이의 항원 결합 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 항-Ang2 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 치료적 유효량을 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 예방 및/또는 치료 방법이 제공된다. 상기 예방 및/또는 치료 방법은 상기 투여 단계 이전에 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [133] 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, 유화제, 현탁제, 보존제 으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [134] 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.
- [135] 상기 약학 조성물 내의 항-Ang2 항체 또는 이의 항원 결합 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 항-Ang2 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 1일 투여량은 0.001 내지 1000mg/kg, 구체적으로 0.01 내지 100mg/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.

- [136] 상기 약학 조성물은 다른 혈관신생 저해제 또는 엔지오포이에틴-2 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.
- [137] 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.
- [138] 특히, 상기 항-Ang2 항체 또는 그 항원 결합 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. (공개특허 10-2015-0089329) 예를 들어, 항체의 Fab' 단편은 디설파이드-교체 반응을 통해 리포솜에 접합될 수 있다.
- [139] 한편, 상기 항-Ang2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 엔지오포이에틴-2에 특이적으로 결합하므로, 이를 이용하여 엔지오포이에틴-2의 활성화 및/또는 과생성 여부를 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명의 또 다른 예는 상기 항-Ang2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성 및/또는 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 진단용 약학 조성물을 제공한다. 또 다른 예에서, 환자로부터 얻어진 생물 시료에 상기 항-Ang2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 처리하는 단계; 항원-항체 반응 여부를 확인하는 단계; 및 항원-항체 반응이 탐지되는 경우 상기 환자를 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성 증상이 존재하거나, 엔지오포이에틴-2의 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.
- [140] 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(enzymeliked immunosorbent assay: ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay: RIA), 효소 면역분석(enzymeimmunoassay: EIA), 형광면역분석(Floresence immunoassay: FIA), 발광면역분석(luminescence immunoassay: LIA), 웨스턴블라팅(Western blotting) 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의하여 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [141] 상기 약학 조성물의 투여 또는 진단 대상 환자는 인간, 원숭이 등을 포함하는 영장류, 마우스, 래트 등을 포함하는 설치류 등을 포함하는 포유류일 수 있다.
- [142] 상기 엔지오포이에틴-2 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 엔지오포이에틴-2를 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.
- [143]
- [144] 실시예
- [145] 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.
- [146]
- [147] 실시예 1. Ang2에 결합하는 항체의 선별
- [148] Ang2에 결합하는 항체를 선별하기 위한 항체 라이브러리 및 라이브러리의 준비는 한국 특허출원 (공개특허 10-2008-0109417호) 와 같은 자체의 인간 미감작 scFv (human naive ScFv) 라이브러리를 이용하였다. 96-웰 면역 플레이트에 항원 (hAng2-his : RND systems. Cat. No 623-AN/CF, hAng2-Fc : pharmabcine)을 2 µg/ml로 100 µl씩 웰에 넣고 4°C 오버나이트 (overnight) 시킨다.

다음날 항원 코팅 플레이트 (coating plate)는 5mM CaCl₂ TBS로 3번 워싱한 후 2% BSA 차단 버퍼 (blocking buffer) 200 µl를 넣고 실온에서 2시간 반응시킨다. 2x YT-TET(tetracycline 10 µg/ml) 성장 배지 (growth medium) 2ml에 XL1-Blue 스톡 (stock) 50 µl를 넣고 37 °C, 200 rpm에서 2시간 정도 키운 후 13 ml를 더 첨가하여 OD₆₀₀이 0.5가 될 때까지 키워준다. 차단 (blocking) 2시간이 지나면 1X 5mM CaCl₂ TBS로 3번 워싱한다. 워싱한 각 웰에 파지 라이브러리 그룹 (phage library group)을 합쳐 파지 라이브러리 양과 4% BSA 양을 동일하게 섞은 후 200 µl씩 첨가하여 실온에서 30분간 로킹(rocking)한 후 2시간을 반응시킨다. 파지 라이브러리 반응이 끝나면 상층액은 버리고 0.1% TBST(5mM CaCl₂)로 5번 워싱하고 TBS(5mM CaCl₂)로 5번 워싱해 각 웰에 100 mM TEA(trimethylamine) 100µl를 넣은 후 실온에서 10분간 흔들어준다. 10분 지나면 각 웰에 1M Tris(pH 7.5) 50 µl를 넣고 섞어준다. 상등액 (supernatant)은 OD₆₀₀ 0.5가 된 XL1-blue 10ml에 넣어 37°C에서 30분간 감염 (infection)시킨다. 감염이 끝나면 100 µl는 아웃풋 타이터 (output titer)로 사용하고 나머지는 6,000 rpm, 10분간 원심분리한다. 상층액은 버리고 침전물은 라지 스퀘어 플레이트 (large square plate: CM 34 µg/ml + 1% Glucose)에 스프레딩 (spreading)하여 30°C에서 오버나이트 인큐베이션 (overnight incubation)한다. 아웃풋 타이터로 남겨둔 100µl는 1/10, 1/100, 1/1000으로 희석 (dilution)하여 CM 플레이트에 스프레딩하여 37°C에서 오버나이트한다. 다음날 스퀘어 플레이트에 자란 콜로니 (colony)는 2x YT 배지 50ml을 넣은 후 룬 (loop)을 사용하여 긁어 모은 후 6000 rpm, 10분 원심분리하여 상층액은 버리고 침전액 (precipitate)에 대하여 1차 패닝 스톡 (panning stock)을 만들고 2x YT 배양 배지 (growth media: CM 34 µg/ml + 1% Glucose) 100 ml을 500 ml 삼각플라스크에 넣은 후 OD₆₀₀ 0.2 되게 세포를 넣고 200 rpm, 37°C에서 OD 0.5가 될 때까지 키워준다. OD₆₀₀ 값이 0.5가 될 때까지 세포를 배양한 후에 헬퍼 파지 (helper phage: M13KO7 mutant)을 세포의 20배가 되게 넣어준다. 헬퍼 파지를 넣고 37°C, 30분 감염 (infection)시킨 후 6000 rpm, 10 min 원심분리 한다. 상층액을 버리고 세포는 2xYT 배지 (CM 34 µg/ml + Kan. 70 µg/ml + 1mM IPTG + 5mM MgCl₂) 100ml로 교체하여 넣어준 후 200 rpm, 30°C, 오버나이트한다. 다음날 자란 세포는 7000 rpm, 10분, 원심분리하고 같은 방법으로 한번 더 원심분리한다. 모은 상층액은 상층액의 1/5 (v/v) 20% PEG/2.5m NaCl 를 넣고 아이스 (ice)에서 1시간 침전시킨다. 침전시킨 후 9000 rpm, 1시간 원심분리한다. 상층액은 버리고 TBS 3ml로 침전액 (precipitate)을 풀어준 후 0.45 µm 필터 (filter)에 여과한 후 4°C에 보관하여 이를 다음 번 패닝 (panning) 과정에서 사용한다. 이 과정을 3~4번 반복하여 항원에 결합하는 항체를 ELISA를 수행하여 확인하였다.

