

명세서

발명의 명칭: 항-TIE2 항체 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 TIE2 (Tyrosine-protein kinase receptor TIE-2)에 특이적으로 결합하여 수용체의 인산화를 통해 혈관을 정상화(vessel normalization)하고, 안정화(stabilization)시키는 기능을 보유한 항체와 관련된 것으로, 항-TIE2 항체, 이를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 세포, 상기 항체의 제조방법, 이를 포함하는 혈관안정화제 및 신생혈관형성(angiogenesis)과 관련된 질병의 치료용 조성물, 종양 또는 암 치료용 약학적 조성물 및 TIE2에 결합하는 항체 이외의 조성물과의 병용투여용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 신생혈관형성(Angiogenesis)이라 함은 내피세포의 성장, 분열, 이동 등에 의하여 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 기작으로, 상처의 치유나 여성의 생리주기를 포함하는 정상적인 성장과정에서 중요한 역할을 담당하고 있으며(Risau, Nature, 386:671, 1997), 뿐만 아니라 비정상적으로 과도한 신생혈관형성은 종양의 성장과 전이(metastasis), 노인성 황반변성(age-related macular degeneration, ARMD), 당뇨병 망막병증(diabetic retinopathy), 건선(psoriasis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 만성염증(chronic inflammation)과 같은 질환에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Carmeliet and Jain, Nature, 407:249, 2000).
- [4] 신생혈관형성 과정의 진행양상은 신생혈관형성 유발 인자들과 신생혈관형성 저해 인자들의 종합적인 밸런스에 의해서 결정되며, 여러 단계의 복잡하고 순차적인 과정에 의해서 진행된다. 그 과정을 살펴보면, 우선 종양이나 상처 난 조직에서 분비되는 혈관내피성장인자(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)를 비롯한 다양한 신생혈관형성 유발 인자들이 주변에 있는 기존 혈관내피세포의 해당 수용체에 결합함으로써, 혈관내피세포들을 활성화시켜 혈관내피세포들의 투과성을 증가시키게 되고, 기저막 단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)와 같은 단백질 분해효소를 분비함으로써, 혈관내피세포 주변의 기저막과 세포외기질을 분해시켜, 혈관내피세포들이 기존의 모세혈관으로부터 벗어나 신생혈관형성 유발 인자를 분비하는 조직을 향해 이동·증식하게 된다.
- [5] 이동·증식한 혈관내피세포들은 혈관 내 관 구조를 이루고, 마지막으로 혈관내피세포의 구조적 지지대인 혈관주위세포가 유입되면서 안정하고 성숙한 혈관형성이 이루어지게 된다. 이때 혈관내피세포로부터 분비되는 ANG1은 그것의 수용체인 TIE-2와 결합함으로써, 혈관주위세포의 유입과 혈관의

- 안정화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Suri *et al.*, *Cell*, 87:1171, 1996).
- [6] 한편, 혈관신생형성 정도가 큰 암 조직이나 혈관 리모델링이 활발한 정상조직인 태반, 자궁, 난소 등에서 ANG2가 과발현 양상을 보이며(Kong *et al.*, *Cancer Res.*, 61:6248, 2001; Ahmad *et al.*, *Cancer*, 92:1138, 2001), 상대적으로 ANG2가 ANG1 보다 높아지는 경우, 결과적으로 종양 신생혈관형성의 시작을 개시한다(Linda *et al.*, *Cell Research*, 13(5):309-317, 2003). 따라서, ANG2가 TIE-2 신호전달 기작에 있어서 길항제(antagonist)로써 역할을 수행하며 신생혈관생성을 촉진시키며, ANG1은 작용제(agonist)로써 혈관구조를 정상화시키는 역할을 수행하는 것으로 해석되고 있다.
- [7] 신생혈관형성 과정은 앞서도 살펴보았듯이 주로 VEGF/VEGFR 신호기작에 의해 이루어지지만, 신생혈관형성으로 혈관 누수(leakage) 현상을 극복할 수 있는 방법은 ANG1-TIE2 신호전달 기작이 혈관내피세포의 연접(junction) 증가와 혈관주변세포의 동원(recruitment)이 중요하다는 것을 알 수 있다.
- [8] 특히, 종양 내 신생혈관은 혈관누수로 인해 간질 압력(interstitial pressure)이 증가하게 되면 혈관 압박(vascular compression)으로 인해 저산소증(hypoxia) 및 조직중심의 괴사까지 발생하게 된다(Folkman J *et al.*, *N Engl J Med.* 333:1757-63, 1995). 이러한 원인으로 인해 종양 치료약물을 처리하더라도 조직내부까지 약물의 접근성이 떨어지기 때문에 치료효과가 감소하게 된다(Gianfranco Baronzio *et al.*, *Front Oncol.* 5: 165, 2015).
- [9] 따라서, TIE2 인산화 신호전달 기전을 활성화시켜 종양 내 신생혈관의 누수현상을 혈관 정상화(vessel normalization)로 개선시키고자 하며, 이는 궁극적으로 약물 전달을 증가시켜 기존에 사용하던 치료제의 단독요법 효능보다 우수한 항암활성을 나타낼 것으로 기대됨. 또한, 혈관 정상화로 인해 조직 내 간질 압력을 낮춰 저산소증을 감소시키므로 족부궤양, 고혈압, 당뇨병망막질환 등 혈관누수로 발생하는 질환 등에 대해서도 치료가능성이 높을 것으로 기대된다.
- [10] 추가적으로 종양 내 미세환경은 혈관 안정화제 처리 시, 면역 효과 T세포(immune effector T cell)의 유입이 혈관 정상화를 통해 증가하게 되어 기존의 면역억제(immunesuppressive) 상태에서 면역지지(immunesupportive) 상태로 재프로그래밍되기 때문에(Huang *et al.*, 2013, *Cancer Research*), 항-TIE2 항체는 혈관 정상화를 유도하여 면역관문억제제 등과의 병용투여시 면역 효과 T세포의 유입이 증가해 면역활성까지 강화시켜 항암활성을 배가시킬 것으로 기대된다.
- [11] 이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 항-TIE2 항체를 개발하기 위하여 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 TIE2에 목적하는 결합력을 나타내는 항-TIE2 항체를 개발하고, 이러한 항-TIE2 항체가 목적하는 혈관 안정화제(vessel stabilizer)로서 혈관누수로 인해 발생하는 혈관누수현상을 개선시킬 수 있는 효능을 확인하였고, 이를 통해 대부분의 암종에 치료제로서 적용이 가능하며, 암종 이외에서 비정상적 신생혈관형성과 관련된 족부궤양,

당뇨망막질환 등의 치료에도 적용가능할 것으로 본다. 특히 암에 대해 항-TIE2 항체는 기존 치료제와 병용투여를 통해 혈관 안정화 기능을 나타내어 기존 치료제의 약물전달률을 높일 수 있으며, 종양 내 미세환경 속 면역환경을 개선시켜 면역항암제와도 우수한 항암효과를 나타낼 것으로 기대하며, 본 발명을 완성하였다.

[12]

[13] **발명의 요약**

[14] 본 발명의 목적은 TIE2에 대한 신규 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는 데 있다.

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

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

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 하는 종양 또는 신생혈관형성과 관련된 질병의 예방 및/또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 하는 혈관 안정 및/또는 정상화를 위한 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 하는 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 치료를 위한 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[20] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 하는 단독 치료 및/또는 다른 치료제와의 병용 치료를 위한 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[21] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1, 7, 13, 19, 25 및 31으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR1,

[22] 서열번호 2, 8, 14, 20, 26 및 32로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR2, 및

[23] 서열번호 3, 9, 15, 21, 27 및 33로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및

[24] 서열번호 4, 10, 16, 22, 28 및 34으로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR1,

[25] 서열번호 5, 11, 17, 23, 29 및 35로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR2, 및

[26] 서열번호 6, 12, 18, 24, 30 및 36로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, TIE2에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합단편을 제공한다.

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

[28] 본 발명은 또한, 상기 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.

[29] 본 발명은 또한, 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다. 본 발명은 또한,

다음 단계를 포함하는 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공한다: (a) 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 회수하는 단계.

- [30] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 혈관안정화제 및/또는 신생혈관형성과 관련된 질병의 치료용 조성물을 제공한다.
- [31] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 혈관안정화제 및/또는 신생혈관형성과 관련된 질병의 진단용 조성물을 제공한다.
- [32] 본 발명은 또한, 상기 항체를 포함하는 종양, 암 및/또는 신생혈관형성과 관련된 질병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [33] 본 발명은 TIE2 항체와 병용투여하기 위한 조성물을 제공한다.
- [34]

도면의 간단한 설명

- [35] 도 1A 및 도 1B는 각각 항-TIE2 항체의 인간 및 마우스 TIE2 발현 세포에 대한 결합을 평가한 유세포분석 결과이다.
- [36] 도 2는 일시발현 및 정제된 항-TIE2 항체의 인간 및 마우스 TIE2에 대한 결합을 평가한 ELISA 결과이다.
- [37] 도 3A 내지 도 3C는 HUVEC 세포주를 이용하여 항-TIE2 항체의 세포 이동(migration)에 대한 효과를 평가한 결과이다.
- [38] 도 4는 선별된 항-TIE2 항체가 ANG1 또는 ANG2와 비경쟁적으로 TIE2에 결합함을 보여주는 결과이다.
- [39] 도 5A 내지 도 5C는 선별된 항-TIE2 항체가 VEGF에 의해 유도된 혈관 투과도(vessel permeability)를 저해할 수 있음을 보여주는 결과이다.
- [40] 도 6은 선별된 항-TIE2 항체가 TIE2 하위 신호전달 기전을 ANG1과 유사하게 따르고 있음을 보여주는 결과이다.
- [41] 도 7은 선별된 항-TIE2 항체의 혈관 안정화(vessel stabilization) 효과를 확인하기 위해 세포간 밀착연접(cell to cell tight-junction)을 세포주의 단백질 수준에서 보여주는 결과이다.
- [42] 도 8A 및 도 8B는 항 Tie2 항체에 의한 cell to cell tight junction 개선 결과를 나타낸 것이다.
- [43] 도 9은 항-TIE2 항체가 VEGF로 인해 유발된 혈관누수현상을 TIE2 신호전달을 통해 정상화시킬 수 있음을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [44] 도 10A 내지 도 10C는 항 Tie2 항체의 망막 신생혈관형성 억제 기능을 평가한 결과를 나타낸 것이다.
- [45] 도 11A 및 도 11B는 항 Tie2 항체의 암혈관 정상화 기능을 평가한 결과를 나타낸 것이다.
- [46] 도 12A 내지 도 12D는 항 Tie2 항체의 항종양 효능을 평가한 결과를 나타낸 것이다.

