(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0014062
(43) 공개일자 2014년02월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7007045
(22) 출원일자(국제) 2011년09월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년03월20일
(86) 국제출원번호 PCT/ES2011/070655
(87) 국제공개번호 WO 2012/038573
국제공개일자 2012년03월29일
(30) 우선권주장
P201031402 2010년09월21일 스페인(ES)

(71) 출원인
푼다시온 센트로 나시오날 드 인베스티가시오네스 온콜로기카스 (씨엔아이오)
스페인 이-28029 마드리드 3 씨/멜초르 페르난데즈 알마그로
(72) 발명자
마르티네즈 토레쿠아드라다 조르지 루이스
스페인 이-28029 마드리드 3 씨/멜초르 페르난데즈 알마그로 푼다시온 센트로 나시오날 드 인베스티가시오네스 온콜로기카스 (씨엔아이오)
아벤고자르 인판테스 마리아 안젤레스
스페인 이-28029 마드리드 3 씨/멜초르 페르난데즈 알마그로 푼다시온 센트로 나시오날 드 인베스티가시오네스 온콜로기카스 (씨엔아이오)
(74) 대리인
김진회, 김성기

전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 **항-에프린 B2 항체 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 에프린 B2에 대한 신규의 항체 및 상기 단백질을 검출하기 위한 이의 용도 및 혈관신생 및 림프관신생에 연루된 질환, 예를 들면 암의 치료에서 혈관신생 및 림프관신생을 억제하기 위한 약제로서의 이의 용도에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 서열 번호: 1과 76% 이상 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하고

(b) 에프린(ephrin) B2를 특이적으로 인지하고 이에 결합하는 것을 특징으로 하는 단리된 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 아미노산 서열이 서열 번호: 1인 폴리펩티드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 항체인 폴리펩티드.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항체는 인간 항체인 폴리펩티드.

청구항 5

제4항에 있어서, 인간 항체 아이소타입이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 IgA인 폴리펩티드.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 신호 펩티드를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 7

제6항에 있어서, 신호 펩티드는 서열 번호: 6인 폴리펩티드.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 마커를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 9

제8항에 있어서, 마커는 c-myc, FLAG, HA, 히스티딘 사슬, GST, 바이오틴, VSV-G, HSVtk, V5, 바이오틴, 아비딘, 스트렙타비딘, 말토스 결합 단백질 및 형광 단백질을 포함하는 목록으로부터 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 10

제9항에 있어서, 마커는 히스티딘 사슬, c-myc 또는 둘 모두인 폴리펩티드.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열이 서열 번호: 7인 폴리펩티드.

청구항 12

아미노산 서열이 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 포함하는, 에프린 B2에 대한 항체.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 또는 제12항에 따른 항체를 코딩하는 핵산.

청구항 14

제13항에 따른 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 15

제14항에 있어서, 발현 벡터인 벡터.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 따른 벡터를 포함하는 세포.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 세포가 원핵세포인 세포.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 세포가 진핵세포인 세포.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 세포가 포유동물 세포인 세포.

청구항 20

(a) 세포에서 제15항에 따라 기재된 벡터를 발현시키는 단계 및 (b) 단계 (a)에서 발현된 폴리펩티드를 정제하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 또는 제12항에 따른 항체를 수득하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 세포는 원핵세포인 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 세포는 진핵세포인 방법.

청구항 23

(a) 단리된 생물학적 시료를 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 또는 제12항에 따른 항체와 접촉시키는 단계 및 (b) 단계 (a)에서 사용된 시료에서 에프린 B2와 상기 폴리펩티드 또는 상기 항체에 의해 형성된 복합체를 검출하고/하거나 정량하는 단계를 포함하는, 에프린 B2의 검출 및/또는 정량 방법.

청구항 24

에프린 B2의 발현과 연관된 질환의 진단 방법으로서, (a) 단리된 생물학적 시료를 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 또는 제12항에 따른 항체와 접촉시키는 단계, (b) 단계 (a)에서 사용된 시료에서 에프린 B2와 상기 폴리펩티드 또는 상기 항체에 의해 형성된 복합체를 검출하고/하거나 정량하는 단계, (c) 검출된 에프린 B2 수준을 대조군 수준과 비교하는 단계 및 (d) 이러한 비교 결과를 질환의 존재 또는 부재와 결부시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 25

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 또는 제12항에 따른 항체의 약제의 제조를 위한 용도.

청구항 26

제25항에 있어서, 혈관신생을 억제하기 위한 용도.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 혈관신생과 연관된 병태의 예방적 또는 치료적 처치를 위한 용도.

청구항 28

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 또는 암의 예방적 또는 치료적 처치를 위한 용도.

청구항 29

제28항에 있어서, 종양 또는 암이 고형 종양 또는 암인 용도.

청구항 30

제29항에 있어서, 암이 췌장암, 대장암 또는 폐암인 용도.

청구항 31

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드, 제12항에 따른 항체, 제13항에 따른 핵산, 제14항 또는 제15항에 따른 벡터 또는 제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 세포를 포함하는 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 조성물이 약학 조성물인 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 부형제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 34

제31항 또는 제32항에 있어서, 항혈관형성제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 35

제31항 또는 제32항에 있어서, 화학요법제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 36

제31항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 약제의 제조를 위한 용도.

청구항 37

제36항에 있어서, 혈관신생을 억제하기 위한 용도.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 혈관신생과 연관된 병태의 예방적 또는 치료적 처치를 위한 용도.

청구항 39

제38항에 있어서, 종양 또는 암의 예방적 또는 치료적 처치를 위한 용도.

청구항 40

제39항에 있어서, 종양 또는 암이 고형 종양 또는 암인 용도.

청구항 41

제40항에 있어서, 암이 췌장암, 대장암 또는 폐암인 용도.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생체의학 및 생명공학 분야에 속하며 혈관 형성(혈관신생) 및 림프관 형성(림프관신생)을 차단할 수 있는 신규의 에프린 B2 특이적 항체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 앞서 언급된 항체의, 예를 들어 약제의 제조를 위한 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 혈관신생(Angiogenesis) 또는 기존 혈관으로부터 신혈관 형성은 배발생 및 출생 후 삶 동안 무수한 생리학적 프로세스: 재생, 흉터형성 및 염증에 중요한 역할을 담당한다. 비록 내피 세포의 혈관형성 표현형으로의 전이를

담당하는 분자 메카니즘이 완벽하게 알려져 있지는 않지만, 이는 내피 세포의 증식, 이동 및 조립(assembly)에 이어 혈관주위세포 또는 근육 세포와 같은 다른 혈관주위 세포의 동원(recruitment) 및 세포외 매트릭스의 리모델링을 수반하는 복잡한 프로세스이다(Risau, W. Nature 1997, 386:671-674). 혈관의 제어되지못한 성장은 다수의 병리, 예컨대 류머티스 관절염 또는 당뇨성 망막병증, 및 특히 신생물성(neoplastic) 프로세스에서 기저(underlying) 장애에 해당된다. 종양 성장은 새로운 혈관의 네트웍의 형성을 통해 산소와 영양분의 일정한 공급에 의존할 것이며, 이에 따라 적절한 혈관형성과정이 없으면 세포는 종양 부피의 증가를 억제하거나 감소시키는 괴사 및/또는 사멸 과정을 겪게 된다.

[0003] 혈관 이외에, 척추동물의 순환계는 유기체 발생 및 병리학적 과정 동안 중요한 역할을 담당하는 림프관으로 또한 구성된다. 림프계는 조직의 간질액을 배수시켜 이를 혈관계로 보내고, 또한 소화 계통으로부터 지질을 흡수하며, 면역계의 개개 면역 방어 수송 세포의 일부분이고, 예를 들어 염증에서 그리고 다양한 병태에서 염증 질환의 유형인 임파종대를 유도하고 암종의 침윤 및 전이에 수반된다(Tammela, T. and Alitalo, K. Cell 2010, 140:460-76). 림프관신생 또는 기존 림프관으로부터 림프관의 형성에 관한 연구는 수 십년간 지체된 상태이며 최근에 와서야 생물학적 메카니즘 및 특이적 마커가 설명되고 있으며, 이들은 현재 종양의 파종(dissemination) 및 전이 과정을 연구하는데 사용된다.

[0004] 배 발생 동안, 혈관은 혈관형성과정으로 불리는 프로세스에서 중배엽으로부터 유래한 내피 전구체에서 발원되지만, 림프관 형성은 경정맥 영역과 중심관 주변부에서 유래한 한 세트의 정맥 내피 세포로부터 개시되는 것으로 여겨진다. 공통된 배(embryonic) 기원으로 인해, 두 혈관 계통은 자신들의 발생 및 성숙을 조절하는 유사한 분자 메카니즘을 공유한다. 티로신 키나제 수용체가 심혈관계의 형성 메카니즘에 있어 매우 중요한 역할을 담당하는 몇몇 신호전달 경로가 확인되어졌으며, 특히 안지오포이에틴에 의해 조절되는 Tie-1 및 Tie-2 수용체의 활성과 협력하여 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR)를 통한 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 신호전달 경로가 확인되고 있다(Thurston, G., Cell Tissue Res 2003; 314:61-68). 또한, 또 다른 그룹의 분자, 에프린("에리트로포이에틴 생성 간종양 수용체 상호작용자"에 대한 두문자어)이 이들의 상응하는 수용체(Eph)와 함께 혈관계(Adams, RH and Klein, R. Trends Cardiovasc Med 2000, 10: 183-188) 및 림프계(Maekinen, T et al. Genes Dev 2005, 19:397-410)의 리모델링에 수반되는 것으로 보고되고 있다. 이러한 집단은 14개의 수용체와 8개의 리간드를 갖는 공지된 가장 큰 그룹의 티로신 키나제를 포함하며, 서열 상동성 및 상응하는 리간드의 결합 성질에 기초하여 2개의 수용체 카테고리, Eph A 및 Eph B로 하부 분류된다. EphA 수용체는 서브그룹 에프린 A의 리간드에 결합하고, 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI) 분자에 의해 막에 고정되는 것을 특징으로 하지만, Eph B 수용체는 막관통 영역에 이어 세포질 도메인을 통해 막에 고정되는 서브그룹 에프린 B의 리간드에 결합한다. 동맥은 막관통 리간드 에프린 B2를 발현시키고 정맥은 Eph B4 수용체를 발현시키는 것으로 보고되고 있다(Adams, RH and Alitalo K. Nat Rev Mol. Cell Biol 2007, 8: 464-478).

[0005] 이러한 그룹의 분자는 세포 골격의 체계를 변형시키고 인테그린 및 다른 세포내 부착 분자의 활성에 영향을 미침으로써 다양한 세포 작용, 예컨대 형태, 이동, 반발, 세포 부착 및 침윤의 조절을 담당한다(Pasquale, EB. Cell 2008, 133:38-52). 이들 활성은 하나의 세포에서 발현되는 Eph 수용체와 또 다른 세포에서 발현되는 상응하는 에프린의 상호작용에 의존하며, 이에 따라 동반된 세포 각각에 영향을 주는 양방향 신호를 생성한다. Eph 수용체에서 발생한 신호의 전달은 "순방향(forward)"으로 불리며, 세포질 영역에 위치하면서 자신을 인산화시키고 다른 단백질을 인산화시키는 능력을 가진 티로신 키나제 도메인에 의존하고 그리고 수용체와 다른 효과기 분자의 연합에 의존한다. 리간드 에프린 B는 "역방향(reverse)"으로 불리는 또 다른 신호를 발생시키며 이는 한편으로는 세포질 영역에서 Src 패밀리 키나제와 다른 티로신 키나제 수용체에 의해 수행되는 몇몇 티로신의 인산화에 의존하고, 다른 한편으로는 연관된 다른 단백질에 의존한다. 또한, Eph 수용체와 에프린 B의 대부분은 세포질 영역에서 PDZ 도메인에 대한 결합 부위를 가지는데, 이는 특히 에프린 B의 생리학적 기능을 수행하는데 중요하다(Maekinen, T et al. Genes Dev 2005; 19:397-410).

[0006] 트랜스게닉 마우스에서 Eph B4 및 에프린 B2를 코딩하는 유전자의 불활성화에 대한 연구가 혈관계통의 발생에서 두 단백질의 중대한 역할을 시사한다. 이들 유전자가 결여된 마우스는 배아기에 치명적인 바뀐 혈관신생을 나타내지만(Wang, HU et al. Cell 1998, 93:741-753; Adams, RH et al. Genes Dev 1999, 13:295-306), 신호전달 활성 부위에서 돌연변이를 갖는 에프린 B2 발현 마우스에 대한 연구는 이러한 단백질이 VEGF 신호전달 경로의 조절을 통해 림프관신생 및 혈관신생 성장을 제어함을 보여주었다(Wang, Y et al. Nature 2010, 465: 483-6; Sawamiphak S et al. Nature 2010, 465:487-91).

[0007] WO2007/127506 및 WO2010/019565에서는 에프린 B2 항체를 기재하고 있다. WO2007/127506에서는 기재된 항체가 에프린 B2와 Eph B4 간의 신호전달을 차단하고 혈관신생에 대한 억제 효과를 나타내며 이에 동물 모델에서 종양

부피를 감소시킬 수 있는 것으로 나타나 있다.

[0008] 그러나, 혈관신생을 제어할 수 있는 새로운 치료제에 대한 필요성은 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은 혈관신생을 제어할 수 있는 새로운 치료제를 제공하며, 지금까지 언급된 항체와 구별되는 서열을 가지고 높은 특이성을 가지며, 새로운 혈관 및 림프관의 형성을 억제할 수 있고 종양의 성장을 유의하게 방지하는, 에프린 B2에 대한 신규한 항체에 관한 것이다. WO2007/127506에 기재된 에프린 B2 항체는 혈관신생을 억제할 수 있지만 림프구신생의 억제 효과에 대해서는 기재되어 있지 않다.

[0010] 본 발명은 에프린 B2를 인지하고 이에 특이적으로 결합하는 항체에 기초하며 언급된 항체 및 이에 기초한 방법 및 조성물을 제공하며, 이들은 에프린 B2와 연관된 병리에 대해 중요한 진단 및 치료 툴을 구성한다.

[0011] 제1 측면에서, 본 발명은 항혈관신생 및 항림프구신생 활성을 나타내고 고형 종양의 성장을 억제할 수 있는, 에프린 B2에 대한 신규의 항체에 관한 것이다.

[0012] 본 발명은 혈관신생 장애를 수반하는 질환, 예를 들면 암을 제어하는 문제에 대해 새로운 해결책을 제공한다.

[0013] 본 발명자들에 의해 입증된 바에 따르면, 본원에 기재된 B11 항체는 에프린 B2를 특이적으로 인지하여 Eph B4 수용체에 대한 에프린 B2의 결합을 억제하며, 시험관내 분석에서, 관(튜브)(tubule) 형성 및 내피 세포(HUVEC)의 이동 능력을 억제하고, 생체내 분석에서, 췌장암, 폐암 및 대장(colon)암 세포의 경우, 종양에서 혈관 및 림프관의 수에 있어 상당한 감소를 유도한다. 또한, 본 발명자들은 본 발명의 항체가 종양 성장을 유의하게 지연시키고 이의 크기 감소를 유도할 수 있음을 밝혀내었다. 본 발명자들은 B11 항체가 시험관내에서 그리고 배양된 세포에서 Eph B4와 에프린 B2의 상호작용을 차단했음을 보여주었고, 또한 상기 항체가 수용체를 통한 에프린 신호전달을 억제할 수 있음을 보여준다(본원에서 도 5 참조).

[0014] 2B1 항체가 또한 관 형성 및 내피 세포(HUVEC)의 이동 능력을 억제할 수 있고 생체내 분석시 종양에서 혈관 및 림프관의 수를 감소시킨다. 2B1 항체는, 본원의 도 5에 도시된 바와 같이, 비아코어(Biacore)™ 분석에서 그리고 Eph B4 차단의 세포 분석에서 Eph B4 수용체와 경쟁하지 않는다.