[149]

[150] 실시예 2. Ang2에 특이적으로 결합하며 Tie2와의 결합을 중화하는 Monoclonal ScFv phage 선별(binding ELISA/competitive ELISA)

- [151] 패닝 (panning) 과정이 끝나면 마지막 라운드 세포 스톱 (round cell stock)을 CM 아가 플레이트 (agar plate)에 200~500개의 콜로니가 형성될 수 있도록 희석하여 깔아준 후 37°C에서 오버나이트한다. 다음날 콜로니 (colony)가 자라면 96 웰 딥 플레이트 (96 well deep plate)에 2xYT 배지 (CM 34 μ g/ml + 1% glucose) 200 μ l를 넣고 각 웰에 콜로니를 하나씩 넣은 후 37°C, 3000rpm에서 오버나이트한다. 다음날 새로운 96 웰 딥 플레이트에 2xYT 배지 (CM 34 μ g/ml + 1% glucose) 200 μ l를 넣고 각 웰에 전날 키운 세포를 각 웰에 마다 20ml씩 넣은 후 37°C, 3000rpm, 1시간 10분 키운다. 나머지 세포는 50% 글리세롤 100 μ l씩 첨가하여 -70°C에 보관한다. 세포가 자라면 헬퍼 파지 1 μ l와 2xYT 배지 19 μ l를 섞은 후 각 웰에 20 μ l씩 첨가 후 37°C에서 30분 인큐베이션한다. 인큐베이션이 끝나면 3000rpm, 10분 원심분리한다. 상층액을 버리고 2xYT 배지 (CM 34 μ g/ml + Kan. 70 μ g/ml + 1mM IPTG + 5mM MgCl₂) 200 μ l를 넣고 메가그로우 (megagrow)에서 30°C, 3000rpm에서 오버나이트한다.
- [152] Ang2에 특이적으로 결합하는 파지를 선별하기 위하여 먼저, 96 웰 면역 플레이트에 Ag (hAng2-Fc, hAng1-his: RND systems. Cat. No 923-AN/CF 또는 mAng1-Fc, phrmabcine) 1 μ g/ml로 만들어 100 μ l/well씩 넣고 4°C에서 오버나이트한다. 다음날 전날 키운 세포는 3000rpm, 10분 원심분리하여 4°C에 보관한다. 깔아 놓은 Ag은 0.1% TBST(5mM CaCl₂)로 3번 워싱한 후에 2% BSA 차단 버퍼 (blocking buffer) 200 μ l씩 넣은 후 25°C 2시간 인큐베이션한다. 차단 (blocking)이 끝나면 0.1% TBST(5mM CaCl₂)로 3번 워싱 한다. 각 웰에 4% BSA 50 μ l와 다운 (down)하여 4°C에서 보관했던 파지 50 μ l을 섞은 후 실온에서 1시간 흔들어 반응시킨다. 파지 결합 (phage binding)이 끝나면 0.1% TBST(5mM CaCl₂)로 3번 워싱한 후에 HRP-접합 마우스 항-M13 항체 1:3000 (HRP-conjugated mouse anti-M13 Ab) (Sino, 11973-MM05)을 100 μ l씩 넣은 후 25°C 1시간 반응시킨다. 반응이 끝나면 0.1% TBST(5mM CaCl₂)로 3번 워싱한 후에 TMB(#BD TMB substrate reagent set 555214) 100 μ l씩 넣은 후 3~5분 발색 시킨 후 정지 용액 (stop solution)을 50 μ l씩 넣은 후에 ELISA 리더 (ELISA reader)로 분석한다.
- [153]

[154] [표1]

Ang2 항원에 특이적으로 결합하는 monoclonal scFv phage를 ELISA로 측정한 결과

Clone	OD		
Agtigen	hAng2-Fc	hAng1-his	mAng1-Fc
No. 3	1.904	0.025	-
No. 4	0.835	-	0.093
No. 8	1.364	-	0.199
No. 41	0.825	-	0.111
No. 46	1.194	-	0.061

[155]

[156] 선별된 항체의 염기서열은 다음 표 2, 표3과 같다

[157]

[158] [표2]

Ang2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 CDR 서열

서열명		아미노산서열	서열번호
No.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
No.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

[159]

No.8	Heavy-chain CDR1	GFTFSSYS	13
	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
No.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
No.46	Heavy-chain CDR1	GFTFDDCA	25

[160]

Heavy-chain CDR2	ISGNSKNV	26
Heavy-chain CDR3	ARDPAYSQFDY	27
Light-chain CDR1	SSNVGGYP	28
Light-chain CDR2	TDY	29
Light-chain CDR3	ATWDDNLNGYV	30

[161]

[162] [표3]

Ang2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 가변영역 서열

항체명칭		서열	서열번호
No.3	중쇄가변영역	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGG CTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTCAAAC CTCCTGCGCAGCCTCTGGATTCTCCTTIG ATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAA GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC CACCATAAAGGACGATGGAAGTCAGACA TACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAGCTC ACTGTTTCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGC CGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTACCA CAGAAGGATTAATGAATGGACTTCATTT GATATGTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAC CGTCTCCTCA	31
		QMLVQSGGGLVQPGRSLKLSCAASGFSFD DYAMHWVRQAPGKGLEWVATIKDDGSQTY YVDSVKGRFTISRDNKSSFLQMNSLRAED TAVYYCTTEGLMNGLHFDMWGQGTMTVTV SS	32
	경쇄가변영역	CAGCTCGTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGTG TCTGGGGCCCCAGGGCAGGGGGTCACCAT CTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAAACATCG GGGCAGGTATGATGTACACTGGTACCAG CAGTTTCCAGGAACAGCCCCAAACTCCT CATCTCTGGTAACAATAATCGGCCCTCAGG GCTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTC TGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGG ACTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTA CTGCCAGTCTTATGACAGCAGGCTGGGT GTGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGAC CGTCTCAGGT	33
		LVLTPPSVSGAPGQGVITISCTGSSSNIGAGY DVHWYQQFPGTAPKLLISGNNRPSGLPDRF SGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDS RLGVVFGGGTKLTVLG	34
No.4	중쇄가변영역	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGCAGA GGTGAAAAGACCCGGGGAGTCTCTGAGGA TCTCCTGTAAGACTTCTGGATACAGCTTTA CCAGCTACTGGATCCACTGGGTGCGCCAG ATGCCCCGGGAAAGAACTGGAGTGGATGGG GAGCATCTATCCTGGGAACCTCTGATACCA GATACAGCCCATCCTTCCAAGGCCACGTCA CCATCTCAGCCGACAGCTCCAGCAGCACC GCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGC	35

[163]

No.8	경쇄가변영역	CTCGGACACCGCCATGTATTACTGTACCAC AGAAGGATTAATGAATGGACTTCATTTT GATATGTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAC CGTCTCCTCA	
		QVQLVESGAIEVKRPGESLRISCKTSGYSFTS YWIHWVRQMPGKELEWMGSIYPGNSDTRY SPSFQGHVTISADSSSSTAYLQWSSSLKASDTA MYYCTTEGLMNGLHFDMMWGQGTMTVTS S	36
		GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCC CTGCCCCTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTC CATCTCCTGTAGGTCAAGTCAGAGCCTCC TGCAIAGTCTTGGAGACAATTATTTGGAT TGGTATCTACAGAAGCCAGGGCAGTCTCCG CAACTCCTGATCTATTGGGTCTTAAGCG GGCCGCCGGGGTCCCCGACAGGTTCAAGTG GCAGTGGCTCAGGCA CAGACTTTACACTC AAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGT TGGAGTTTATTATTGCATGCAATCTCTACA AACTCCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGA CCAAGCTGGAGATCAAACT	37
	중쇄가변영역	DIVMTQTPLSLPVTPEPASISCRSSQSLHLS LGDNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSKRAAG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQSLQTPPYTFGQGTKLEIKR	38
		CAGGTGCAGCTGGTAGAGTCTGGGGGAGG CCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTC AGTAGCTATAGCATGAAGTGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCT CATCCATTAGTGCTAGTGATGGTGCCACA TACTACGCAGACTCCGTGAGGGGCCGGTTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAGCAC ACTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGC CGAGGACACGGCCGTGTTACTGTGCGA AAATTCTCGCGGGATATAGTGGCCCAAT GGGCGGAATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA	39
		QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS YSMNWVRQAPGKLEWVSSISASDGATYY ADSVRGRFTISRDNRSRTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKILAGYSGPMGGMGVWGQGTTV TVSS	40
	경쇄가변영역	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCA CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGATCACC ATCACTTGTCGGGCGAGTCGGGACATTAG	41