- [47] 도 13A 내지 도 13C는 항 Tie2 항체의 저산소증 개선 평가 결과를 나타낸 것이다.
- [48]
- [49] **발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예**
- [50] 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.
- [51] 본 출원의 발명자들은 신규한 항-TIE2 항체를 선별하였다. 본 발명에 따른 TIE2에 결합하는 항체 또는 항원 결합단편에 의해, TIE2를 활성화하면 혈관을 정상화하여 종양 또는 암 내부의 저산소증 증가를 해소하고 종양 또는 암 내부로 혈류를 증가시켜 충분한 산소 공급이 이루어지며, 기타 다른 항암 약물 전달량과 면역세포의 침투가 증가하도록 할 수 있음을 확인하였다.
- [52] 이러한 관점에서, 본 발명은 서열번호 1, 7, 13, 19, 25 및 31으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR1, 서열번호 2, 8, 14, 20, 26 및 32로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR2, 및 서열번호 3, 9, 15, 21, 27 및 33로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 4, 10, 16, 22, 28 및 34으로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR1, 서열번호 5, 11, 17, 23, 29 및 35로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 6, 12, 18, 24, 30 및 36로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, TIE2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다.
- [53] 본 명세서에서 사용된 용어, "항체(antibody)"는 Tie2에 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 범위에는 TIE2에 특이적으로 결합하는 완전한 항체 형태 뿐 아니라, 상기 항체 분자의 항원 결합 단편도 포함된다.
- [54] 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.
- [55] 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 하나 이상의 비-인간 항체(공여체 또는 공급원 항체)로부터 유래된 하나 이상의 아미노산 서열(예를

들어, CDR 서열)을 포함하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는, 수용자의 추가변 영역으로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 종 (공여자 항체), 예를 들어 마우스, 랫트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 추가변 영역로부터의 잔기로 대체시킨 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다. 인간화를 위해 수용자 인간 항체의 가변 영역의 하나 이상의 프레임워크 도메인 (framework domain, FR) 내의 잔기가 비-인간 종 공여체 항체부터 상응하는 잔기로 대체될 수 있다. 이를 통해 그래프팅된 CDR(들)의 적절한 3차원 구성을 유지하도록 돕고, 이로써 친화성 및 항체 안정성을 개선시킬 수 있다. 인간화된 항체는, 예를 들어, 항체 성능을 추가로 세밀화하기 위해, 추가의 수용자 항체 또는 공여체 항체에서 나타나지 않는 새로운 잔기를 포함할 수 있다.

- [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.
- [66] 구체적으로, 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,
- [67] 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,
- [68] 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,
- [69] 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,
- [70] 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,
- [71] 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 가변영역을 포함할 수 있다.
- [72] "콜릭 영역" (FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각 가변 도메인은 전형적으로, FR1, FR2, FR3 및 FR4로서 확인된 4개의 FR을 가진다.
- [73] TIE2 항체는 1가 또는 2가이고, 단쇄 또는 이중 쇄를 포함한다. 기능적으로, TIE2 항체의 결합 친화성은 10^{-5} M 내지 10^{-12} M 범위 내에 있다. 예를 들어, TIE2 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.
- [74] 상기 TIE2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 38, 42, 46, 50, 54 및 58로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 또한, 서열번호 40, 44, 48, 52, 56 및 60으로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [75] 구체적으로, 상기 TIE2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역;
- [76] 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역;
- [77] 서열번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역;
- [78] 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역;
- [79] 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역; 또는
- [80] 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [81] "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.

- [82] 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.
- [83] 섬유상 파지 표면 상에서의 펩티드의 발현과 E. coli의 주변세포질에서의 기능성 항체 단편의 발현을 입증하는 것이 항체 파지 디스플레이 라이브러리를 개발하는 데 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.
- [84] 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.
- [85] 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.
- [86] 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.

- [87] 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.
- [88] 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.
- [89] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 TIE2을 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 본 발명의 항-TIE2 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.
- [90] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 항체가 가지는 아미노산 서열 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, blastm, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLAST는 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.

- [91] 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.
- [92] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산에 관한 것이다.
- [93] 상기 핵산은 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 37, 41, 45, 49, 53 및 57로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 또는 상기 핵산은 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 39, 43, 47, 51, 55 및 59로 구성된 군에서 선택될 수 있다.
- [94] 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.
- [95] "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.
- [96] 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.
- [97] 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.

- [98] “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.
- [99] 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lacUV5* 프로모터, *lpp* 프로모터, *pL λ* 프로모터, *pR λ* 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, 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.
- [100] 경우에 따라서는, 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.
- [101] 상기 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카페니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [102] 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.
- [103] 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.
- [104] 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.

- [105] 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.
- [106] 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.
- [107] 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.
- [108] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [109] 상기 혈관신생은 이전에 존재한 혈관으로부터 새로운 혈관의 형성 또는 성장을 의미하며, "혈관신생 관련 질환(angiogenesis-related disease)"은 혈관신생의 발생 또는 진행과 관련된 질환을 의미한다. 상기 항체로 치료될 수 있다면, 그 질병은 한정 없이 혈관신생 관련 질환의 범위에 포함될 수 있다. 혈관신생 관련 질환의 예로는 암, 전이(metastasis), 당뇨병망막병증(diabetic retinopathy), 미숙아 망막병증(retinopathy of prematurity), 각막 이식 거부(corneal graft rejection), 황반변성(macular degeneration), 혈관신생성녹내장(neovascular glaucoma), 전신홍색증(erythrosis), 증식성망막증(proliferative retinopathy), 건선(psoriasis), 혈우병성 고관절염(hemophilic arthritis), 동맥경화성 플라크(atherosclerotic plaques)의 모세혈관 형성, 켈로이드(keloid), 상처 과립화(wound granulation), 혈관 유착(vascular adhesion), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 퇴행성 관절염(osteoarthritis), 자기면역질환(autoimmune diseases), 크론병(Crohn's disease), 레스테노시스(restenosis), 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 장협착(intestinal adhesions), 고양이 찰과상 감염증(cat scratch disease), 궤양(ulcer), 간경변증(liver cirrhosis), 신장염(nephritis), 당뇨병성 신장질환(diabetic nephropathy), 당뇨병성 족부궤양(diabetic Foot Ulcers), 만성 신부전 (chronic kidney failure), 진성 당뇨병(diabetes mellitus), 염증 질환(inflammatory diseases), 특발성 폐섬유증(Idiopathic Pulmonary Fibrosis), 패혈증(sepsis), 급성 호흡곤란 증후군(Acute respiratory distress syndrome) 및 신경변성 질환(neurodegenerative

diseases)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [110] 또한, 상기 암은 식도암(esophageal cancer), 위암(stomach cancer), 대장암(large intestine cancer), 직장암(rectal cancer), 구강암(oral cancer), 인두암(pharynx cancer), 후두암(larynx cancer), 폐암(lung cancer), 결장암(colon cancer), 유방암(breast cancer), 자궁경부암(uterine cervical cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 난소암(ovarian cancer), 전립선암(prostate cancer), 고환암(testis cancer), 방광암(bladder cancer), 신장암(renal cancer), 간암(liver cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 뼈암(bone cancer), 결합조직암(connective tissue cancer), 피부암(skin cancer), 뇌종양(brain cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 백혈병(leukemia), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 림프종(lymphoma) 및 다발성 골수혈액암(multiple myeloid blood cancer)으로 구성된 군에서 선택되나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [111] 여기에 사용된 용어 "예방(prevention or prophylaxis)"은 본 발명의 항체 또는 조성물을 투여하여 관심 질환의 시작을 억제 또는 지연하게 하는 모든 조치를 가리킨다. 용어 "치료(treatment or therapy)"는 본 발명의 항체 또는 조성물을 투여하여 관심 질환의 증상이 개선되거나 증상이 호전되게 하는 모든 조치를 가리킨다.
- [112] 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 항체를 포함하는 유효성분으로 포함하는 혈관안정화용 조성물에 관한 것이다.
- [113] 여기에 사용된 용어 "혈관안정화"는 혈관의 완전성(integrity)을 손상시킬 수 있는 요인을 완화, 경감 또는 제거하거나, 혈관의 손상을 억제, 경감 또는 제거함으로써, 혈관의 기능을 유지할 수 있음을 의미할 수 있다. 구체적으로, 혈관의 투과성 억제, 혈관 손상 억제, 및/또는 손상된 혈관의 완전성 복구를 포함할 수 있다.
- [114] 본 발명의 항체를 포함하는 조성물은 바람직하게는 약학적 조성물이고, 본 분야에서 전형적으로 사용되는 적절한 비히클, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다.
- [115] 약학적으로 허용가능한 비히클을 포함하는 약학적 조성물은 정제, 알약, 분말, 과립제, 캡슐제, 서스펜션, 내복용액, 에멀전, 시럽, 멸균수용액, 비수용액, 서스펜션, 동결건조물(lyophilizates) 및 좌약과 같은 다양한 경구 또는 비경구 복용형태일 수 있다. 관련하여 본 발명의 약학적 조성물은 필러, 증점제, 바인더, 습윤제, 정제분해물질(disintegrant), 계면활성제 등과 같은 희석제 또는 부형제로 조합하여 제형화될 수 있다. 경구 투여를 위한 고상 조제는 정제, 알약, 분말, 과립제, 캡슐제 등과 같은 형태일 수 있다. 이들 고상제와 관련하여 본 발명의 화합물은 녹말, 칼슘 카보네이트, 수크로즈, 락토오즈, 또는 젤라틴과 같은 하나 이상의 부형제를 조합하여 제형화될 수 있다. 간단한 부형제, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 등과 같은 윤활제를 추가로 사용할 수 있다. 경구 투여를 위한 액체 조제는 서스펜션, 내복용액, 에멀전, 시럽 등일 수 있다. 물 또는 액체 파라핀과 같은 간단한 희석제, 습윤제, 감미제, 방향족, 방부제 등과 같은 다양한

부형제를 액체 조제 내에 포함시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 멸균수용액, 비수용성 용매, 서스펜션, 에멀전, 동결건조물, 좌약 등과 같은 비경구 복용 형태일 수 있다. 주입가능한 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름 및 에틸 올레에이트와 같은 에스테르가 비수용성 용매 및 서스펜션에 적합할 수 있다. 좌약의 기본 물질은 위텡졸(Witepsol), 마크로골(macrogol), 트윈 61(Tween 61), 카카오버터(cacao butter), 라우린버터(laurin butter) 및 글리세로젤라틴(glycerogelatin)을 포함한다.