[0015] 따라서, 본 발명의 제1 측면은

[0016] a. 서열 번호: 1과 76% 이상 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하고

[0017] b. 에프린 B2를 특이적으로 인지하고 이에 결합하는

[0018] 단리된 폴리펩티드에 관한 것이다.

[0019] 바람직하게는, 폴리펩티드는 서열 번호: 1과 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다.

[0020] 폴리펩티드를 언급하면서 본 기재(description)에서 사용된 용어 "단리된"은 폴리펩티드를 자연 환경으로부터 동정하고 분리하고/하거나 추출하였음을 의미한다.

[0021] 폴리펩티드에 대해 용어 "% 서열 동일성"은 보존적 치환을 고려함이 없이, 서열 동일성의 최대 백분율을 달성하기 위해 필요하다면 서열들을 정렬하고 스페이스를 도입한 후, 비교되는 서열의 아미노산과 일치하는 해당 서열의 아미노산의 백분율을 지칭한다. 정렬(alignment)은 당업자에게 공지된 다양한 방식에 의해, 예를 들면 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR)과 같은 공지의 툴을 사용하여 실시될 수 있다. 당업자는 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터(비교되는 서열들의 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘 포함)를 결정할 수 있다.

[0022] 달리 구체적으로 또는 상황적으로 언급하지 않는 한 본 기재에서 사용된 용어 "에프린 B2"는 에프린 B2 단백질의 임의의 천연 폴리펩티드 또는 임의의 변이체를 지칭한다. 이러한 단백질의 명칭은 "*에리트로포이에틴 생성 간종양 수용체 상호작용자*"에 대한 두문자어이지만, 또한 에프린으로도 불릴 수 있다. 천연 폴리펩티드는 세포외 도메인과 같이 천연의 끝잘린 또는 분비된 형태이거나 또는 다양한 선택적 "스플라이싱" 형태 또는 임의의 대립유전자(allelic) 변이체와 같은 임의의 천연 변이체일 수 있다.

[0023] 바람직하게는, 폴리펩티드는 항체이다. 더욱 바람직하게는, 항체는 인간 항체이다. 바람직하게는, 인간 항체 아이소타입(isotype)이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 IgA 이다.

[0024] 용어 "항체" 또는 "면역글로불린"은 가장 광의의 의미로 사용되고 (원하는 생물학적 활성을 나타낸다면) 단일클론 항체, 다클론 항체, 다특이적 항체를 포함하며 항체 단편을 포함할 수 있다. 항체는 인간 항체, 인간화 항체 및/또는 친화 성숙된 항체일 수 있다. "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 가진 항체이다.

[0025] 본 발명의 항체는 단일쇄 가변 영역(scFv: single chain variable Fragment)일 수 있다. 용어 "가변"은, 항체의 가변 도메인의 특정 부분이 자신의 서열 중에서 매우 상이하고 항원에 대한 각각의 항체의 특이적 결합을 담당하는 서열임을 의미한다. 그러나, 가변성(variability)은 항체의 전체 가변 도메인을 따라 고르게 분포하지 않는다. 이러한 가변성은 경쇄와 중쇄 모두의 가변 도메인에서 발견되는 CDR("상보성 결정 영역(complementarity-determining region)") 또는 과가변(hypervariable) 영역으로 불리는 3개의 세그먼트에 집중된다. 가변 도메인의 가장 보존된 부분은 프레임워크로 불린다. 두 사슬(경쇄 및 중쇄)에서 유래한 CDR은 항원 결합 부위의 형성에 기여한다. 가변 단편 또는 "Fv"는 완전한 항원 인지 및 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 단일쇄 가변 영역은 중쇄와 경쇄가 연합하여 항원 결합 부위의 구조체를 형성하도록 하는 펩티드에 의해 공유적으로 연결된 중쇄 가변 도메인과 경쇄 가변 도메인을 가질 수 있다. Fv는 또한 2개 사슬에 의해 형성될 수 있다. 어떠한 경우든, 단지 3개의 CDR을 가진 단일 가변 도메인 조차, 비록 보다 낮은 친화성을 가지더라도, 항원을 인지하고 특이적으로 결합하는데 충분하다.

[0026] 항체 또는 포유동물의 면역글로불린의 경쇄는 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 2 종류, 소위 카파 및 람다일 수 있다. 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 상이한 부류 또는 종류로 그룹핑된다. 5개의 주된 종류 또는 부류가 존재한다: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM. 또한, 이들 중 일부는 서브부류 또는 아이소타입, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgGA2로 나눠진다. 나아가, 상이한 부류 및 면역글로불린의 중쇄의 불변 도메인은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤(mu)로 불린다.

[0027] 항체 단편은 전체 항체의 기능을 유지하는 항체의 임의의 부분일 수 있다. 항체 단편의 예로는 Fv, Fab(항원 결합 단편), Fab2(2개의 항원 결합 부위를 갖는 단편)가 있으며, 이들 모두 당업자에게 익히 알려져 있다. 단일쇄 가변 영역(scFv)은 항체의 V_H 도메인(중쇄의 가변 도메인) 및 V_L (경쇄의 가변 도메인)을 포함하고 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬 내에 존재한다. 본 발명의 항체의 다른 포맷은 scFv 및 CH3 타입의 불변 영역을 포함하는 미니항체 또는 "미니바디", 또는 scFv 및 CH2 및 CH3 불변 영역을 포함하는 소위 scFv-Fc로 알려진 것들일 수 있다. 이들 포맷은 scFv 분자량을 증가시키고, 신장에 의한 빠른 제거를 피하며 조영 기법에서 scFv의 사용을 위해 매우 유용할 수 있다.

[0028] 용어 "항원"은 항체가 선택적으로 결합할 수 있는 소정의 항원을 의미한다. 항원은 폴리펩티드, 탄수화물, 핵산, 지질, 합텐 또는 또다른 천연 또는 합성 분자일 수 있다. 바람직하게는, 항원은 폴리펩티드이다.

[0029] 본 발명자들은 에프린 B2에 대한 항체 2B1 및 B11의 친화성을 연구하였으며, 그 결과 B11이 상기 항원에 대해 높은 친화성을 가지는 것을 밝혀내었는데, B11의 친화상수(K_D)가 110 nM인 반면, 2B1은 K_D가 630 nM로서 B11 보다 낮은 친화성을 나타낸다. 항체의 인지 부위 및 결합 부위와 이의 항원 간의 결합 친화성은 둘 간의 비공유적 상호작용의 전체 총 강도(세기)와 관련된다. 일 분자의 또 다른 분자에 대한 친화성은 소위 해리 상수(K_D)로 불리는 친화 상수에 의해 일반적으로 표시될 수 있다. 친화성은 본원에 기재된 방법과 같은 일반적으로 공지된 방법에 의해 측정될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0030] 항체가 항원에 대해 낮은 친화성을 가지는 경우, 항체는 종종 항원에 느리게 결합되고 쉽게 해리된다. 항체의 항원에 대한 친화성을 개선시키기 위해서는, "친화성을 성숙"시키기 위해 문헌[Marks *et al.* BioTechnology 1992. 10:779:783; Barbas, CF *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1994 26; 91:3809-13]에 충분히 개시된 기법들이 사용될 수 있다. 이러한 기법들은 V_H 및 V_L 도메인의 "셔플링(shuffling)" 또는 임의(random) 돌연변이일 수 있다.

[0031] 본 발명의 바람직한 일 실시양태에서, 폴리펩티드는 신호 펩티드를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 신호 펩티드는 pelB로 알려진 에르위니아 카로토보라(*Erwinia carotovora*)의 박테리아 펙테이트 리아제(pectate lyase)의 신호 펩티드인 서열 번호: 6이다. 이러한 신호 펩티드는 scFv가 산화 환경으로 인해 정확하게 폴딩되는 주변세포질에 위치하도록 한다.

[0032] 신호 펩티드는 특정 세포내(subcellular) 위치, 예컨대 소포체, 미토콘트리아 또는 핵으로 폴리펩티드 또는 단백질의 수송을 지시하는 3 내지 60개 아미노산의 짧은 서열이다. 신호 펩티드는 또한 세포 외부로 단백질의 수

송을 지시할 수 있으며, 이는 에쉐리치아 콜라이(*Escherichia coli*)와 같은 세포의 경우에 주변세포질 안으로 단백질의 분비 또는 세포 수송에 대응될 수 있다. 폴리펩티드의 분비를 지시하는 신호 펩티드의 몇몇 예로는 pelB, stli, 에코티나(ecotina), lamB, 헤르페스(herpes) GD, lpp, 알칼라인 포스파타제, 인버타제, 알파 인자 및 단백질 A의 선도 서열이 있다.

[0033] 본 발명의 바람직한 일 실시양태에서, 폴리펩티드는 하나 이상의 마커를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 마커는 c-myc, FLAG, HA, 히스티딘 사슬, GST, 바이오틴, VSV-G, HSVtk, V5, 바이오틴, 아비딘, 스트렙타비딘, 말토스 결합 단백질 및 형광 단백질을 포함한 목록으로부터 선택된다. 더욱 바람직하게는, 마커는 히스티딘 사슬, c-myc 또는 둘 모두이다. 바람직하게는, 히스티딘 사슬은 4 내지 12개의 히스티딘을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 히스티딘 사슬은 6개의 히스티딘을 포함한다. 본 발명의 바람직한 일 실시양태에서, 폴리펩티드는 마커인 c-myc 및 히스티딘 사슬을 포함한다. 본 발명의 바람직한 일 실시양태에서, 폴리펩티드 아미노산 서열은 서열 번호: 7이다.

[0034] 본 기재에서 사용된 용어 "마커(marker)"는 마커 펩티드 또는 마커 단백질을 지칭하며, 융합 단백질로서 이러한 단백질과 함께 목적 단백질이 생성될 때 목적 단백질의 동정을 가능하게 한다. 마커 펩티드 또는 마커 단백질은 목적 단백질의 동정 및/또는 위치정보(localization)를 위해 사용되는데, 그 이유는 이러한 마커들이 특정 분자 또는 원자에 대한 결합 부위에 상응하기 때문이거나(히스티딘 사슬, GST, 아비딘 또는 스트렙타비딘의 경우), 또는 이러한 마커들이 면역화학적 기법에 의해 쉽게 검출가능하기 때문이거나(헤마글루티닌, VSV-G, HSVtk, FLAG, V5 또는 myc의 경우), 또는 이러한 마커들이 쉽게 관측이 가능하기 때문(형광 단백질의 경우)이다.

[0035] 마커 펩티드 VSV-G는 수포성 구내염 바이러스 글리코프로테인에 속한다. HSVtk 마커 펩티드는 단순 포진 바이러스 1의 티미딘 키나제에 속한다. FLAG 펩티드는 재조합 단백질에 대한 마커로서 특이적으로 설계된 8개 아미노산 에피토프이다. V5는 파라믹소 원숭이 바이러스 5(SV5)의 P 및 V 단백질에 존재하는 작은 에피토프이다. myc 에피토프는 10개의 아미노산을 가지며 인간 전사 인자 c-myc의 서열의 일부분이다.

[0036] 본 발명의 또 다른 실시양태는 아미노산 서열이 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드를 포함하는 항체이다.

[0037] 본 발명의 제2 측면은 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산에 관한 것이다. 바람직하게는 핵산은 벡터이다. 더욱 바람직하게는, 벡터는 발현 벡터이다.

[0038] 핵산 또는 폴리뉴클레오티드는 DNA 및 RNA를 포함한, 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체이다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해 또는 합성 반응에 의해 중합체 안으로 도입될 수 있는 임의의 기질(substrate)일 수 있다.

[0039] 용어 "코딩하다"는 뉴클레오티드 서열이 폴리펩티드 또는 단백질로 번역되는 방법을 결정하는 유전 코드를 지칭한다. 하나의 서열에서 뉴클레오티드의 순서는 폴리펩티드 또는 단백질을 따라 아미노산의 순서를 결정한다.

[0040] 벡터는 세포에 유전 물질을 전달하기 위해 사용되는 핵산 분자이다. 언급된 유전 물질 이외에, 벡터는 또한 전사 제어 요소를 포함한 다양한 기능적 요소들, 예를 들면 프로모터 또는 작동자, 인핸서 또는 전사 인자 결합 영역, 및 해독의 개시 및 종결을 위한 제어 요소를 내포할 수 있다. 벡터는 플라스미드, 코스미드, 바이러스, 박테리오파지, 재조합 발현 카세트 및 트랜스포손을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 박테리아 복제 기원을 가진 박테리아 벡터 또는 에피솜 포유동물 벡터와 같은 특정 벡터는 일단 숙주 세포로 도입되면 독자적으로 복제 또는 분화할 수 있다. 다른 벡터는 숙주 세포 게놈에 통합되어 세포 게놈과 함께 복제될 수 있다. 발현 벡터는 자신이 작동적으로 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있는 벡터이다. 발현 벡터는 일반적으로 프로모터에 의해 제어되는 목적 유전자의 전사 및 번역을 위해 사용된다. 프로모터는 목적 유전자의 전사를 제어하는 뉴클레오티드 서열이다. 프로모터는 목적 유전자에 작동가능하게 연결된다. "작동가능하게 연결된"은 기능적인 관계 및 목적 유전자에 대한 프로모터 서열의 위치를 지칭하며, 예를 들어 프로모터 또는 인핸서는, 서열의 전사에 영향을 미친다면 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, 작동가능하게 연결된 프로모터는 목적 서열에 인접한다. 그러나, 인핸서는 목적 서열의 발현을 제어하기 위해 목적 서열에 인접할 필요는 없다.

[0041] 본 기재에 사용된 용어 "복제 기원"은 복제 분기점(replication fork)이 형성되고 DNA 복제가 개시되는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다.

[0042] 본 발명의 제3 측면은 본 발명의 제2 측면의 벡터를 포함하는 세포에 관한 것이다. 세포는 예를 들면 원핵세포일 수 있지만, 제한이 없으며, 세포는 본 발명의 항체를 생산하는데 사용되는 이. 콜라이와 같은 박테리아일 수 있다. 세포는 본 발명의 항체를 생산하는데 사용되는 효모 또는 곤충 세포와 같은 진핵세포일 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 진핵 세포는 세포 요법에 사용될 수 있거나 또는 유전자 요법에 의해 본 발명의 제2 측면의

벡터가 도입된 세포일 수 있다. 본 발명의 바람직한 일 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포이다. 포유동물 세포는 동물계(kingdom *Animalia*), 척삭동물문(phylum *Chordata*), 척추동물 아문(subphylum *Vertebrata*) 및 포유류강(class *Mammalia*)에 속하는 종의 임의의 세포이다.

[0043] 본 발명의 제4 측면은 (a) 본 발명의 제2 측면의 벡터를 세포에서 발현시키는 단계 및 (b) 단계 (a)에서 발현된 폴리펩티드를 정제하는 단계를 포함하는, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드를 수득하는 방법에 관한 것이다.

[0044] 본 발명의 제4 측면의 바람직한 일 실시양태에서, 세포는 원핵세포이다. 본 발명의 제4 측면의 또 다른 바람직한 실시양태에서, 세포는 진핵세포이다.

[0045] 본 발명의 제5 측면은 (a) 단리된 생물학적 시료를 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드와 접촉시키는 단계 및 (b) 단계 (a)에서 사용된 시료에서 에프린 B2와 언급된 폴리펩티드에 의해 형성된 복합체를 검출하고/하거나 정량하는 단계를 포함하는, 에프린 B2의 검출 및/또는 정량화 방법에 관한 것이다.

[0046] 본 발명의 제5 측면의 바람직한 일 실시양태는 에프린 B2의 발현과 연관된 질환을 진단하는 방법으로서, (a) 단리된 생물학적 시료를 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드와 접촉시키는 단계, (b) 단계 (a)에서 사용된 시료에서 에프린 B2와 언급된 폴리펩티드에 의해 형성된 복합체를 검출하고/하거나 정량하는 단계, (c) 검출된 에프린 B2 수준을 대조군 수준과 비교하는 단계 및 (d) 언급된 비교 결과를 질환의 존재 또는 부재와 결부시키는 단계를 포함하는 방법이다.

