

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024년 9월 6일 (06.09.2024)



(10) 국제공개번호
WO 2024/181783 A1

(51) 국제특허분류:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 9/14 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/002554

(22) 국제출원일:

2024년 2월 28일 (28.02.2024)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0027030 2023년 2월 28일 (28.02.2023) KR

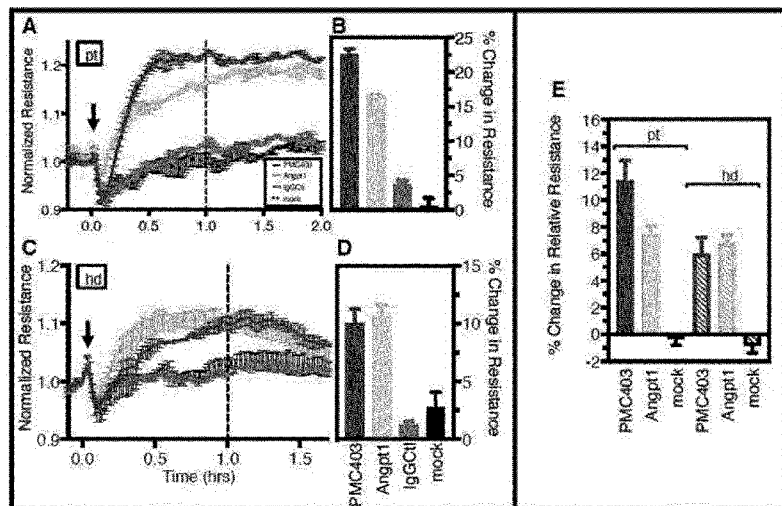
(71) 출원인: 주식회사 파맵신 (PHARMABCINE INC.) [KR/KR]; 34047 대전광역시 유성구 유성대로1689번길 70, 연구2동, 2층, Daejeon (KR). 더 유나이티드 스테이츠 오브 어메리카, 애즈 리프리젠티드 바이 더 셰크레테리, 디파트먼트 오브 헬스 앤드 휴먼 서비스즈 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) [US/US]; 20892 메릴랜드주 베서스다 엠에스씨 7788, 스위트 700, 6701 록리지

드라이브, 내셔널 인스티튜츠 오브 헬스, 오피스 오브 테크놀로지 트랜스퍼, Maryland (US).

(72) 발명자: 유진산 (YOO, Jin-San); 34124 대전광역시 유성구 엑스포로339번길 320, #2-101, Daejeon (KR). 이원섭 (LEE, Weon Sup); 34120 대전광역시 유성구 가정로 65, #102-1106, Daejeon (KR). 심상렬 (SHIM, Sang Ryeol); 34022 대전광역시 유성구 배울1로 35, #409-1501, Daejeon (KR). 정보영 (JEONG, Boyoung); 34083 대전광역시 유성구 은구비로 31, #509-801, Daejeon (KR). 박천호 (PARK, Cheon Ho); 34118 대전광역시 유성구 가정로 43, #106-803, Daejeon (KR). 이은아 (LEE, Eun Ah); 34088 대전광역시 유성구 지족로 92, #105-402, Daejeon (KR). 박범용 (PARK, Beomyong); 35205 대전광역시 서구 청사로 281, #202-206, Daejeon (KR). 강누리 (KANG, Nu Ri); 34200 대전광역시 유성구 상대남로 26, #904-1201, Daejeon (KR). 김부연 (KIM, Bu Yeon); 34546 대전광역시 동구 계족로437번길 42, Daejeon (KR). 드루이커크 메튜 (DRUEY, Krik Matthew); 20892-7788 메릴랜드주 베서스다 엠에스씨 7788, 스위트 700, 6701 록리지 드라이브, 국립 보건원, 오티티 내, Maryland (US).

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING SYSTEMIC CAPILLARY LEAK SYNDROME

(54) 발명의 명칭: 전신 모세혈관 누출 증후군의 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention pertains to a composition for preventing or treating systemic capillary leak syndrome (SCLTimeS), the composition containing a Tie2 receptor activating agent as an active ingredient.

(57) 요약서: 본 발명은 전신 모세혈관 누출 증후군 (Systemic Capillary Leak Syndrome: SCLS) 의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, Tie2 수용체 활성화 제제를 유효성분으로 포함하는 전신 모세혈관 누출 증후군의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]

아블루글루아라랏 젠 (ABLOOGLU, Ararat Jan); 20892-7788 메릴랜드주 베서스다 엠에스씨 7788, 스위트 700, 6701 록리지 드라이브, 국립 보건원, 오티티 내, Maryland (US). 드사이아브히셱 아지쿠마르 (DESAI, Abhishek Ajikumar); 20892-7788 메릴랜드주 베서스다 엠에스씨 7788, 스위트 700, 6701 록리지 드라이브, 국립 보건원, 오티티 내, Maryland (US).

(74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06210 서울특별시 강남구 언주로 430, 16층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 전신 모세혈관 누출 증후군의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 전신 모세혈관 누출 증후군 (Systemic Capillary Leak Syndrome: SCLS)의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, Tie2 수용체 활성화 제제를 유효성분으로 포함하는 전신 모세혈관 누출 증후군의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] SCLS는 치명적인 잠재적 혈관 누출의 일시적인 현상을 특징으로 하는 원인 불명의 드문 질병이다. SCLS와 관련된 주요 징후와 증상은 저혈압, 헤모글로빈 및 헤마토크릿 수치 상승, 저알부민 혈증을 포함하고, 환자들은 표피 미세혈관계가 비 에피소드 단계 (non-episodic phase)에서 히스타민 또는 모르핀에 노출되면 과민성을 나타낸다. SCLS와 관련된 알려진 바이오마커는 없지만, 대부분의 환자 (68-85%)는 MGUS(monoclonal gammopathy of unknown significance)를 가지고 있다 (Amoura, Z., et al., *Systemic capillary leak syndrome: report on 13 patients with special focus on course and treatment*. Am J Med, 1997. 103(6): p. 514-9.0).
- [4] 또한, 급성 SCLS 발작에 특징적인 혈관 투과성 항진의 근저에 있는 공통의 조직학적 및 생화학적 메커니즘은 내피 형상의 변화와 환자의 에피소딕 혈청 (episodic serum)에서의 안지오포이에틴 2(Angpt2 angiopoietin2)와 혈관 내피 성장 인자 (VEGF vascular endothelial growth factor)와 같은 혈관신생 투과성 인자 수준의 증가이다. Angpt2와는 달리, 상동체인 Angpt1은 내피 혈관계를 안정화시키는 것으로 알려져 있기 때문에, 이러한 혈관신생 투과성 요인으로부터 안지오포이에틴과 관련된 내피 투과성의 복잡한 특성이 분명하게 된다.
- [5] 흥미롭게도, Angpt1과 Angpt2는 내피세포상 동일한 수용체 Tie2 (면역 글로불린 유사 및 EGF 유사 도메인을 갖는 티로신 키나아제)에 결합하고, SCLS 질환에서 Tie2 관련 혈관 안정성은 더 평가해야 할 것으로 남아 있다. 정맥내 면역 글로불린 투여(IVIG intravenous immunoglobulin administration) 또는 테오필린 (theophylline) 및/또는 테르부탈린 (terbutaline) 투여는 소수의 환자 그룹에서 증상을 다소 감소시키는 것으로 보이며, 치료에 대한 신규한 치료적 접근을 제공할 수 있다는 점에서, SCLS의 병인 중 Tie2 수용체 기능을 밝히기 위해 연구에 착수했다.
- [6] 이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 Tie2 수용체 활성화 제제를 SCLS 환자 유래의 내피세포 생체외에서 사용하고, SCLS 감수성 마우스 모델 (SJL)의 생체내에 사용한 결과, 혈관 누출 중재자 (히스타민, VEGF, LPS 및

TNF α)에 노출된 경우, 환자 유래의 내피세포는 Tie2 수용체 활성화 제제로 전처리된 경우 세포간 상호작용을 유지하고, 치사량의 히스타민에 노출되었을 때 생존율이 크게 개선되었고, 히스타민에 대한 과민증도 크게 회복되며, 히스타민 또는 VEGF에 노출되었을 때 전신 또는 피부의 혈관누출이 과도하게되는 경향이 없어지며, 호흡기 감염에 의해 유발된 혈관 투과성 항진도 개선됨을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[7]

[8] **발명의 요약**

[9] 본 발명의 목적은 전신 모세혈관 누출 증후군의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[10] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Tie2 수용체 활성화 제제를 포함하는 전신 모세혈관 누출 증후군 (SCLS: systemic capillary leak syndrome)의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[11] 본 발명은 또한, Tie2 수용체 활성화 제제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 전신 모세혈관 누출 증후군의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[12] 본 발명은 더욱이, 전신 모세혈관 누출 증후군의 예방 또는 치료에 사용하는 제제의 제조에 사용하기 위한 Tie2 수용체 활성화 제제의 용도를 제공한다.

[13]

도면의 간단한 설명

[14] 도 1. PMC-403 유도 BOEC 세포 반응의 ECIS 프로파일. SCLS 환자 2(pt)(A, B)와 건강한 기증자로부터 유래된 BOEC(C, D) 세포의 4kHz에서 시간대별 임피던스 $D_{1/2}/Z_{1/2}$ 변화. 혈청 결핍 세포는 $t = 0$ (검은 화살표)에서 PMC-403 (30 mg/ml) (파란색), Angpt1 (200 ng/ml) (녹색), 마우스 IgG 아이소타입 컨트롤 항체 (mIgG2a, 30 mg/ml) (빨간색) 또는 Mock (검정)와 배양되었다. $t=1$ 시간에 관찰된 저항의 최대 변화의 각각의 정량 분석은 B, D에 표시된다. 3 명의 다른 환자 (pt)와 3 개의 다른 건강한 기증자 (hd) 유래 BOEC의 데이터를 결합한 저항의 상대적인 변화를 패널 E에 나타낸다. 각 pt 및 hd BOEC 군주를 사용한 실험은 특정 세포주에 대해 적어도 3회 이상 반복되었다. 평균값으로 표시하였다($\pm$ sem). 상대 저항의 변화는 작용제 PMC-403 또는 Angpt1 또는 mIgG2a 아이소 타입 컨트롤 X 100에 대한 모의 존재하에 저항의 변화로 계산된다.[15] 도 2. PMC-403 유도 보호 반응. BOEC 세포는 혈관신생 투과성 인자에 노출되었다: (A, B, C) 히스타민 (pt1 2 mM, hd3 10 mM). (D, E, F) VEGF (pt1 10 ng/ml, hd3 70 ng/ml). (G, H, I) LPS (pt1 33 ng/ml, hd2 100 ng/ml) 및 (J, K, L) TNF α (pt1 100 pg/ml, hd2 100 pg/ml). 시간대별 4kHz에서 기록된 임피던스 $D_{1/2}/Z_{1/2}$ 변화. 혈청 결핍 상태의 BOEC는 먼저 PMC-403 (30 mg/ml, 청색) 또는 mIgG2a (30 mg/ml, 빨강) (검은 화살표)로 전처리되었다. 약 2시간 후, 작용제를 ECIS 웰에 첨가하였다(검은 화살표). 작용제 반응은 임피던스의 최대 감소에 대한 영향으로 결정되

었다 (점선). 실험은 적어도 2회 이상 반복되었다. 3명의 환자 (pt)와 3명의 건강한 기증자 (hd)로부터의 BOEC로부터 시험한 각 작용제의 데이터를 조합한 보호 반응의 정량 분석을 패널 C, F, I, L에 나타내었다. DIgG 아이소타입 컨트롤의 전처리된 세포에서 내성의 변화. % Protection = $[(1 - \text{PMC-403 또는 Angpt1 또는 모의 전처리 세포에서 작용제에 의한 내성 변화}) / \Delta] \times 100$.