- [116] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여된다. 여기에 사용된 용어 "약학적으로 유효한 양(pharmaceutically effective amount)"은 모든 의학적 치료에 적용가능한 합당한 이익과 위험 비율(benefit/risk ratio)로 충분한 질환 치료용 약학적 조성물의 양을 가리킨다. 유효량은 치료해야 할 질환의 중증도, 환자의 나이 및 성별, 질환의 종류, 약제의 활성도, 약제에 대한 민감도, 투여시간, 투여경로, 분비속도, 치료기간, 약제의 공투여 및 본 분야에서 알려진 다른 파라미터를 포함한 다양한 요인에 따라서 달라진다. 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 다른 치료법과 조합하여 투여될 수 있다. 이와 같은 경우에, 종래의 치료법과 함께 순서대로 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 1회량 또는 다회 용량으로 나누어서 투여될 수 있다. 이들 요인들을 완전하게 고려할 때, 부작용 없이 최대의 효과를 얻기에 충분한 최소량을 투여하는 것이 중요하며, 이 복용량은 분야의 전문가에 의하여 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 복용량은 특별하게 한정되지는 않으나, 환자의 건강 상태 및 체중, 질환의 중증도, 약의 종류, 투여경로 및 투여시간을 포함한 다양한 요인에 따라 변경된다. 조성물은 하루에 1회량 또는 다회 용량으로 랫, 쥐, 가축, 인간 등을 포함하는 포유류 내로 전형적으로 허용된 경로, 예를 들면, 경구로, 직장으로, 정맥으로(intravenously), 피하로(subcutaneously), 자궁내로(intrauterinely) 또는 뇌혈관내로(intracerebrovascularly) 투여될 수 있다.
- [117] 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 항체 또는 상기 조성물을 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 혈관신생을 억제하는 방법, 혈관신생 관련 질환 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.
- [118] 본 발명의 방법은 혈관신생의 억제를 필요로 하는 개체에 약학적으로 유효한 양의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 상기 개체는 개, 소, 말, 토끼, 마우스, 랫, 닭 및 인간과 같은 포유류일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 약학적 조성물은 비경구적으로(parenterally), 피하로(subcutaneously), 복강내로(intraperitoneally), 폐내로(intrapulmonarily) 또는 코내로(intranasally), 필요하다면, 국소치료를 위해 병변내(intralesional) 투여를 포함하는 적절한 방법에 의하여 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 복용량은 개체의 건강 상태 및 체중, 질환의 중증도, 약제의 종류, 투여경로 및 투여시간을 포함한 다양한 요인에 따라 변하며, 본 분야의 당업자에 의하여 용이하게 결정될 수 있다.

- [119] 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 항체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 상기 항체 또는 상기 조성물을 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다. 용어 '항체', '예방' 및 '치료'는 상기에 언급한 바와 같다.
- [120] 본 발명의 항체로 치료 가능하다면, 암은 제한되지 않는다. 상세하게는 본 발명의 항체는 혈관신생을 억제함으로써 암의 발생 또는 진행을 예방할 수 있다. 암의 예로는 식도암(esophageal cancer), 위암(stomach cancer), 대장암(large intestine cancer), 직장암(rectal cancer), 구강암(oral cancer), 인두암(pharynx cancer), 후두암(larynx cancer), 폐암(lung cancer), 결장암(colon cancer), 유방암(breast cancer), 자궁경부암(uterine cervical cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 난소암(ovarian cancer), 전립선암(prostate cancer), `고환암(testis cancer), 방광암(bladder cancer), 신장암(renal cancer), 간암(liver cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 뼈암(bone cancer), 결합조직암(connective tissue cancer), 피부암(skin cancer), 뇌종양(brain cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 백혈병(leukemia), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 림프종(lymphoma) 및 다발성 골수혈액암(multiple myeloid blood cancer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [121] 또한, 본 발명의 항체는 다른 항체 또는 생물학적 활성제 또는 다양한 목적을 위한 물질과 조합하여 사용될 수 있다. 본 발명은 이러한 관점에서 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 다른 혈관신생 질환 치료제와의 병용투여용 조성물에 관한 것이다.
- [122] 상기 다른 혈관신생 질환 치료제는 항-혈관신생 약물, 소염 약물 및/또는 항암 약물을 들 수 있다. 이를 통해 서로의 저항성을 극복시키고 효능을 증진시킬 수 있다.
- [123] 본 발명에 따른 조성물에서 다른 혈관신생 질환 치료제와 병용 투여되는 경우 TIE2 항체와 다른 혈관신생 질환 치료제는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 예를 들면, 항-혈관신생 약물, 소염 약물 및/또는 항암 약물을 대상체에게 투여한 후, 활성 성분으로서 TIE2에 대한 항체 또는 그의 항원 결합단편을 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하거나, 상기 조성물을 대상체에게 투여한 후, 항-혈관신생 약물, 소염 약물 및/또는 항암 약물을 상기 대상체에게 투여한다. 경우에 따라서, 상기 조성물을 항-혈관신생 약물, 소염 약물 및/또는 항암 약물과 동시에 대상체에게 투여할 수 있다.
- [124] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 혈관신생 질환의 진단용 조성물이다. 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 처리하여 혈관신생 질환을 진단하는 방법에 관한 것이다.
- [125] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 통해 샘플에서의 TIE2 발현 수준을 측정함으로써 혈관신생 질환을 진단할 수 있다. 발현 수준은 통상적인 면역분석 방법에 따라 측정할 수 있으며, 상기 항체를 이용한 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA (enzyme-linked

immunosorbant assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경재 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 통해 측정할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [126] 상기 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 세기를 분석함으로써, 암을 진단할 수 있다. 즉, 생물학적 시료에서 본 발명의 마커의 단백질이 고발현 되어 시그널이 정상 생물학적 시료(예컨대, 정상 위조직, 혈액, 혈장 또는 혈청) 보다 강하게 나오는 경우에는 암으로 진단된다.
- [127] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단용 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따른 키트는 항-TIE2 항체를 포함하고, 시료와 항체가 반응함으로써 나타내는 시그널을 분석하여, 암을 진단할 수 있다. 이 때, 상기 시그널은 항체에 결합된 효소 예를 들어 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시퍼라아제 또는 사이토크롬 P450을 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 이 때 효소에 대한 기질은 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트 (BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움 (NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트 (naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF (enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌 (비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR (p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB (tetramethylbenzidine), ABTS (2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민 (OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT (nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS (phenazine methosulfate)과 같은 기질이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [128] 또한, 본 발명에 따른 키트는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 포함할 수 있으며, 상기 레이블은 화학물질 (예컨대, 바이오틴), 효소 (알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P450), 방사능물질(예컨대, C14, I125, P32 및 S35), 형광물질 (예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질 (chemiluminescent) 및 FRET (fluorescence resonance energy transfer)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [129] 혈관신생의 진단을 위해 사용되는 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이를 통해 TIE2의 발현을 정성적 또는 정량적으로 분석할 수 있다.
- [130]
- [131] 실시예
- [132] 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.

[133]

[134] 실시예 1. TIE2에 결합하는 항체의 선별

[135] TIE2에 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 Ni⁺ 플레이트에 항원 (hTIE2-his: sino biological, 10700-H08H)을 2 µg/mL 100 µL씩 웰에 넣고 4°C 오버나이트(overnight) 시킨다. 다음날 항원 코팅 플레이트(coating plate)는 0.1% TBST로 3번 워싱한 후 2% BSA 차단 버퍼(blocking buffer) 200 µL를 넣고 실온에서 2시간 반응시킨다. 2×YT-TET (tetracycline 10 µg/mL) 성장 배지(growth medium) 2 mL에 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 1XTBS로 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 2.5시간 반응시킨다. 파지 라이브러리 반응이 끝나면 상층액은 버리고 0.1% TBST로 5번 워싱하고 TBS로 3번 워싱해 각 웰에 100 mM TEA (trimethylamine) 100 µL를 넣은 후 실온에서 10분간 흔들어준다. 10분 지나면 각 웰에 1 M Tris (pH 7.5) 50 µL를 넣고 섞어준다. 상등액(supernatant)은 OD₆₀₀ 0.5가 된 XL1-blue 10 mL에 넣어 37°C에서 30분간 감염(infection)시킨다. 감염이 끝나면 100 µL는 아웃풋 타이터(output titer)로 사용하고 나머지는 6,000 rpm, 10분간 원심분리 한다. 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 100 µL는 1/10, 1/100, 1/1000으로 희석(dilution)하여 CM 플레이트에 스프레딩하여 37°C에서 오버나이트한다. 다음날 스퀘어 플레이트에 자란 콜로니(colony)는 2XYT 배지 50 mL을 넣은 후 룰(loop)을 사용하여 긁어 모은 후 6000 rpm, 10분 원심분리하여 상층액은 버리고 침전액(precipitate)에 대하여 1차 패닝 스톡(panning stock)을 만들고 2XYT 배양 배지(growth media: CM 34 µg/mL + 1% Glucose) 100 mL을 500 mL 삼각플라스크에 넣은 후 OD₆₀₀ 값이 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 2×YT배지(CM 34 µg/mL + Kan. 70 µg/mL + 1 mM IPTG + 5 mM MgCl₂) 100 mL로 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/2.5 M NaCl를 넣고 아이스(ice)에서 1시간 침전시킨다. 침전시킨 후 9000 rpm, 1시간 원심분리한다. 상층액은 버리고 TBS 3 mL로 침전액(precipitate)을 풀어준 후 0.45 μ m 필터(filter)에 여과한 후 4°C에 보관하여 이를 다음 번 패닝(panning) 과정에서 사용한다. 이 과정을 3번 반복하여 항원에 결합하는 항체를 ELISA를 수행하여 확인하였다.