[0047] 에프린 B2의 발현과 연관된 질환은 혈관신생의 탈규제(deregulation)와 관련된 임의의 질병, 예컨대 신생물성 및 비신생물성 질환일 수 있다. 혈관신생의 조절장애가 있는 비신생물성 질환은 이상 비대, 관절염, 류머티스 관절염, 건선, 유육종증, 죽상경화증, 당뇨성 망막병증, 증식성 망막병증, 신생혈관 녹내장, 노인성 황반변성, 당뇨황반부종, 각막신생혈관, 수막종, 혈관종, 혈관섬유종, 갑상샘 증식, 만성 염증, 폐 염증, 패혈증, 뇌부종, 활막 염증, 골형성의 비대, 골관절염, 다낭성 난소 증후군, 자궁내막증, 크론병, 궤양성 대장염, 혈우병성 관절, 비대흉터, 경피증, 트라코마, 활액막염, 피부염, 자간 전증(WO2007/127506)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0048] 단리된 생물학적 시료는 인간 또는 동물 신체와 같은 신체로부터 단리된 시료이고 유기체의 생리학적 유체 및/또는 임의의 세포 또는 조직에서 유래할 수 있다. 생물학적 시료는 조직, 예를 들면 생검 또는 미세바늘흡인생검일 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 바람직한 일 실시양태에서, 단계 (a)에서 단리된 생물학적 시료는 생물학적 유체이다. 생물학적 유체는 신체로부터 방출되거나 분비된 유체뿐만 아니라 정상적으로 분비되지 않는 유체를 포함할 수 있다. 생물학적 유체는 태아 주변의 양수, 안방수(aqueous humor), 간질성 유체, 림프, 모유, 점액(콧물 및 가래 포함), 타액, 피지(스킨 오일), 유장(whey), 땀, 눈물, 소변, 심막액, 혈액 및 혈장을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 더욱 바람직한 일 실시양태에서, 생물학적 유체는 혈액, 혈장 또는 혈청이다. 본 발명의 방법의 단계 (a)에서 단리된 생물학적 시료는 예를 들면 생(fresh)시료이거나, 동결된 시료이거나, 파리핀에 고정되거나 묻힌 시료일 수 있다.

[0049] 본 발명의 기재에서 사용된, 단리된 생물학적 시료에서 에프린 B2와 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드에 의해 형성된 복합체를 "검출하고/하거나 정량하다"라는 용어는 바람직하게는 반정량적인 방식 또는 정량적인 방식으로 존재의 검출 및/또는 양 또는 농도의 측정을 의미한다. 측정은 직접적으로 또는 간접적으로 수행될 수 있다. 직접적인 측정은 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드와 에프린 B2에 의해 형성된 복합체로부터 직접적으로 얻어진 신호에 기초하여 언급된 복합체의 양 또는 농도를 측정하는 것을 의미하며 신호는 시료 중에 존재하는 복합체 분자의 수와 직접적으로 관련된다. 신호 강도로서도 지칭될 수 있는 이러한 신호는 예를 들면 복합체의 물리적 또는 화학적 성질의 세기 값을 측정함으로써 얻어질 수 있다. 간접적인 측정은 부차적인 성분(예를 들면, 복합체의 다른 성분) 또는 생물학적 측정 시스템(예를 들면, 세포 반응, 리간드, "태그" 또는 효소 반응 생성물의 측정 시스템)으로부터 얻어지는 측정을 포함한다.

[0050] 용어 "양(amount)"은 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드와 에프린 B2에 의해 형성된 복합체의 절대적인 또는 상대적인 양 및 복합체와 연관되거나 복합체로부터 유도될 수 있는 임의의 다른 값 또는 파라미터를 의미하지만 이에 한정되지 않는다. 이러한 값 또는 파라미터는 직접적인 측정에 의해 복합체의 물리적 또는 화학적 성질 중 임의의 성질로부터 얻어진 신호의 세기 값, 예를 들면 질량 분석법 또는 핵자기공명으로부터 얻어진 세기 값을 포함한다. 부가적으로, 이러한 값 또는 파라미터는 간접적인 측정에 의해 얻어진 것들을 포함한다.

[0051] 당업자에 의해 이해되는 검출은 분석된 시료의 100%가 정확한 것으로는 의도되지 않는다. 그러나, 분석된 시료의 통계적으로 유의한 수가 정확하게 분류될 것이 요구된다. 통계적으로 유의한 양은 다양한 통계적 툴, 예를

들어 신뢰구간 결정, p-값 결정, 스튜던트 t 테스트 또는 피셔 판별식을 사용하여 당업자에 의해 확립될 수 있다. 바람직하게는, 신뢰 구간은 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상이다. 바람직하게는 p 값은 0.1 미만, 0.05 미만, 0.01 미만, 0.005 미만 또는 0.0001 미만이다. 바람직하게는, 본 발명은 분석되는 주어진 그룹 또는 집단의 대상체의 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상에서 질환을 정확하게 검출할 수 있다.

[0052] 본 기재에 사용된 용어 "비교하는"은 분석될 생물학적 시료(생물학적 시료군으로도 불림)에 대해 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드와 에프린 B2에 의해 형성된 복합체의 양을 대조군으로 불리는 기준 시료의 복합체의 양과 비교하는 것을 의미하지만 이에 한정되지는 않는다. 기준 시료는 예를 들어 생물학적 시료군과 동시에 또는 순차적으로 분석될 수 있다. 비교는 수동으로 실시되거나 컴퓨터로 이루어질 수 있다.

[0053] 본 발명의 제6 측면은 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 약제 제조를 위한 용도에 관한 것이다. 본 발명의 바람직한 일 실시양태에서, 약제는 혈관신생을 억제하는데 사용되며, 바람직하게는, 혈관신생과 연관된 병태의 치료적 또는 예방적 처치를 위해 사용되며, 더욱 바람직하게는, 종양 또는 암의 예방적 또는 치료적 처치를 위해 사용된다.

[0054] 혈관신생과 연관된 병태는 임의의 종양 형성뿐만 아니라 다른 비신생물성 질환, 예를 들면 WO2007/127506에 기재된 바와 같은 질환일 수 있지만 이에 한정되지 않는다.

[0055] 본 발명의 제6 측면의 바람직한 일 실시양태에서, 종양 또는 암은 고형 종양 또는 암이며, 바람직하게는, 췌장암, 대장암 또는 폐암이다. 종양 또는 암은 강(cavity) 또는 액체를 함유하지 않은 조직 덩어리일 때 고형이라고 말해진다. 세포 유형에 따라 고형 종양은 육종, 암종 또는 림프종과 같은 다양한 명칭을 갖는다.

[0056] 본 발명의 제7 측면은 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드, 본 발명의 제2 측면의 핵산 또는 벡터, 또는 본 발명의 제3 측면의 세포를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 제7 측면의 바람직한 일 실시양태에서, 조성물은 약학 조성물이다. 바람직하게는, 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 것을 특징으로 한다. 또한, 부형제는 약리학적으로 허용가능한 것이어야 한다.

[0057] "부형제"는 활성 화합물은 아니지만 안전하고, 무독성이면서 악영향을 미치지 않는 경우에 "약학적으로 허용가능한"으로 간주되는 희석제, 담체 또는 충전제인 약학 조성물의 성분이다. 용어 "부형제"는 화합물의 흡수를 돕거나, 화합물을 안정화시키거나, 컨시스턴시(consistency)를 제공하거나 더욱 선호적인 향미를 제공하는 관점에서 약제의 제조에 도움을 주는 물질을 의미한다. 따라서, 부형제는 전분, 당 또는 셀룰로스와 같은 성분과 함께 유지하는 기능, 단맛을 내는 기능, 염색 기능, 공기 및/또는 수분으로부터 격리시키는 것과 같은 약물 보호 기능, 정제, 캡슐 또는 이염기 인산칼슘과 같은 다른 형태의 충전 기능, 장에서 성분들의 용해 및 흡수를 촉진하기 위한 붕해 기능을 가질 수 있으며, 본 단락에서 언급되지 않은 다른 유형의 담체를 배제하지 않는다.

[0058] 부형제와 관련하여 "약학적으로 허용가능한"이란 용어는 담체가 투여되는 유기체에 손상을 일으키지 않도록 허락되고 가치판단된 것을 의미한다. 또한, 담체는 약학적으로 적합해야 하고, 약학 조성물의 화합물들의 활성을 가능하게 해야하며, 즉, 성분들과 화합가능(compatible)해야 한다.

[0059] "비히클" 또는 담체는 바람직하게는 불활성 물질이다. 비히클 기능은 다른 화합물들의 도입을 촉진하거나, 보다 우수한 제형 및 투약을 가능하게 하거나 약학 조성물에 컨시스턴시 및 형태를 제공하는 것이다. 따라서, 담체는 본 발명의 약학 조성물의 임의 성분을 정해진 부피 또는 중량으로 희석시키기 위해 의약(medicine)에서 사용되거나 또는 심지어 희석되지 않은 성분들의 경우 보다 우수한 제형 및 투약을 가능하게 하거나 의약에 컨시스턴시 및 형상을 제공할 수 있는 물질이다. 제형이 액체인 경우, 약학적으로 허용가능한 담체는 희석제이다.

[0060] 또 다른 보다 더 바람직한 실시양태에서, 약학 조성물은 또 다른 활성 물질을 더 포함한다. 다른 치료제의 사용을 필요로 하는 것은 치료 효능의 요건 이외에도 본 발명의 화합물과 다른 치료제의 병용 사용을 강제하거나 크게 권장하는 부가적인 이론적 근거가 존재할 수 있다. 용어 "활성"은 인간, 동물, 식물, 화학적 또는 그밖의 기원에 상관없이 적절한 활성을 가진 임의의 물질, 예컨대 약물을 의미한다.

[0061] 본 발명의 제7 측면의 바람직한 실시양태에서, 약학 조성물은 항혈관형성제를 더 포함한다. 항혈관형성제는 혈관신생, 혈관형성과정, 또는 원치않은 혈관 투과성을 직접적으로 또는 간접적으로 억제할 수 있는 분자이다. 항혈관형성제의 예로는 혈관형성제를 차단할 수 있는 분자, 예컨대 VEGF에 대한 항체, VEGF 수용체 또는 VEGF 경로를 차단하는 소분자가 있으며, 이들 모두 익히 공지되어 있다.

[0062] 본 발명의 제7 측면의 바람직한 일 실시양태에서, 약학 조성물은 화학요법제를 더 포함한다. 화학요법제는 암

치료에 유용한 화합물이다. 화학요법제 약물의 예로는 세포독성 화합물, 예컨대 안트라시클린, 다우노루비신, 아드리아마이신, 도세탁셀의 유도체, 빈카 알칼로이드, 빈크리스틴, 카르무스틴, 시스플라틴, 플루오로우라실, 세포증식억제 화합물 예컨대 폴리아민 억제제, 타목시펜 또는 프로다손 산도스타틴, 또는 부티르산나트륨 또는 미토마이신 C와 같이 세포사멸을 유도하는 화합물, 항생제 예컨대 페니실린, 베타락타민, 세팔로스포린, 시클린, 아미노글리코시드, 매크로라이드, 또는 술폰아미드, 또는 항바이러스제 예컨대 AZT, 프로테아제 억제제 또는 아시클로비르, 레트로비르 또는 포스카르넷이 있다.

[0063] 본 발명의 제8 측면은 본 발명의 제7 측면의 조성물의 약제 제조를 위한 용도에 관한 것이다. 본 발명의 이러한 측면의 바람직한 일 실시양태에서, 약제는 혈관신생을 억제하는데 사용된다. 바람직하게는, 약제는 혈관신생과 연관된 병태의 치료적 또는 예방적 처치를 위해 사용된다. 더욱 바람직하게는, 약제는 종양 또는 암의 예방적 또는 치료적 처치를 위해 사용된다. 바람직한 일 실시양태에서, 종양 또는 암은 고형 종양 또는 암이다. 바람직하게는, 암은 췌장암, 대장암 또는 폐암이다.

[0064] 본 발명의 제8 측면의 바람직한 일 실시양태에서, 치료적 유효량이 투여된다. 용어 "치료적 유효량"은 요구 시간 동안 복용량으로 투여시 원하는 예방적 또는 치료적 결과를 달성하는데 효과적인 양을 의미한다. 본 발명의 폴리펩티드 또는 약학 조성물의 "치료적 유효량"은 개체의 질환 단계, 연령, 성별 및 체중에 따라 달라질 수 있고, 독성 또는 부작용을 나타내지 않으면서 원하는 예방적 또는 치료적 효과를 달성할 수 있는 양을 의미한다. "개체"는 척추동물이다. 바람직하게는, 척추동물은 포유동물이다. 더욱 바람직하게는, 포유동물은 인간이다. 포유동물에는 가축(예, 소), 스포츠에 관련된 동물, 애완동물(예를 들면 고양이, 개 및 말), 영장류, 마우스 및 래트가 포함되지만 이에 한정되지 않는다.

[0065] 각각의 경우에 약물의 포맷은 사용된 투여 형태에 적합하게 되며, 이에 따라 본 발명의 조성물은 임상적으로 허용가능한 투여 및 치료적 유효량의 용액 형태 또는 임의의 다른 형태로 존재할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 고체, 반고체, 액체 또는 기체의 형태, 예컨대 정제, 캡슐, 분말, 과립, 연고, 용액, 좌약, 주사액, 흡입제, 겔, 마이크로구 또는 에어로졸로 제제화될 수 있다. 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에 따르면, 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여에 적합한 형태이다.

[0066] 경구 투여에 적합한 형태는 경구 투여를 허락하는 물리적 상태를 의미한다. 경구 투여에 적합한 이러한 형태는 물약(drop), 시럽, 차, 엘릭시르, 현탁액, 처방전에 따라 조제된 현탁액, 음용 바이알, 정제, 캡슐, 과립, 카세(cachet), 알약, 정제, 로젠지, 트로치(troche) 또는 냉동건조물을 포함한 목록으로부터 선택되지만 이에 한정되지 않는다.

[0067] 비경구 투여에 적합한 형태는 주사 투여를 가능하게 하는 물리적 상태, 바람직하게는 액체 상태를 의미한다. 비경구 투여는 근육내, 동맥내, 정맥내, 피내, 피하 또는 뼈내를 통해 이루어질 수 있지만, 이들 종류의 비경구 투여 루트에만 한정되지 않는다.

[0068] 또다른 가능성은 약학 조성물이 설하 투여, 코 투여, 초내(intrathecal) 투여, 기관지 투여, 림프액 투여, 직장 투여, 경피 투여 또는 흡입 투여에 적합한 형태로 존재하는 것이다.

[0069] 상세한 설명 및 청구범위 전체를 통해 단어 "포함하다" 및 이의 변형어는 다른 기술적 특징, 첨가제, 성분 또는 단계를 배제하는 의도가 아니다. 당업자라면 본 발명의 다른 목적, 이점 및 특징을 부분적으로는 상세한 설명으로부터 그리고 부분적으로는 본 발명의 실시로부터 도출해 낼 수 있다. 하기 실시예는 설명을 위해 제공된 것이며 본 발명을 제한하고자 하는 의도는 아니다.

도면의 간단한 설명

[0070] **도 1: 이. 콜라이에서 선별된 클론의 발현.** 이. 콜라이에서 발현 선별된 에프린 B2에 대한 scFv(2B1, A1, B11 및 E4 클론)(전체 추출물의 경우) 및 온화한 삼투 쇼크에 의해 단리된 상응하는 주변세포질 분획(주변세포질의 경우)의 아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 및 쿠마시 블루 염색에 의한 분석. 분자량은 도면 좌측에 kDa로서 표시되어 있다.