- [16] 도 3. PMC-403 보호효과에 대한 BOEC 세포 고해상도 이미징. 히스타민으로 치료 한 SCLS 환자 BOEC (pt1)의 대표적인 면역 형광 이미지. 혈청 결핍 상태의 BOEC의 합류 단층을 PMC-403 (30 $\mu\text{g} / \text{ml}$) 또는 mIgG2a(30 $\mu\text{g} / \text{ml}$)로 전처리하였다. 항체 전처리 2 시간 후 각 웰에 히스타민을 첨가하고 15 분 후에 각 샘플을 고정하고 VE-cadherin (녹색), F-액틴을 확인하기 위한 F-actin (빨간색) 및 DAPI (청색)에 대해 염색했다. PMC-403으로 처리된 웰에서는 세포간 접합부 사이의 갭이 줄어든다(흰색 화살표). 스케일 바 10mm.
- [17] 도 4. 전신성 히스타민 챌린지 SCLS 감수성 마우스(SJL/J)는 PMC-403으로 전처리하면 더 오래 생존하고 과민성이 낮다. SJL/J 마우스 복강 내 치사량 (10 mg / kg)의 히스타민 주사 2 시간 전에 PMC-403 (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 mIgG2a(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 전처리 하였다. (A) 전신 히스타민 투여 동물에서 사망 확률을 나타내는 생존 플롯의 카플란 - 마이어 분석. (B) 히스타민에 대한 과민증 : 과민증은 전신 히스타민 주사 30 분 후에 생존하고 살아있는 것으로 기록된 동물로 결정된다. n PMC-403 = 11, n mIgG2a= 12; $\pm\text{sem}$; *, $p = 0.0175$.
- [18] 도 5. 히스타민의 전신 투여는 혈관 누출을 유발하지만 SJL/J 마우스에서 PMC-403 전처리하는 경우 혈관 누출을 유발하지 않는다. (A, B, C) 히스타민을 전신 주사하면 근육과 피부에 혈관 누출이 유발되었다. EB를 r.o. 주사한 다음 아치 사용량의 히스타민 (2.5 mg/kg)을 i.p. 주사하였다: ** $p < 0.003$, *** $p < 0.0002$. (D, E, F) PMC-403 전처리는 히스타민 유발 혈관 누출을 억제시킨다 : 항체를 정맥 내 주사하고 2 시간 후에 EB를 정맥 내 주사 한 후 히스타민 (2.5 mg / kg)을 복강 내 주사했다. (A, D) 혈관외부누출 염료는 조직/장기의 건조 중량에 대해 정규화되며 대조 PBS (C) 또는 mIgG2a(F)에 비해 배율 변화로 표시된다. 각 기호는 한 마리의 마우스를 나타내며 사용된 동물의 수를 나타낸다 : n_{PBS} = 7, n_{히스타민} = 9, n_{히스타민 + PMC-403} = 9, n_{히스타민 + mIgG2a} = 7. 평균값을 보여준다 ($\pm\text{sem}$): *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ns, 유의하지 않음.
- [19] 도 6. SJL/J 마우스의 피부 혈관계는 히스타민을 피내 투여했을 경우(마일즈 분석)에 누출의 영향을 받기 쉬웠지만, PMC-403으로 전처리한 마우스에서는 피부 혈관 누출이 대폭 감소했다. (A) 피내 히스타민 처리 마우스로부터의 피부 생검. (B) 피부 생검에서 EB 혈관 외 누출의 정량화. 혈관 외부 누출 염료는 피부 샘플의 건조 중량에 대해 표준화되었으며 대조군 mIgG2a(C)에 비해 배율 변화로 나타났다. 제1 항체를 i.v. 주사하고, 2시간 후에 EB를 r.o. 주사한 후, 히스타민을 i.d. 주사하였다. 사용한 동물의 수: n_{PMC-403} = 9, n_{mIgG2a} = 9. 평균값을 나타낸다 ($\pm\text{sem}$): **, $p < 0.002$. ****, $p < 0.0001$; ns, 유의하지 않음.

- [20] 도 7. VEGF를 피부에 접종하면 PMC-403으로 전처리된 SJL / J 마우스의 피부에서 혈관 누출이 크게 감소했다. (A) 피내 히스타민 처리 마우스로부터의 피부 생검. (B) 피부 생검에서 EB 혈관외 누출의 정량화. 혈관 외부 누출 염료는 피부 샘플의 건조 중량에 대해 표준화되었으며 대조군 mIgG2a(C)에 비해 배율 변화로 나타났다. t-2시간에 항체를 정맥내 주사하고, t-30분에 백그라운드를 감소시키기 위해 말레산 피릴라민을 복강내 투여하고, t=0시간에 EB를 복강내 주사한 후, VEGF를 복강 내 내부 주사했다. 사용한 동물의 수: n_{PMC-403} = 5, n_{mIgG2a} = 6. 평균값 ($\pm$ sem): ****, $p < 0.0001$; ns, 유의하지 않음.
- [21] 도 8. PMC-403-Tie2 상호작용의 생화학적 특성.
- [22] 도 9. ECIS에 의해 모니터링되는 BOEC의 히스타민 용량별 반응. (A) D $\frac{1}{2}$ SCLS 환자 1 (pt1) BOEC를 사용하여 4kHz에서 기록된 시간 변화에 따른 임피던스 D $\frac{1}{2}$ Z $\frac{1}{2}$ 변화. 농도 반응은 t = 15 분에서 관찰된 임피던스의 최대 변화에 의해 결정되었다. (B) 15 분에 변화의 대표값 및 농도-반응 곡선을 히스타민 농도의 로그 함수로 플롯팅 (C) 하고 50% 유효농도(EC50)를 결정했다.
- [23] 도 10.pt와 hd BOECs 사이의 Tie2 발현 비교. BOEC에서 Tie2 단백질의 발현 수준은 FACS 분석에 의해 측정되었다. (A) hd # 2 세포 (별표)에서 Tie2 수준과 비교하여 BOEC간에 상대적인 Tie2 발현 수준을 확립했다. Tie2 레벨은 이러한 샘플 간에 유의미한 차이가 없었다. (B) pt vs hd BOEC 간의 Tie2 레벨을 나타내는 누적 데이터. 측정은 pt#4 및 hd#4를 제외하고 적어도 두 번 수행되었다. ns, 유의하지 않음.
- [24] 도 11. VEGF로 처리된 SCLS 환자 BOEC (pt1)의 고해상도 이미지. 혈청 결핍 상태의 BOEC의 합류 단층을 PMC-403(30 μ g/ml) 또는 mIgGa(30 μ g/ml)로 전처리하였다. 2 시간의 항체 전처리 후, 각 웰에 VEGF를 첨가하고, 15 분 후에 각 샘플을 고정하고, VE-cadherin (녹색), F-액틴을 확인하기 위한 phalloidin (적색) 및 DAPI (청색)에 대해 염색했다. 스케일 바 10mm.
- [25] 도 12. LPS로 처리된 SCLS 환자 BOECs (pt1)의 고해상도 이미지. 혈청 결핍 상태의 BOEC의 합류 단층을 PMC-403 (30 μ g/ml) 또는 mIgG2a(30 μ g/ml)로 전처리하였다. 항체 전처리 2 시간 후, LPS를 각 웰에 첨가하고, 10 시간 후에 각 샘플을 고정하고, VE-cadherin (녹색), F-액틴을 확인하기 위한 phalloidin (빨간색) 및 DAPI (청색)에 대해 염색했다. 스케일 바 10mm.
- [26] 도 13. TNF α 로 처리된 SCLS 환자 BOEC (pt1)의 고해상도 이미지. 혈청 결핍 상태의 BOEC의 합류 단층을 PMC-403 (30 μ g/ml) 또는 mIgG2a(30 μ g/ml)로 전처리하였다. 2 시간의 항체 전처리 후, 각 웰에 TNF α 를 첨가하고, 10 시간 후에 각 샘플을 고정하고, VE-cadherin (녹색), F-액틴을 확인하기 위한 phalloidin (적색) 및 DAPI (청색)에 대해 염색했다. 스케일 바 10mm.
- [27] 도 14. LPS로 처리된 SCLS 환자 BOEC (hd2)의 고해상도 이미지. 혈청 결핍 상태의 BOEC의 합류 단층을 PMC-403 (30 μ g/ml) 또는 mIgG2a(30 μ g/ml)로 전처리하였다. 항체 전처리 2 시간 후, LPS를 각 웰에 첨가하고, 10 시간 후에 각 샘플을 고

정하고, VE-cadherin (녹색), F-액틴을 확인하기 위한 phalloidin (빨간색) 및 DAPI (청색)에 대해 염색했다. 스케일 바 10mm.

- [28] 도 15. $\text{TNF}\alpha$ 로 처리한 SCLS 환자 BOEC (hd2)의 고해상도 이미지. 혈청 결핍 상태의 BOEC의 합류 단층을 PMC-403 ($30\mu\text{g/ml}$) 또는 mIgG2a($30\mu\text{g/ml}$)로 전처리 하였다. 2 시간의 항체 전처리 후, 각 웰에 $\text{TNF}\alpha$ 를 첨가하고, 10 시간 후에 각 샘플을 고정하고, VE-cadherin (녹색), F-액틴을 확인하기 위한 phalloidin (적색) 및 DAPI (청색)에 대해 염색했다. 스케일 바 10mm.

[29]

[30] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

- [31] 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.

- [32] 본 발명은 전신 모세혈관 누출 증후군 (SCLS: systemic capillary leak syndrome) 관련 사이토카인에 의해 유발된 내피세포 (EC endothelial cell) 장벽 기능장애에 대한 Tie2 수용체 활성화 제제 기반 효과를 확인한 결과이다. SCLS의 포유류 모델에서 혈관 누출을 방지하기 위한 Tie2 수용체 활성화 제제의 효능을 확인하였다.

- [33] 하나의 실시예에서, 상기 Tie2 수용체 활성화 제제는 Tie2 수용체에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.

- [34] "항체(antibody)"는 Tie2에 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 범위에는 TIE2에 특이적으로 결합하는 완전한 항체 형태뿐 아니라, 상기 항체 분자의 항원 결합 단편도 포함된다.

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

- [36] 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 다이설파이드 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 다이며와 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.

- [37] 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.
- [38] "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, "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.
- [39] Tie2 수용체 활성화 제제는 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.
- [40] 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.
- [41] "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.
- [42] 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 초가변 영역으로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 중

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

- [43] 상기 "인간 항체"는 인간 면역글로불린으로부터 유래하는 분자로서 상보성 결정 영역, 구조 영역을 포함한 항체를 구성하는 모든 아미노산 서열 전체가 인간의 면역글로불린으로 구성되어 있는 것을 의미한다.
- [44] 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.
- [45] "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.
- [46] "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.
- [47] 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 가변영역을 포함한다 (이하, PMC-403).
- [48] "골격 영역" (FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각 가변 도메인은 전형적으로, FR1, FR2, FR3 및 FR4로서 확인된 4개의 FR을 가진다.
- [49] TIE2 항체는 1가 또는 2가이고, 단쇄 또는 이중 쇠를 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.