[136]

[137] 실시예 2. TIE2에 특이적으로 결합하며 TIE2와의 결합을 중화하는 Monoclonal ScFv phage 선별(binding ELISA)

[138] 패닝(panning) 과정이 끝나면 마지막 라운드 세포 스톡(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 2xYT배지(CM 34 μ g/mL + 1% glucose) 200 μ L를 넣고 각 웰에 콜로니를 하나씩 넣은 후 37°C, 3000 rpm에서 오버나이트한다. 다음날 새로운 96 웰 딥 플레이트에 2xYT배지(CM 34 μ g/mL + 1% glucose) 200 μ L를 넣고 각 웰에 전날 키운 세포를 각 웰에 마다 20 μ L씩 넣은 후 37°C, 3000 rpm, 1시간 10분 키운다. 나머지 세포는 50% 글리세롤 100 μ L씩 첨가하여 -70°C에 보관한다. 세포가 자라면 헬퍼 파지 1 μ L와 2xYT배지 19 μ L를 섞은 후 각 웰에 20 μ L씩 첨가 후 37°C에서 30분 인큐베이션한다. 인큐베이션이 끝나면 3000 rpm, 10분 원심분리한다. 상층액을 버리고 2xYT배지(CM 34 μ g/mL + Kan. 70 μ g/mL + 1 mM IPTG + 5 mM MgCl₂) 200 μ L를 넣고 메가그로우(megagrow)에서 30°C, 3000 rpm에서 오버나이트한다.

[139] TIE2에 특이적으로 결합하는 파지를 선별하기 위하여 먼저, 96 웰 Ni+ 플레이트에 Ag(hTIE2-his: sino biological, 10700-H08H) 2 μ g/mL로 만들어 100 μ L/well씩 넣고 4°C에서 오버나이트한다. 다음날 전날 키운 세포는 3000 rpm, 10분 원심분리하여 4°C에 보관한다. 깔아 놓은 Ag은 0.1% TBST로 3번 워싱한 후에 2% BSA 차단 버퍼(blocking buffer) 200 μ L씩 넣은 후 25°C 2시간 인큐베이션한다. 차단(blocking)이 끝나면 0.1% TBST로 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% TBST로 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% TBST로 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 리더기 (ELISA reader)로 분석한다.

[140]

[141] 표 1에서와 같이 TIE2 항원에 특이적으로 결합하는 monoclonal scFv phage를 ELISA로 측정한 결과 선별된 항체의 염기서열은 다음 표 2, 표3과 같다.

[142]

[143] [표1]

TIE2 항원에 특이적으로 결합하는 monoclonal scFv phage를 ELISA로 측정한 결과

No.	Clone number	human ELISA	mouse ELISA
1	1A6	2.1	0.1
2	1A9	2.4	0.0
3	2F2	1.9	0.1
4	3D6	2.1	0.1
5	4 E2	1.2	0.4

[144]

[145] [표2]

TIE2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 CDR 서열

서열명			아미노산서열	
No.1	1A6	Heavy-chain CDR1	GFTFSSYA	1
		Heavy-chain CDR2	ISGSGGST	2
		Heavy-chain CDR3	ARGVDSSMVTGFDH	3
		Light-chain CDR1	QSISRW	4
		Light-chain CDR2	EAS	5
		Light-chain CDR3	QQYEDYPLT	6
No.2	1A9	Heavy-chain CDR1	GYTENSVD	7
		Heavy-chain CDR2	VNPPGGTGST	8
		Heavy-chain CDR3	ARDYNRAPPTLDV	9
		Light-chain CDR1	SSSDVGGYNY	10
		Light-chain CDR2	DVT	11
		Light-chain CDR3	SSYSSSTFYV	12

[146]

No.3	2F2	Heavy-chain CDR1	GFTFSSYA	13
		Heavy-chain CDR2	ISGSGGST	14
		Heavy-chain CDR3	ARGGLHHGFDI	15
		Light-chain CDR1	NIESKS	16
		Light-chain CDR2	YDN	17
		Light-chain CDR3	QVWDTYTDQPV	18
No.4	3D6	Heavy-chain CDR1	GFTFSRYN	19
		Heavy-chain CDR2	ISSSGRFI	20
		Heavy-chain CDR3	ARDSPTQGPYYYYGMDV	21
		Light-chain CDR1	KIGSKS	22
		Light-chain CDR2	YDS	23
		Light-chain CDR3	QVWDSSSDRPV	24
No.5	4E2	Heavy-chain CDR1	GFTFSDYA	25

[147]

No.6		Heavy-chain CDR2	ISFDGNNQ	26
		Heavy-chain CDR3	TTDTMSGYDWEDAFDI	27
		Light-chain CDR1	QSIGRW	28
		Light-chain CDR2	ASS	29
		Light-chain CDR3	QSYSTPYT	30
	11F	Heavy-chain CDR1	GFSFSDHA	31
		Heavy-chain CDR2	VWPDGSNK	32
		Heavy-chain CDR3	ARDSGPISRGLTY	33
		Light-chain CDR1	GGSIASNY	34
		Light-chain CDR2	EDD	35
		Light-chain CDR3	QSYDDTNVV	36

[148]

[149] [표3]

TIE2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 가변영역 서열

	항체 명칭		서열	서열번 호
No.1	1A6	중쇄가변영역	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTT GGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATG CCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGT GGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAA GGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCA AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTG AGAGCCGAAGACACGGCCGTGTATTACTGTGC GAGAGGCGTGGATTCTTCTATGGTAAACCGATT TGATCACTGGGGCCAGGGAACTTTGATCACCGT CTCCTCA	37
			QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGV DSSMVTGFDHWGQGTLITVSS	38
		경쇄가변영역	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTG TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGGTGGTTG GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC TAAGTTCCTGATCTATGAGGCATCTACTTIAGAA AGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGG AACTGGGACAGAATTCATCTCACCATCAGCA GCCTGCAGCCTGATGATTTTGCTACTTATTACTG TCAACAGTATGAGGACTACCCGCTCACCTTCGG CCAAGGGACACGACTGGAAATCAAACGT	39
			DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCRASQSISRWLAW YQKPKGKPKFLIYEASTLESGVPSRFSGSGTGTE FTLTISLQPDDEFATYYCQYEDYPLTFGQGTRLE IKR	40
No.2	1A9	중쇄가변영역	CAGATGCAGCTGGTACAGTCTGAGGCTGAGGT GAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCT	41

[150]

No.3	2F2		GTAAGGCATCTGGATACACCTTTAACAGTTACG ATATACACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA GGGCTTGAGTGGATGGGAGTAGTCAACCCACC TGGTGGAACCGGAAGCACTGTTTACGCACAGA AGTTCGAGGACAGACTCACCTGACCACGGAC ATGTCCACAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAG CAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTA CTGTGCAAGAGACTATAATAGGGCCCCGCTAC TTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGATCA CCGTCTCCTCA	
			QMQLVQSEAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNSYD IHWVRQAPGQGLEWMGVVNPPGGTGSTVYAQK FEDRLTLITDMSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCA RDYNRAPPTLDVWGQGTITIVSS	42
			경쇄가변영역	
			AATTTIATGCTGACTCAGCCCGCTCCGTGTCT GGGTCCCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGC ACTGGAAGCAGCAGCGACGTTGGTGTTATAA CTATGTCTCCTGGTACCAACAGCAGCCAGGCAA AGCCCCCAACTCATCATTTATGATGTCACTAA GCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCCGG CTCCAAGTCTGGCAACTCGGCCTCCCTGACCAT CTCTGGACTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTA TTA CTGCAGCTCATA CAGCAGCAGCACTTTTAA CGTCTTCGGA ACTGGGACCAAGGTCACCGTCC TAGGT	43
		중쇄가변영역	NFMLTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNYV SWYQQHPGKAPQLIYDVTKRPSGVSNRFSKSKS GNSASLTISGLQAEDEADYYCSSYSSSTFYVFGTG TKVTVLG	44
			CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATG CCATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCACGTATCAGTGGTAGT GGTGGGAGCACA AACTACGCAGACTCCGTGAA GGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCA AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTG	45

[151]

			AGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC AAGAGGGGGTCTCCATCATGGTTTTGATATCTG GGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCA	
			QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MTWVRQAPGKGLEWVSRISSGGSTNYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GGLHHGFDIWGQGTMTVTSS	
		경쇄가변영역	TCCTATGAGCTGACACAGCCACCCTCACTGTCA GTGGCCCCAGGGAAGACGGCCAGGATTACATG TGACGGGGACAACATTGAAAGTAAAAGTGTC ACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCT GTGCTAGTCATCTATTATGATAATGACCGGCCCT CAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACT CTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGG GTCGAAGCCGGAGATGAGGCCGACTATTACTGT CAGGTGTGGGACACTTATACCGATCAGCCGGTA TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGG T	47
			SYELTQPPSLSVAPGKTARITCDGDNIESKSVHW YQKPGQAPVLVIYYDNDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEADYYCQVWDITYDQPVFGG GKLTVLG	48
		중쇄가변영역	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGGAGGCTT GATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGACTATG CTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGCAAG GGGCTGGAGTGGGTGGCACTCATATCTTTTGAT GGGAATAATCAATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCGAAG AACACAATATATCTGCAATGAACAGTCTGAGA GCCGAGGACACGGCCGTGTAATACTGTACCAC AGATACGATGAGTGGCTACGATTGGGAAGATGC TTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGATCAC CGTCTCCTCA	49
No.4	3D6		QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCIGSGFTFSRYNI NWVRQAPGKGLEWVSSISSGRFIHYAGSVKGR FTVSRDNTKNSVSLQMNSLRAEDTAVYYCARDS	50

[152]