도 2: 클론 2B1 및 B11이 보다 다량으로 정제됨. 아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 및 쿠마시 블루 염색에 의한 에프린 B2에 특이적인 scFv A1, B11, E4 및 2B1의 정제 분석. 각각의 주변세포질 추출물에 존재하는 scFv는 고정화된 Ni^{2+} 상에서의 친화성 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 도면은 각각의 scFv의 용출 크로마토그래피의 다양한 분획을 보여준다. 분자량은 kDa로 표시된다.

도 3: 클론 B11 및 2B1은 보다 특이적임. 면역블롯에 의해, 상이한 에프린 B에 대해 선별된 scFv 항-에프린 B2의 특이성의 결정. 마우스의 시판용 재조합 단백질 에프린 B1-Fc(EB1), 마우스의 에프린 B2-Fc(EB2) 및 인간 에프린 B3-Fc(EB3)을 전기영동에 의해 분리하고 니트로셀룰로스 막으로 이동시켰다. 이후, 대조군(C)으로서 시판용 항체 항-에프린 B2와 함께 B11 및 2B1 클론의 반응성을 분석하였다. 분자량은 도면의 좌측에 kDa로 표시된다.

도 4: 비아코어™에 의해 scFv 항-에프린 B2의 친화성 분석. 센서그램(sensorgram)은 4가지 상이한 농도(0.4, 0.2, 0.1, 0.05 μM)를 사용하여 고정화된 에프린 B2에 대한 클론 B11의 결합 곡선 **(A)** 및 농도 30, 20, 10 및 7.5 μM에서 클론 2B1의 결합 곡선 **(B)**에 상응하는 시간(들)에 따른 반응을 나타내며, 이로부터 각각의 친화 상수(K_D)를 계산했으며, 클론 B11의 경우 K_D는 110 nM이고 클론 2B1의 K_D는 630 nM이다.

도 5: Eph B4에 대한 에프린 B2의 결합을 차단하는 연구. A. Eph B4에 대한 에프린 B2의 결합%를 보여주는 그래프. 표면 플라즈몬 공명에 의한, scFv 항-에프린 B2의 존재하에서 Eph B4에 대한 에프린 B2의 결합 억제 시험. scFv B11(●) 또는 2B1(○)의 연속 희석물을 에프린 B2와 혼합하고 이를 칩상에 고정화된 Eph B4 위에 주입하였다. 각 시료의 주입 직후 Eph B4에 결합된 에프린 B2의 상대적인 양을 측정하고 scFv의 농도의 함수에 따라 작도하였다. 본 도면은 scFv의 각 농도의 평균 값을 보여주며 오차 막대는 표준 편차(n = 3)를 나타낸다. **B.** scFv B11은 세포 분석에서 에프린 B2와 Eph B4 수용체 간의 상호작용을 차단할 수 있다. HEK293 세포의 표면상에서 과발현된 에프린 B2를 이용한 자극에 반응하여 HUVEC 세포에서 Eph B4 수용체의 티로신 인산화에 대한 분석. 에프린 B2를 과발현하는 HUVEC 및 HEK293 세포를 항-에프린 B2 scFv의 존재 또는 부재하에 20분간 공동배양하였다. Eph B4 수용체의 면역침전 후, 이러한 단백질의 총량(하부 패널)과 면역블롯에 의한 인산화 수준(상부 패널)을 분석하였다.

도 6: 마트리겔(Matrigel)에서 내피 세포 HUVEC에 의한 시험관내 관상(튜브형) 구조 형성에 대한 B11 및 2B1의 억제 효과. B11, 2B1 또는 음성 대조군(C-)으로서 부적절한(irrelevant) scFv의 존재하에 마트리겔 상에서 HUVEC 세포의 배양 6시간째 관(tubule) 형성을 보여주는 현미경 사진(4x배율). 양성 대조군으로서 본 발명자들은 VEGF를 사용했다. 그래프는 관 형성에 대한 정량화를 보여준다. 각 처리를 적어도 3회 반복하고, 상응하는 값(평균 +/- 표준 편차)을 어떠한 처리도 없는 대조군과 관련하여 시험된 항체의 존재하에 형성된 관들의 백분율로서 작도한다. * = p <0.0001.

도 7: 시험관내 상처 치유 분석에 의한 세포 측면 이동 억제의 분석. HUVEC 세포를 성장시켜 합류(confluence)시키고 세포 단층에서 상처를 행하였다. 이후, 세포를 이동 자극으로서 VEGF의 부재(대조군) 또는 존재하에 무혈청 배지에서 인큐베이션시켰다. 세포의 측면 이동을 scFv 항-에프린 B2, B11 또는 2B1, 또는 음성 대조군으로서 부적절한 scFv의 존재하에 24시간 동안 모니터링하였다. 본 도면은 0시간째 세포없는 초기 영역에서 가는 점선으로 표시된 상처 영역에 대한 24시간 후의 현미경사진(4x 배율)을 보여준다. 그래프는 24시간째 세포 이동을 정량화한다. 각 scFv에 대해 적어도 3회 시험하고, 상응하는 값(평균 +/- 표준 편차)을 0시간에 대한 이동된 영역의 백분율로 작도한다. * = p <0.001.

도 8: 생체내에서 관상 구조의 억제 효과 분석. 마트리겔 이식을 무흉선 누누(nu/nu) 마우스에서 실시하고 내피 세포 및 헤모글로빈의 정량화에 의해 이식 6일 후 혈관 형성을 평가하였다. **8a.** 6일 후 제거되고 내피 세포 마커 CD34로 염색된 상응하는 이식편의 조직 절편에 대한 대표적인 현미경 사진(배율 40x). **8b.** 그래프는 마커 CD34에 대한 양성 영역의 백분율(좌측 패널)과, VEGF 없는 대조군 이식편에 대해 이식편 중의 헤모글로빈 함량에 있어 상대적인 변화(우측 패널)를 보여준다.

도 9: 췌장암 세포(BxPC3)가 이종이식(xenograft)되고 B11 또는 2B1으로 처리된 마우스에서 종양 성장 억제. 그래프는 20 mg/kg의 B11(▲), 2B1(■)로 처리되거나 비처리된 (C-)(◆) 각 그룹(n = 8)에 대한 각 지점에서의 평균 종양 부피 및 표준 편차를 보여준다.

도 10: B11 또는 2B1으로 처리된 췌장암 세포(BxPC3) 이종이식 종양의 조직병리학적 분석. 분석은 이식 후 38일째 그리고 항체의 최종 투여 후 1일째 수행되었다. 종양을 포르말린에 고정시키고 추후 상응하는 면역조직화학 염색의 실시를 위해 파라핀에 파묻었다. 활성 카스파제 3에 대한 염색에 의해 사멸 세포를 검출하고, 증식 활성을 Ki67 염색에 의해 분석하였으며, 혈관분포를 CD34 염색으로 표지하고, 림프관을 LYVE1 염색으로 검출하였다. 추후, 세포를 카운팅하거나 양성 영역 및 표준 값을 각각의 표준 편차와 함께 카운팅된 모든 영역에 대해 작도하였다. * = p <0.0001 ** = <0.001.

도 11: B11은 대장암 세포(SW620) (도 11a) 및 폐암 세포(H460) (도 11b)가 이종이식된 마우스에서 종양 성장을

억제할 수 있음. 그래프는 20 mg/kg의 B11이 처리된 군과 비처리된 대조군에서 각 지점에서의 표준 편차와 함께 평균 종양 부피(우측 패널) 및 평균 형광 세기(하부 패널)를 보여준다.

도 12: B11 및 2B1의 생체분포 분석 및 종양 덩어리의 위치. 무흉선 누누 마우스에 형광 단백질 mCherry를 안정적으로 발현하는 폐암종 H460 세포를 이종이식시켰다. 종양이 거시적으로 검출가능하고 610 nm에서 형광 세기를 갖는 크기에 도달하면, 적절한 플루오로크롬-접합된 scFv AlexaFluor® 750을 정맥내 투여하였다. **12a**. scFv의 투여 후 0.5, 2, 6, 24 및 48 시간째에 등쪽 영역에 대한 이미지. 종양의 위치(localization)는 화살표로 표시된다. **12b**. AlexaFluor® 750으로 표지된 scFv B11 및 2B1 투여군과 PBS로 처리된 음성 대조군(C-)의 투여 후 6시간 및 48시간째 절개된 종양에 대한 750 nm에서의 형광 세기.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] **실시예**

[0072] 이하에서는 본 발명자들에 의해 실시된 시험에 의해 본 발명을 설명하고 있으며, 이는 에프린 B2에 대해 특이성을 갖는 본 발명의 항체 및 나아가 새로운 혈관 및 림프관의 형성을 억제하는데 있어 이의 효능을 설명해 준다.

[0073] **실시예 1: 에프린 B2에 대한 신규의 인간 항체의 동정 및 특징규명.**

[0074] 파지 M13의 표면상에서 발현된 인간 항체의 라이브러리로부터, 그리고 포유동물 세포에서 발현되고 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된 에프린 B2의 세포외 영역에 대한 선별의 연속 라운드를 통해, ELISA에 의해 에프린 B2 항원과 양성적으로 반응한 파지 클론의 채집물(collection)을 수득하였다. 이들 클론에 대해 특정 프라이머를 사용하여 서열분석하고, V_H (가변 중쇄) 및 V_L (가변 경쇄) 모두에서 상호간에 상이한 서열들의 4종류의 단일쇄 가변 영역(scFv) (A1, B11, E4 및 2B1으로 불림)을 동정하였다. 이후, 선별된 scFv 각각의 발현 및 정제에 대한 분석을 시행하였다. 이를 위해 이들 클론을 T7 RNA 폴리머라제의 프로모터 하에 벡터 pET28b 중으로 서브클론하여 히스티딘 테일을 갖는 단편을 제공하고 이에 따라 친화성 크로마토그래피에 의한 이의 정제를 촉진시켰다. 재조합 벡터를 생성하고 이를 이. 콜라이 BL21(DE3) 균주로 형질전환시켜 추후에 IPTG를 이용한 이의 발현을 유도하였다. 온화한 삼투 쇼크에 의해 주변세포질 분획을 제조하고 이들 분획에 대해 SDS-PAGE에 의해 scFv 존재에 대해 시험하였다(도 1). 다음, 니켈 친화성 크로마토그래피를 사용하여 주변세포질 분획에 존재하는 scFv를 정제한 후 겔 여과에 의해 PBS와 완충액 교환을 시행하였다 (도 2). 클론 2B1(이의 서열은 서열 번호: 8임)의 경우에 최고 수율이 얻어졌고 그 다음으로 클론 B11(이의 서열은 서열 번호: 7임)이 수율이 높았다. 그러나, scFv A1 및 E4의 발현은 너무 낮았고, 얻어진 양은 이들 항체의 추가 특징규명을 위해 충분하지 않았다 (도 2). 따라서, B11 및 2B1 클론을 최종적으로 선별하여 이의 반응성을 분석하였다. ELISA에 의한 기본적인 분석은 이들 항체가 기능적으로 활성인 형태로 발현되어 이들의 목적 항원, 에프린 B2를 특이적으로 인지함을 보여주었다.

[0075] 두 항체의 특이성은, B11 및 2B1과 에프린 B 패밀리의 다른 성분: 상업적 재조합 형태의 에프린 B1 및 에프린 B3의 반응성을 에프린 B2와의 반응성과 비교하는 ELISA 분석 및 면역블롯팅(웨스턴 블롯)에 의해 확인되었다 (도 3). 대조군으로서, 본 발명자들은 시판용 항-에프린 B2(R & D)를 사용하였다. 두 항체, B11 및 2B1만이 에프린 B2를 인지했으며, 이는 이러한 단백질에 대한 높은 특이성을 입증해 주며, 이러한 특이성은 에프린 B1 및 B3을 인지하는 시판용 항체보다 심지어 높다. 이러한 결과는 ELISA에 의해 확인되었다.

[0076] **파지 라이브러리로부터 특이적 에프린 B2 항체로부터 단일쇄 가변 영역 (scFv)의 선별**

[0077] 비면역화된 개체로부터 1.5 x 10^{10} scFv의 인간 항체의 라이브러리를 사용하여 파지 표면상에서 단백질 디스플레이 기술(파지 디스플레이)을 사용하였다. 패닝(panning)의 제1 라운드는, 인간 IgG의 Fc 도메인에 융합된 에프린 B2의 세포외 영역을 사용하여 실시되었으며, 이는 ELISA 플레이트(효소-결합된 면역흡수 분석, Maxisorp, Nunc) 상에서 1 ㎍/웰로 고정화된 항원으로서 PBS(인산염 완충 식염) 중에서 4℃에서 16시간 동안 발현되고 포유동물 세포로부터 정제되었다. 웰을 PBS로 3회 세척 후, 37℃에서 PBS에서 2시간 동안 2% 밀크로 블로킹하는 단계를 실시한 후 37℃에서 2시간 동안 라이브러리를 인큐베이션시켰다. 비특이적으로 결합된 파지는 PBS-0,1% Tween을 사용한 연속 세척에 의해 제거된 반면에, 항원-특이적 파지는 100 ㎕의 트립신으로 용출하였다. 지수

적 성장(600 nm 파장에서의 광학 밀도(OD_{600}) 0.4)을 보이는 에쉐리치아 콜라이 균주 TG1(MRC Geneservices) 세포에 용출된 파지를 37℃에서 30분간 감염시켰다. 감염된 박테리아를 100 ㎍/ml 앰피실린 및 1% 글루코스(v/v)가 보충된 TYE(트립톤 효모 추출물) 플레이트 상에 도말하고 37℃에서 16시간 동안 성장시켰다. 다음, 박테리아를 플레이트로부터 15% 글리세롤이 보충된 2xTY 배지(16 g/l 트립톤, 10 g/l 효모 추출물 및 5 g/l NaCl)에 모으고, 희석된 박테리아 50 ㎕를 100 ㎍/ml 앰피실린 및 1% 글루코스가 보충된 2xTY 배지 50 ml에 모으고, 지수 성장기에 도달할 때까지 배양액을 인큐베이션시키고 세포를 2.5 x 10^{11} 헬퍼 파지 KM13(MRC Geneservices)로 감염시켰다. 37℃에서 인큐베이션 30분 후, 배양액을 원심분리하고, 펠렛을 100 ㎍/ml 앰피실린, 50 ㎍/ml 카나마이신 및 0.1% 글루코스가 보충된 2xTY 배지의 동일 부피에 재현탁시키고 30℃에서 밤새 성장시켰다.

[0078] 선별의 각 라운드로부터 얻어진 파지를 배양 배지로부터 침전시켰다. 이를 위해 배양액을 3,300 x g로 15분간 원심분리시키고 폴리에틸렌 글리콜(PEG)/NaCl 10 ml를 첨가하며 얼음상에서 상등액 40 ml를 1시간 동안 방치시켰다. 다음, 3,300 x g로 30분간 원심분리하고 상등액을 버렸다. 침전물을 2 ml의 PBS에 재현탁시키고 11,600 x g로 10분간 원심분리하였다. 상등액을 회수하고 앞서 기재한 것과 유사하게 선별의 다음 라운드를 위해 파지를 사용하되, 특이점은 항체의 친화성을 개선하기 위해 감소량의 항원을 사용했다는 점이다. 제2 라운드에서 결합된 파지를 증폭시키고 선별의 제3 라운드로 보내어 에프린 B2에 대한 반응성 scFv를 운반하는 파지의 농축물(enrichment)을 수득하였다.