[164]

		CAACTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACC AGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATGG AGCATCCAATTTACAAAGTGGGGTCTCATC ACAGTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAG ATTTACCCCTCACCATCAACAGCCTGCAGC CTGAAGATTCTGCAACTTATTACTGTCAAC AGTACTATAGTTACCCGCTCACTTTTGGC GGAGGGACCAAGGTGGATATCAAACGT	
		DIQMTQSPSSLASVGDRTTTCRASRDISNY LAWYQQKPGKAPKSLIYGASNLQSGVSSQF SGSGSGTDFTLTINSLQPEDSATYYCQQYYS YPLIFGGGKVDIKR	42
No.41	중쇄가변영역	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG CTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGAAGCCTCTGGATTCCGCTTC GGTCTTATGAGATGAATTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTG CATATATTGATACTGGTGGTGGTGC AAA GTCTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCAGAGACGACAGCAAAAATC CCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGC CGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTACCA CAGAAGGATTAATGAATGGACTTCATTT GATATGTGGGGCCAAGGGACAATGATCAC CGTCTCCTCA	43
		QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFAFG RYEMNWVRQAPGKGLEWIAIDTGGGAK VYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCTTEGLMNGLHFDMWGQGTMIT VSS	44
	경쇄가변영역	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACC CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCGCC ATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGCTATTAG TACCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAAC CTGGTAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTATA CGGCGTCTACTTTAGAAAGTGGGGTCCCA TCAAGGTTCAAGCGCAGTGGATCTGGGAC AGATTCACTCTCACCATCAACAGCCTGCA GCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGTCAA CAGCTTAATAGTACCTTACACTTTTCGG CGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGT	45
		DIQMTQSPSTLSASVGDRTTTCRASQAIST WLAWYQQKPGKAPKLLIYTASTLESGVPSR FSGSGSGTDFTLTINSLQPDFFATYYCQQLNS YPYIFGGGKVEIKR	46
No.46	중쇄가변영역	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG	47

[165]

		CTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACT CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTG ATGATTGTGCCATGCACTGGGTCCGACAA GCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTC AGGTATTAGTGGGAATAGTAAAAACGTA GCCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATT AGCATCTCCAGAGACGACGCAAGAATC CCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGC CGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGA GAGATCCGGCATAACAGCCAGTTTACTA CTGGGGCCAGGGAACCCTGATCACCGTCT CCTCA	
		QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFIFD DCAMHWVRQAPGKGLEWVSGISGNSKNVA YADSVKGRFSISRDDAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARDPAYSQFDYWGQGLITVSS	48
	경쇄가변영역	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCCCTCACTG TCTGCGACCCCGGGCAGAGGGTCACCAT CTCTTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACGTCG GAGGATATCCTGTCAACTGGTACCAGCAG GTCCCAGGAGCGGCCCCAACTCCTCAT GTATACTGATTATAAGCGGCCCTCAGGTGT CCCTGACCGATTCTTTGGCTCCAAGTCTGG CACTTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGCCT CCAGTCTGAAGATGAGGCTGATTACTTG TGCTACATGGGACGACAACCTGAATGGC TATGCTCTCGGAACTGGGACCAAGGTCAC CGTCCTAGGT	49
		QSALTQPPSLSATPGQRVTISCSGSSSNVGGY PVNWWYQQVPGAAPKLLMYTDYKRPSGVPD RFFGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATW DDNLNGYVFGTGKVTVLG	50

[166]

[167] Competitive ELISA에서는 Ang2/Tie2의 결합을 중화하는 파지를 선별하기 위하여, 96 웰 면역 플레이트에 Ag (hTie2-Fc : phrmabcine) 1 μ g/ml로 만들어 100 μ l/well씩 넣고 4°C에서 오버나이트한다. 깔아 놓은 Ag은 1X PBS로 2번 워싱한 후에 3% BSA 차단 버퍼 (blocking buffer) 200 μ l씩 넣은 후 25°C 2시간 인큐베이션한다. 차단 (blocking)이 끝나면 0.1% PBST로 2번 워싱 한다. 각 웰에 hAng2-his(RND, 623-AN/CF) 5 μ g/ml 20 μ l와 다운 (down)하여 4°C에서 보관했던 파지를 부피별로 (80 μ l, 40 μ l+1X PBS 40 μ l, 20 μ l+1X PBS 60 μ l) 섞은 후 실온에서 1시간 흔들어 반응시킨다. 파지 결합 (phage binding)이 끝나면 0.05% PBST로 3번 워싱한 후에 항-Ang2 마우스 항체(RND, MAB098)를 0.5 μ g/ml로 실온에서 1시간 반응시킨다. 항체 결합이 끝나면, 0.05% PBST로 3번 워싱한 후에 HRP-접합 마우스 항-IgG 항체 1:2000 (HRP-conjugated Goat anti-mIgG Ab) (RND, HAF007)을 100 μ l씩 넣은 후 25°C 1시간 반응시킨다. 반응이 끝나면 0.05% PBST로 3번 워싱한 후에 TMB(#BD TMB substrate reagent set 555214) 100 μ l씩 넣은 후 3~5분 발색 시킨 후 정지 용액 (stop solution)을 50 μ l씩 넣은 후에 ELISA

리더 (ELISA reader)로 분석한다. 그 결과를 [도 1]에 나타내었다. 도1 도면에서 보여지듯이 선별된 파지들은 Tie2/Ang2의 결합을 중화시키는 능력이 있음을 확인하였다.

[168]

[169] 실시예 3. Ang2에 대한 고친화력을 가진 항체선별 (Off-rate screening)

[170] 선별된 항체의 항원에 대한 결합력을 Octet (ForteBio)을 이용하여 측정하였다. 이를 위하여 Ang2를 바이오센서 (biosensor)에 고정 (immobilize)한 후 scFv 형태로 발현된 후보항체를 넣고 결합시킨 후, 해리 속도 상수를 측정하였다. 그 결과를 [표 4]에 나타내었다.

[171]

[172] [표4]

Ang2항원에 특이적으로 결합하는 항체의 해리속도 상수

clone	Kdis (1/s)
No.3	6.42E-04
No.4	2.12E-04
No.8	<1.0E-07
No.41	1.08E-05
No.46	6.14E-05

[173]

[174] 실시예 4. 항-Ang2 항체 발현

[175] 선별한 scFv 파지의 IgG형태로의 전환은 분자생물학적 기법을 사용하여 수행하였다. 선별한 E. Coli 클론에서 파지미드 (Phagemid)를 추출, PCR기법을 사용하여 가변영역을 증폭하였다. 증폭한 중쇄 가변영역을 중쇄 불변영역을 포함하는 발현벡터 (Invivogen, pfusess-hchg1)에 삽입하고, 증폭한 경쇄 가변영역을 경쇄 불변영역을 포함하는 발현벡터 (Invivogen, pfuse2ss-hclk)에 삽입하여, IgG 형태의 DNA 클로닝을 완료하였다.