No.5	4E2		PTQGPYYYYGMDVWGQGTITVSS	
		경쇄가변영역	TCCTATGAGCTGACACAGCCACCCTCAGAGTC AGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCACAATTACTT GTGGGGGAAATAAAATTGGAAGTAAAGTGTG CACTGGTACCAACAGAAGCCAGGCCAGGCCCC TCTAATGGTCATCTATTATGATAGCGACCGCCC TCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAC TCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAG GGTCGAGGTCGGGGATGAGGCCGACTATTACT GTCAGGTGTGGGATAGTAGTAGCGATCGTCCGG TGTTCCGGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA GGT	51
			SYELTQPPSESVAPGKTATITCGGNKIGSKSVHWY QQKPGQAPLMVIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNT ATLTISRVEVGDEADYYCQVWDSSSDRPVFGGT KLTVLG	52
		중쇄가변영역	CAGGTGCAGCTGGTAGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT GTATAGGCTCTGGCTTACCTTCAGTCGCTATAA CATAAATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GCCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTG GAAGGTTCATCCACTACGCAGGCTCAGTGAAG GGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAACACCAA GAACTCAGTGTCTCTACAAATGAACAGTCTGA GAGCCGAGGACACGGCCGTGTTACTGTGCG AGAGACTCTCCAACACAGGGCCCCTACTACTA CTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCA CGATCACCGTCTCCTCA	53
			QVQLVQSGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAM HWVRQAPGKLEWVALISFDGNNQYYADSVKG RFTISRDN SKNTIYLQMNSLR AEDTAVYYCTIDT MSGYDWEDAFDIWGQGTMITVSS	54
		경쇄가변영역	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG TCTGCATCTATCGGCGACAGAGTCACCATCACT TGCCGGGCCAGTCAGAGTATTGGTAGGTGGTTG GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC TAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCA	55

□

[153]

No.6	11F		AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTG GATCTGGGACAGATTTCACCTCACCATCAGCA GTCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTIACACT GTCAACAGAGTTACAGTACCCCGTACACTTTTG GCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTGG AGGAGCCAGCCTCGTG	
			DIQMTQSPSSLSASIGDRVITTCRASQSIGRWLAW YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQSYSTPYTFGQGTKV EIKRGGASLV	56
		중쇄가변영역	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGT GGTCCAGCCCGGGAGGTCCCTTAGACTCTCCT GTTCAAGCTCTGGATTCTCCTTCAGTGATCATG CCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAGG GGCCTAGAATGGGTGGCAACTGTTTGGCCTGAT GGAAGTAATAAATATTATGTAGATTCTGTGAACG GTCGATTAGCATTTCAGAGACAATTCCAAGA ACACAGTGTCTCTGCAAATGAACAGTCTGAGA GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCACG AGATTCGGGACCTATCAGCCGCGGAGATTGAC TTACTGGGGCCCGGGAGTCTGGTCACCGTCTC CTCA	57
			QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCSASGFSFS MHWRVQAPRGLEWVATVWPDGSENKYYVDSV NGRFSISRDNKNTVSLQMNSLRAEDTAVYYCAR DSGPISRGLTYWGPGLVTVSS	58
No.6	11F	경쇄가변영역	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCG GAGTCTCCGGGGAAGACTGTAATCATCTCCTGC ACCGGCAGCGGTGGCAGCATTGCCAGCAACTA TGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAGTG CCCCACCATTGTGATCTATGAAGATGATCAGA GACCTCTGGGGTCCCTGATCGGTACTCTGGCT CCACCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCA CCATCTCTGGACTGAGGGCTGAGGACGAGGCT GACTACTACTGTCAGTCTTATGACGATACCAAT GTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGT CCTAGGTGGAGGAGCCAGCCTCGTG	59

[154]

			NFMLTQPHSVSESPGKTVIISCTGSGGSIASNYVQ WYQQRPGSAPTIVIEDDQRPSGVPDRYSGSTDS SSNSASLTISGLRAEDEADYYCQSYDDTNVVFVG GTKLTVLGGGASLV	60
--	--	--	--	----

[155]

[156] 실시예 3. 세포 발현 TIE2에 대한 결합력을 가진 항체 선별

[157] 세포 발현 TIE2에 대한 결합을 확인하기 위하여, 자체 수립한 인간/마우스 TIE2 과발현 CHO-K1 세포주 (hTIE2/CHO-K1, mTIE2/CHO-K1)에 대한 결합을 유세포분석법으로 측정하였다. 각 세포를 유지 배양 후, hTIE2 CHO-K1은 PBS로 세정, 5 mM EDTA를 첨가하여 세포부유액을 취하고, 원심분리를 통해 각각의 세포를 회수하였다. FACS 전용 버퍼 (2% FBS, 0.05% sodium azide 함유 PBS)를 사용하여 5×10^6 cells/mL 세포현탁액을 제조, 각 tube 당 100 μ L씩 분주하였다. 2 μ g/mL의 clone들을 각 시험관에 100 μ L씩 첨가한 후 4°C에서 30분간 정치하여 세포 결합을 유도하였다. 이후 2 mL의 FACS 버퍼를 사용하여 세정하였고, 100 μ L의 2차 항체 희석액 (1/500, PE-conjugated anti-human IgG-Fc polyclonal antibody fragment, #A80-248PE, Bethyl Laboratories Inc. US)를 첨가 후 4°C에서 20분간 정치하여 형광표지 하였다. 2 mL의 FACS 버퍼로 세정 후 200 μ L의 FACS 버퍼를 첨가하여 세포를 부유시켰다. TIE2에 대한 양성대조군으로는 PE anti-mouse CD202b (Tie-2, CD202) Antibody (124007, Biolegend), PE anti-human CD202b (Tie2/Tek) Antibody (334205, Biolegend), PE-conjugated anti-mouse IgG polyclonal antibody(A90-139PE, Bethyl Laboratories Inc.) 및 PE-conjugated anti-human IgG polyclonal antibody(A80-248PE, Bethyl Laboratories Inc.)로 형광표지 하였다. 분석에는 BD Bioscience사의 FACSCalibur를 이용하여 분석하였다.

[158] 그 결과, 모든 clone들이 CHOK1 세포주에 발현된 인간 TIE2에 대한 결합이 우수함을 확인하였고, 4E2 클론의 경우 인간과 마우스 모두에서 TIE2에 대한 결합력을 보유하고 있음을 확인하였다(도 1A 및 도 1B).

[159]

[160] 실시예 4. 항-TIE2 항체 발현

[161] 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 가변영역은 경쇄 불변영역을 포함하는 발현벡터(Invivogen, pfuse2ss-hcll)에 삽입하여, IgG 형태의 DNA 클로닝을 완료하였다.

[162] 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 셰이커 상 부유배양 하였다. 3일마다 3×10^5 cells/mL 되도록 계대배양 하였으며, 발현 벡터 도입시에는 3×10^6 cells/mL 되도록 세포수를 조정 한 후 사용하였다. 유전자 도입은 전용 시약인 Expifectamine을 사용하였으며, 세포현탁액 1 mL 당 발현 벡터 DNA 1 μ g과 Expifectamine 2.7 μ L을 함유하는 Lipid-DNA 복합체를 제작, 세포현탁액에 첨가하였으며, 도입 16-18시간 후 인헨서(Enhancer) 1/2를

첨가하여 발현을 유도하였다. 이후 동일 조건에서 3-4일간 배양 후 원심분리하여 IgG 함유 상등액을 취하였다.

[163]

[164] 실시예 5. 항-TIE2 항체의 정제

[165] 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.

[166] 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.

[167]

[168] 실시예 6. 항-TIE2 항체의 human 및 mouse TIE2에 대한 cross reactivity 확인

[169] ScFv phage clone에서의 TIE2의 결합을 IgG에서도 유지되는지 ELISA를 이용하여 확인하였다. 96 웰 면역플레이트에 Ag (hTIE2-his: sino biological, 10700-H08H; mTIE2-his: sino biological, 51087-M08H) 1 µg/mL로 만들어 100 µL/well씩 넣고 4°C에서 오버나이트한다. 다음날 전날 키운 세포는 3000 rpm, 10분 원심분리하여 4°C에 보관한다. 깔아 놓은 Ag은 0.1% TBST로 3번 워싱한 후에 2% BSA 차단 버퍼(blocking buffer) 200 µL씩 넣은 후 25°C 2시간 인큐베이션한다. 차단(blocking)이 끝나면 0.1% TBST로 3번 워싱 한다. 각 웰에 4% BSA 50 µL와 다운(down)하여 4°C에서 보관했던 파지 50 µL을 섞은 후 실온에서 1시간 흔들어 반응시킨다. 파지 결합(phage binding)이 끝나면 0.1% TBST로 3번 워싱한 후에 HRP-접합 goat 항-인간 항체 1:3000 (HRP-conjugated goat anti-human Ab) (Sino, 11973- MM05)을 100 µL씩 넣은 후 25°C 1시간 반응시킨다. 반응이 끝나면 0.1% TBST로 3번 워싱한 후에 TMB (#BD TMB substrate reagent set 555214) 100 µL씩 넣은 후 3~5분 발색 시킨 후 정지 용액(stop solution)을 50 µL씩 넣은 후에 ELISA 리더기 (ELISA reader)로 분석한다.

[170] 그 결과 ScFv에서와 마찬가지로 1A6, 1A9, 2F2, 4E2 및 3D6 클론이 인간 TIE2에 결합하였고, 4E2 클론은 인간과 마우스 TIE2에 모두 결합함을 확인하였다(도 2).

[171]

[172] 실시예 7. 항-TIE2 항체의 migration 활성 측정

[173] 항-TIE2 항체들 중에 가장 우수한 혈관안정화제로서의 역할을 하는 클론을 찾기 위해서, 혈관 정상화 기작에서 early stage를 담당하는 혈관내피세포의

migration 특징을 이용하여 선별하고자 하였다. 따라서, 인간혈관내피세포주인 HUVEC cell을 이용한 migration assay 수행하였다.