[0079] **파지에 대한 ELISA**

[0080] 선별의 각 라운드에서 얻어진 에프린 B2에 대한 특이적 파지의 농축 정도를 평가하기 위해 파지에 대한 ELISA를 실시하였다. 가요성 ELISA 플레이트(Falcon, BD Biosciences)를 0.3 ㎍의 에프린-B2-Fc 및 PBS 중의 음성 대조군으로서 부적절한 단백질로 4℃에서 16시간 동안 코팅하였다. PBS로 수회 세척 후, 플레이트를 실온에서 2시간 동안 PBS 중의 2% 밀크로 블로킹한 후 실온에서 1시간 동안 PBS-2% 밀크에서 선별의 각 라운드로부터 얻어진 파지의 다양한 희석액과 함께 인큐베이션시켰다. 웰을 PBS-Tween 20(0.1%)으로 다시 세척하고 실온에서 1시간 동안 퍼옥시다제(HRP)(GE Healthcare)에 접합된 단일클론 항-M13 항체의 1:5000 희석액과 함께 배양하였다. PBS-Tween 20(0.1%)으로 4회 세척 후, TMB (3,3', 5,5'-테트라메틸벤지딘)(Sigma)으로 현상하였다. 비색계 반응을 1M 황산으로 중단시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0081] 선별된 두 scFv, B11 및 2B1에 대해 다양한 기법을 사용하여 특징규명하였다. 첫째 본 발명자들은 고정화된 에프린 B2의 세포외 영역 및 정제된 scFv의 다양한 희석액에 대해 비아코어 X 상에서의 표면 플라즈몬 공명 기법에 의해 에프린 B2에 대한 항체 친화 상수를 결정하였다. B11 클론은 최고 친화 상수(110 nM)를 보여준 반면, 클론 2B1의 친화성은 이보다 낮았다(630 mM) (도 4). 다음, 동일한 기법을 사용하여 에프린 B2의 자신의 천연 수용체 Eph B4로의 결합에 대해 경쟁하는 항체의 능력을 분석하였다. 이를 위해, Eph B4-Fc를 칩상에 고정화시키고 에프린 B2에 대한 결합을 다양한 농도의 B11 또는 2B1의 존재하에 측정하였다. B11의 존재는 IC_{50} 0.3 mM에서 농도 의존적인 방식으로 Eph B4로의 에프린 B2의 결합을 방지하는데(도 5), 이는 B11이 Eph B4 수용체의 동일 결합 부위에 대해 경쟁함을 나타낸다. 그러나, 2B1 항체는 차단 효과를 나타내지 않는다(도 5).

[0082] **단일클론 파지의 ELISA**

[0083] 선별의 제3 라운드로부터 개개 콜로니를 채집하고 96-웰 플레이트(Sarstedt) 에서 100 ㎍/ml 앰피실린 및 1% 글루코스가 보충된 2xTY 배지 100 ㎕에서 밤새 37℃에서 교반하에 성장시켰다. 다음날 배양액을 동일 배지에서 100배 희석시켰으며 37℃에서 교반하에 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 다음, 10^{9} KM13 *헬퍼* 파지를 갖는 배지 25 ㎕를 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 박테리아를 원심분리하고 세포 펠렛을 50 ㎍/ml 카나마이신이 보충된 2xTY에서 재현탁시키고 30℃에서 밤새 성장시켰다. 마지막으로, 배양액을 원심분리하고 앞서 기재된 것과 동일한 조건하에서 ELISA를 위해 상등액 50 ㎕를 사용하였다.

[0084] **서열 분석**

[0085] 올리고뉴클레오티드 또는 pelB순방향 프라이머(서열 번호: 2) 5'-CATAATGAAATACCTATTGCCTA-3' 및 cmyc역방향 프라이머(서열 번호: 3) 5'-CTTATTAGCGTTTGCCATT-3'를 사용한 PCR에 의해 양성 scFv로부터의 코딩 서열을 증폭

시켰다. PCR 생성물을 효소 ExoI(USB)로 처리하여 미사용된 올리고뉴클레오티드를 제거하고, SAP(USB)로 처리하여 37℃에서 30분간 그리고 80℃에서 15분간 남은 dNTP를 제거하고, 이러한 생성물을 두 올리고뉴클레오티드로 서열분석하였다. 일단 서열들이 얻어지면, 이들을 ClustalW 프로그램 및 번역 툴 ExPASy 프로테오믹스 서버를 사용하여 서로 비교하여 독특한 서열 클론의 수를 결정하였다.

[0086] **scFv의 pET28b로의 서브클로닝**

[0087] 선별된 scFv에 이의 정제를 촉진하는 히스티딘 테일을 제공하기 위해, 이들을 벡터 pET28b(Novagen)에 서브클로닝시켰다. ScFv는, NcoI로 미리 절단된 RcaI 및 XhoI에 필적하는 pET28b 벡터 부위 중으로의 후속 클로닝을 위해 두 제한 부위 XhoI 및 RcaI 각각을 포함하는 프라이머 pET28-scFvMehta 5'(서열 번호: 4) 5'CAGTCATCATGAAATACCTATTGCCTAC3' 및 pET28-scFvMehta3'(서열 번호: 5) 5'CACCGGACTCGAGTGCGGCCCCATTCAG3'를 사용한 PCR에 의해 증폭시켰다. 절단된 삽입체 및 벡터의 연결은 삽입체:벡터의 몰비 3:1에서 T4 리가제 효소(Roche)를 사용하여 16℃에서 밤새 인큐베이션에 의해 수행되었다. 이. 콜라이 균주 DH5a 라이브러리 적격(competent) 세포(Invitrogen)를 열 쇼크에 의해 형질전환시키고 50 ㎍/ml 카나마이신을 갖는 LB-Agar (LB, "lysogeny Broth") 플레이트 상에서 선별하였다. 각 작제물의 양성 콜로니를 카나마이신이 보충된 LB에 접종하고 37℃에서 밤새 배양하였다. 재조합 벡터를 Wizard 키트(Promega)를 사용하여 정제하고 DNA 서열분석에 의해 서열을 확인하였다.

[0088] **scFv의 발현 및 정제**

[0089] 이. 콜라이 균주 BL21 (DE3) 적격 세포를 열 쇼크에 의해 pET28 재조합 플라스미드로 형질전환시켰다. 형질전환체 박테리아를 50 ㎍/ml 카나마이신이 있는 LB 플레이트 상에서 선별하였다. 배양액의 OD_{600}이 0.6일 때 IPTG (이소프로필-β-D-1-티오갈락토피라노시드)를 사용하여 최종 농도 1 mM로 유도함으로써 scFv 발현을 수행하였다. 본 발명자들은 SDS-폴리아크릴아미드 겔(나트륨 도데실 설페이트)에 이어 쿠마시 브릴런트 블루를 이용한 염색에 의해 scFv 발현 수준을 분석하였다. 기능성 scFv는 주변세포질 영역에 집중되기 때문에, 온화한 삼투 쇼크에 의해 박테리아 외벽의 용해를 유도했으며, 세포를 20 ㎍/ml 벤즈아미딘(Sigma) 및 10 ㎍/ml 대두 트립신 억제제(Sigma)가 보충된 TES 완충액(200 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 0.5 M 수크로스) 1/50 부피에 재현탁시킨 다음 0.2 x TES 완충액으로 1.5배 희석시켰다. 용해물을 얼음상에서 30분간 방치하고 16,250 x g로 10분간 원심분리했으며 주변세포질 분획을 함유한 상등액을 수집하였다.

[0090] Ni^{2+} HisTrap 컬럼(GE Healthcare)을 사용하여 고정화된 금속(IMAC) 상에서 친화성 크로마토그래피에 의해 scFv의 정제를 실시한 후 컴퓨터 AEKTAxpress 상에서 텐덤(tandem)으로 커플링된 겔 여과 HiPrep 26/10 디솔팅(GE Healthcare) 컬럼 상에서 탈염을 실시하였다. 친화성 컬럼의 평형 완충액으로서 20 mM 인산나트륨 pH 7.4, 0.5 M NaCl, 20 mM 이미다졸을 사용하였고, 용출 완충액으로서 동일한 물질을 사용하되 이미다졸 농도 0.3 M로 밸런스를 유지했다. 이러한 완충액은 겔 여과에 의해 PBS로 교환하였다.

[0091] **면역블롯 (웨스턴 블롯)**

[0092] 재조합 마우스 단백질 에프린 B1-Fc, 마우스 에프린 B2-Fc 및 인간 에프린 B3-Fc (R & D)를 폴리아크릴아미드-SDS 10% 겔에서 전기영동적으로 분리하고 니트로셀룰로스 막(GE Healthcare) 상으로 이동시켰다. PBS-3% 스킴 밀크 분말을 사용하여 막을 1시간 동안 블로킹한 후, PBS-3% 분말화된 밀크 중의 1:5 희석된 주변세포질 분획과 함께 4℃에서 16시간 동안 인큐베이션시켰다. 사용된 이차 항체는 실온에서 2시간 동안 1:1000으로 희석된 항 c-Myc(Sigma)와 실온에서 1시간 동안 1:5000으로 희석된 항-마우스 퍼옥시다제 접합체(Sigma)였다. ECL 시제(ECL, "증진된 화학발광")(GE Healthcare)를 사용한 인큐베이션에 의해 가시화를 수행하였다.

[0093] **scFv의 속도 상수 분석**

[0094] scFv의 친화 상수를 연구하기 위해 BIAcore X 장비(BIAcore)를 이용한 표면 플라즈몬 공명 기법을 사용하였다. 에프린 B2-Fc는, 칩의 덱스트란 매트릭스의 카르복실기를 0.4 M EDC(1-에틸-3-(-디메틸아미노프로필)-카보디이미드) 및 0.1 M NHS (N-히드록시숙신이미드)(1:1 비)로 유속 10 ㎕/분으로 7분간 활성화했을 때 CM5 칩 표면(GE

Healthcare)에 공유적으로 결합하였다. 에프린 B2-Fc 단백질을 pH 4의 10 mM 아세트산 나트륨 중에서 10 ㎍/ml로 희석하고, 이 용액의 30 ㎕를 HBS-EP 완충액(10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% 계면활성제 P20)(GE Healthcare)에서 10 ㎕/min의 유속으로 칩 표면 위를 통과시켰다. 과량의 활성화된 에스테르기는, pH 8.5의 1M 에탄올아민을 10 ㎕/분의 유속으로 7분간 주입함으로써 블로킹시켰다. 이러한 프로토콜을 사용하여 에프린 B2의 대략 2,000개의 반응 유닛(RU)을 고정화시켰다.

[0095] scFv의 친화 상수를 결정하기 위해, 항체의 다양한 희석액(증가 순서)을 30 ㎕/분의 유속으로 순차적으로 주입하였다. 센서그램을 얻은 후, 랑뮈르 1:1 모델에 의해 평가 프로그램 BIA소프트웨어를 사용하여 친화 상수를 계산하였다.

[0096] **Eph B4로의 결합에 대한 경쟁 분석**

[0097] 에프린 B2의 자신의 EphB4 수용체로의 결합을 억제하는 scFv의 능력을 표면 플라즈몬 공명 경쟁 결합 분석에 의해 분석하였다. 앞서 기재한 것과 동일한 프로토콜을 사용하여 가용성 Eph B4(R&D)를 CM5 칩(GE Healthcare)에 접합시켰다. 각 scFv의 연속 희석액을 HBS-EP 완충액 중의 일정 농도(0.2 μM)의 에프린 B2-Fc와 혼합하고 각 혼합물 30 ㎕를 20 ㎕/분의 유속으로 Eph B4의 코팅된 칩상으로 주입하였다. Eph B4에 결합된 에프린 B2의 상대적인 양은 항체의 상응하는 농도의 함수로서 표시된다.

[0098] **scFv B11 항-에프린 B2를 이용한 EphB4 신호전달의 차단**

[0099] 에프린 B2-유도된 인산화를 통한 Eph B4의 활성화를 차단하는 항-에프린 B2 scFv의 능력을 시험하기 위해, 에프린 B2를 일시적으로 과발현시키는 HEK293 세포를 사용하여 높은 수준의 Eph B4를 발현시키지만 낮은 수준의 에프린 B2를 발현시키는 것을 특징으로 하는 HUVEC 세포를 자극하는 세포 분석을 실시하였다. 그 결과가 도 5의 B에 도시되어 있다. HEK293 세포의 표면상에서 발현되는 에프린 B2는 상기 두 종류의 세포를 20분간 인큐베이션한 후 HUVEC 세포에서 Eph B4의 효율적인 인산화를 유도한다. 그러나, 이러한 프로세스에서 scFv B11의 존재는 Eph B4의 인산화를 거의 완벽하게 억제했는데, 이는 scFv B11 처리가 세포간의 직접적인 접촉의 맥락에서 에프린 B2와 수용체 Eph B4 간의 상호작용을 차단함을 의미한다. 이러한 효과는 scFv 2B1을 이용한 처리를 실시한 경우에는 관찰되지 않았다. scFv 2B1의 경우, Eph B4 인산화 수준은 항체의 부재하에 관찰된 것과 유사했다.

[0100] **Eph B4의 인산화 세포 분석**

[0101] 5% 우태혈청(fetal bovine serum)이 보충된 RPM1(Sigma)에서 성장한 HEK-293 세포에 플라스미드 pcDNA3-에프린 B2를 형질감염시켰다. HEK-293 세포를 플라스틱병 T-75(Nunc)에 4.5 x 10^6으로 시딩하였다. 다음 날, 1 ml의 OPTIMEM 배지(Invitrogen)에서 20 ㎍의 pcDNA3-에프린 B2 및 60 ㎕의 FUGENE 형질감염제(Roche)를 이용한 혼합물을 제조하고 이를 실온에서 30분간 인큐베이션시켰다. 세포 단층을 무혈청의 OPTIMEM 배지(Invitrogen)로 수회 세척하고 DNA-FUGENE 혼합물을 첨가하였다. 37℃ 및 5% CO_2에서 5시간 동안 인큐베이션 후, 배지를 제거하고 5% 우태혈청을 함유한 RPM1을 첨가하였다. 48 시간 째, 형질감염된 세포를 PBS-5 mM EDTA로 부상시키고, 20 ㎍/ml의 scFv 항-에프린 B2의 존재 또는 부재하에 10% 우태혈청이 보충된 EGM 불렛 키트 배지(Lonza)에서 성장하여 합류된 HUVEC 세포를 갖는 P100 플레이트(Falcon)에 5x10^6 세포를 첨가하였다. 37℃ 및 5% CO_2에서 20분간 인큐베이션 후, 프로테아제 억제제 칵테일(Roche) 및 포스파타제(Sigma)가 보충된 용해 완충액(100 mM Tris HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.5% Triton X100)으로 세포를 용해시켰다. 용해물을 4℃에서 16.000xg로 25분간 원심분리한 다음, 상등액을, Eph B4에 대한 특이적 항체(R&D) 및 G 단백질-커플링된 세파로스(GE Healthcare)를 사용하여 4℃에서 16시간에 걸쳐 미리 형성된 복합체와 함께 4℃에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 마지막으로, 면역복합체를 용해 완충액으로 2회 세척하고 7.5% 폴리아크릴아미드 겔 SDS-PAGE 상에서 전기영동시켰다.

[0102] 인산화된 Eph B4의 검출을 면역블롯으로 실시하였다. 이를 위해, 항-Eph B4에 의해 면역침전되고 전기영동에 의해 분리된 단백질을 니트로셀룰로스 막 하이본드-C(GE Healthcare)로 이동시키고 Tween-20(Sigma)(0.05%) 및 Phosphoblocker® 블로킹제(Cell Biolabs, Inc.)(3%)가 보충된 PBS로 실온에서 1시간 동안 블로킹시켰다.

다음, 막을 1:2000으로 희석된 퍼옥시다제 접합된 단일클론 항체 4G10 항-포스포티로신(Millipore)과 함께 4℃에서 16시간 동안 인큐베이션시켰다. SuperSignal® 웨스트 펨토 기질(Thermo Scientific)에 의해 화학형광 검출을 사용하여 가시화를 수행하였다. 총 Eph B4의 검출을 위해, 동일 막을 스트롱 플러스 ReBlot 시제(Chemicon)로 실온에서 15분간 재생시키고 0.05% Tween-20 및 5% 스킴 밀크를 갖는 PBS에서 1:1000으로 희석된 항-Eph B4 항체(R&D)와 함께 4℃에서 16 시간 동안 인큐베이션시켰다. 0.05% Tween-20을 갖는 PBS로 수회 세척 후, 막을 실온에서 2시간 동안 퍼옥시다제 접합된 항-염소 항체(1:5000)(Dako)와 함께 인큐베이션시키고 ECL 플러스 시제(GE Healthcare)를 사용하여 밴드를 가시화시켰다.