[176] IgG의 일시 발현은 Expi293F 발현 시스템 키트 (Expi293F expression system kit: Thermo Fisher Scientific, US)을 사용하였다. Kit에 포함된 Expi293 세포를 전용 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 환경 하에서 125 rpm 오비탈 шей커 상 부유배양 하였다. 3일마다 3 x 10⁵ cells/ml 되도록 계대배양 하였으며, 발현 벡터 도입시에는 3 x 10⁶ cells/ml 되도록 세포수를 조정 한 후 사용하였다. 유전자 도입은 전용 시약인 Expifectamine을 사용하였으며, 세포현탁액 1 ml 당 발현 벡터 DNA 1 µg과 Expifectamine 2.7 µl을 함유하는 Lipid-DNA 복합체를 제작, 세포현탁액에 첨가하였으며, 도입 16-18시간 후 인핸서 (Enhancer) 1/2를 첨가하여 발현을 유도하였다. 이후 동일 조건에서 3-4일간 배양 후 원심분리하여 IgG 함유 상등액을 취하였다.

[177]

[178] 실시예 5. 항-Ang2 항체의 정제

[179] 취득한 상등액을 Protein A 컬럼(GE Healthcare)에 주입하여 친화력

크로마토그래피를 통해 IgG를 정제하였다. 컬럼을 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 7.0)으로 평형화 시킨 후 상등액을 주입, 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2% polysorbate 20 (pH 7.0) 용액으로 세정한 후, 50 mM NaCl, 0.1 M glycine-HCl (pH 3.5)로 용출 후 1 M Tris로 중화하였다. 용출된 단백질은 MWCO 10,000 spectra/por dialysis membrane (Spectrum Labs, US)를 사용한 투석 과정을 통해 PBS로 용매를 교체하였다. 이후 Vivaspin (Satorius, DE)을 사용하여 필요 농도로 농축하여 분주 후 -80°C에서 보관하였다.

- [180] 정제 후 각 항체는 비환원 및 환원 LDS 샘플 버퍼 (Non-reducing 및 Reducing LDS sample buffer: Thermo Fisher Scientific)에 처리하여 NuPAGE System (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 전기영동 하였다. 그 결과 50 kDa의 중쇄 및 25 kDa의 경쇄 사슬을 포함하는 총 분자량 약 150 kDa의 IgG를 획득하였다. (도 2)
- [181]
- [182] 실시예 6. 항-Ang2 항체의 결합 특이성 분석
- [183] 결합 특이성 분석에는 ELISA법과 Biacore T200 system (GE Healthcare Life Sciences)을 사용하여 결합상수를 측정하였다.
- [184] 96웰 이뮤노플레이트(Nunc, US)의 각 웰에 1 µg/ml의 His-tag 된 인간(R&D systems, 623-AN/CF), 마우스(sino, 50298-M07H) Ang2 단백질은 인간(R&D systems, 923-AN/CF), 마우스(sino, 50300-M07H) Ang1 용액을 100 µl 첨가 후 4°C에서 하룻밤 정치하여 흡착시켰다. 다음 날 0.05% Tween-20 함유 PBS (이하 PBST)로 3회 세정하고, 2% BSA/PBST 용액을 각 웰 당 200 µl 첨가 후 상온에서 2시간 정치하여 블로킹하였다. PBST로 3회 세정 후 각 시험 항체 용액을 농도별로 100 µl씩 첨가하여 상온에서 1시간 결합시킨 후, PBST로 3회 세정, 1:2000의 비율로 희석한 HRP-접합된 goat anti-human IgG(kappa) (bethyl lab #A80-115P)를 100 µl 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켜 결합을 유도하였으며, PBST로 3회 세정 후 100 µl의 TMB 기질 시약을 사용하여 발색시켰다. 발색 반응은 50 µl 의 2N H₂SO₄를 첨가 하는 것으로 정지시켰으며, Sunrise 마이크로플레이트 리더(TECAN, CH)를 사용하여 특이적 흡광도 OD₄₅₀₋₆₃₀을 측정하였다 (도 3). 도3에서 보여지듯이 선별된 항체는 인간 과 마우스 Ang2에 특이적으로 결합하며, 인간과 마우스 Ang1에는 결합하지 않는다.
- [185] 선별된 항Ang2 항체의 결합력을 분석하기 위해 인간 Ang2와 마우스 Ang2에 대한 친화도 분석을 BIACORE® T200 (GE Healthcare)을 사용하여 분석하였다. protein A 센서칩을 사용하였으며, 제조자의 매뉴얼에 따라 실험하였다. 분석의 세부적인 조건은 다음과 같다. Porotein A 고정은 2000 RU(Response Unit)이고, 항Ang2 항체 후보는 25 RU로 결합하였으며, 인간 Ang2 와 마우스 Ang2를 다양한 농도로 결합하였다. 분석 시작농도는 각각 100nM 과 150nM이다. 분석은 유속 30 µl/min으로 진행하며 인간 Ang2의 결합구간은 300초, 해리구간은 2000초로 측정하였으며, 마우스 Ang2는 결합구간 300초, 해리구간 1000초로 분석하였다. 분석모델은 1:1 결합모델을 사용하여 분석하였다. 분석 결과는 [표

5]에 나타내었다.

[186]

[187] [표5]

	SPR (Biacore T-200)					
	hAng2			mAng2		
sample	ka (1/Ms)	kd(1/s)	KD (pM)	ka (1/Ms)	kd(1/s)	KD (pM)
No.3	3.34E+05	4.22E-05	127	1.58E+05	8.53E-05	538
No.4	2.73E+05	5.93E-05	217	1.57E+05	7.05E-05	450
No.8	2.68E+05	4.37E-05	163	1.44E+05	6.69E-05	463
No.41	3.20E+05	7.77E-05	243	2.89E+05	9.47E-05	328
No.46	2.74E+05	8.62E-05	314	4.65E+05	8.94E-05	193
REGN910	3.53E+05	9.30E-05	263	2.10E+05	5.51E-05	262

[188]

[189] 실시예 7. 항-Ang2 항체의 중화능력 확인 (Ang2/Tie2, Ang2/integrin)

[190] 96웰 이뮤노플레이트(Nunc, US)의 각 웰에 1 µg/ml의 인간 Tie2-Fc (R&D systems, 313-TI), 마우스 Tie2-Fc(R&D systems, 762-T2-100), 인테그린 α3/β1(R&D systems, 2840-A3-050) 그리고 인테그린 α5/β1(R&D systems, 3230-A5-050) 용액을 100 µl 첨가 후 4°C에서 하룻밤 정치하여 흡착시켰다. 다음 날 0.05% Tween-20 함유 PBS (이하 PBST)로 4회 세정하고, 2% BSA/PBST 용액을 각 웰 당 200 µl 첨가 후 상온에서 1시간 정치하여 블로킹하였다. 항Ang2 후보 항체는 최고1000nM에서 4배로 단계희석하여 일부는 biotin-결합된 인간 Ang2 단백질이 최종 100ng/mL이 되도록 만들고, 일부는 biotin-결합된 인간 Ang2 단백질이 최종 625ng/mL이 되도록 만들어서 미리 상온에서 1시간 결합하였다. 블로킹이 끝난 플레이트는 PBST로 4회 세정 후 미리 항원 항체 반응을 유도한 시료를 넣어, 상온에서 1시간 결합시킨다. 위의 플레이트를 PBST로 3회 세정, 1:200의 비율로 희석한 HRP-접합된 streptavidin (R&D systems, DY998)를 100 µl 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켜 결합을 유도하였으며, PBST로 4회 세정 후 100 µl의 TMB 기질 시약을 사용하여 발색시켰다. 발색 반응은 50 µl 의 2N H₂SO₄를 첨가 하는 것으로 정지시켰으며, Sunrise 마이크로플레이트 리더(TECAN, CH)를 사용하여 특이적 흡광도 OD₄₅₀을 측정하였다 (도 4, 도 5). 도4에서 보여지듯이 선별된 항체는 인간 과 마우스 모두에서 Ang2/Tie2 결합을 중화하였다. 중화능력은 IC₅₀값을 구하여 수치화 하였으며, [표 6]에 나타내었다. 또한 도5에서 보여지듯이 인테그린/Ang2의 결합도 중화하였다. 인테그린/Ang2의 중화능력은 IC₅₀값을 구하여 수치화 하였으며, [표 7]에 나타내었다.