- [174] 24-well transwell polycarbonate insert (8.0µm pore size, Corning)를 0.1% gelatin solution으로 coating하고, 상온에서 약 10분간 건조 시켰다. 각 약물들을 600 µL basal medium에 희석하여 lower chamber에 넣어주었다. 이후 insert chamber를 medium이 담긴 lower chamber에 넣어주고, 1×10^5 cells/100 µL의 HUVEC cell을 insert chamber에 접종하였다. 37°C에서 4시간 동안 배양한 후, insert chamber를 꺼내어 증류수에 3회 세척한 후 insert chamber에 부착된 세포를 0.5% crystal violet으로 상온에서 10분간 염색하였다. 이후 면봉을 이용하여, insert 내부의 migration이 되지 않은 세포들을 닦아 광학현미경을 이용하여, insert chamber 내부에서 외부로 migration된 세포들을 200배율로 촬영 후 Image-J program (NIH)을 이용하여 정량 하였다.
- [175] 그 결과 양성대조군인 500 ng/mL ANG1 (R&D system, 923-AN-025)을 clustering한 군은 하지 않은 군에 비해 migration을 잘 시키는 것으로 나타났고, 음성대조군인 500 ng/mL ANG2 (R&D system, 623-AN-025)에 있어서는 clustering 유무에 상관없이 migration 효능은 보이지 않았다. 특히, 시험군 중에서 30 µg/mL 4E2 및 2F2 클론의 migration effect가 증가하는 것이 확인되었다. 1A6, 1A9, 11F 클론들은 migration을 basal 수준정도로 확인되었으며 오히려 3D6은 migration을 감소시켰다(도 3A).
- [176] Migration 결과를 바탕으로 4E2와 2F2 클론의 농도별 활성 및 Ang1과 병용처리시 synergistic effect를 확인하기 위해 앞서 언급한 방법을 이용하여 migration 활성을 측정하였다. 그 결과, 4E2와 2F2 클론의 농도 의존적인 활성을 나타내었고, Ang1과 병용처리시 additive effect를 나타냄을 확인하였다(도 3B 및 도 3C). 따라서, 4E2 및 2F2 클론이 ANG1과의 synergistic effect를 나타내어 vessel normalization의 early stage에서 일어나는 migration을 빠르게 유도하여 vessel stabilization 효과를 잘 나타낼 것으로 보여진다.
- [177]
- [178] 실시예 8. 항-TIE2 항체와 경쟁물질 (Ang1&Ang2)와의 결합 특성 비교
- [179] Migration assay로 혈관안정화제로 선별된 항체인 2F2와 4E2가 TIE2에 결합하여 기능을 나타낼 때 Ang1과 Ang2와 경쟁을 통해 결합하는지 여부를 확인하기 위해 competitive ELISA를 통해 확인하고자 한다. 96 웰 면역 플레이트에 hTIE2 (sino biological, 10700-H08H)을 1 µg/mL의 농도로 만들어 100 µL/well씩 넣고 4°C에서 오버나이트한다. 깔아 놓은 hTIE2은 1xPBS로 2번 워싱한 후에 2% BSA (blocking buffer)를 200 µL씩 넣은 후 RT에서 2시간 인큐베이션한다. Blocking이 끝나면 0.1% PBST로 2번 워싱한다. 항-TIE2 후보 항체는 2 µg/mL의 농도와, ANG1 & ANG2 단백질은 50 µg/mL의 최고농도에서 10배씩 단계희석을 통해 TIE2와 결합시켰다. 이후 PBST로 3회 세정 후 1:2000의 비율로 희석한 HRP-접합 goat 항-인간 항체 1:3000 (HRP-conjugated goat

anti-human Ab) (Sino, 11973- MM05)를 100 μ L 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켜 결합을 유도하였으며, PBST로 3회 세정 후 TBM 기질 시약을 사용하여 발색시켰다. 발색 반응은 50 μ L의 2N H₂SO₄를 첨가하는 것으로 정지시켰으며, sunrise 마이크로 플레이트 리더(TECAN, CH)를 사용하여 특이적 흡광도 OD₄₅₀₋₆₃₀을 측정하였다.

[180] 도 2에서 보여지듯이 선별된 항체(2F2 및 4E2)는 인간 ANG1과 ANG2와 경쟁하지 않고 TIE2에 결합하는 것을 확인하였다(도 4).

[181]

[182] 실시예 9. 항-TIE2 항체의 결합 친화도 평가

[183] 선별된 항-TIE2 항체인 4E2, 2F2와 11F의 인간 TIE2-his(sino biological, 10700-H08H)와 마우스 Tie2-his(sino biological, 51087-M08H)에 대한 친화도 분석을 Octet system (Fortebio Inc. US)를 사용하여 측정하였다. 항-TIE2 항체를 바이오센서에 고정화 하고, 제조자의 매뉴얼에 따라 실험하였다. 인간 TIE2와 마우스 Tie2의 농도 별 결합 동역학을 측정하여 결합 속도 상수(k_{on}), 해리 속도 상수(k_{off}) 및 결합 상수(KD)를 산출하였다 (표 4).

[184] 11F 항체는 인간 TIE2와 마우스 Tie2간의 crossreactivity를 가짐을 확인하였고, ELISA에서 확인한 마우스 Tie2 (KD: 2.09E-05 M)에서 매우 약한 affinity를 가진다는 것을 증명하였다. 4E2에서도 마찬가지로 인간과 마우스 Tie2에서 모두 부착하며, 인간 TIE2에 대한 binding affinity가 KD값이 1.0E-12 M로 높은 affinity를 나타냄을 확인하였고, 마우스 Tie2에 대한 affinity (1.38E-08 M)도 가진다는 것을 확인하였다. 2F2의 경우 인간 TIE2에만 특이적인 결합력을 나타내는 것으로 확인하였고, KD값이 7.94E-10 M로 높은 affinity를 나타냄을 확인하였다.

[185]

[186] [표4]

Sample	KD (M)	K _{on} (1/Ms)	K _{off} (1/s)	Full R ²	
11F	hTIE2-his	2.76E-09	5.53E+04	1.52E-04	0.9986
	mTie2-his	2.09E-05	1.87E+02	3.90E-03	0.8997
2F2	hTIE2-his	7.94E-10	1.46E+05	1.16E-04	0.9994
	mTie2-his	-	-	-	-
4E2	hTIE2-his	<1.0E-12	1.06E+05	<1.0E-07	0.9949
	mTie2-His	1.38E-08	2.12E+05	2.91E-03	0.9215

[187]

[188] 실시예 10. 항-TIE2 항체의 혈관누수 recovery 활성 측정

[189] 항-TIE2 항체의 혈관안정화제로서의 활성을 확인하기 위해, 혈관내피세포를 이용하여 혈관누수 회복 시험을 진행하였다. Angiogenesis 발생시 VEGF의 과발현에 의해 vessel의 junction이 끊어지게 되어, 혈관 누수현상이 발생하게 된다. 이를 in vitro 수준에서 구현하기 위해 HUVEC 세포주를 이용하여 vessel

permeability assay를 수행하고자 한다.

- [190] 24-well transwell polycarbonate insert (0.4 μ m pore size, Merck Millipore)를 0.1% gelatin solution (Sigma Aldrich, G1890)으로 coating 한 후, 상온에서 약 10분간 건조시켰다. 이후 insert chamber를 medium이 담긴 lower chamber에 넣어주고, 6 $\times$ 10⁴ cells/200 μ L의 HUVEC cell을 insert chamber에 접종하였다. 이 후, 37°C 조건의 5% CO₂ 배양기에서 medium 교체없이 72시간동안 배양하였다. Insert chamber 내의 medium을 제거한 후, basal medium에 각 약물들을 처리하였다. 37°C에서 30분동안 세포를 배양한 후, 100 ng/ mL VEGF (R&D system, 293-VE-050)를 처리하여 150분간 반응시켰다. 이후 0.5 mg/ mL FITC-dextran (70 kDa, Sigma)을 insert chamber에 처리하여 실온에서 30분동안 반응시켰다. Lower chamber로 빠져나온 FITC-dextran을 50 μ L 채취하여, PBS에 1:20으로 희석하였다. 이 후, 희석된 시료들을 492 nm/520 nm (excitation/emission) 파장에서 fluorescence를 microplate reader (Hidex Chameleon)로 측정하였다.
- [191] 그 결과 VEGF만 처리해준 군에서 혈관내피세포의 tight-junction이 끊어져 FITC-dextran의 이동량이 많아졌으나, 양성 대조군인 Ang1을 처리하였을 때 FITC-dextran의 이동량이 감소되는 것을 확인하였다. 반면 음성 대조군인 Ang2는 VEGF만을 처리한 그룹과 유사한 permeability를 타나내었고, 2F2 및 4E2를 처리한 그룹에서는 permeability가 감소되었다. 또한, 동일한 실험방법으로 11F의 활성을 확인한 결과, 11F 역시 vessel permeability를 감소시키는 것을 확인하였다(도 5A 및 도 5B).
- [192] 위의 결과를 통해 항-TIE2 항체는 VEGF에 의해 유도된 혈관누수를 개선시킬 수 있는 활성을 가지고 있음을 확인하였다. 추가적으로, 항-TIE2 항체가 질환모델과 유사한 배양조건에서도 혈관누수를 회복시킬 수 있는지 VEGF와 Ang2가 동시에 처리된 군에서의 활성을 확인하였다.
- [193] 그 결과, 2F2는 basal 수준만큼 vessel permeability를 감소시킨다는 것을 확인하였고, 4E2 또한 basal 수준만큼 감소시킴을 확인하였다. Vessel permeability 결과를 바탕으로 2F2 및 4E2 클론은 VEGF 및 Ang2로 유도된 혈관누수를 정상화시킬 수 있음을 확인하였다(도 5C).
- [194]
- [195] 실시예 11. 항-TIE2 항체의 혈관정상화에 대한 기전연구
- [196] 선별된 항-TIE2 항체의 혈관누수 개선 효과가 혈관정상화 신호전달 기전에 의해서 나타나는 것인지 확인하기 위해, TIE2 하위 신호전달 기전을 측정하고자 한다. 이를 위해 인간혈관내피세포주인 HUVEC 세포에 약물을 처리한 후 western blot 분석법으로 혈관정상화와 관련된 단백질 발현을 확인하고자 한다.
- [197] Western blot 수행을 위해, 각 약물 반응이 끝난 HUVEC 세포주를 PBS로 2번 세척 후, cell extract를 얻기 위해 lysis buffer (Thermo Scientific, RIPA buffer & phosphatase inhibitors)를 넣고 아이스에서 20분 반응 시킨다. 이 후, 13000 rpm, 4°C에서 원심분리 후, 상등액만 얻는다. BCA 단백질 정량법을 이용하여 정량 후,