[0103] **실시예 2: 시험관내 HUVEC 세포에서 B11 및 2B1 항체의 항혈관형성 활성**

[0104] 혈관형성 능력과 내피 세포 이동에 대한 B11 및 2B1 항체의 작용을 분석하였다. 이를 위해, 마트리겔에서 관(튜브) 형성 및 HUVEC 세포(인간제대정맥내피세포)를 이용한 시험관내 상처 치유 분석 실험을 각각 실시하였다.

[0105] 마트리겔상에서 관 형성 실험에서, 100 ug/ml의 B11 항체의 존재하의 HUVEC 세포는 항체가 없거나 부적절한 scFv를 갖는 대조군에 비해 관 수에 있어 2배 더 낮았으며(도 6), 이외에도 처리 6시간째 관 수에 있어 감소가 있었고, 단층의 세포의 보다 큰 소인(disposition)이 있는 것으로 밝혀졌는데, 이는 상기 항체의 존재가 관 형성을 방지했음을 입증해준다. 유사한 결과가 클론 2B1에서 얻어졌지만 B11에 비해 억제 능력이 보다 낮았으며, 대조군에 비해서는 40% 정도였다.

[0106] HUVEC 세포의 측면(lateral) 이동에 대한 작용을 평가하기 위해, 이동 자극제로서 혈관 내피 성장 인자(VEGF)의 존재하에 단층에 대한 치유 실험을 실시하였다. 상처를 만들고 24 시간 후에, VEGF 또는 VEGF와 부적절한 항체가 있는 경우 단층 세포의 60%가 자유 공간으로 이동하였다. 이에 반해, VEGF 및 B11 또는 2B1으로 처리된 상처들은 각각 세포의 25% 또는 30% 만이 콜로니를 형성했으며, 이러한 데이터는 이동 자극이 없는 음성 대조군에서의 이동된 세포의 수(20%)에 필적한다(도 7).

[0107] 따라서, 두 실험으로부터 에프린 B2에 특이적인 B11 및 2B1 항체, 특히 B11 항체가 항혈관형성 능력을 나타내고 시험관내에서 내피 세포 이동을 억제할 수 있는 것으로 결론지을 수 있다.

[0108] **마트리겔에서 모세관 형상 구조 형성 분석**

[0109] 24 웰 플레이트를 마트리겔(BD Biosciences)로 코팅하고 겔 형성을 위해 37℃에서 20분간 인큐베이션시켰다. 다음, 5 x 10^4의 HUVEC 세포를 10% 우태혈청이 보충된 1 ml의 완전 배지 EGM-2 불렛 키트(Lonza)에서 마트리겔 층위에 도말하고 100 ㎍/ml에 이르는 다양한 항체의 존재하에 37℃에서 6시간 동안 인큐베이션시켰다. 6시간째 카메라가 장착된 현미경 Axiovert 100(Zeiss)에서 얻어진 디지털 이미지를 분석하여 관 구조의 형성 정도를 연구하였다.

[0110] **시험관내에서 상처 치유 시험**

[0111] 세포 이동 분석을 시험관내 상처 치유를 이용하여 수행하였다. HUVEC 세포를 0.5% 우태혈청이 보충된 EGM-2(Lonza)와 함께 1시간 동안 인큐베이션 후 24 웰 플레이트에서 합류로 성장시키고, 피펫 팁을 사용하여 선형 스크래핑을 만들고 해당 영역에 대해 사진을 찍었다. 세포를 이동 자극으로서 100 ㎍/ml VEGF (혈관 내피 성장 인자, Peprotech) 및 100 ㎍/ml의 해당 항체의 부재(대조군 조건) 또는 존재하에 인큐베이션시켰다. 24시간 후 해당 영역에 대해 사진을 찍고, 상처 영역으로 측면 이동된 세포를 카운팅했으며, 스크래핑 시점으로부터 이동된 영역의 백분율을 결정하였다.

[0112] **실시예 3: 생체내에서 마트리겔 이식편의 혈관형성과정에 대한 B11 및 2B1 항체의 작용**

[0113] 항체 2B1 및 B11이 생체내 혈관신생을 직접적으로 억제할 수 있는지를 확인하기 위해, 무흉선 누드 누누 마우스(그룹 당 6 마리)에서 VEGF(Peprotech)가 보충된 마트리겔 이식편에 대한 실험을 수행하였다. 해당 마트리겔의 이식 6일 후 제거된 이식편에 존재하는 헤모글로빈의 정량 및 CD34의 면역조직학적 염색에 이어 이러한 혈관 마커에 대한 양성 영역을 계산함으로써 모세관 네트웍 형성에 대한 평가를 실시하였다. 마트리겔의 이식 직후 격

일로 최종 용량 300 ㎍/마우스일 때까지 각 항체를 이용한 처리를 정맥내로 개시하였다. VEGF 없는 이식군을 음성 대조군으로 사용하였으며 이는 어떠한 혈관형성과정을 나타내지 않았다(도 8a). 이에 반해, VEGF 이식군과 VEGF 및 부적절한 scFv로 처리된 이식군은 실험의 양성 대조군을 고려했을 때 뚜렷한 혈관형성과정을 나타내었다. 항체 B11로 처리된 동물은 최소의 혈관형성과정을 보였으며, 양성 대조군보다 95% 낮았고, 성장 인자없이 마트리겔이 이식된 동물에 존재하는 수준에 필적했으며, 이는 상기 이식군에서 CD34에 대해 양성인 내피 세포 및 헤모글로빈의 결핍을 반영한다(도 8b). 2B1 항체로 처리된 마우스군은 양성 대조군에 대한 혈관 혈성의 50% 억제를 보여주었다.

[0114] **생체내 관(tube) 형성 분석**

[0115] 4-6주된 무흉선 누누 마우스(Charles River)를 사용하였다. 대조군의 경우, 2% 이소플루란으로 마취된 마우스에 200 ㎕의 마트리겔(BD Biosciences)을 주입하였다. 또 다른 동물군에는 50 ng/ml VEGF 및 375 ㎍/ml 헤파린(Sigma)이 보충된 200 ㎕의 마트리겔을 상부 복부 영역으로 주입하였다. 마트리겔의 이식 직후, 총 용량이 300 μ/마우스일 때까지 scFv를 이용한 정맥내 처리를 격일로 개시한다. 6일 후, 이식편을 제거하고 존재하는 헤모글로빈의 농도에 따라 그리고 혈관 마커인 항-CD34로 염색된 조직 단면에서 새로운 혈관 형성을 평가하였다. 헤모글로빈을 측정하기 위해, 각 마트리겔 이식편의 일부를 취하고 칭량한 다음 300 ㎕의 증류수에서 균질화시켰다. 16,000 x g로 5분간 원심분리 후, 100 ㎕의 상등액을 취하고 TMB 기질(3,3',5-5'-테트라메틸벤지딘)(Sigma)과 1:1로 희석시켰다. 15분 후, 650 nm에서 광학 밀도를 측정하여 색 반응을 평가하였다. 마지막으로, 얻어진 값을 이식편의 중량으로 정규화하였다.

[0116] 면역조직화학적 분석을 위해, 이식편의 일부를 10% 완충 포르말린에 고정시키고 파라핀에 묻은 다음 마이크로톰을 사용하여 2.5 ㎛ 두께로 절단하였다. Tris-EDTA pH 9.0를 사용하여 항원 회수를 수행하고 내피 세포를 1:75로 희석된 래트 단일클론 항-CD34(Abcam)로 표지한 다음 퍼옥시다제로 표지된 이차 항-래트 항체(Biocare Medical)로 표지하였다. 3,3-디아미노벤지딘 테트라히드로클로라이드 플러스(DAKO)를 사용하여 가시화하고 헤마톡실린으로 대조염색하였다. 양성 세포를 AxioVision 시스템(Zeiss)으로 카운팅하였다.

[0117] **실시예 4: B11 및 2B1 항체는 무흉선 마우스에서 인간 종양의 성장을 억제한다.**

[0118] 생체내 및 시험관내에서 혈관신생에 대한 B11 및 2B1 항체의 입증된 능력을 전제로 하여, 이들 항체가 종양 성장시 혈관신생에 고도로 의존적인 프로세스를 억제할 수 있는지에 대해 연구하였다. 이를 위해, 췌장암 세포(BxPC3), 대장암 세포(SW620) 및 폐암 세포(H460)를 갖는 3마리의 마우스 이종이식 모델을 사용하였다. 방출된 형광을 분석하여 종양 진행을 추적하기 위해 대장 및 폐 세포는 본질적으로 형광 단백질 mCherry를 발현시킨다. 앞서, 두 항체, B11 및 2B1은 사용된 세 종류의 세포주에서 시험관내 세포 생존도에 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀졌다.

[0119] BxPC3 세포를 8마리 마우스의 2 그룹으로 피하 이식하였고 일단 종양 덩어리가 거시적으로 검출이 되면 최종 농도 20 mg/kg일 때까지 B11 및 2B1을 격일로 정맥내 처리를 개시하고 음성 대조군의 경우에는 PBS를 처리하였다. 종양 세포의 이식 60일 후 B11 항체로 처리된 마우스군은 종양 크기의 유의한 감소를 보여주었으며, 대조군의 평균 종양 크기에 비해 70% 성장 억제율에 해당하였다(도 9). 2B1-처리된 마우스는 종양 성장에 있어 적절한 감소(대략 35%)를 나타내었다.

[0120] 신생물성 성장에서 이러한 억제를 담당하는 메카니즘을 연구하기 위해, 항체 처리 완료 후 1일째 몇몇 종양을 제거하고 면역조직화학적 분석을 실시하여 카스파제 3 활성, Ki67, CD34 및 Lyve1 각각에 대한 항체를 사용하여 세포사멸 상태, 증식 상태, 혈관형성 상태 및 림프구형성 상태를 평가하였다(도 10). B11이 처리된 종양에서 사멸 세포의 수는 대조군에 비해 5배 증가하였다. 이에 반해, 2B1 및 대조군으로 처리된 종양에서 사멸 세포 수간의 차이는 유의한 수준이 아니었다.

[0121] 증식 마커 Ki67과 관련하여, 처리군과 대조군 간에 뚜렷한 차이가 없었는데 이는 3종류의 모든 군에서 약 30%의 Ki67 양성 세포를 보여주었다.

[0122] 종양에서 CD34에 대해 양성인 영역을 측정함으로써 혈관의 존재를 분석한 경우, 대조군에 비해 B11로 처리된 종양에서 80% 감소가 있었고 대조군에 비해 2B1으로 처리된 종양에서는 55% 감소가 있었다.

[0123] 마지막으로, Lyve1 마커에 의해 림프관의 존재를 분석했으며, B11로 처리된 종양에서는 림프관의 거의 완벽한

부재가 관찰되었다. 2B1이 처리된 종양에서는 림프관의 수에 있어 유의한 감소가 관찰되었지만, B11의 경우만큼 극적인 감소는 없었다.

[0124] 다음, 앞서 기재한 것과 동일한 과정에 따라 다른 이종이식 모델에서 B11 항체의 항혈관혈성 및 항림프관형성 능력과 종양 성장 억제 능력에 대해 연구하였다. 대장암 세포주 SW620의 경우, 이식 23일 후 종양 크기에 있어 90% 감소가 관찰되었지만 (도 11a), 폐암 세포의 경우에는 감소율이 65%였다(도 11b). 각각의 크기에 있어 이러한 감소는 종양 세포에 존재하는 형광 방출 단백질 mCherry의 유사한 감소로서 실증되었다. 면역조직화학 분석은 B11로 처리된 종양에서 혈관 수의 감소 및 림프관의 부재를 확인시켜주었으며, 이는 췌장암 세포 모델에서 관찰된 바와 같다.

[0125] 따라서, 에프린 B2에 특이적인 B11 항체는 강력한 항혈관형성 능력과 항림프관형성 능력을 가지고 있으며, 그 결과 이러한 항체로 처리된 종양에서 성장 감소 또는 지연이 달성된다고 결론지을 수 있다. 2B1 항체도 또한 우수한 항혈관형성 능력과 항림프관형성 능력을 가진다.

[0126] **이종이식**

[0127] 형광 단백질 mCherry(Clontech)를 안정적으로 발현하는, 췌장암 세포(BxPC3), 대장암 세포(SW620, 및 폐암 세포(H460)가 이종이식된 3 종류의 이종이식군이 있었다. 세 경우 모두, 본질적으로 하기의 동일 프로토콜을 따랐다. 신생물성 덩어리(대략 30 ㎣)가 거시적으로 관찰될 때까지 0.2 ml 부피의 PBS 중에서 1 내지 5 백만 인간 종양 세포를 면역결핍 마우스(누드 또는 SCID, "증증 합병 면역결핍증")의 옆구리에 피하 주입하였다. 이때, 처리는 2주간 격일로 또는 최종 농도 20 mg/kg일 때까지 100-200 ㎕의 PBS 중의 해당 항체의 꼬리 정맥을 통한 정맥내 투여에 의해 개시되었다. 대조군 동물에는 동일한 가이드라인에 따라 PBS가 투여되었다. 종양 크기는 캘리퍼스를 사용하여 주당 2-3회 측정하였으며, mCherry 형광 단백질로 표지된 세포가 이종이식된 마우스의 경우, IVIS 이미징 시스템 스펙트럼 200(Caliper Life Sciences)에서 610 nm까지 형광 방출 강도(초 및 ㎠ 당 광자의 수)를 또한 측정하여 mCherry 단백질 발광 강도의 함수에서 종양 성장을 디스플레이하였다. 이미지의 최종 프로세싱은 잔류 신호 차감(자가형광의 제거) 및 신호 강도의 프로필에 따른 색 스케일을 포함한다. 종양이 1500-2000 ㎣의 소정 크기에 도달하면 실험 동물의 사용에 관한 법령에 따라 동물을 CO_2 질식에 의해 희생시켰다. 종양 성장 측정치의 통계적 분석을 스튜던트 t-테스트를 이용한 파라미터 분석에 의해 실시하였다. 통계적 유의 수준은 $p \leq 0.05$로 설정되었다.

[0128] **조직학적 분석**

[0129] 항체를 이용한 처리 완료 후 1일째 희생된 이종이식 마우스로부터 종양 시료를 추출하였다. 시료를 포르말린으로 고정시키고 파라핀에 묻었다. 각 종양으로부터 얻어진 조직 절편을 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하거나 면역조직화학적 특징규명을 위해 준비하였다. 토끼 항-Ki67의 단일클론 항체(DAKO)를 사용한 염색에 의해 종양 세포의 증식 활성을 분석하고, 토끼 다클론 항-활성 카스파제 3(R&D)을 사용하여 사멸 세포의 존재를 검출하였으며, 특정 래트 단일클론 항체(Abcam)를 갖는 내피 세포상에서 CD34에 대한 염색에 의해 새로운 혈관형성을 확인하였고 토끼 다클론 항-LYVE1(Abcam)를 이용한 염색에 의해 림프관을 표지하였다. 모든 컷에 대한 가시화는 3,3-디아미노벤지딘 테트라히드로클로라이드 플러스(DAKO)를 사용하여 실시하였고 헤마톡실린으로 대조염색하였다. 양성 세포는 AxioVision 시스템(Zeiss)에 의해 카운팅하였다.