[191]

[192] [표6]

no.	sample	IC ₅₀ (hAng2 competition) (pM)	IC ₅₀ (mAng2 competition) (pM)
1	No.3	491.4	5021
2	No.4	461.6	4544
3	No.8	495.5	4830
4	No.41	475.5	3985
5	No.46	336.6	5255
6	REGN910	458.6	10445

[193]

[194] [표7]

no.	sample	IC ₅₀ (α5β1/hAng2 competition) (pM)	IC ₅₀ (α3β1/hAng2 competition) (pM)
1	No.3	1531	2495
2	No.4	1572	2425
3	No.8	1888	4682
4	No.41	1494	2432
5	No.46	1896	4389
6	REGN910	2512	5251

[195]

[196] 실시예 8. 항-Ang2항체의 Ang2/Tie2 신호 억제 효과 분석(p-Tie2 assay)

[197] 인간 Tie2 과발현 세포(1x10⁵)를 96웰 플레이트에 넣고, 37°C 이산화탄소가 공급되는 인큐베이터에서 하룻밤 키운다. 위의 세포를 혈청없는 배지에서 하룻밤 키워 혈청기아 상태를 만든다. 인간 Ang2 (5μg/ml)와 다양한 농도의 항-Ang2를 상온에서 1시간 미리 반응시킨 후, 세포가 들어있는 플레이트에 넣고 20분간 반응시킨다. 이때 항체가 없고, Ang2단백질만 들어있는 웰을 포함시켜 신호 억제 효과 분석의 기준값으로 삼는다. 세포는 용해완충액을 넣어 용해시킨 후 정량한다. 인산화 반응을 측정하기 위하여 R&D systems사의 Human Phospho-Tie2 DuoSet IC ELISA(R&D systems, DYC2720-5)를 사용하였다. 96웰 이뮤노플레이트(Nunc, US)의 각 웰에 4 μg/ml의 인간 Tie2 캡처 단백질을 첨가 후 4°C에서 하룻밤 정치하여 흡착시켰다. 다음 날 희석제를 웰 당 200 μl 첨가 후 상온에서 2시간 정치하여 블로킹하였다. 세포용해물을 50μg씩 넣고 상온에서 2시간 결합하였다. 반응이 끝난 후, 항 포스포 티로신 항체를 2700:1로 희석하여, 상온에서 2시간 결합시킨다. 반응이 끝난 플레이트는 TMB 기질 시약을 사용하여 발색시켰다. 발색 반응은 50 μl의 2N H₂SO₄를 첨가 하는 것으로 정지시켰으며, Sunrise 마이크로플레이트 리더(TECAN, CH)를 사용하여 특이적 흡광도 OD₄₅₀을 측정하였다 (도 6). 도6에서 보여지듯이 항체의 농도가 높아질수록 인산화가 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 인산화 정도는 IC₅₀값을 구하여 수치화 하였으며, [표 8]에 나타내었다.

[198]

[199] [표8]

no.	sample	Clone	IC ₅₀ (pM)
1	No.3	1D10	8528
2	No.4	2D8	12312
3	No.8	3A10	20169
4	No.41	2B2	10962
5	No.46	3C6	10122
6	REGN910	REGN910	5424

[200]

[201] 실시예 9: 친화도 증진을 위한 변이체 제작 및 선별

[202] 항-Ang2 항체 클론 No.8의 친화도 증진을 위해 항체 최적화를 수행하였다.

No.8의 원래 DNA 서열을 70% 보존하며 랜덤화(randomize)시키는 소프트-랜덤화(soft-randomization)법을 활용하여, No.8의 경쇄 CDR3와 중쇄 CDR3에 무작위 변이를 도입한 프라이머를 제작하였다. 이를 사용한 PCR을 통해 변이가 도입된 경쇄 가변영역, 중쇄 가변영역 코딩 DNA 단편을 확보하였다. 이 DNA 단편을 각각 No.8 scFv 파지 파지미드의 경쇄 가변영역 및 No.8 scFv 파지 파지미드의 중쇄 가변영역과 치환하여, 경쇄 CDR3와 중쇄 CDR3 변이체 scFv 파지 DNA 라이브러리를 제작하였다.

[203] 변이체 scFv 파지 DNA 라이브러리를 페놀-클로로포름 정제 후 전기천공법을 사용하여 대장균주 XL-1 Blue에 형질전환 하였다. 형질전환 효율 분석 및, DNA 서열 분석을 통해 다양성이 확보된 것을 확인한 후, 500 ml 규모로 배양하여 파지 발현을 유도하고, PEG-침전법을 이용하여 경쇄와 중쇄의 CDR3 변이체 scFv 파지 라이브러리를 제작하였다.

[204] 각 변이체 scFv 파지 라이브러리를 사용하여 실시예 1에서 제시한 방법으로 바이오패닝을 실시하였다. 그 후 선별과정에서는 결합을 유지하는 능력의 정량적 평가지표로서 scFv의 해리 속도 상수 kdis를 측정하였다. 선별된 최적화 클론 3종에 대한 아미노산 서열(표 9, 10)과 해리 속도 상수 측정 결과(표 11)를 도시하였다.

[205]

[206] [표9]

서열번호		아미노산서열	서열번호
No.O4	Heavy-chain CDR3	AKTLAGYSGPMGGMDV	51
No.O10	Heavy-chain CDR3	AKILVGYS GPMGGMDV	52
No.O12	Heavy-chain CDR3	AKSLASYSGPMGGMDV	53

[207]

[208] [표10]

항제명칭		서열	서열번호
No.04	중쇄가변영역	CAGGTGCAGCTGGTAGAGTCTGGGGGAGG CCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTC AGTAGCTATAGCATGAACTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCT CATCCATTAGTGCTAGTGATGGTGCCACA TACTACGCAGACTCCGTGAGGGGCCGGTTC ACCATCTCCAGAGACAATCCAGGAGCAC ACTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGC CGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGA AAACTCTCGCGGGATATAGTGGCCCAAT GGGTGGCATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA	54
		QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS YSMNWVRQAPGKGLEWVSSISASD G ATYY ADSVRGRFTISRDNRSRSTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKTLAGYSGPMGGMDVWGQGT VTVSS	55
	경쇄가변영역	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCA CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC ATCACTIGTCGGGCGAGTC GGG GACATTAG CAACTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACC AGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATGG AGCATCCAATTIACAAAGTGGGGTCTCATC ACAGTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAG ATTTACCCCTCACCATCAACAGCCTGCAGC CTGAAGATTCTGCAACTTATTACTGTCAAC AGTACTATAGTTACCCGCTCACTTTTGGC GGAGGGACCAAGGTGGATATCAAACGT	41
No.010	중쇄가변영역	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASRD ISNY LAWYQQKPGKAPKSLIYGASNLQSGVSSQF SGSGSGTDFTLTINSLQPEDSATYYC QQYY S YPLTFGGGTKVDIKR	42
		CAGGTGCAGCTGGTAGAGTCTGGGGGAGG CCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTC AGTAGCTATAGCATGAACTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCT CATCCATTAGTGCTAGTGATGGTGCCACA TACTACGCAGACTCCGTGAGGGGCCGGTTC ACCATCTCCAGAGACAATCCAGGAGCAC ACTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGC CGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGA	56