- [50] 상기 TIE2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 7의 중쇄 가변영역 및 서열번호 8의 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [51] 상기 TIE2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편을 코딩하는 단리된 핵산 분자를 포함할 수 있다.
- [52] "단리된 핵산 분자"는 전체 핵산이 공급원 세포로부터 단리될 때 그와 함께 자연에서 발견되는 단백질, 지질, 탄수화물, 또는 다른 물질의 약 50% 이상으로부터 분리되었거나, 자연에서는 연결되지 않는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결되거나, 또는, 보다 큰 폴리뉴클레오티드 서열의 일부로서 자연에서 발생하지 않는 본 발명의 핵산 분자를 의미한다. 구체적으로, 본 발명의 단리된 핵산 분자에는 임의의 다른 오염 핵산 분자, 또는 폴리펩타이드 생산 또는 그의 치료, 진단, 예방 또는 연구 용도에서 그의 사용을 저해하는 그의 천연 환경에서 발견되는 다른 오염물이 실질적으로 존재하지 않는다.
- [53] 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 양 전하를 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.
- [54] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 항체 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열번호에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)은 NCBI 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용될 수 있다. BLAST는 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프

로그그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

- [55] 이에 기초하여, 본 발명의 항체 또는 이의 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.
- [56] 상기 단리된 핵산분자를 포함하는 발현벡터를 제공한다.
- [57] 본 발명에서 사용하는 용어 "발현벡터"란, 숙주 세포의 형질전환에 적합하고 삽입된 이중 핵산 서열의 발현을 지시하거나 제어하는 핵산 서열을 함유하는 벡터를 의미한다. 상기 벡터는 선형(linear) 핵산, 플라스미드, 파지미드(phagemids), 코스미드(cosmids), RNA 벡터, 바이러스 벡터 및 이의 유사체들을 포함한다. 상기 바이러스 벡터의 예로는 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 및 아데노-관련 바이러스(adeno-associated virus)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [58] 본원에서 사용된 용어, 목적 단백질의 "이중 핵산 서열의 발현" 또는 "발현"은, 삽입된 DNA 서열의 전사, mRNA 전사체의 번역, 및 융합 단백질 생산물 또는 항체 또는 항체 단편의 생산을 의미한다.
- [59] 유용한 발현 벡터는 RcCMV(Invitrogen, Carlsbad) 또는 이의 변이체일 수 있다. 유용한 발현 벡터는 포유류 세포에서 목적 유전자의 연속적인 전사를 촉진하기 위한 인간 CMV(cytomegalovirus) 프로모터, 및 전사 후 RNA의 안정상태 수준을 높이기 위한 우태 성장 인자(bovine growth hormone) 폴리아데닐레이션 신호 서열을 포함할 수 있다.
- [60] 상기 발현벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.
- [61] 본원에서 사용된 용어 "숙주세포"는 재조합 발현 벡터가 도입될 수 있는 원핵 및 진핵 세포를 나타낸다. 본원에서 사용된 용어, "형질전환된" 및 "형질감염된"은 당업계에 공지된 많은 기술에 의한 세포 내로의 핵산(예를 들어, 벡터)을 도입하는 것을 의미한다.
- [62] 상기 숙주세포는 본 발명의 DNA 서열로 형질 전환되거나 형질 감염시킬 수 있으며, 목적 단백질의 발현 및/또는 분비에 이용될 수 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 숙주 세포는 불사의 하이브리도마 세포(immortal hybridoma cells), NS/0 골수종 세포(NS/0 myeloma cells), 293 세포, 중국 햄스터 난소 세포(CHO cell), HeLa 세포, CAP 세포 (인간 양수 유래 세포), 또는 COS 세포를 포함할 수 있다.
- [63] 상기 Tie2 수용체 활성화 제제는 혈관 누출 유도제 (vascular leakage mediators)에 노출된 혈관 내피세포의 보호 반응을 통해 혈관 누출을 감소시킬 수 있다. 상기 Tie2 수용체 활성화 제제는 혈관 누출 유도제에 대한 과민증을 개선시킬 수 있다. 이 때, 상기 혈관 누출 유도제는 히스타민, VEGF (vascular endothelial growth

factor), LPS (lipopolysaccharide) 및 TNF α (Tumor necrosis factor- α)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[64] 또한, 상기 Tie2 수용체 활성화 제제는 호흡기 바이러스 감염에 의해 유발된 혈관 투과성 항진 (vascular hyperpermeability)을 완화시킬 수 있다.

[65] 인간과 마우스 모두에서 Tie2 수용체를 인식하는 완전 인간화된 마우스 항체 (PMC-403)를 사용하였다. 표준 투과성 중재자 (canonical permeability mediators)를 가지는 SCLS 환자와 정상 인간 기증자 유래 혈액 신장 내피 세포 (BOEC blood-outgrowth endothelial cells)를 이용한 전기 세포 기질 임피던스 감지 (ECIS electric cell-substrate impedance sensing)를 사용하여 EC 장벽 기능을 실시간으로 평가하였다. 또한, 면역형광 (IF) 및 FACS를 통해 인간 유래 BOEC 세포 및 세포 내 조직에 대한 PMC-403의 영향을 테스트했다. 이러한 생체 내 관찰을 강화하기 위해 SCLS 감수성 마우스 모델 (SJL SCLS-susceptible mouse model)을 사용하여 SJL 마우스에서 히스타민 유발, VEGF 유발 및 인플루엔자 유발 전신 및 피부 혈관 누출에 대한 PMC-403의 생리학적 역할을 평가했다.

[66] Tie2 수용체 활성화 항체 (PMC-403)를 SCLS 환자 유래의 내피세포 생체외에서 사용하고, SCLS 감수성 마우스 모델 (SJL)의 생체내에서 사용하였다. 혈관 누출 중재자 (히스타민, VEGF, LPS 및 TNF α)에 노출된 경우, 환자 유래의 내피세포는 아이소타입 컨트롤 항체가 아닌 PMC-403으로 전처리되었을 때 세포간 상호작용을 유지했다. 게다가, SJL 마우스에게 PMC-403 항체를 투여하면, 치사량의 히스타민에 노출되었을 때 생존율이 크게 개선되었고, 히스타민에 대한 과민증도 크게 회복되었다. 아마도 가장 흥미로운 관찰은 PMC-403으로 전처리된 동물이 히스타민 또는 VEGF에 노출되었을 때 전신 또는 피부의 혈관누출이 과도하게 되는 경향이 없었다는 것이다. 마지막으로 호흡기 감염에 의해 유발된 혈관 투과성 항진도 개선되는 것으로 보인다. 전반적으로, 이러한 관찰은 PMC-403이 혈관 장벽 기능에 대한 조절 장애가 있는 SCLS와 같은 질병의 잠재적인 치료제로 간주될 수 있다는 견해를 지지한다.

[67] 이를 바탕으로, 본 발명은 Tie2 수용체 활성화 제제를 포함하는 전신 모세혈관 누출 증후군의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 Tie2 수용체 활성화 제제를 개체에 투여하는 전신 모세혈관 누출 증후군의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다. 본 발명은 전신 모세혈관 누출 증후군의 예방 또는 치료용 조성물 제조에 Tie2 수용체 활성화 제제를 사용하기 위한 용도에 관한 것이다.

[68] 상기 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다.

[69] 약학 조성물은 어떠한 경로로도 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 직접적으로(예, 조직 부위에 주입, 이식 또는 국부적으로 투여함으로써, 국소적으로) 또는 시스템적으로(예, 비경구 또는 경구로) 임의의 적절한 수단에 의하여 동물에게 제공될 수 있다. 본 발명의 조성물이 정맥 내, 피하, 눈(ophthalmic), 복강 내, 근육 내, 구강, 직장, 안와 내(intraorbital), 뇌 내(intracerebral), 두개 내(intracranial), 척추 내(intraspinal), 뇌실 내(intraventricular), 수막강 내(intrathecal), 조내(intracisternal),

캡슐 내(intracapsular), 비 내(intranasal) 또는 에어로졸 투여와 같이 비경구적으로 제공되는 경우, 약학 조성물은 예를 들면, 수성(aqueous) 이거나 생리학적으로 적용가능한 체액 현탁액 또는 용액의 부분을 포함할 수 있다. 이에 따라, 담체 또는 운반체(vehicle)가 생리학적으로 허용가능하므로 조성물에 첨가하여 환자에게 전달될 수 있다. 따라서, 제제를 위한 체액과 같은 담체로 일반적으로 생리식염수를 포함할 수 있다.

[70] 또한, 투여 빈도는 사용되는 제제의 약동학적 파라미터에 따라 달라질 것이다. 전형적으로, 임상의는 목적 효과를 달성하는 투여량에 도달할 때까지 약학 조성물을 투여할 것이다. 따라서, 약학 조성물은 단일 용량으로서, 시간 간격을 둔 2 회 이상의 용량으로서, 또는 이식 장치 또는 카테터를 통한 연속 주입으로서 투여될 수 있다. 적절한 투여량의 추가의 정밀화는 당업자에 의해 일상적으로 이루어지고, 그들에 의해 일상적으로 수행되는 업무 영역 내에 해당한다.

[71] 또한, 단위 투여량은 인간에 있어서 $0.01 \mu\text{g/kg}$ 내지 100 mg/kg 이며, 구체적으로, $1 \mu\text{g/체중kg}$ 내지 10 mg/kg 이다. 상기 함량이 최적량이긴 하나, 치료대상 질환 및 부작용의 유무에 따라 달라질 수 있으며, 최적의 투여량은 통상적인 실험을 이용하여 결정될 수 있다. 융합 단백질의 투여는 주기적인 급속 주입(periodic bolus injections)에 의하거나, 외측 공급원(external reservoir) (예, 정맥주사 보유주머니(intravenous bag)) 또는 내측(예, 생체부식성 임플란트(bioerodable implant))으로부터의 지속적인 정맥 내, 피하, 또는 복막 내 투여에 의할 수 있다.

[72] 적합한 경로에는 경구, 비경구 (피하, 근육내, 정맥내, 동맥내, 흡입, 피내, 수막강내, 경막, 및 주입 기술 포함), 경피, 직장, 비내, 국소 (불 및 설하 포함), 질, 복강내, 폐내 및 비내 투여가 포함된다. 국소 투여는 경피 패치 또는 이온삼투요법 장치와 같이 경피 투여를 이용하는 것을 포함할 수 있다.

[73] 바람직한 경로는, 예를 들어 수용자의 상태에 따라서 다양할 수 있다. 경구 투여하는 경우에는, 이를 제약상 허용되는 담체, 활택제 또는 부형제와 함께, 환제, 캡셀제, 정제 등으로서 제형화할 수 있다. 비경구 투여하는 경우에는, 이를 제약상 허용되는 비경구 비히클 또는 희석제와 함께, 단위 투여 주사제 형태로 제형화할 수 있다.

[74] 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 담체는 약물의 제제화에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학 조성물은 또한 약학 조성물 제조에 통상적으로 사용되는 희석제, 부형제, 운반제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.

- [75] 상기 약학 조성물, 또는 상기 항체 또는 이의 항원결합단편의 유효량은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [76] 전신 모세혈관 누출 증후군은 모세혈관의 투과성이 일 시적으로 증가하여 혈관 내에서 간질 공간으로 혈장 및 단백질이 이동하는 질환이다.
- [77] "치료"는 임의의 주관적 또는 객관적 매개변수, 예를 들어 경감; 관해; 환자에 대해 더 용인 가능한 증상 또는 손상 생성, 병리 또는 병태의 감소; 퇴보 또는 쇠퇴 속도의 늦춤; 덜 쇠약하게 하는 최종 퇴보 지점의 생성; 환자의 신체적 또는 정신적 웰빙의 개선을 포함하는 손상, 병리 또는 병태의 치료 또는 개선에서의 임의의 성공 징후를 지칭한다. 증상의 치료 또는 개선은 신체 검사, 신경정신병학적 검사 및/또는 정신 의학적 평가를 포함하는 객관적 또는 주관적 매개변수에 기반할 수 있다.
- [78] "유효량"은 일반적으로 증상의 중증도, 빈도를 감소시키거나, 증상, 근본적인 원인을 제거하거나 증상의 발생 또는 근본적인 원인을 예방하거나, 질환 상태에서부터 초래되거나 또는 이와 관련된 손상을 개선시키거나 또는 교정하는 데 충분한 양이다.
- [79] 유효량은 치료적 유효량 또는 예방적 유효량이다. "치료적 유효량"은 질환 상태 또는 증상, 특히 질환 상태와 관련된 상태 또는 증상을 교정하거나, 또는 질환 상태 또는 어떠한 방법으로든 질환과 관련된 임의의 다른 바람직하지 않은 증상의 진행을 달리 예방하거나, 방해하거나, 지연시키거나 또는 반전시키는 데 충분한 양이다. "예방적 유효량"은 대상체에게 투여될 때, 의도된 예방적 효과, 예를 들어, 질환 상태 개시의 예방 또는 지연, 또는 질환 상태 또는 관련 증상의 개시 (또는 재발) 가능성 감소를 갖는 약제학적 조성물의 양이다.
- [80] 실시예
- [81] 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.
- [82] 1. 방법
- [83] 1.1 환자샘플-세포배양
- [84] BOEC (Blood outgrowth endothelial cells)는 SCLS 피험자 또는 정상적인 인간 기증자로부터 준비되었고, IRB 승인 연구 프로토콜 (I-0184) 하에서 미국 국립 보건원 임상센터(Clinical Center of the National Institutes)에서 수집되었다. 10% FBS(GIBCO) 및 VEGFA(+3 ng/ml)를 추가한 EGM2+ 배지(Lonza)를 포함한 I형 콜

라겐으로 코팅된 배양 웰에서, 95% 공기 분위기 및 5% CO₂ 에서 37°C의 일정한 습도하에서 배양하였다.