10% SDS-PAGE gel에 lysate를 로딩 후, 전기영동 한다. Nitrocellulose membrane (Bio-Rad)을 이용하여 transfer 진행 후, 0.1% Tween20 TBST buffer에 5% skim milk를 희석하여 상온 1시간 blocking 진행한다. 이 후, 1차 antibody (p-TIE2, TIE2, p-AKT, AKT, p-ERK, ERK, p-VEGF, p-VE cadherin, VE Cadherin and Histone; Cell signaling)들을 1:1000으로 희석하여 4°C에서 shaking overnight 진행하고, Peroxidase-conjugate 2차 antibody (Santa cruz)를 1:5000으로 희석하여, 상온 1시간 반응시킨다. ECL solution (Pierce) 반응을 거쳐 목적하는 단백질의 밴드를 관찰한다. 먼저 시간대 별 TIE2 신호전달 기전에 대해 확인하였다. 그 결과, 항-TIE2 항체인 2F2는 ANG1과 유사하게 TIE2 인산화 반응을 유발시키고, vessel normalization 신호인 AKT 또한 인산화 시켰다. 항-TIE2 항체의 4E2 및 11F에 대해서도 확인한 결과 이와 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 따라서, 2F2, 4E2 및 11F 항체는 TIE2 인산화를 통해 혈관정상화제로서의 가능성을 확인하였다(도 6).

- [198] 따라서 혈관누수 환경 속에서도 항-TIE2 항체가 혈관안정화 신호전달을 통해 혈관누수를 회복시켰는지 확인하고자, VEGF가 포함된 배지에 항-TIE2 항체 2F2를 처리하고 위와 동일한 western blot 분석법을 통해 혈관내피세포의 tight-junction 회복을 담당하는 VEGFR와 VE-Cadherin의 인산화 신호를 측정하였다(도 7).
- [199] 그 결과, 신생혈관생성을 담당하는 VEGF군에서 VEGFR의 인산화가 증가하고 cell to cell tight-junction을 이루는 VE-cadherin의 인산화 증가를 확인하였다. 양성 대조군인 Ang1의 경우 이와 반대로 VEGFR와 VE-cadherin의 인산화를 저해했으며, 이와 마찬가지로 2F2도 VEGFR와 VE-cadherin의 인산화를 저해시켰다. 이러한 신호전달은 항-TIE2 항체가 TIE2 인산화를 통해 VEGFR의 활성화를 저해시키고, 저해된 VEGFR은 세포막에서 cell to cell tight-junction을 담당하는 VE-cadherin의 인산화를 저해시켜 cell to cell tight-junction이 회복된 것으로 보여진다. 결과적으로, 항-TIE2 항체는 혈관누수현상 회복 기능 및 신호전달을 가지는 혈관안정화제로 시사된다.
- [200]
- [201] 실시예 12. 항 Tie2 항체에 의한 cell to cell tight junction 유지
- [202] 항 Tie2 항체가 vessel normalization에 영향을 미치는지 확인하기 위해, HUVEC 세포주를 이용하여 immunocytochemistry 시험을 수행하였다. ICC용 4 well chamber slide에 HUVEC 세포주를 8×10^5 cells/well 농도로 seeding하고 24시간 후 100 ng/mL VEGF, Ang1, Ang2, 10 ug/mL 항 Tie2 항체 (2F2, 4E2)를 분주하고 24시간동안 incubation하였다. 이후 4% PFA로 15분간 고정후 Triton X-100으로 cell membrane을 permeabilization시키고, 10% goat serum으로 blocking하였다. PBS로 wash 후 Alexa-488 conjugated anti-VE-cadherin (Thermo)를 1:200 농도로 overnight binding시키고, 1 ng/mL DAPI를 10분간 반응시킨다. 이후 PBS로 워싱하고 mounting용액으로 고정시킨 후 형광현미경으로 촬영하였다.

- [203] VE-Cadherin 발현을 관찰한 결과, VEGF 및 Ang2 동시 처리군에서 cell to cell tight junction molecule인 VE-Cadherin 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었고, 양성대조군인 Ang1 처리시 junction이 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 항 Tie2 항체(2F2)를 처리하였을 때 양성 대조군과 같이 유의적인 VE-Cadherin 발현 증가를 보였으며, Ang2와 병용 처리시 VE-Cadherin 발현 증가 경향성을 나타냈다. 항 Tie2 항체(4E2) 또한 양성대조군처럼 유의적인 VE-Cadherin 발현 증가를 나타냈으며, Ang2와 병용 처리시에도 단독 처리군과 유사한 VE-Cadherin 발현 증가 수준을 나타냈다(도 8). 이를 통해 항 Tie2 항체(2F2, 4E2)가 VE-Cadherin 발현을 증가시켜 결과적으로 vessel normalization 시키는 것으로 사료된다.
- [204]
- [205] 실시예 13. 항-TIE2 항체의 혈관정상화에 대한 in vivo test
- [206] 항-TIE2 항체의 혈관정상화 기능이 in vivo 수준에서 나타나는지 확인하기 위해 VEGF-induced vessel leakage ear model을 이용하여 마우스 Tie2와 결합력을 가지는 4E2 항체를 이용하여 항-TIE2 항체의 활성을 확인하고자 한다.
- [207] 7주령 Balb/c 수컷 마우스의 꼬리정맥에 1% Evans blue 염색약을 주사하고 10 분동안 반응시켜서 혈색을 푸르게 염색하였다. 이어 시험군 쥐의 오른쪽 귀 혈관에 10 mg/kg의 4E2를 투여하고, 왼쪽 귀 혈관에 PBS를 투여하였다. 30분 후 VEGF(R&D system, 293-VE-050)를 양쪽 귀 혈관에 투여해주었다. 대조군은 왼쪽 귀 혈관에 PBS를 투여하고, 오른쪽 귀에 VEGF를 투여해 주었다. 30분 후 귀를 잘라 ethanol에서 24시간 동안 evans blue dye를 추출하였다. 이후 microplate reader기로 OD값을 측정해주었다.
- [208] 그 결과, 음성대조군에서 VEGF에 의해 evans blue dye 유출을 확인하였고 이는 PBS군 대비 약 2배 가량 증가된 유출 수준을 나타냈다. 시험군에서 4E2 처리군이 VEGF군 대비 약 30% evans blue dye 유출 감소효과를 가지는 것으로 나타났다. 따라서, 본 실험을 통해 항-TIE2 항체가 VEGF로 인해 유발된 혈관누수현상을 TIE2 신호전달을 통해 충분히 혈관을 정상화시킬 수 있음을 확인하였다(도 9).
- [209]
- [210] 실시예 14. 항 Tie2 항체의 망막 신생혈관형성 억제 기능 평가
- [211] 항 Tie2 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. (Plos One, 1:15, 2015) 등이

제안한 기준을 modification한 exclusion criteria에 근거하여 결과분석 및 통계처리 과정에서 제외하였다.

- [212] CNV 유도 24시간 뒤 항 Tie2 항체(20, 40 $\mu\text{g}/\text{eye}$)와 대조약물 aflibercept (20 $\mu\text{g}/\text{eye}$)을 투여하였다. 이에 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.
- [213] 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($0.9 \log \text{cds}/\text{m}^2$ (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.
- [214] CNV mouse model에 대한 항 Tie2 항체의 신생혈관 감소 효능 결과는 도 10에 나타내었다. FFA 상에서 관찰된 CNV 병변의 크기에 있어서, 항 Tie2 항체를 투여한 모든 시험군에서 CNV 대조군 대비 통계적으로 유의한 감소가 관찰되었으며(각각, $P < 0.0001$) aflibercept을 투여한 시험군과 비교할 때에도 보다 뛰어난 감소효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 도 10B에서 OCT 측정으로 병변의 부피를 CNV 대조군과 비교할 때에도, 항 Tie2 항체를 투여한 모든 시험군에서 통계적으로 유의하게 병변의 부피를 감소시키는 것을 확인하였다(각각, $P < 0.0001$, $P < 0.001$). 또한, 도 10C에서 scotopic-ERG로 망막 전위도를 CNV 대조군과 비교하였을 때, aflibercept 투여군과 동등하며 통계적으로 유의한 B-wave amplitude의 증가가 관찰되었다(각각, $P < 0.0001$). 결과적으로 CNV mouse model에서 항 Tie2 항체는 신생혈관형성 억제 및 혈관 누수현상을 억제하는 기능을 가지는 것으로 보여진다.
- [215]
- [216] 실시예 15. 항 Tie2 항체의 암혈관 정상화 기능 평가