[209]

		AAATCCTCGTAGGATACAGTGGCCCAAT GGGCGGAATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA	
		QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS YSMNWVRQAPGKGLEWVSSISASDGATYY ADSVRGRFTISRDNRSRTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKILVGYSGPMGGMDVWGQTTV TVSS	57
	경쇄가변영역	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCA CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC ATCACTTGTCGGGCGAGTCGGGACATTAG CAACTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACC AGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATGG AGCATCCAATTTACAAAGTGGGGTCTCATC ACAGTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAG ATTCACCCTCACCATCAACAGCCTGCAGC CTGAAGATTCTGCAACTTATTA CTGTCAAC AGTACTATAGTTACCCGCTCACTTTTGGC GGAGGGACCAAGGTGGATATCAACCGT	41
		DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASRDISNY LAWYQQKPGKAPKSLIYGASNLQSGVSSQF SGSGSGTDFTLTINSLQPEDSATYYCQQVYS YPLIFGGGTKVDIKR	42
	No.012		
	중쇄가변영역	CAGGTGCAGCTGGTAGAGTCTGGGGGAGG CCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTC AGTAGCTATAGCATGAAGTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCT CATCCATTAGTGCTAGTGATGGTGCCACA TACTACGCAGACTCCGTGAGGGGCCGGTTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAGCAC ACTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGC CGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGA AAAGCCTTGCCAGCTATAGTGCCCAAT GGGCGGCATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA	58
		QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS YSMNWVRQAPGKGLEWVSSISASDGATYY ADSVRGRFTISRDNRSRTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKSLASYSGPMGGMDVWGQTTV TVSS	59
	경쇄가변영역	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCA CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC ATCACTTGTCGGGCGAGTCGGGACATTAG CAACTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACC AGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATGG	41

[210]

		AGCATCCAATTTACAAAGTGGGGTCTCATC ACAGTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAG ATTTCACCCTCACCATCAACAGCCTGCAGC CTGAAGATTCTGCAACTTATTA CTGTCAAC AGTACTATAGTTACCCGCTCACTTTTGGC GGAGGGACCAAGGTGGATATCAAACGT	
		DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASRDISNY LAWYQQKPGKAPKSLIYGASNLQSGVSSQF SGSGSGTDFTLTINS LQPEDSATY YCQQYYS YPLIFGGG TKVDIKR	42
No.04-1	중쇄가변영역	CAGGTGCAGCTGGTAGAGTCTGGGGGAGG CCTGTTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAC TCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTC AGTAGCTATAGCATGAAGTGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCT CATCCATTAGTGCTAGTGATGGTGCCACA TACTACGCAGACTCCGTGAGGGGCCGTTT ACCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAGCAC ACTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGC CGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGA AAACTCTCGCGGGATATAGTGGCCCAAT GGGTGGCATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA	60
		QVQLVESGGGLSKPGGSLRLSCAASGFTFSS YSMNWVRQAPGKLEWVSSISASDGATYY ADSVRGRFTISRDNRSRTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKTLAGYSGPMGGMDVWGQGT VTVSS	61
	경쇄가변영역	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCA CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC ATCACTTGTCGGGCGAGTCCGGACATTAG CAACTATTAGCCTGGTATCAGCAGAAACC AGGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATGG AGCATCCAATTTACAAAGTGGGGTCTCATC ACAGTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAG ATTTCACCCTCACCATCAACAGCCTGCAGC CTGAAGATTCTGCAACTTATTA CTGTCAAC AGTACTATAGTTACCCGCTCACTTTTGGC GGAGGGACCAAGGTGGATATCAAACGT	41
		DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASRDISNY LAWYQQKPGKAPKSLIYGASNLQSGVSSQF SGSGSGTDFTLTINS LQPEDSATY YCQQYYS YPLIFGGG TKVDIKR	42

[211]

[212] [표11]

clone	Kdis (1/s)
No.04	9.01E-05
No.010	3.92E-05
No.012	1.70E-05

[213]

[214] 실시예 10: 최적화된 항Ang2 항체의 ScFv 생산

- [215] 최적화된 항Ang2 항체(No.O4)를 대장균에서 발현시키기 위하여 pET-22b 벡터(Novagen)에 클로닝 하였다. BL21(De3)에 형질전환하여 생성된 콜로니를 선별하여 LB(Lysogeny broth)배지에 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin을 첨가하여 37°C, 200rpm 조건에서 전배양한 대장균을 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 Ampicillin 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.
- [216] 배양한 대장균을 8000rpm, 10min 원심분리 하여 집균 하였다. 배지를 제거한 후 50 mM Tris-Hcl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)의 lysis buffer을 cell 무게 g당 10 ml buffer를 이용하여 resuspension 하였다. 초음파 파쇄기를 사용하여 Power:20W, rest: 3Sec, Work: 3Sec, Time: 5Min조건에서 Cell을 파쇄하였다. 파쇄된 cell을 11000rpm에서 1시간 원심분리 하여 상층액과 침전된 물질을 분리하였다.
- [217] ScFv는 insoluble한 형태로 발현되어 refolding을 진행하기 위해 Pellet wash를 진행하였다. 50 mM Tris-Hcl pH 7.4, 150 mM NaCl buffer를 이용하여 Homogenizer으로 균질화 시킨 후 11000rpm, 1h 원심분리하는 방법으로 pellet를 2번 wash 하였다. 50 mM Tris-Hcl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 M Urea, 0.5% Triton X-100 buffer를 이용하여 pellet내에 남아있는 대장균 유래의 물질들을 제거 하였고 50 mM Tris-Hcl pH 7.4, 150 mM NaCl buffer 으로 3번 워싱을 반복하였다. 50 mM Tris-Hcl pH 7.4, 150 mM NaCl, 8 M Urea, 10 mM DTT buffer으로 inclusion body를 resuspension 시킨 후 30 min정도 반응시켜 ScFv를 unfolded한 형태로 만들고 11000rpm, 1h Centrifuge하여 침전물질과 분리하였다.
- [218] ScFv 항체를 Step Dialysis를 통해 Urea를 제거하여 Refolding을 유도하였다. Dialysis buffer는 50 mM Tris-Hcl pH 7.4, 150 mM NaCl를 기본으로 하여 Urea농도를 1/2씩 낮춰가면서 진행 하였다. 구조가 대부분 형성되는 4-2-1 M Urea 농도 구간에서 0.1 M L-Arginine를 첨가하여 Aggregation 형성을 억제하여 Refolding을 진행하였다. Refolding이 완료된 ScFv 항체는 HisTrap 과 Capto L column을 이용하여 분리정제 진행하였다.
- [219] 분리 정제는 다음과 같은 순서로 진행하였다. AKTA Prime(GE healthcare) System을 이용하여 정제 하였으며, 5 ml HisTrap Packing Column을 사용하였다. 50 mM Sodium Phosphate, 400 mM NaCl, 10 mM Imidazole pH 7.4 buffer으로 Histrap column Volume의 10 Column Volume 흘려 평형화 시킨 후, ScFv 항체 샘플을 5 ml/min의 유속으로 Histrap Column에 흐르게 하여 Column내 Resin과 결합시켰다. 50 mM sodium Phosphate, 400 mM NaCl, 10 mM Imidazole pH 7.4 buffer으로 Resin에 존재하는 비특이적인 결합 물질을 제거해주기 위해 약 10 Column Volume 흘려준 후, 50 mM Sodium Phosphate, 400 mM NaCl, 300 mM Imidazole pH 7.4 buffer를 농도 Gradient하게 흘려 ScFv 항체가 Elution되어 나오게 하였다. Elution 된 항체시료는 5 ml Capto L column을 이용하여 다음 정제를