[85]

[86] 1.2 마일스 검정.

[87] 마우스의 히스타민 유도 피부 혈관누출에 대한 PMC-403 항체의 영향을 평가하기 위해 Miles 분석을 사용했다.

[88] [PMC-403]

[89]

구분		아미노산서열	서열번호
PMC-403	Heavy-chain CDR1	GFTFSDYA	1
	Heavy-chain CDR2	ISFDGNNQ	2
	Heavy-chain CDR3	TTDTMSGYDWEDAFDI	3
	Light-chain CDR1	QSIGRW	4
	Light-chain CDR2	ASS	5
	Light-chain CDR3	QQSYSTPYT	6
중쇄가변영역	QVQLVQSGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMHWVRQAPGKGLE WVALISFDGNNQYYADSVKGRFTISRDN SKNTIYLQMNSLRAEDTAV YYCTTDTMSGYDWEDAFDIWGQGTMITVSS		7
경쇄가변영역	DIQMTQSPSSLSASIGDRVITICRASQSIGRWLAWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQSYSTPYT FGQGTKVEIKR		8

[90] 실험 수행하기 최소 2 일 전에 동물의 등 털을 제거하였다. 동물은 먼저 PMC-403 또는 mIgG2a 이소형 대조군 항체(동물 체중 1kg 당 30mg)를 정맥내(i.v.)에 주사하였다(t-2시간). 2 시간 후(t 0 시간), 동물에게 100 µl의 2 % 에반스 블루 염료(PBS의 EB, Sigma)를 후안와 주사(r.o.)를 통해 주사한 다음 히스타민(625 ng, 125 ng, 25 ng) 또는 식염수(총 50 µl)를 동물의 뒤 피부 중 4 개의 다른 지점에 주입한다. 피내 주사 30 분 후(t 0.5 시간), 등쪽 피부를 12mm 생검 펀치로 채취하고 95 °C에서 밤새 건조시켰다. EB 염료는 포르마미드(Sigma; 65°C에서 24 시간)를 사용하여 건조 샘플로부터 추출하였다. 각 샘플의 EB양은 620 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 결정되었고, 결과는 피부 샘플당 EB 염료량(ng)으로 표현되었고, 분리/건조된 샘플에 대해 정규화되었다. VEGF 유도 피부 혈관 누출은 동물을 다룰 때의 투과성 백그라운드를 줄이기 위해 t-30 분에 복강 내(i.p.) 주사된 말레산 피리라민(pyrilamine maleate PM, 체중 kg 당 4 mg, Sigma)을 사용한 것을 제외하고 치료는 히스타민 치료와 거의 유사했다.

[91]

[92] 1.3 SJL의 생존 분석.

[93] PMC-403 또는 mIgG2a 이소형 대조군 항체(동물 체중 1kg 당 30mg)를 주사한 마우스로부터 각종 조직/장기를 수집하였다. 정맥 내 항체 전달 2 시간 후(t = 2 시

간), 마우스를 히스타민 (10 mg / kg)으로 복강 내 처리하고, 2 시간 관찰하고 사망을 기록 하였다.

[94]

[95] 1.4 전신 혈관 누출 분석.

[96] PMC-403 항체가 다양한 조직/기관에서 혈관 누출을 유발하는지 여부와 보호 효과를 평가하기 위해 마우스에 PMC-403 또는 mIgG2a 아이소타입 컨트롤 항체 (동물 체중 kg 당 30 mg)를 i.v. 주사했다 (t -2 시간). 2 시간 후, PBS 중 2 % EB 100 μ l를 r.o. (t 0 hr.) 주사하였다. EB 염료 주사 직후, 히스타민 10 mg / kg 체중 (PBS 중)을 i.p. 로 주사하였다. 히스타민 주사 15분 후 (t 2.25 hr.), 이소플루란 흡입에 의해 마우스를 깊게 마취시키고, 심장의 좌심실을 통해 헤파린화 PBS 20ml로 관류하였다. 조직을 추출하고 두 부분으로 나누었다: 한 부분을 95 °C에서 밤새 가열하여 건조 중량을 얻었고, 두 번째 부분을 중성 완충 포르말린으로 고정시켰다. 파라핀 포매 조직 절편을 헤마톡실린과 에오신으로 염색하고 현미경으로 조사하였다. EB 염료의 양은 상기 기재된 바와 같이 정량화되었고, 개별 조직의 건조 중량에 의해 정규화되었다. 결과는 상응하는 대조군 (mIgG2a또는 PBS 투여 마우스)에 비해 배율 변화로서 나타내었다.

[97]

[98] 1.5 ECIS[®]를 사용한 임피던스 측정.

[99] 실험은 세포 배양 인큐베이터에 보관된 16-웰 어레이 홀더를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 ECIS 시스템(Applied BioPhysics Inc., Troy, NY, USA)에서 수행되었다. 경내피 전기 저항은 4 kHz의 진폭으로 기록되었다. 실험을 시작하기 전에 1000 옴의 컷오프 저항이 필요했다. 일회용 8-웰 전극 어레이(8w10e+)의 성장 표면을 실온에서 타입 I 콜라겐(220 μ l m/웰, 18mM 아세트산 중 50 μ g m/ml)으로 코팅하였다. 웰을 PBS로 3회 세척하고, 1시간 후에 BOEC 배양 배지(EGM+)로 교체하였다. 이어서 35,000 ~ 60,000 개의 BOEC를 웰당 파종하고 실온에서 30 분간 웰 표면에 부착한 후 8웰 어레이를 ECIS 장치에 넣고 모니터링을 위해 세포 배양 인큐베이터에 밤새 보관했다. 밤새 일정한 임피던스 값에 도달한 후, 세포를 4시간 (t=-4시간) 혈청 결핍시키고, t=0시간 에 하기 방법으로 작용제에 노출시켰다. 혈관 내피 투과성 인자에 노출되면 각 BOEC는 적정 가능한 장벽 파괴를 나타내며 (도 9), 각 작용제의 50% 유효 농도 (half maximal effective concentration values EC50)을 정량화할 수 있도록 한다 (표 1).

[100] [표1]

Apparent EC50 values for each agonist-tested

BOEC	Histamine (μ M)	VEGF (ng/ml)	TNF α (pg/ml)	LPS (μ g/ml)
pt#1	2.7 $\pm$ 0.7	21.9 $\pm$ 13.4	91 $\pm$ 12	0.14 $\pm$ 0.17
pt#2	14.9 $\pm$ 7.2	1.3 $\pm$ 0.3	200 $\pm$ 13	0.03 $\pm$ 0.01
pt#3	0.9 $\pm$ 0.1	13.4 $\pm$ 7.1	332 $\pm$ 150	0.38 $\pm$ 0.30
hd#1	4.3 $\pm$ 1.7	25.7 $\pm$ 27.0	64 $\pm$ 10	0.04 $\pm$ 0.08
hd#2	2300 $\pm$ 390	70.9 $\pm$ 51.6	72 $\pm$ 13	0.09 $\pm$ 0.10
hd#3	8.6 $\pm$ 5.8	53.1 $\pm$ 13.1	12 $\pm$ 16	1.20 $\pm$ 2.50

[101] EC50 측정에서 BOEC를 4가지 농도의 작용제로 2회씩(적어도 2회) 적정하였다. PMC-403의 작용제에 미치는 영향은 먼저 BOEC를 PMC-403 또는 아이소타입 컨트롤 항체 (30 μ g/ml)에 노출시킴으로써 결정되었다. 90 분에서 2 시간 후 ($t = 1.5 \sim 2$ 시간) 다양한 내피 투과성 중재자를 각 테스트 BOEC의 각 EC50값에 첨가하였다. 각 웰의 임피던스 값은 분석의 전체 시간에 걸쳐 60초마다 기록되었고, EC50 측정을 위한 투과성 매개체의 첨가 직전 또는 항체의 첨가 직전의 임피던스 값, 즉 $|Z|(t) = |Z|$ 작용제 또는 항체를 포함하는 샘플 (t) / $|Z|$ 샘플 (t_0)로 정규화되었다.

[102]

[103] 1.6 웨스턴 블롯 분석.

[104] BOEC는 I형 콜라겐 코팅 디쉬로 컨플루언스까지 증식시키고, 0.2% BSA를 포함하는 EBM으로 하룻밤 혈청 기아 상태($t=0$ 시간)에서 PMC-403 또는 IgG2a(30 μ g/ml)를 지시된 시간만큼 처리하였다. 세포를 새로 제조된 PMSF(1 mM)로 보충한 빙냉 PBS로 2회 세척하였다. 1x PhosSTOP 및 1x cOmplete 프로테아제 억제제 콕테일 (Roche, 4693159001, 11836153001)을 첨가한 1x RIPA (EMD Millipore, 20-188)를 사용하여 얼음에 15 분간 세포를 용해시키고 40-50 μ g SDS-PAGE 분석에 사용했다. iBlot™ 2 Dry Blotting System (Invitrogen)을 사용하여 샘플을 니트로 셀룰로오스 막으로 전사했다. 블롯을 실온에서 2 시간 동안 블로킹 완충액 (5 % BSA + 1 TBS + 0.1 % Tween-20 + 50 mM NaCl)으로 차단 하였다. 1차 항체와 함께 블로킹 완충액에서 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다: 마우스 항-인간 Tie-2 (1:1000) (Invitrogen, CD202b). 토끼 항인간 P-Tie-2 (1:500) (IR&D, AF2720); 마

우스 항인간 FKHR (1:500) (Santa Cruz, sc-374427); 토끼 항인간 (S256P) Fox01A (1:1000) (Abkam, ab131339). 멤브레인을 실온에서 1x TBST로 15분 동안 4회 세척하고 실온에서 1시간 동안 2차 항체와 함께 배양하였다. IRDye® 680RD 당나귀 항마우스; IRDye® 800CW 염소 항 토끼 (LI-COR). 세척된 멤브레인은 LI-COR Odyssey 9120 적외선 이미징 시스템으로 이미징되었다.

[105]

[106] 1.7 면역 형광 현미경.

[107] 25,000 BOECs/웰을 타입 I 콜라겐-코팅된 ibTreat 8-웰 슬라이드 상에서 킨플루언스로 성장시키고, 0.2% BSA를 함유하는 EBM에서 4시간(t-4시간) 혈청 기아 상태로 만들고 (t=0 시간) PMC-403 또는 mIgG2a (30 μ g m/ ml)로 작용제 처리 2 시간 전 (t + 2 시간), 표시된 기간 동안 처리하였다. 세포를 PBS 중 4% 파라포름알데히드(Sigma)로 1시간 이상 고정시킨 후, 0.2% Triton X-100 + PBS 중 2.0% BSA(블록킹 완충액)로 4°C에서 밤새 투과시켰다. 항-인간 CD144 항체 (1:150) (BD Pharmingen, 555661)로 4°C에서 밤새 염색시켰다. 웰을 Tween 20 (01 % v / v)을 함유하는 PBS (PBST)로 4 회, 실온에서 각 15 분 동안 세척하였다. 세척된 세포를 블로킹 완충액 중 2차항체 항 마우스 IgG (H + L) Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen A-11017)로 밤새 4°C로 염색하였다. 웰을 PBST로 4 회, 실온에서 각 15 분 동안 세척하고 차단 버퍼 중 Texas red phalloidin (1:80) (Molecular Probes, T7471), DAPI (3 mM)로 90 분 인큐베이션 하였다. 샘플을 PBST로 4회, 실온에서 각각 15분 동안 세척하고, PBS로 2회 세척하고, 이미징까지 4°C로 유지하였다.

[108]

[109] 1.8 유동 세포 계측.

[110] 2 $\times$ 10⁵ 샘플당 BOEC는 실온에서 15분 동안 PBS 중 4% 파라포름알데히드로 고정되었다. 고정 된 세포를 PBS 중 2% BSA로 2 회 세척하고 실온에서 30 분 동안 차단 완충액 (PBS 중 1% BSA + 0.05% Tx100 + 0.05% NaN₃)으로 차단하였다. 세포를 Alexa Fluor® 488 항 인간 CD202b (1:40) (BioLegend clone 33.1 cat#334208), Alexa Fluor® 594 항 인간 CD31 (1:40) (BioLegend clone WM59 cat#3034126)로 얼음 중 2.5hr 동안 염색하였다. 2% BSA를 함유하는 PBST로 2 회 세척하고 FACS 완충액 (PBS 중 1% BSA + 0.05% NaN₃)으로 옮겼다. 모든 BOEC는 CD31 발현이 양성이었다. 미염색 세포와 염색 세포의 기하 평균 이동을 사용하여 각 BOEC에서 Tie2 (CD202b) 발현 수준을 측정하였다.