[0130] **실시예 5: 생체내 종양 덩어리의 생체분포 및 위치**

[0131] 동물에서 항체의 분포를 분석하고 종양 발생 영역에서의 위치를 입증하기 위해, 종양 세포주(이 경우 H460 폐암 세포주)로 이종이식된 마우스를 근적외선을 방출하는 플루오로크롬 표지된 항체® AlexaFluor 750(Molecular Probes)로 처리하는 실험을 디자인하였다. 종양 덩어리의 위치를 확인하기 위해, 형광 단백질 mCherry를 발현하는 세포를 사용하였다. H460 세포를 무흉선 누드 누누 마우스의 등쪽 영역에 피하 이식하였다. 종양이 대략적인 부피 0.3 ㎤에 도달했을 때, AlexaFluor® 750가 접합된 항체 15 ㎍을 정맥내 투여하였다. 투여 후 0.5, 2, 6, 24 및 48 시간 째에, 복부 영역과 등쪽 영역에 대한 이미지를 취하였다. 마우스의 등쪽 이미지의 연구에 따르면 투여 후 30분에서부터 항체가 종양 덩어리에서 위치하고(도 12a) 6시간째에 피크를 보여주었다(도 12b). 6시간째 종양에서 항체 B11에 의해 방출된 형광 강도는 항체 2B1에 의한 것보다 명백히 높았으며, 이는 B11이

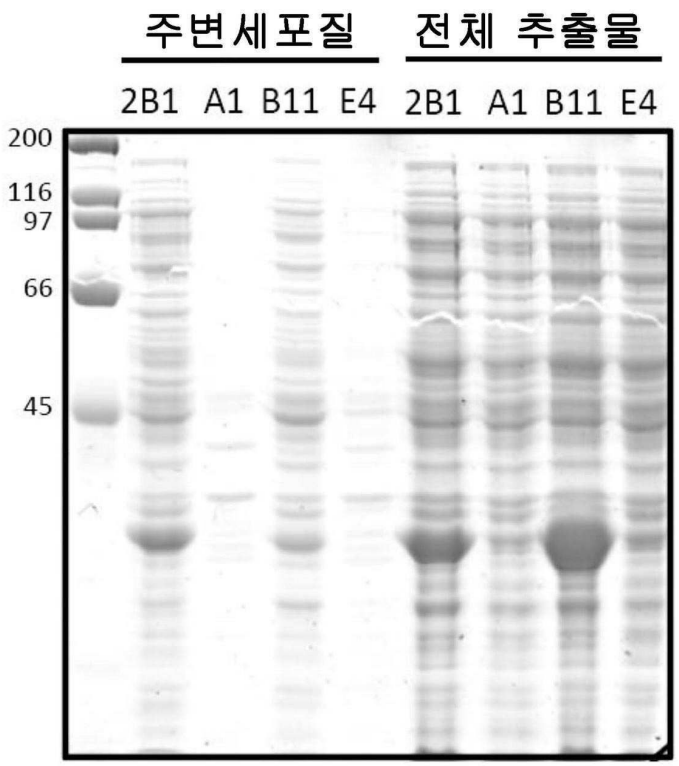
2B1 보다 종양 영역에서 보다 효율적으로 위치함을 의미한다. 30분 후 방광 및 신장에서 신호가 매우 강했는데, 이는 항체의 신장에 의한(renally) 빠른 그리고 활성인 제거를 의미한다. 48시간째, 이들 영역에서 신호가 매우 약했으며, 값은 자가형광에 근접했는데, 이는 거의 모든 항체가 완전히 제거되었음을 시사한다. 나아가, 동물은 상부 복부 영역에서 제1 시간 동안 형광 신호를 보여주었는데 이는 간담도 경로에 의한 항체의 제거 정도에 기인한 것일 수 있으며, 이러한 사실은 장기를 별도 분석했을 때 입증되었으며, 6시간째 간은 대략 1 x 10^8 p/s/㎠/sr(광자/초/㎠/에스터디안(esterdian))의 형광을 보이는 것으로 확인되었다.

[0132] **생체분포**

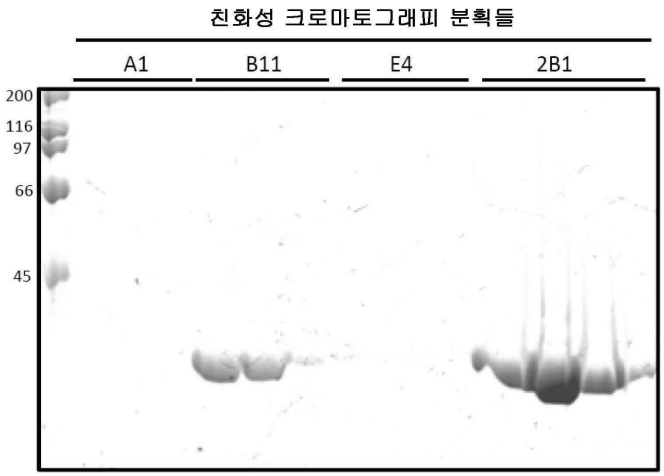
[0133] scFv 분포 실험을 위해, mCherry 형광 단백질을 안정적으로 발현하는 H460 폐암 세포주가 이종이식된 누드 마우스를 사용하였다. 종양의 위치를 명확하게 확인하기 위해 형광 마커를 갖는 세포를 사용하였다. 5 x 10^6 세포를 피하 주입하고 신생물성 덩어리의 크기가 대략 500 ㎟에 도달할 때까지 성장이 이루어졌다. 마찬가지로, scFv를 제조자의 지시에 따라 SAIVI™ 빠른 항체 표지 키트(Invitrogen)에 의해 플루오로크롬 AlexaFluor® 750에 접합시켰다. 일단 종양이 예상 크기에 도달하면, 각 마우스에 15 ㎍의 표지된 항체를 정맥내 주입하였다. 플루오로크롬을 749 nm로 여기시키는 생체내 이미징 시스템 IVIS 스펙트럼 200(Caliper Life Sciences)으로 표지된 scFv의 투여 후 0.5, 2, 6, 24 및 48 시간째에 생체내 형광 이미지를 취하였다. 자가형광을 제거한 후, 본 발명자들은 신호 강도의 프로필에 따라 색 스케일을 제공하였다.

도면

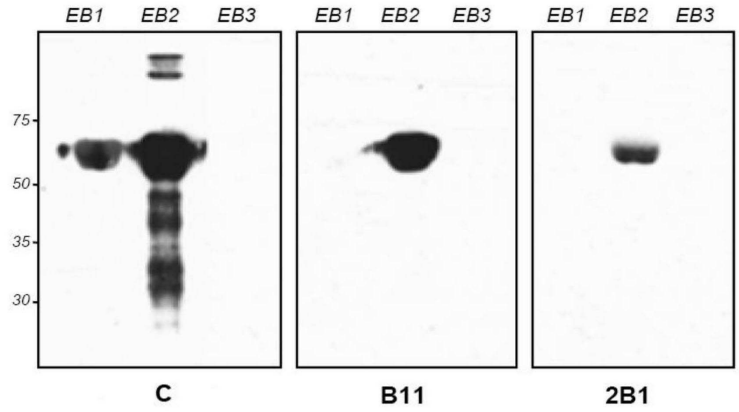
도면1



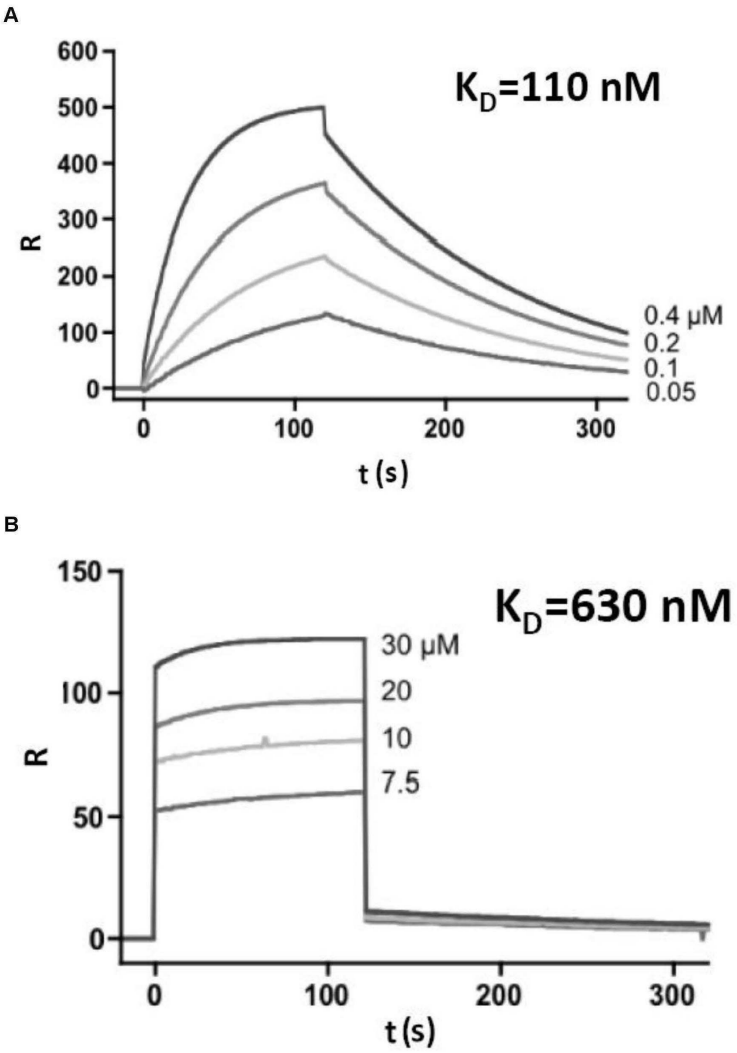
도면2


친화성 크로마토그래피 분획들
A1
B11
E4
2B1
200
116
97
66
45

도면3

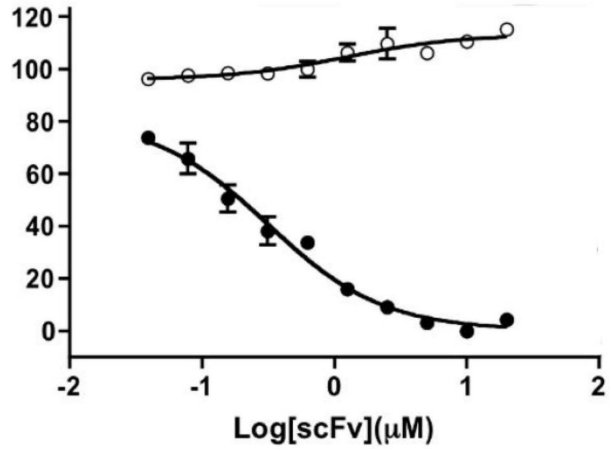

EB1
EB2
EB3
EB1
EB2
EB3
EB1
EB2
EB3
75
50
35
30
C
B11
2B1

도면4

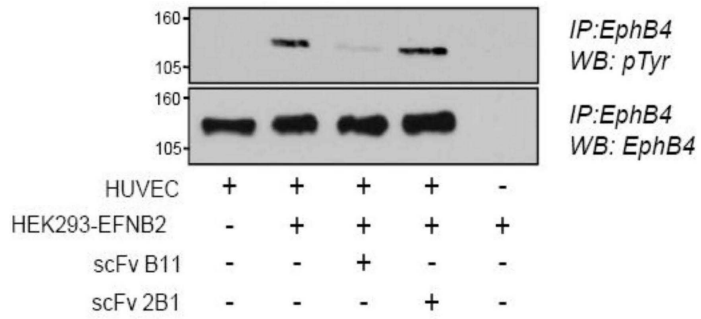


도면5

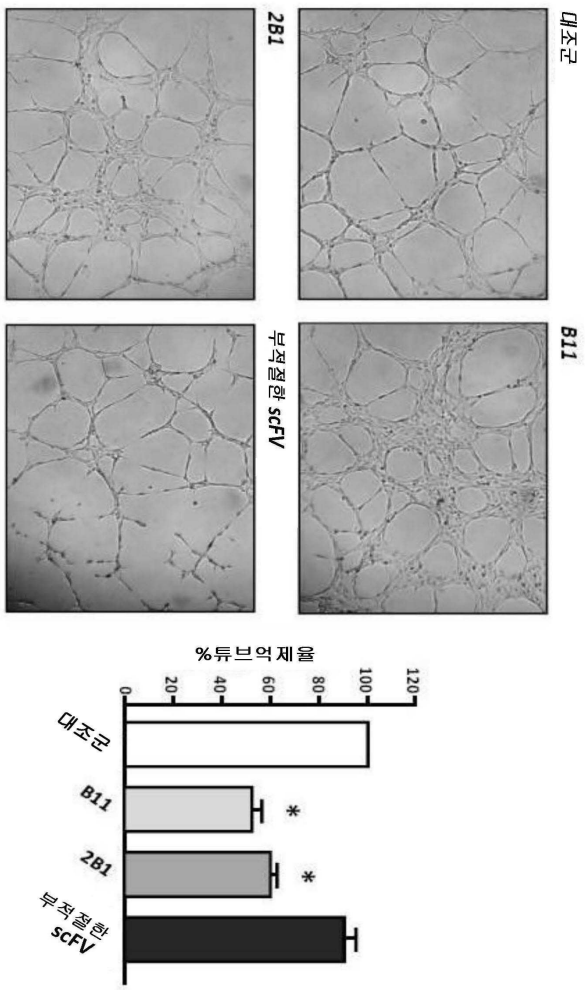
A


120
100
80
60
40
20
0
-2
-1
0
1
2
Log[scFv](μM)

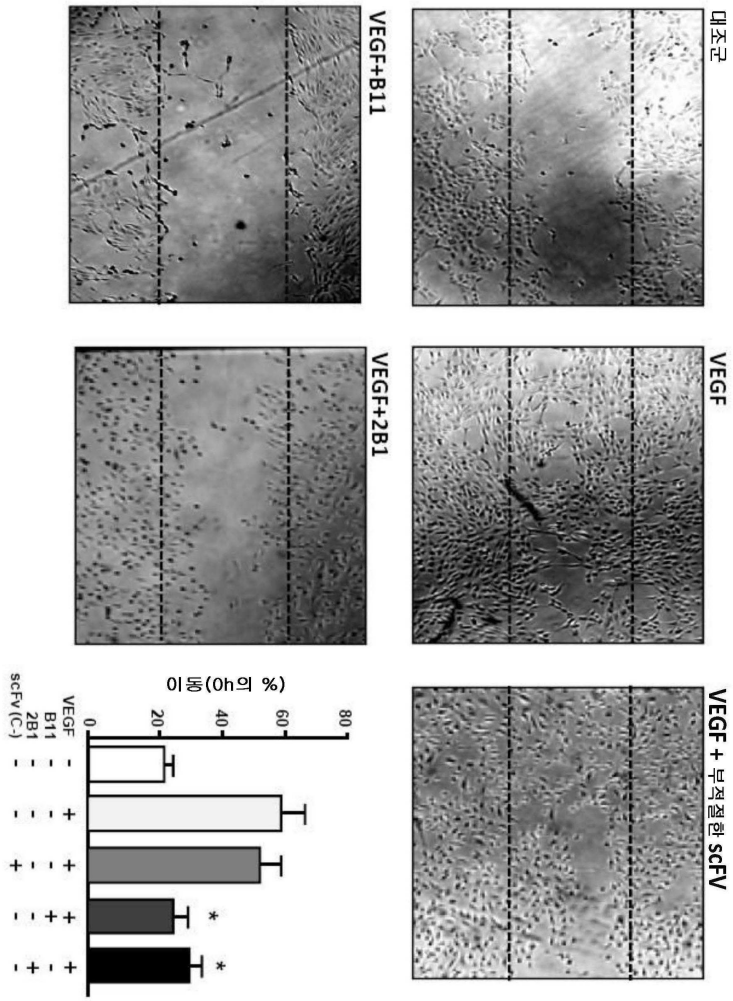
B


160
105
160
105
IP:EphB4
WB: pTyr
IP:EphB4
WB: EphB4
HUVEC + + + + -
HEK293-EFNB2 - + + + +
scFv B11 - - + - -
scFv 2B1 - - - + -