진행하였다. PBS(Phosphate-buffered saline) pH 7.4 buffer으로 Capto L Column을 평형화 시킨 후, 샘플을 5 ml/min의 유속으로 Capto L column에 흐르게 하여 Column내 Resin과 결합시킨다. PBS Buffer를 약 10 Column Volume 흘려 비특이적 결합 물질을 제거하였다. 0.1 M Citric Acid, 0.2 M Na₂HPO₄ pH 2.6 Buffer을 10 Column Volume 흘려 ScFv 항체가 Elution되어 나오게 하였다. (도7)은 최종적으로 정제후 얻은 단백질을 SDS-PAGE를 수행한 결과이다. 그 결과 순도가 높은 ScFv 항체를 얻을 수 있었다.

[220]

[221] 실시예 11: 최적화된 항Ang2 ScFv 항체의 결합 특이성 분석

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

[223] 96웰 이뮤노플레이트(Nunc, US)의 각 웰에 1 µg/ml의 His-tag 된 인간Ang2 단백질(R&D systems, 623-AN/CF) 용액을 100 µl 첨가 후 4°C에서 하룻밤 정치하여 흡착시켰다. 다음 날 0.05% Tween-20 함유 PBS (이하 PBST)로 3회 세정하고, 2% BSA/PBST 용액을 각 웰 당 200 µl 첨가 후 상온에서 2시간 정치하여 블로킹하였다. PBST로 3회 세정 후 각 시험 항체 용액을 농도별로 100 µl씩 첨가하여 상온에서 1시간 결합시킨 후, PBST로 3회 세정, 1:1000의 비율로 희석한 HRP-접합된 항-His 태그 모노클로날 항체 (HRP-conjugated anti-His tag monoclonal antibody: MAB050H, R&D systems, US)를 100 µl 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켜 결합을 유도하였으며, PBST로 3회 세정 후 100 µl의 TMB 기질 시약을 사용하여 발색시켰다. 발색 반응은 50 µl의 2N H₂SO₄를 첨가 하는 것으로 정지시켰으며, Sunrise 마이크로플레이트 리더(TECAN, CH)를 사용하여 특이적 흡광도 OD₄₅₀을 측정하였다 (도 8). 도8에서 보여지듯이 정제된 항체는 인간 Ang2에 결합한다.

[224] 정제된 ScFv 항체의 인간 Ang2에 대한 결합력을 Octet system (Fortebio Inc. US)를 사용하여 측정하였다. 이를 위하여 항-Ang2 항체를 바이오센서에 고정화 하고, 인간 Ang2의 농도 별 결합 동역학을 측정하여 결합 속도 상수 (k_a), 해리 속도 상수 (k_{dis}) 및 결합 상수 (K_D)를 산출하였다 (표 12).

[225]

[226] [표12]

sample	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
No.O4 scFv	9.4E+04	2.54E-05	2.8E-10

[227]

[228] 실시예 12: 선별된 항-Ang2 ScFv 항체의 in vivo 효능분석 (CNV mouse model)

[229] 항-Ang2 scFv 항체의 신생혈관형성의 억제효능이 있는지를 확인하기 위하여, laser-induced choroidal neovascularization mouse 모델에서 약효시험을 실시하였다. 그 효력은 상용약물인 aflibercept을 대조군으로 시험하였다.

마우스를 케타민으로 전신 마취시킨 후, 마취 점안제를 안구에 점안하여 추가 국소마취시키고, 산동제를 점안하여 산동 유도한다. 마우스를 제물대 위에 올려놓고 Micron-IV를 이용하여 CNV 유도조건(wavelength 532 nm, diameter 50 μ m, duration 80 mS, power level 200 mW)에 따라 laser burn을 유도하여 Bruch's membrane을 파괴시킨다. Laser burn 유도 과정에서 bubbling이 관찰되지 않은 병변은 unsuccessful laser burn으로 분류하고 Gong Y. 등이 제안한 기준을 modification 한 exclusion criteria에 근거하여 결과분석 및 통계처리 과정에서 제외하였다.

- [230] CNV 유도 및 약물에 의한 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 imaging camera로 fundus에 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. 단, Gong Y. 등이 제안한 exclusion criteria에 해당하는 CNV 병변은 최종 결과 및 통계 분석 과정에서 제외되었다.
- [231] 시신경 회복효과를 확인하기 위해 망막전위도(ERG) 검사를 진행하였다. 마우스는 ERG 평가 12시간 전부터 암실에서 암순응을 유도하였다. 평가 당일(CNV 유도 후 11일)에 럼퐁®과 케타민®으로 전신 마취시킨 후, 알카인®을 안구에 점안하여 추가 국소마취를 유도하고 산동제를 점안하여 산동을 유도하였다. 마우스를 ERG 제물대 위에 올려놓고 ERG의 probe를 각각 꼬리, 머리 및 각막에 접촉시켰다. ERG는 단일 flash 자극(0.9 log cds/m² (10 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. 단, Gong Y. 등이 제안한 exclusion criteria에 해당하는 안구는 최종 결과 및 통계 분석 과정에서 제외되었다.
- [232] CNV mouse model에 대한 항-Ang2 ScFv 항체의 신생혈관 감소 효능 결과는 [도 9]에 나타내었다. FFA 상에서 관찰된 CNV 병변의 크기에 있어서, ScFv를 10 μ g/ μ L투여한 시험군에서 CNV 대조군 대비 통계적으로 유의한 감소가 관찰되었으며($P < 0.01$), aflibercept을 투여한 시험군과 비교할 때에도 보다 뛰어난 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. [도 10]에서 OCT 측정으로 병변의 부피를 CNV 대조군과 비교할 때에도, ScFv를 투여한 모든 시험군에서 통계적으로 유의하게 병변의 부피를 농도의존적으로 감소시키는 것을 확인하였다 (각각 $P < 0.01$, $P < 0.0001$, $P < 0.05$). 또한, [도 11]에서 scotopic-ERG로 망막 전위도를 CNV 대조군과 비교하였을 때, 통계적으로 유의한 B-wave amplitude의 증가가

관찰되었다 (각각 $P < 0.0001$).

[233]

[234] 실시예 13: 선별된 항-Ang2 항체의 항종양 효능분석 (TNBC model)

[235] 항-Ang2 항체의 신생혈관형성의 억제효능이 있는지를 확인하기 위하여, human triple negative breast cancer (TNBC) 모델 (MDA-MB-231) 에서 항종양 효력시험을 실시하였다. 항-Ang2 항체의 항 종양 활성을 평가하기 위해 인체 유래 유방암 세포주인 MDA-MB-231을 왼쪽 옆구리에 이식한 NSG 마우스에서 isotype control, nesvacumab, 항-Ang2 항체 치료제들의 미정맥 투여에 의한 항암 약효를 평가하고자 하였다. 실험은 미국 Champions Oncology에 의뢰하여 진행하였다.