[111]

[112] 실시예 1. SCLS 환자 유래 BOEC에 의한 정량적 EC 투과성 측정.

[113] SCLS 환자 유래 EC에 대한 PMC-403의 영향을 평가하기 위해 배양 중 성숙 내피세포로의 분화능을 가진 성인 말초 혈액에서 순환 내피 전구세포 (circulating endothelial progenitors)에서 생성된 BOEC 라이브러리를 사용했다. BOEC를 사용하는 주요 이점 중 하나는 환자의 체외 SCLS와 같은 혈관 장애와 관련된 EC 기능 장애를 연구하는 낮은 침습성 접근을 제공하는 것이다. SCLS 또는 건강한

기증자 유래 BOEC에서 세포 간 상호작용에 PMC-403의 영향을 평가하기 위해 ECIS 분석을 사용했다. PMC-403 항체로 처리한 경우, SCLS 환자와 건강한 기증자 BOEC에서 각각 11.50 ± 1.43 및 $6.03 \pm 1.2\%$ 의 임피던스 값 증가를 보였다 (도 1). 이러한 관찰은 유의하고 (각각 $p = 0.019$, $p = 0.038$), 세포 간 상호작용이 더 밀접한 것을 보여준다. 유사한 양상이 BOEC를 Angpt1로 처리하였을 때 관찰되었고 (각각 $7.37 \pm 0.68 \%$, $p = 0.019$ 및 $6.73 \pm 0.65 \%$, $p = 0.010$), PMC-403 및 Tie2 수용체의 상호작용은 Angpt1-T 상호작용을 모방하는 것을 제안한다. 실제로, PMC-403 및 Tie2 수용체의 상호작용을 생화학적으로 테스트한 결과, Angpt1의존성 결합도 나타났으며, 공통된 상호작용 에피토프를 공유하는 것으로 확인되었다 (도 8). 또한, PMC-403 또는 Angpt1로 처리했을 때, SCLS 환자에서 유래된 BOEC의 관찰된 임피던스 증가는 건강한 기증자 BOEC의 임피던스 증가보다 높았다(각각 $p=0.003$, $p=0.029$). 이것은 혈관 투과성 인자에 대한 과민증(hypersensitivity)을 나타낸다.

[114]

[115] 실시예 2. PMC-403에 의한 BOEC의 전처리는 투과성 인자로 인한 결합을 완화한다.

[116]

SCLS 또는 건강한 기증자 유래 BOEC에서 내피 투과성 인자에 대한 PMC-403의 영향을 평가하기 위해 아포화 농도 (subsaturating concentrations)의 작용제 (agonist)를 사용하였다 (도 2, 표 1). 아고니스트인 히스타민에 대하여 3명의 별개의 환자(pt)와 3명의 별개의 건강한 기증자(hd)의 BOEC를 종합적으로 테스트했지만, VEGF 환자의 BOEC는 건강한 기증자의 BOEC보다 더 높은 감도를 가진 것으로 보인다 (3.78 배 $p<0.0001$, 6.26-폴드 $p = 0.0392$, 각각). 반면에 LPS 차이는 거의 없었고, $\text{TNF}\alpha$ 에 대한 감도는 감소했다 (0.31 배, $p = 0.0138$). 따라서, 아포화 농도의 작용제를 사용하여 PMC-403에 대한 pt 및 hd BOEC 반응을 평가하였다. 일반적으로, 효능제인 히스타민, VEGF, LPS 및 $\text{TNF}\alpha$ 에 노출되면 SCLS와 건강한 기증자의 BOEC 모두 다양한 정도로 보호 반응을 보였다(도 2). 이러한 관찰 결과는 PMC-403이 생체 외에서 BOEC의 보호 반응을 유도할 수 있음을 시사한다. 아마도 관찰된 일부 작용제 감수성은 SCLS 환자의 BOEC에서 비정상적 Tie2 발현 수준으로 인한 것일 수 있는데, Tie2 발현의 50% 손실(Tie2 +/- 마우스)이 Tie2 KO 마우스에서 혈관 누출로 이어질 수 있기 때문이다. 따라서 이러한 BOEC에서 Tie2 발현 수준을 평가하였다(도 10). Tie2 발현 수준은 4명의 개별 환자 유래 BOEC와 4명의 개별 건강한 공여자로부터의 BOEC 사이에서 동등한 것으로 보이며, 이러한 BOEC에서 Tie2 발현 수준에는 유의한 차이가 없었다. ECIS 데이터는 실시간으로 EC 장벽 기능을 제공하였지만, 면역형광 이미징을 사용하여 이들 PMC-403 및/또는 작용제로 처리된 BOEC에서 세포내 분자 조직을 시각적으로 검사하였다(도 3, 및 도 11-15). 환자의 BOEC를 저용량 또는 중용량의 히스타민으로만 치료하였을 때, 세포간 상호작용은 히스타민 처리 15분 이내에 명확하게 약해졌다. 그러나 동일한 조건하에서 아이소타입 컨트롤 mIgG2a로 전처리된

BOEC가 아닌 PMC-403으로 전처리된 BOEC는 세포 간 상호작용에 장애를 거의 나타내지 않았다. 이러한 관찰은 시험된 모든 작용제들 사이에서 일관되었다. 전반적으로, BOEC의 육안 검사는 ECIS 데이터를 지원하고 EC가 생체 외에서 혈관 투과성 인자에 노출되었을 때 PMC-403 항체가 보호할 수 있는 가능성을 보여준다.

[117]

[118] 실시예 3. PMC-403 전처리는 SCLS 감수성 마우스 모델 (SJL)에서 히스타민 과민증을 완화한다.

[119] 최근 SCLS의 임상적 특징을 자발적으로 보여주는 자연 발생 마우스 모델 (SJL / J)이 보고되었다 [Raza, A., et al., *A natural mouse model reveals genetic determinants of systemic capillary leak syndrome (Clarkson disease)*. Commun Biol, 2019. 2: p. 398.]. Chr6에 위치한 히스타민 과민 유전자좌를 가지고 있으며 인간 SCLS GWAS 후보와 공통된 유전적 및 표현형의 유사성을 공유하는 것으로 보인다. SJL 마우스와 SCLS 환자는 혈관 투과성 항진 (vascular hyperpermeability)에 대한 감수성 증가와 관련하여 유사한 유전적 특성을 공유하기 때문에 이러한 동물에서 PMC-403의 영향을 평가하기로 결정했다. SJL 마우스가 치사량의 히스타민 (10 mg/kg)으로 전신 투여 (i.p. systemically challenged) 되었을 경우, PMC-403 전처리 동물은 2시간까지 36%의 절대 생존율의 우위성을 보였다 (도 4A). 실제로, 이들 동물은 히스타민 치료의 30 분 이내에 관찰된 히스타민 과민증을 감소시킨 것으로 보인다 $22.2 \pm 10.2\%$ vs $70 \pm 12.2\%$ (도 4B).

[120]

[121] 실시예 4. 투과성 중재자가 유발하는 전신 및 피부의 혈관 누출은 PMC-403 전처리에 의해 감소한다.

[122] SCLS 환자와 마찬가지로 SJL 마우스에서 혈관 누출은 주로 골격근과 피부에서 보고되었다. 동물의 혈관 누출 정도를 평가하기 위해 노화된 마우스에 알부민 결합 염료인 에반스 블루 (EB)를 정맥 내 (r.o.)로 전신 투여한 다음, 준치사량 (sublethal doses)의 히스타민 (2.5 mg/kg)을 전신 (i.p.) 투여하였다. SJL 마우스는 주로 골격근과 피부에 혈관 누출을 보였으며 각각 약 6.2 ± 1.1 배와 1.7 ± 0.2 배였다 (도 5A-C). 그러나, 이들 마우스를 mIgG2a항체가 아닌 PMC-403으로 전처리하면, 혈관 누출 표현형의 역전이 관찰되었다(도 5D-F). 히스타민의 전신 투여는 전신에 영향을 미치고 피부 혈관계를 선택적으로 묘사하지만 마일즈 분석을 사용하기로 결정했다. 투과성 중재자를 피부에 접종하고 미세피부혈관계 (microdermalvasculature)의 누출도를 EB의 전신 투여에 의해 평가한다. 먼저, PMC-403 또는 mIgG2a항체를 2시간 동안 정맥내 주사한 후, EB를 r.o. 을 통해 전신 투여한 다음, 이어서 히스타민을 피내 주사하였다 (도 6A). 피부 생검 후 혈관의 누출 EB를 추출하고 정량화했다 (도 6B). mIgG2a마우스에서는 미세혈관누출이 분명하고 용량 의존적이었지만 PMC-403으로 전처리한 동물에서는 누출이 3-4 배 감소했다 (도 6C). SCLS 환자는 표피 미세 혈관계가 히스타민에 노출되면

과민성을 나타내지만, 에피소드 혈청에서 혈관신생 투과성 인자 VEGF 수준의 증가로 보면 마일즈 분석에서 VEGF의 사용이 생리학적으로 더 관련될 수 있음을 시사한다. SJL 마우스에 다양한 용량의 VEGF를 피내 접종하여 피부 누출 반응을 평가했다 (도 7). 미세 혈관 누출은 분명하고 mIgG2a마우스에서 용량의존적이었지만 PMC-403으로 전처리 한 동물은 누출을 각각 1000ng 및 250ng 접종으로 2.8 ± 1.0 배에서 5.1 ± 3.5 배 유의하게 감소시켰다(도 6C).

[123] 요약하면, Tie2 수용체 활성화 항체 (PMC-403)를 SCLS 환자 유래의 내피세포 생체외에서 사용하고, SCLS 감수성 마우스 모델 (SJL)의 생체내에서 사용하였다. 혈관 누출 중재자 (히스타민, VEGF, LPS 및 $\text{TNF}\alpha$)에 노출된 경우, 환자 유래의 내피세포는 아이소타입 컨트롤 항체가 아닌 PMC-403으로 전처리되었을 때 세포간 상호작용을 유지했다. 게다가, SJL 마우스에게 PMC-403 항체를 투여하면, 치사량의 히스타민에 노출되었을 때 생존율이 크게 개선되었고, 히스타민에 대한 과민증도 크게 회복되었다. 아마도 가장 흥미로운 관찰은 PMC-403으로 전처리된 동물이 히스타민 또는 VEGF에 노출되었을 때 전신 또는 피부의 혈관누출이 과도하게되는 경향이 없었다는 것이다. 마지막으로 호흡기 감염에 의해 유발된 혈관 투과성 항진도 개선되는 것으로 보인다. 전반적으로, 이러한 관찰은 PMC-403이 혈관 장벽 기능에 대한 조절 장애가 있는 SCLS와 같은 질병의 잠재적인 치료제로 간주될 수 있다는 견해를 지지한다.

[124] 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.

[125]

산업상 이용가능성

[126] 본 발명을 통해 Tie2 수용체 활성화 제제의 신규 용도 즉, 전신 모세혈관 누출 증후군의 예방 또는 치료 효과를 제공할 수 있다.