- [217] 항 Tie2 항체의 암혈관 정상화에 대한 효능을 평가하기 위해 항 VEGFR 항체 DC101을 대조약물로 사용하여 자발성 교모세포종 마우스 모델에서 시험을 수행하였다. 자발성 교모세포종은 EGFR viii/viii Luciferase fl/+ tdTomato fl/+ 마우스로서 생후 6-7주령이 되었을 때부터 주 1회 IVIS 촬영으로 종양 유발정도를 측정한다. 종양 발생은 IVIS signal radiance가 3.0×10^4 (photons/sec/cm²/sr) 이상이면서, 생쥐의 brain에 국소적으로 집중된 신호가 보이는 경우로 정의했다. 종양 발생이 확인된 생쥐를 군분리하여 약물 투여 전 1회, 투여 중 1회, 투여 종료 시점 1회 총 3회의 IVIS 이미지가 촬영되었고 각 촬영시마다 signal radiance가 기록되었다. 항 Tie2 항체(1 mg/mouse)와 항 VEGFR 항체(1 mg/mouse) 약물은 각각 정맥투여로 투여되었고 2주간, 주 2회, 총 4회 용량이 투여되었다. 약물 투여 전 Isoflurane 호흡마취를 통해 생쥐를 충분히 마취시켰다. 케타민 52.5 uL + 럼폰 22.5 uL + PBS 75 uL 혼합 용액을 I.P. 주입하여 마우스를 충분히 마취시킨 뒤 retro-orbital vein을 통해 lectin-649 200 uL를 I.V. 주입하고, 10분 후 생쥐를 다시 마취하여 뇌를 적출하였다. 기 적출된 생쥐 뇌에서 CD31, PDGFR β 염색을 통해 혈관구조변화 및 혈관주위세포의 coverage를 평가하였다.
- [218] Td-Tomato발현이 높은 종양형성 부위를 중심으로 PECAM signal을 관찰한 결과, human IgG과 DC101 대비 4E2 처리군에서 암혈관의 지름이 넓어지고, 구부러지고, 혈관 가지가 많이 감소되는 암혈관의 외형적 특징이 감소된 형태가 관찰되었다(도 11A). 또한 PDGFR β signal을 관찰을 통해 항 Tie2 항체처리군에서 PECAM staining된 부위를 혈관부착세포 마커인 PDGFR β protein이 대부분 부착을 잘 이루는 것으로 관찰되었다. 이를 통해, 항 Tie2 항체는 혈관내피세포의 비정상적 증식을 억제하고 혈관내피세포에 대한 혈관주변세포의 부착을 증가시켜 암혈관의 외형을 정상화시키는 기능을 가지는 것으로 보여진다(도 11B).
- [219]
- [220] 실시예 16. 항 Tie2 항체의 항종양 효능 평가
- [221] 항 Tie2 항체의 항종양 효과 및 암혈관 정상화에 의한 종양 내 면역세포 이동증가를 확인하기 위하여, 마우스 유래 대장암세포주인 CT26 이식 BALB/c 마우스에서 항 마우스 PD-1 항체와 병용 투여 및 단독투여 시험을 수행하였다. CT26 대장암세포주를 이식한 마우스의 종양크기를 장축, 단축 및 두께를 버니어캘리퍼스를 이용하여 측정하였고, 동시에 체중을 측정하였다. 이렇게 측정된 종양의 크기를 (장축 $\times$ 단축 $\times$ 두께)/2로 계산 하여 평균 27.5 mm³ 정도로 종양 마우스 군분리를 하였다. 이후 항 Tie2 항체 (30 mg/kg), 항 마우스 PD-1 (10 mg/kg)의 약물을 각각 주 1회와 주 2회 단독 투여 및 병용투여를 하였다. 약물투여 이후 10일째 모든 개체들에 대해서 CO₂ gas를 이용하여 치사 시킨 후 개복하여 장기의 이상유무를 육안으로 확인하고 종양을 적출하였다. 적출한 종양은 chemical balance에 무게를 측정하고 사진 촬영 후 종양은 유세포

분석법으로 종양 내 면역세포인 CD4⁺ T cell, CD8⁺ T cell, MDSC를 측정하였으며, 포르말린에 고정시킨 종양은 면역조직염색법을 이용하여 CD8⁺ T cell과 MDSC를 염색하였다.

- [222] 그 결과, 항 Tie2 항체(10 mg/kg) 단독 처리군에서 약 40% 종양 억제효과를 나타내었고, 항 마우스 PD-1 항체(10 mg/kg) 투여군 대비 유의적인 감소효과를 보였다(도 12A-12B). 특히, 항 Tie2 항체와 항 마우스 PD-1 항체를 병용투여 시 약 64% 종양억제 효과를 나타내었다(도 12A-12B). 이를 바탕으로 종양 내 이동된 면역세포를 유세포 분석법과 면역조직염색법으로 측정결과, 항 Tie2 항체 투여군에서 세포독성 세포로 알려진 CD8⁺T cell 분포가 음성대조군 대비 약 3배가량 증가한 것으로 관찰되었고, 항 마우스 PD-1 항체와 병용투여에서도 동등한 이동량을 나타내었다(도 12C-12D). 따라서, 항 Tie2 항체는 암혈관 정상화 기능을 통해 종양 내로 면역세포 이동을 증가시켜 항종양 효과를 나타내는 것으로 사료된다.
- [223]
- [224] 실시예 17. 항 Tie2 항체의 저산소증 개선 평가
- [225] 항 Tie2 항체의 암혈관 정상화에 의한 항종양 효능 및 종양 내 저산소증 개선을 확인하기 위하여, 마우스 유래 대장암 세포주인 CT26이식 BALB/c 마우스에서 약물투여를 수행하였다. CT26 대장암 세포주를 이식한 마우스의 종양크기를 장축, 단축 및 두께를 버니어캘리퍼스를 이용하여 측정하였고, 동시에 체중을 측정하였다. 이렇게 측정된 종양의 크기를 (장축×단축×두께)/2로 계산 하여 평균 24.6 mm³ 정도로 종양 마우스 군분리를 하였다. 이후 항 Tie2 항체(10 mg/kg)와 대조약물인 항 VEGFR 항체인 DC101(20 mg/kg)을 각각 주 1회와 주 2회 단독 투여를 하였다. 약물투여 이후 10일째 군당 2마리씩 pimonidazole을 IV투여하고 90분 뒤 모든 개체를 CO₂ gas를 이용하여 치사시킨 후 회복하여 장기의 이상유무를 육안으로 확인하고 종양을 적출하였다. 적출한 종양은 chemical balance에 무게를 측정하고 사진 촬영 후 종양은 유세포 분석법으로 종양 내 면역세포인 림프구(CD45⁺CD3⁺ T cells)를 측정하였으며, pimonidazole 투여된 종양은 4% PFA에 고정시킨 후 면역조직염색법을 통해 hypoxyprobe 염색을 진행하였다.
- [226] 항 Tie2 항체투여군과 대조약물인 DC101간의 종양 억제효과는 약 30%로 유사한 효능을 나타내었고(도 13A, P<0.01, P<0.001), 항 Tie2 항체군에서 종양 내 면역세포인 림프구가 대조군 대비 약 2배 증가하였다(도 13B, P<0.01). 대조약물인 항 VEGFR2 항체는 음성대조군과 유사한 수준으로 종양 내 면역세포 이동은 측정되지 않았다. 또한, hypoxyprobe stain 시험법을 이용하여 저산소증 개선 평가를 수행한 결과, 항 Tie2 항체 투여군에서 형광염색 발색이 음성 대조군 대비 약 4배 가량 감소되었고(도 13C, P<0.01), 대조약물인 항 VEGFR 항체와도 약 2.5배가량 감소된 결과를 나타냈다(도 13C, P<0.01). 따라서, 항 Tie2 항체는 암혈관 정상화시키는 기능을 통해 종양 내 면역세포 이동을 증가

시키고 저산소증을 개선시키는 보여진다.

[227]

산업상 이용가능성

[228] 본 발명에 따른 항-TIE2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TIE2에 목적하는 결합력을 나타내며, 목적하는 암/종양 또는 혈관안정화제 및 신생혈관형성과 관련된 질병의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명을 통해 기존의 TIE2를 표적하는 치료제와 다른 표적 포인트를 가진 치료제를 개발함으로써 종양 및 신생혈관형성관련 질병을 치료하는데 있어서 기존 치료제와의 병용 치료 및 단독 치료법을 제공할 수 있다.

[229]

[230] 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.

[231]

서열목록 Free Text

[232] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1, 7, 13, 19, 25 및 31으로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR1, 서열번호 2, 8, 14, 20, 26 및 32로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR2, 및 서열번호 3, 9, 15, 21, 27 및 33로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호 4, 10, 16, 22, 28 및 34으로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR1, 서열번호 5, 11, 17, 23, 29 및 35로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 6, 12, 18, 24, 30 및 36로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, TIE2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [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 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 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 서열번호 38, 42, 46, 50, 54 및 58로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 서열번호 40, 44, 48, 52, 56 및 60으로 구성된 군에서

- 선택되는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 중쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 37, 41, 45, 49, 53 및 57로 구성된 군에서 선택되는 핵산.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 경쇄 가변영역을 코딩하는 서열번호 39, 43, 47, 51, 55 및 59로 구성된 군에서 선택되는 핵산.
- [청구항 8] 제5항의 핵산을 포함하는 발현벡터.
- [청구항 9] 제8항의 발현벡터로 형질전환된 세포.
- [청구항 10] 다음 단계를 포함하는 TIE2에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법:
 (a) 제9항의 세포를 배양하는 단계; 및
 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 회수하는 단계.
- [청구항 11] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 질환의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 혈관신생 질환은 종양, 암, 전이(metastasis), 당뇨병망막병증(diabetic retinopathy), 미숙아 망막병증(retinopathy of prematurity), 각막 이식 거부(corneal graft rejection), 황반변성(macular degeneration), 혈관신생성녹내장(neovascular glaucoma), 전신홍색증(erythrosis), 증식성망막증(proliferative retinopathy), 건선(psoriasis), 혈우병성 고관절염(hemophilic arthritis), 동맥경화성 플라크(atherosclerotic plaques)의 모세혈관 형성, 켈로이드(keloid), 상처 과립화(wound granulation), 혈관 유착(vascular adhesion), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 퇴행성 관절염(osteoarthritis), 자기면역질환(autoimmune diseases), 크론병(Crohn's disease), 레스테노시스(restenosis), 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 장협착(intestinal adhesions), 고양이 찰과상 감염증(cat scratch disease), 궤양(ulcer), 당뇨병성 족부궤양(diabetic Foot Ulcers), 간경변증(liver cirrhosis), 신장염(nephritis), 당뇨병성 신장질환(diabetic nephropathy), 만성 신부전(chronic renal failure), 진성 당뇨병(diabetes mellitus), 염증 질환(inflammatory diseases), 특발성 폐섬유증(Idiopathic Pulmonary Fibrosis), 패혈증(sepsis), 급성 호흡곤란 증후군(Acute respiratory distress syndrome) 및 신경변성 질환(neurodegenerative diseases)으로 구성된 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 13] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 혈관안정화용 조성물.
- [청구항 14] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을

- 유효성분으로 포함하는 혈관신생 질환의 진단용 조성물.
- [청구항 15] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 종양 또는 암의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 16] 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 다른 치료제와의 병용 투여용 조성물.