[236] 인체 유래 유방암 세포주 MDA-MB-231(breast cancer cell line)를 해동 (thawing)한 후 CO₂ 인큐베이터 (Forma, USA) 내에서 온도 37°C와 CO₂ 농도 5%로 맞춰서 배양하였다. 배양 최종일에 모든 암세포를 수거하여 계수하고 무혈청 배지 (serum-free media)를 이용하여 세포 농도를 1×10^8 cells/ml로 조절하였다. 이렇게 조절된 세포 배양액을 마우스 왼쪽 옆구리에 0.1 ml(1×10^7 cells/mouse)씩 주입하였다. 마우스의 군분리는 종양의 부피가 100-150 mm³가 될 때 각 처리군당 8 마리씩 지그재그 방식으로 군분리를 실시했다. 군분리 직후 약물의 투여를 시작했다. 음성대조군에는 isotype control을 10 mg/ml, 항-Ang2 항체 처리군에는 3, 10 mg/ml, Nesvacumab 처리군에는 3, 10 mg/ml을 각각 주 2회 빈도로 3주간 정맥주사 방식으로 투여하였다. 약물 투여 후 주 2회씩 20일 동안 종양 부피를 측정하였다. 측정 과정에서 mouse의 임상적 독성 반응은 보이지 않았다. 항-Ang2 항체의 항종양 효과는 10 mg/kg 처리군에서 약 70%의 종양 성장 억제효과를 보였고, 대조약물인 Nesvacumab 10 mg/ml 처리군 대비 약 2배의 항종양 효과를 보였다. 종양 부피의 계산식은 다음과 같다. Tumor Volume (TV) = width² x length x 0.52. 각 개체별 무게는 평균 5% 정도의 고른 증가 추세를 보임으로써 특별히 독성 반응은 없는 것으로 확인되었다(도 12).

[237]

[238] [표13]

항-Ang2 항체 투여에 의한 종양 성장 억제 효과 (mm³)>

Tumor Volume - Mean							
Treatment	0	3	6	10	13	17	20
01 Isotype Control	157	199	216	237	250	290	323
02 항 Ang-2 3mg/kg	157	179	187	179	188	205	212
03 항 Ang-2 10mg/kg	157	184	188	171	178	193	207
04 Nesvacumab 3mg/kg	157	186	192	185	203	231	262
05 Nesvacumab 10mg/kg	157	186	197	210	221	243	278
Tumor Volume - SEM							
Treatment	0	3	6	10	13	17	20
01 Isotype Control	7.254	12.682	18.216	25.044	34.67	47.517	61.862
02 항 Ang-2 3mg/kg	6.777	9.424	12.741	14.444	20.313	23.01	25.324
03 항 Ang-2 10mg/kg	6.625	10.606	10.416	13.104	12.733	12.434	15.184
04 Nesvacumab 3mg/kg	6.155	7.339	8.681	13.944	17.324	21.042	29.726
05 Nesvacumab 10mg/kg	6.009	12.15	12.827	18.151	19.917	25.11	31.335
Tumor Growth Inhibition (%)							
Treatment	0	3	6	10	13	17	20
01 Isotype Control	0	0	0	0	0	0	0
02 항 Ang-2 3mg/kg	0	47.62	49.15	72.5	66.67	63.91	66.87
03 항 Ang-2 10mg/kg	0	35.71	47.46	82.5	77.42	72.93	69.88
04 Nesvacumab 3mg/kg	0	30.95	40.68	65	50.54	44.36	36.75
05 Nesvacumab 10mg/kg	0	30.95	32.2	33.75	31.18	35.34	27.11

[239]

[240] [표14]

날짜별 마우스의 체중 변화 (g)

Body Weight - Mean							
Treatment	0	3	6	10	13	17	20
01 Isotype Control	23.281	23.707	23.736	23.825	24.259	24.478	24.489
02 항 Ang-2 3mg/kg	23.356	23.701	24.449	24.444	25.19	25.23	25.201
03 항 Ang-2 10mg/kg	24.046	24.482	24.899	24.423	25.161	25.355	25.433
04 Nesvacumab 3mg/kg	23.253	23.813	24.198	23.991	24.768	25.066	25.186
05 Nesvacumab 10mg/kg	22.648	23.531	23.96	23.53	24.159	24.674	24.346
Body Weight - SEM							
Treatment	0	3	6	10	13	17	20
01 Isotype Control	1.38	1.042	1.02	1.129	0.97	1.066	1.117
02 항 Ang-2 3mg/kg	0.473	0.411	0.474	0.539	0.555	0.582	0.556
03 항 Ang-2 10mg/kg	0.751	0.705	0.769	0.829	0.85	0.889	0.86
04 Nesvacumab 3mg/kg	0.772	0.658	0.771	0.807	0.788	0.659	0.918
05 Nesvacumab 10mg/kg	0.346	0.308	0.238	0.318	0.312	0.359	0.502

[241]

산업상 이용가능성

[242] 본 발명에 따른 항-Ang2 항체 또는 이의 항원 결합단편은 Ang2에 목적하는 결합력을 나타내며, 목적하는 암/종양 또는 혈관신생 억제제 및 엔지오포이에틴-2 활성화 및 또는 과생성과 관련된 질병의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명을 통해 기존의 Ang2를 표적으로 하는 치료제와 다른 표적 포인트를 가진 치료제를 개발함으로써, 종양을 치료하는데 있어서 기존 치료제와의 병용 치료 및 단독 치료법을 제공할 수 있다.

[243]

[244] 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.

[245]

서열목록 Free Text

[246] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] 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, 51, 52 및 53로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR3를 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, Ang2 (Angiopoietin-2)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 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,
 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,
 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,
 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,
 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,
 서열번호 13의 중쇄 CDR1, 서열번호 14의 중쇄 CDR2 및 서열번호 51의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 16의 경쇄 CDR1, 서열번호 17의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 18의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역,
 서열번호 13의 중쇄 CDR1, 서열번호 14의 중쇄 CDR2 및 서열번호 52의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 16의 경쇄 CDR1, 서열번호 17의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 18의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄

가변영역, 또는

서열번호 13의 중쇄 CDR1, 서열번호 14의 중쇄 CDR2 및 서열번호 53의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역, 서열번호 16의 경쇄 CDR1, 서열번호 17의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 18의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.

- [청구항 3] 제1항에 있어서, 서열번호 32, 36, 40, 44, 48, 55, 57, 59 및 61로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 서열번호 34, 38, 42, 46 및 50으로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합단편을 코딩하는 핵산.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 31, 35, 39, 43, 47, 54, 56, 58 및 60로 구성된 군에서 선택되는 핵산.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 33, 37, 41, 45 및 49로 구성된 군에서 선택되는 핵산.
- [청구항 8] 제5항의 핵산을 포함하는 발현벡터.
- [청구항 9] 제8항의 발현벡터로 형질전환된 세포.
- [청구항 10] 다음 단계를 포함하는 Ang2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법:
 (a) 제9항의 세포를 배양하는 단계; 및
 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계.
- [청구항 11] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 12] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 저해용 조성물.
- [청구항 13] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 진단용 조성물.
- [청구항 14] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 안질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 15] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 종양 또는 암의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 16] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 병용 투여용 조성물.