[127]

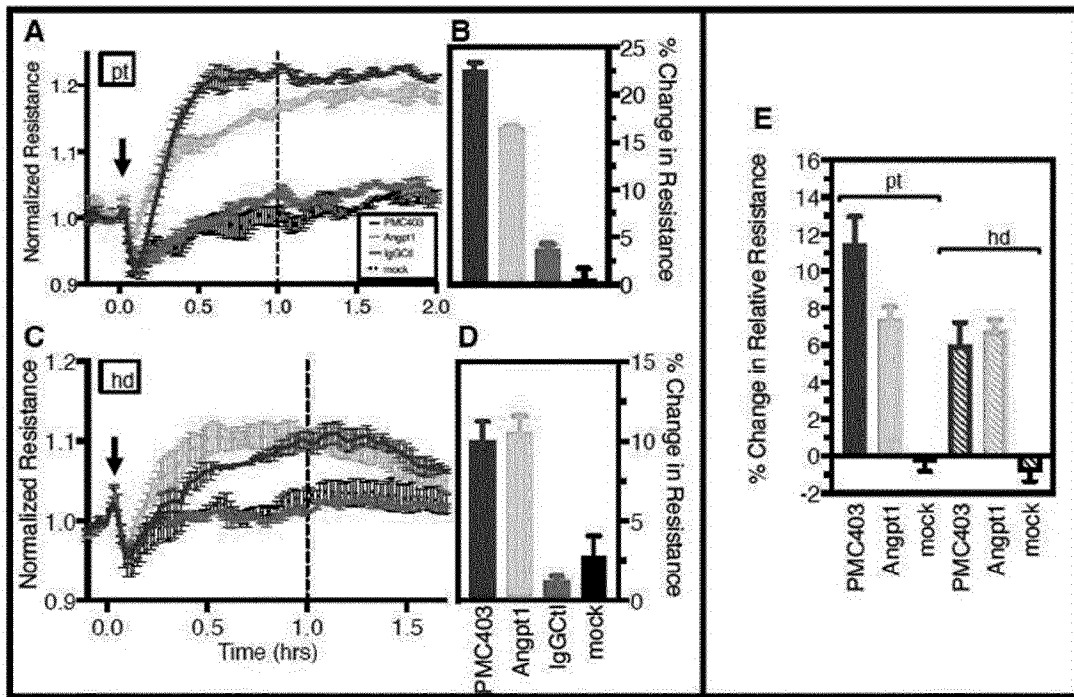
서열목록 Free Text

[128] 전자파일 첨부하였음.

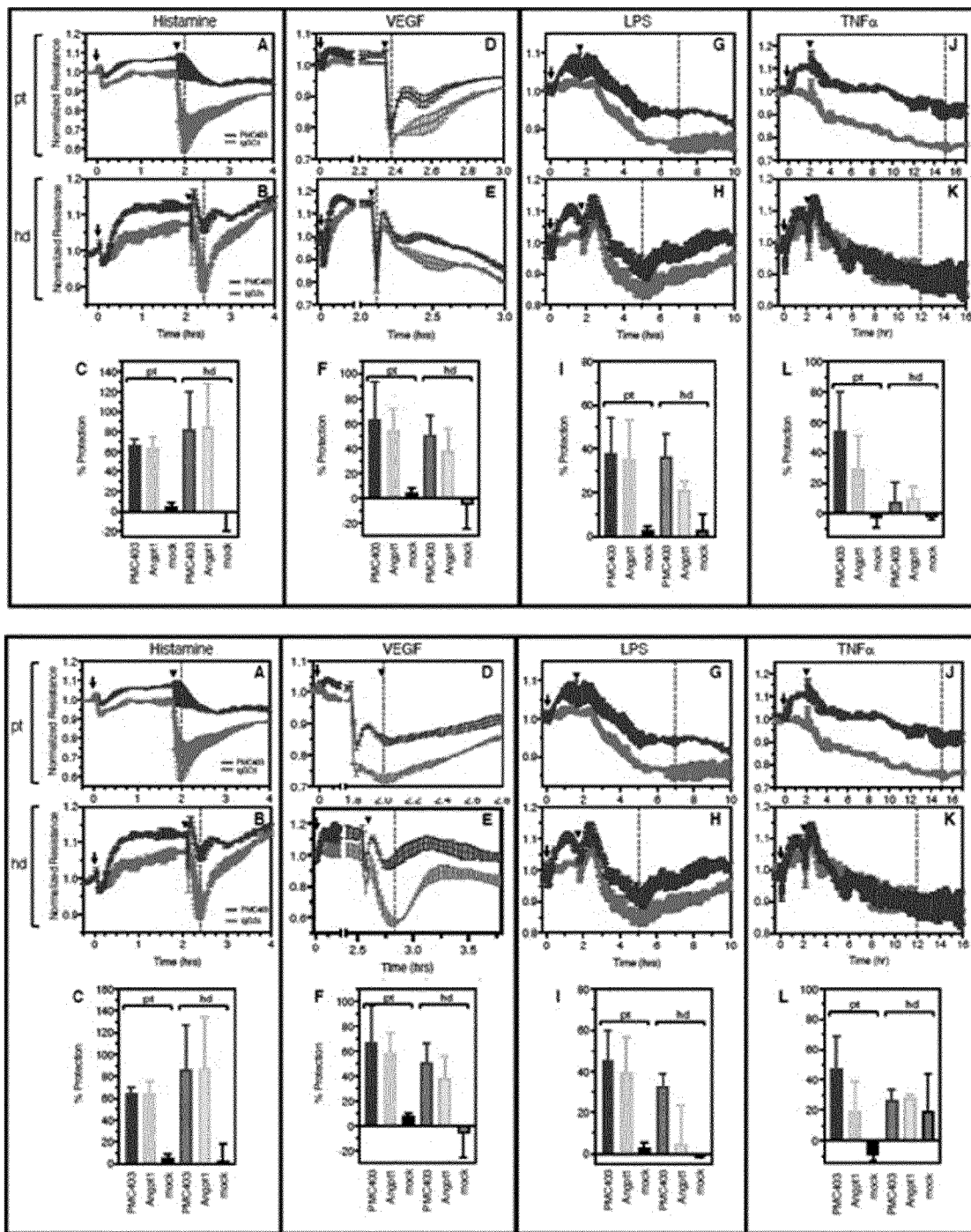
청구범위

- [청구항 1] Tie2 수용체 활성화 제제를 포함하는 전신 모세혈관 누출 증후군 (SCLS: systemic capillary leak syndrome)의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 Tie2 수용체 활성화 제제는 Tie2 수용체에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 항체는 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 가변영역을 포함하는 조성물.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 7의 중쇄 가변영역 및 서열번호 8의 경쇄 가변영역을 포함하는 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 Tie2 수용체 활성화 제제는 혈관 누출 유도제 (vascular leakage mediators)에 노출된 혈관 내피세포의 보호 반응을 통해 혈관 누출을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 Tie2 수용체 활성화 제제는 혈관 누출 유도제에 대한 과민증을 개선시키는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 7] 제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 혈관 누출 유도제는 히스타민, VEGF (vascular endothelial growth factor), LPS (lipopolysaccharide) 및 TNF α (Tumor necrosis factor- α)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인, 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 Tie2 수용체 활성화 제제는 호흡기 바이러스 감염에 의해 유발된 혈관 투과성 항진 (vascular hyperpermeability)을 완화시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

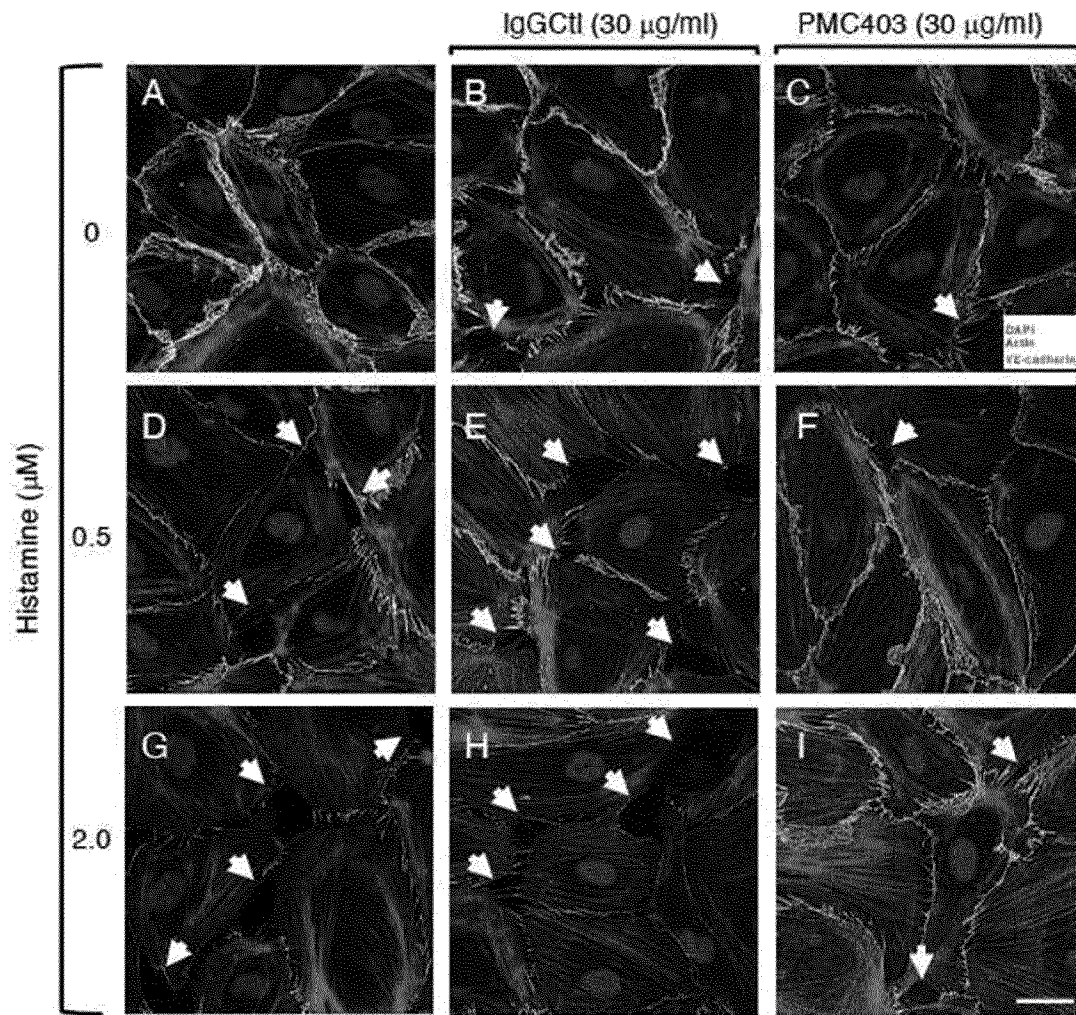
[도 1]



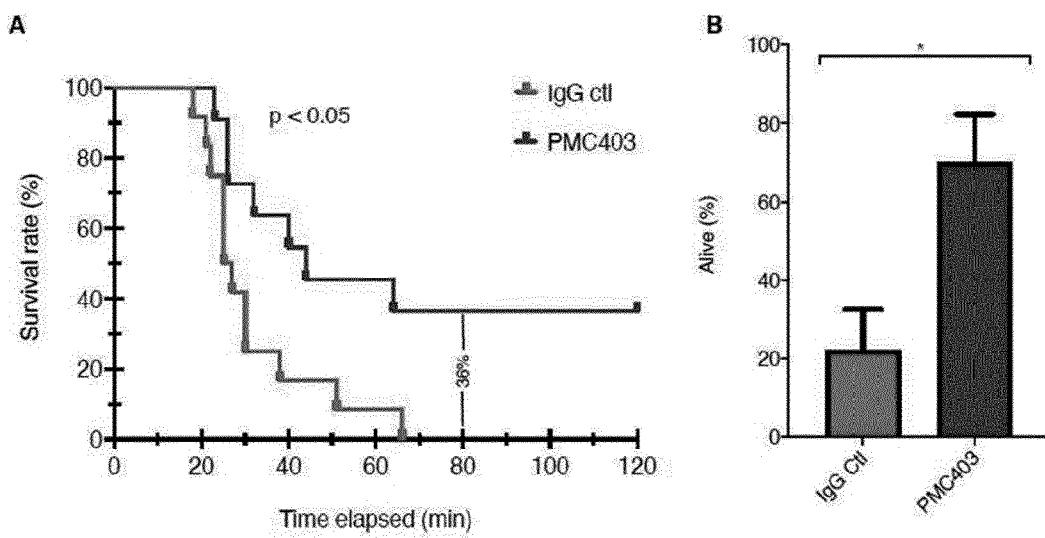
[도2]