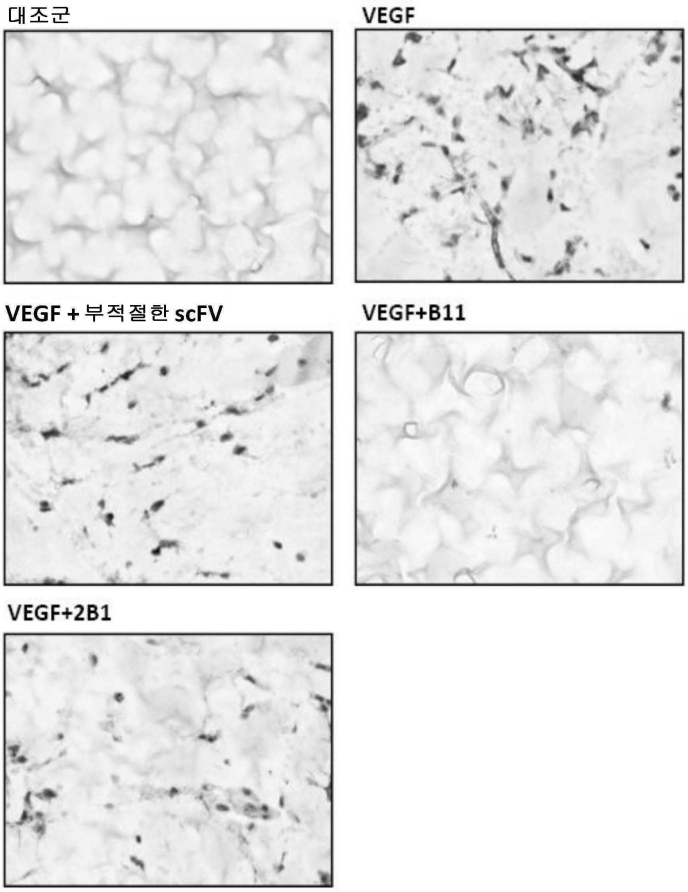
도면6


대조군
B11
2B1
부적절한 scFV
%튜브억제율
0
20
40
60
80
100
120
대조군
B11
2B1
부적절한 scFV
*
*

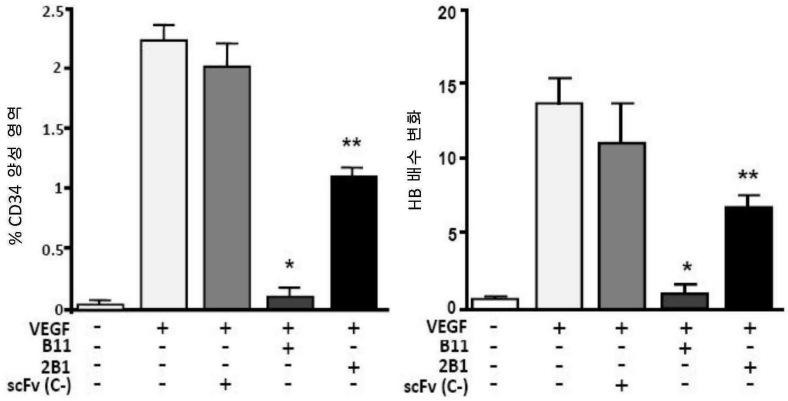
도면7


대조군
VEGF+B11
VEGF
VEGF+2B1
VEGF + 부적절한 scFV
이동(0h의 %)
0
20
40
60
80
VEGF
B11
2B1
scFv(C-)
*
*

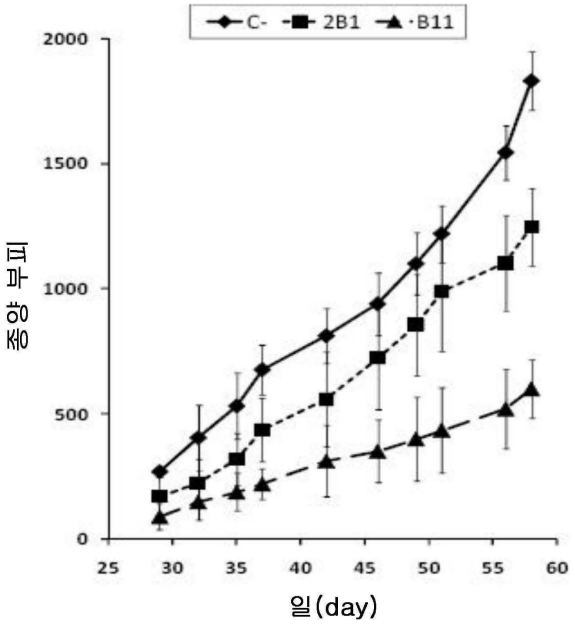
도면8a


대조군
VEGF
VEGF + 부적절한 scFV
VEGF+B11
VEGF+2B1

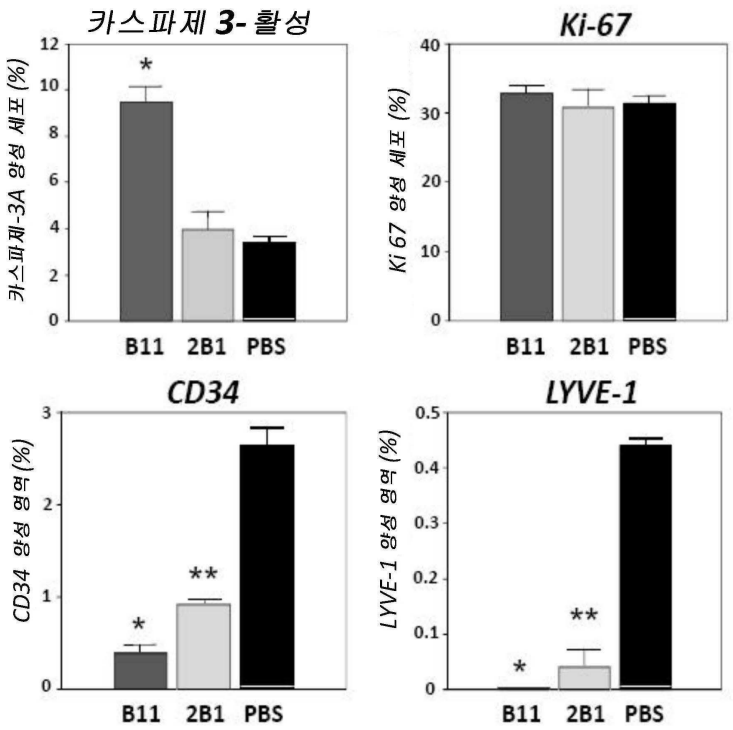
도면8b


% CD34 양성 영역
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
**
VEGF - + + + +
B11 - - - + -
2B1 - - - - +
scFv (C-) - - + - -
HB 배수 변화
20
15
10
5
0
*
**
VEGF - + + + +
B11 - - - + -
2B1 - - - - +
scFv (C-) - - + - -

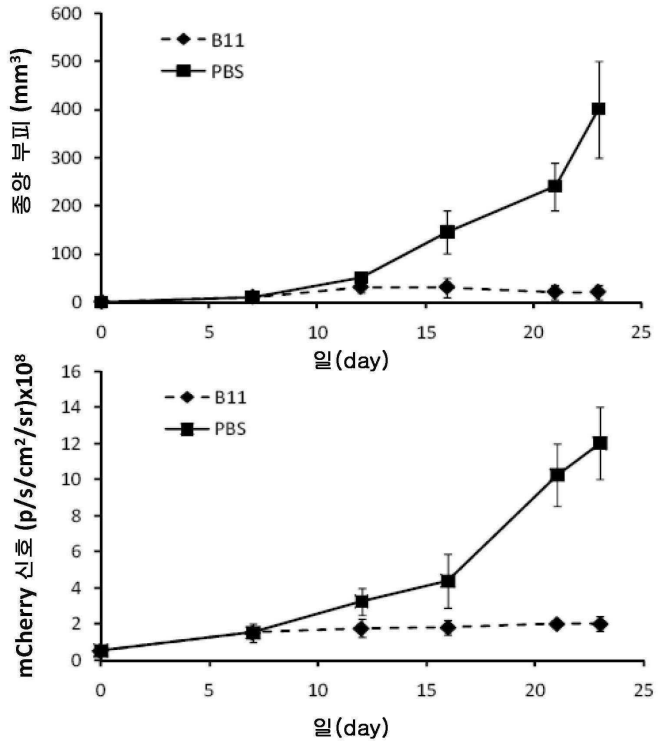
도면9


C-
2B1
B11
종양 부피
2000
1500
1000
500
0
25
30
35
40
45
50
55
60
일(day)

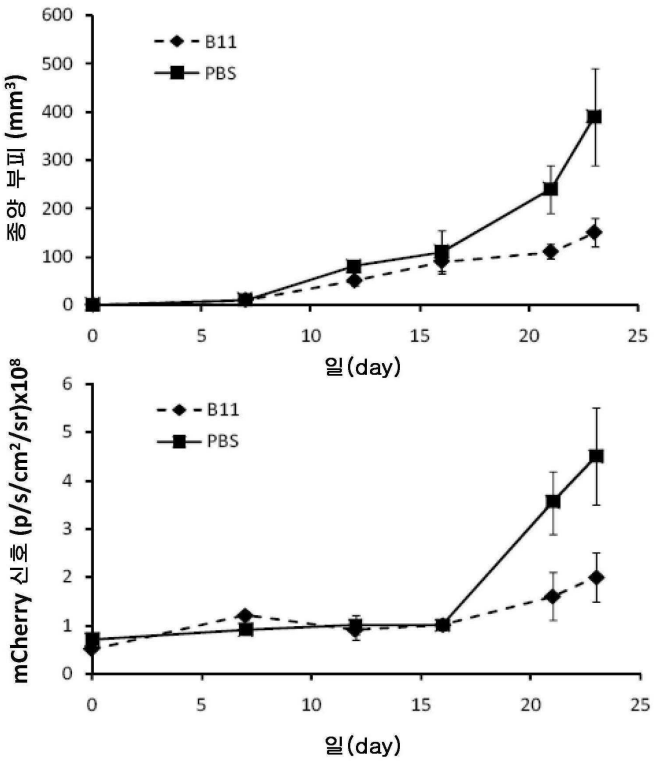
도면10


카스파제 3-활성
카스파제-3A 양성 세포 (%)
Ki-67
Ki 67 양성 세포 (%)
CD34
CD34 양성 영역 (%)
LYVE-1
LYVE-1 양성 영역 (%)
B11
2B1
PBS

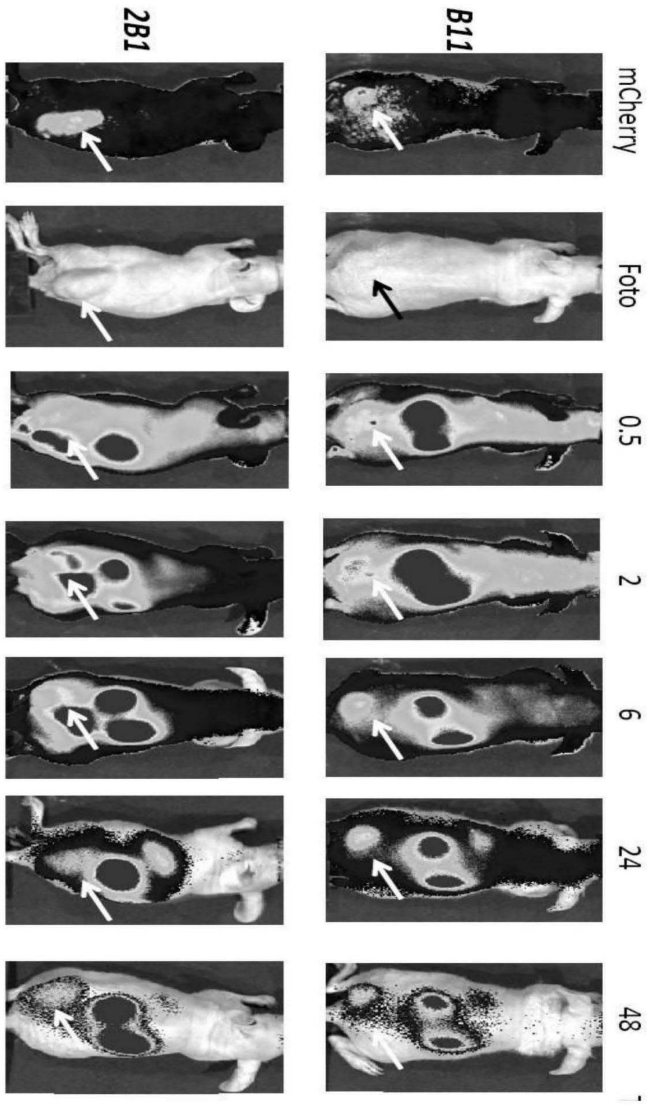
도면11a


종양 부피 (mm³)
B11
PBS
일(day)
mCherry 신호 (p/s/cm²/sr)x10⁸
B11
PBS
일(day)

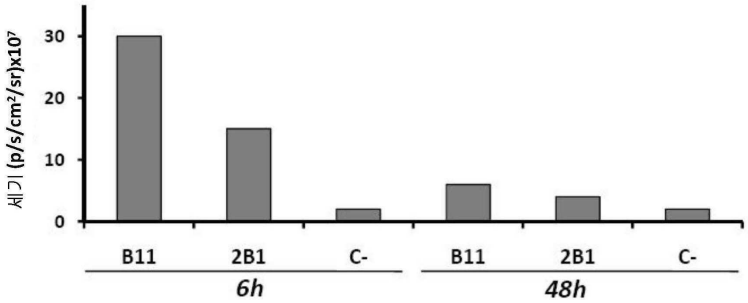
도면11b


종양 부피 (mm³)
B11
PBS
일(day)
mCherry 신호 (p/s/cm²/sr)x10⁸
B11
PBS
일(day)

도면12a



도면12b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Fundacion Centro Nacional de Investigaciones Oncologicas (CNIO)

<120> Ephrin B2 antibody and its use

<130> ES1599.10

<150> ES201031402

<151> 2010-09-21

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 256

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Ser Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln
50 55 60

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Ile Thr Gly Thr Ala Thr Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
145 150 155 160

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
165 170 175

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu
180 185 190
Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
195 200 205
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp

210 215 220
Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly Leu Leu Ser Pro Val Thr Phe
225 230 235 240
Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Thr
245 250 255

<210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> sense primer for verifying the sequence of the scFv
<400> 2
cataatgaaa tacctattgc cta 23

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> antisense primer for verifying the sequence of the scFv
<400> 3
cttattagcg tttgccatt 19
<210> 4
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> sense primer with the RcaI target
<400> 4
cagtcatcat gaaataccta ttgcctac 28
<210> 5
<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer with the XhoI target

<400> 5

caccggactc gagtgcggcc ccattcag 28

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Erwinia carotovora

<400> 6

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala
20

<210> 7

<211> 301

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> scFv from clon B11 including the signal peptide and the markers c-myc and histidine chain.

<400> 7

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
20 25 30

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly
35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
50 55 60

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Ser Ser Gly Asn Thr
65 70 75 80

Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr

85 90 95

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp

100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ile Thr Gly Thr Ala Thr Gly

115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly

130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr

180 185 190

Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu

195 200 205

Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

210 215 220

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val

225 230 235 240

Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly Leu Leu Ser

245 250 255

Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Lys Arg Thr Val

260 265 270

Ala Ala Pro Thr Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp

275 280 285

Leu Asn Gly Ala Ala Leu Glu His His His His His His

290 295 300

<210> 8

<211> 291

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> scFv from clon 2B1.

<400> 8

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly

20 25 30

Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

35 40 45

Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile

65 70 75 80

Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

85 90 95

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

100 105 110

Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly His Arg Thr Ser Asp Ala Phe

115 120 125

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Val Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Thr Cys Gly Gly Asp Ser Ile Gly Leu Lys Ser Val His Trp Tyr Gln

180 185 190

Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Ser Ser Asp Ser Asp

195 200 205

Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn

210 215 220

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp

225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Met Val Phe Gly
245 250 255
Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser

260 265 270
Ala Ala Ala Leu Glu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His His His
275 280 285
His His His
290