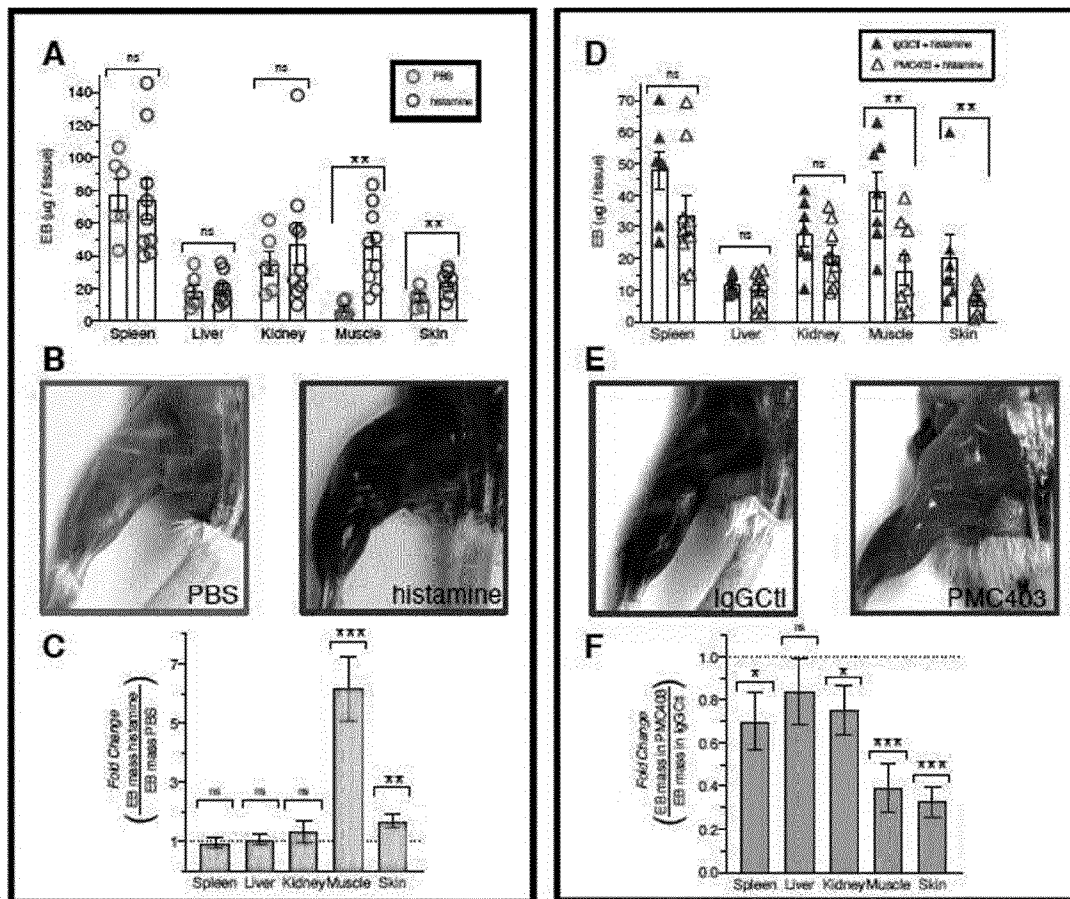
[도3]



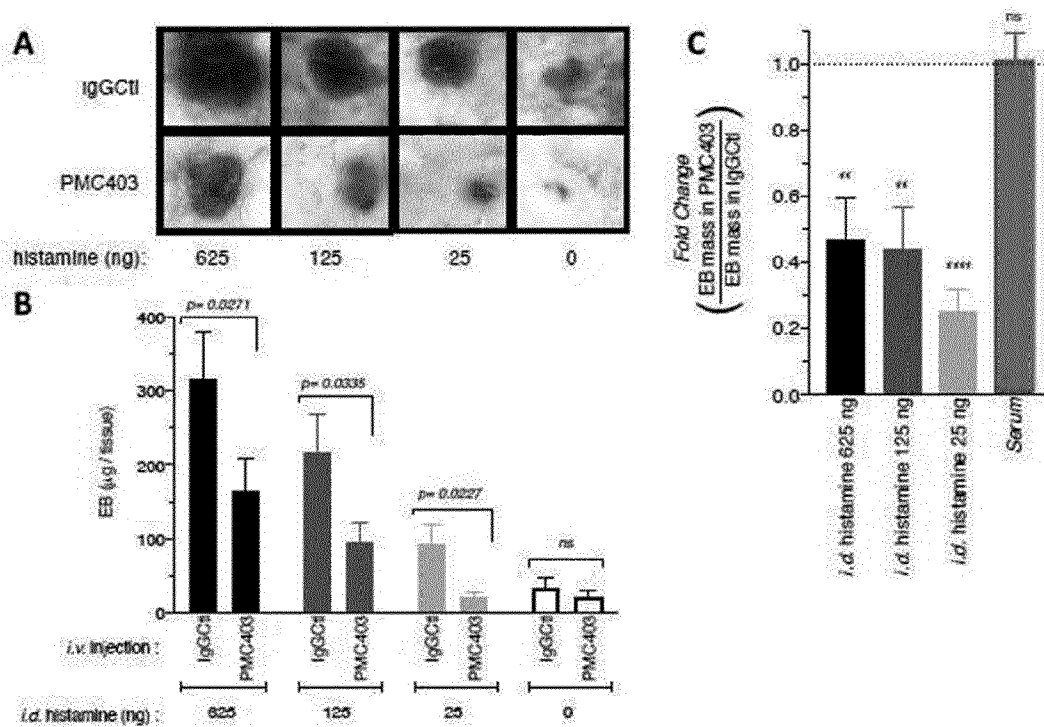
[도4]



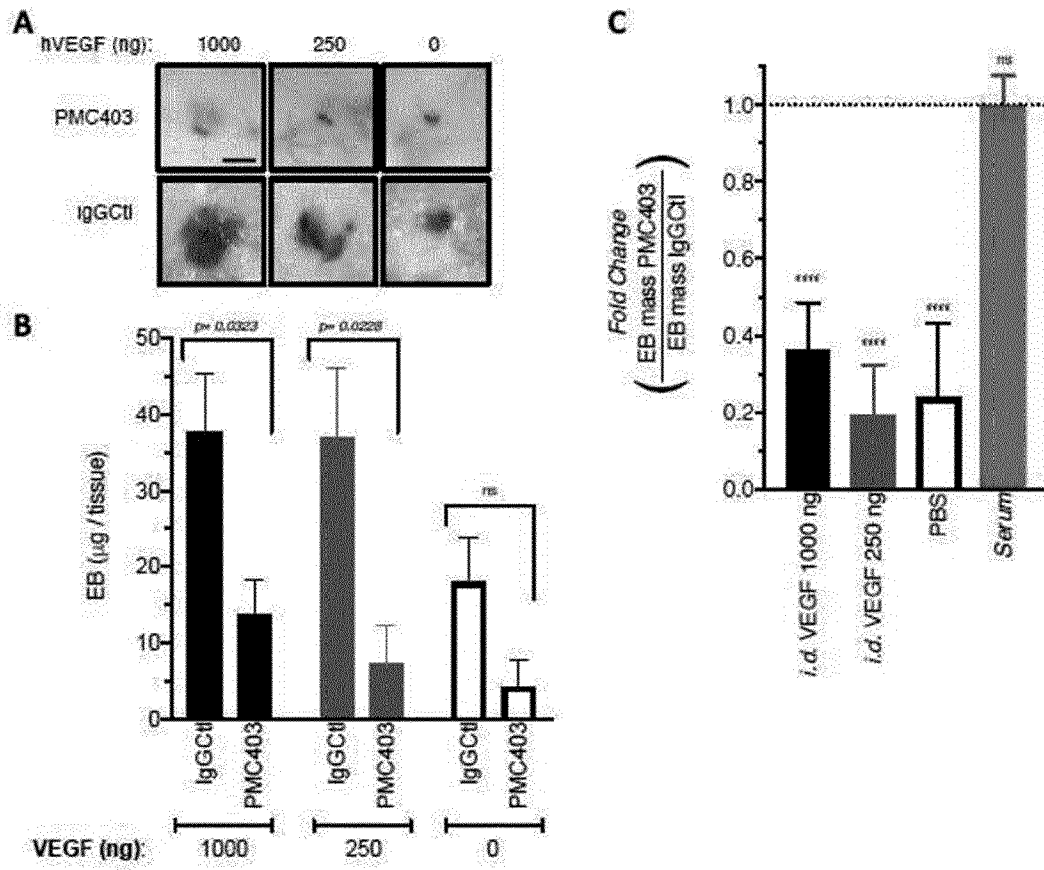
[도5]



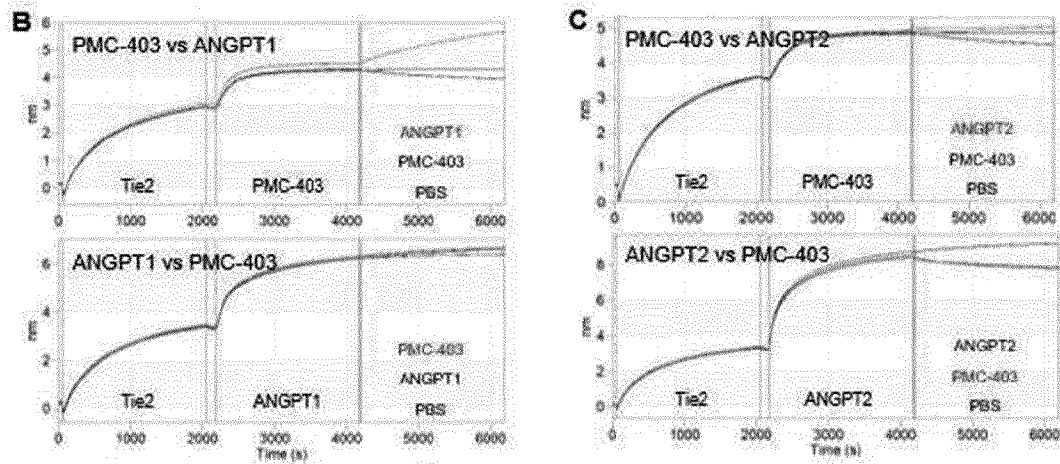
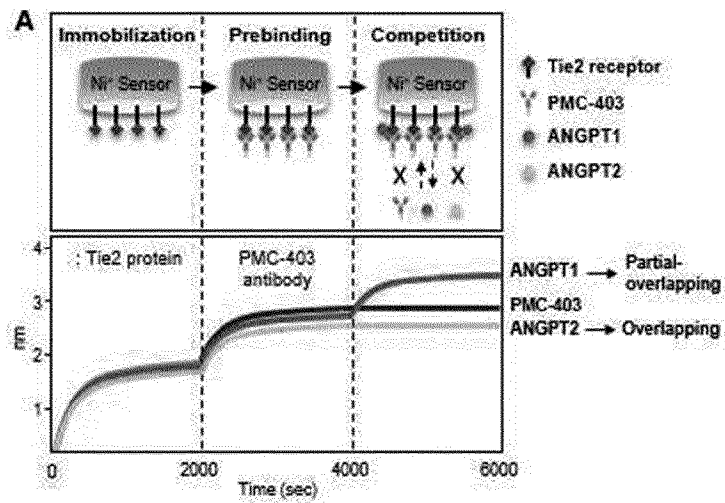
[도6]



[도7]

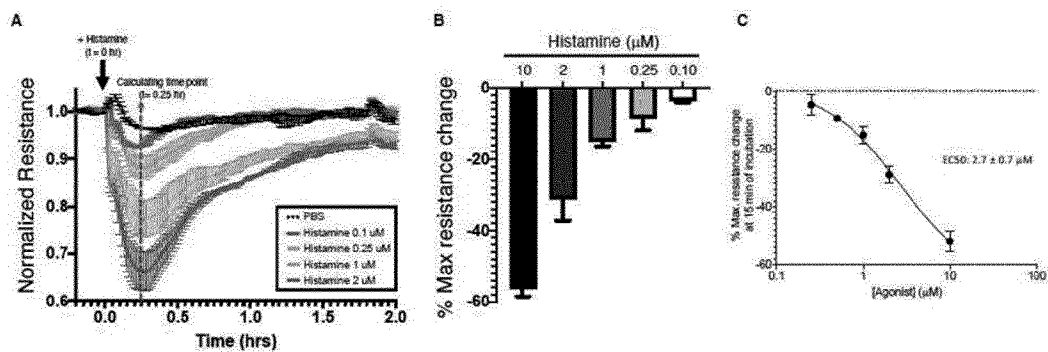


[도8]

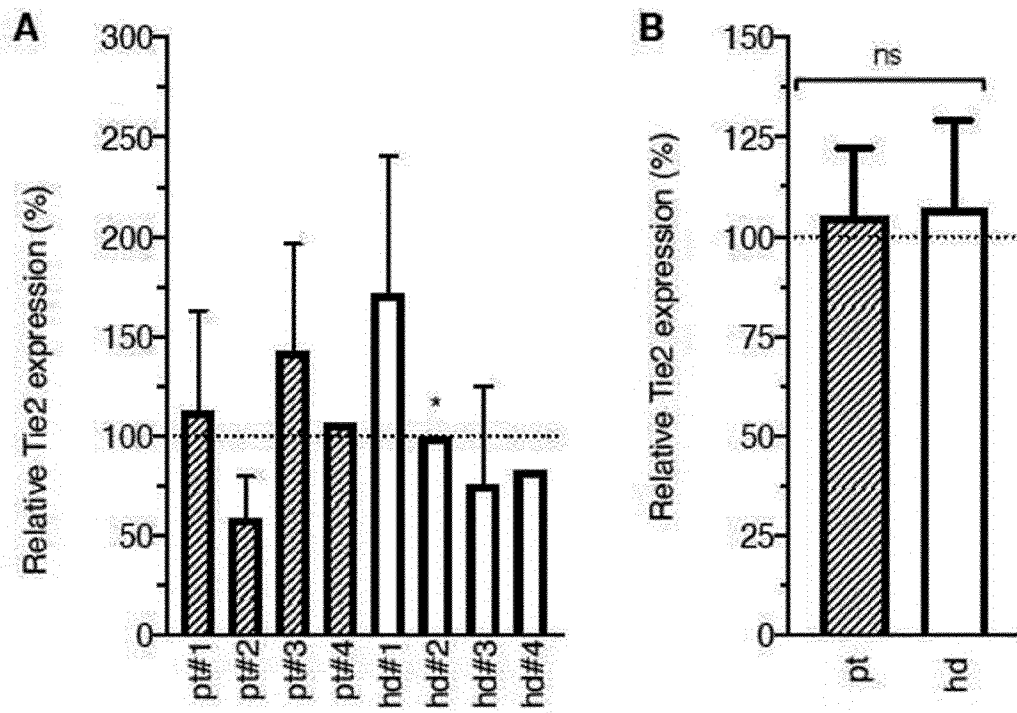


[도9]

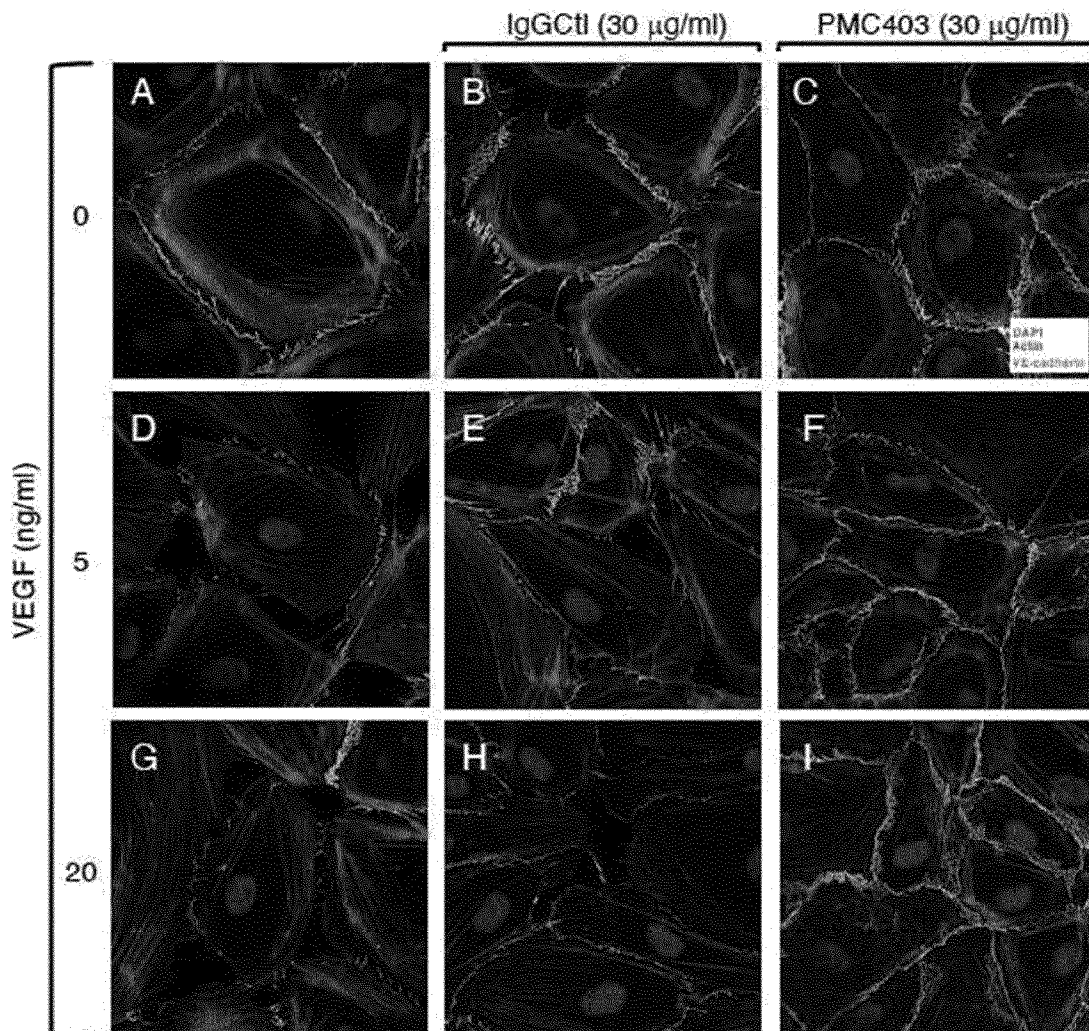
- **Histamine** induces barrier disruption in blood outgrowth endothelial cells (BOECs) that were derived from SCLS patients.
 - Representative Cell Line: SCLS patient BOECs (pt#1)



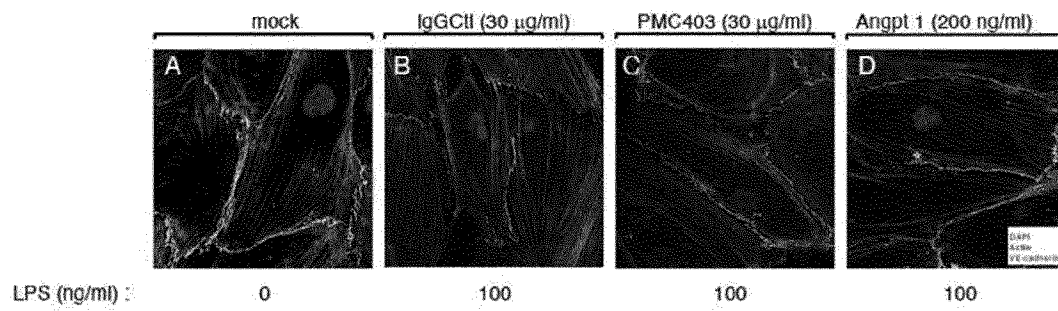
[도10]



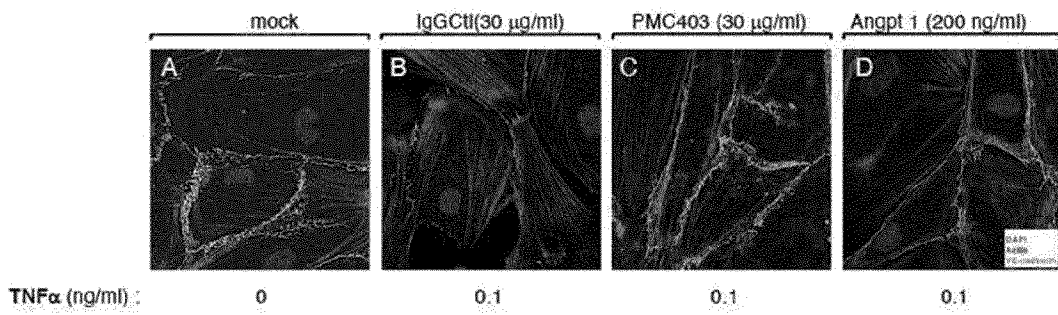
[도11]



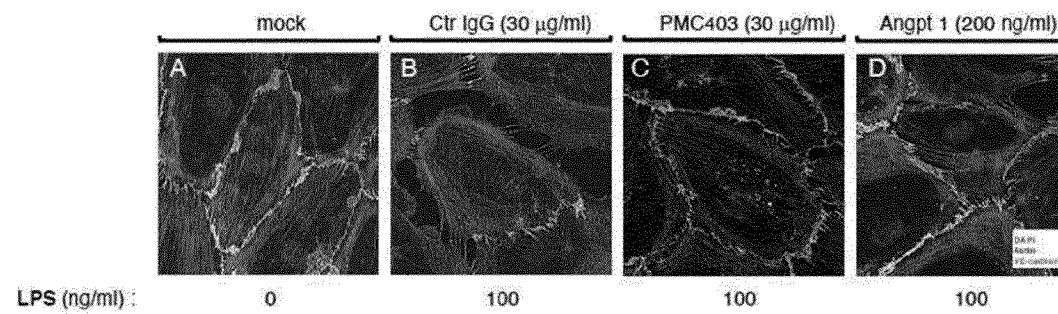
[도12]



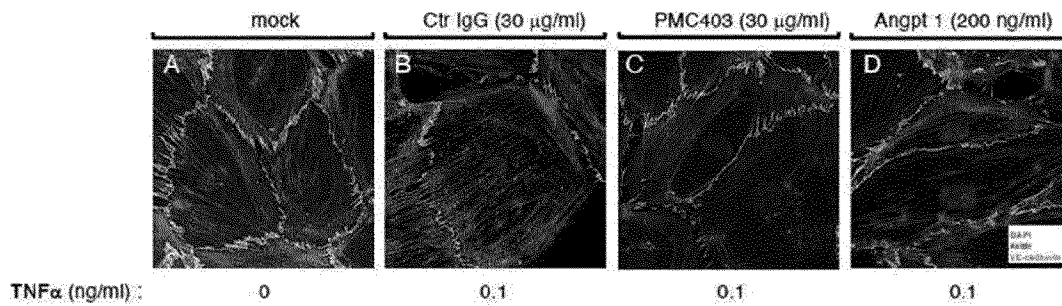
[도13]



[도14]



[도15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/002554

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; A61P 9/14(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/28(2006.01); A61K 38/39(2006.01); A61K 39/00(2006.01); C07K 16/10(2006.01); C07K 16/40(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: Tie2 수용체 활성화 제제(Tie2 receptor activating agent), 항체 (antibody), 전신 모세혈관 누출 증후군(systemic capillary leak syndrome), 예방(prevention), 치료(treatment), 중쇄 가변영역 (heavy chain variable region), 경쇄 가변영역(light chain variable region), 혈관 누출 유도제(vascular leak inducer), 호흡기 바이러스 감염(respiratory viral infection), 투과성 항진(vascular hyperpermeability), 완화(alleviation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	약업신문. [online article]. 파맵신, 'PMC-403' FDA 희귀의약품 지정. 22 February 2023, pp. 1-5, non-official translation (YAKUP. PharmAbcine Inc. Receives an Orphan Drug Designation (ODD) from the FDA for the 'PMC-403'). Retrieved from the Internet URL : http://m.yakup.com/news/index.html?mode=view&nid=278894 . See pages 1-2.	1-2,8 5-7 3-4
Y	KR 10-2021-0020839 A (PHARMABCINE INC.) 24 February 2021 (2021-02-24) See paragraphs [0160]-[0170], and figures 5A and 9.	5-7
X	KR 10-2022-0131894 A (UNITY BIOTECHNOLOGY, INC.) 29 September 2022 (2022-09-29) See abstract, claims 1, 36, 38 and 41, paragraphs [0072], [0074], [0077], [0135]-[0136] and [0257]-[0260], and figures 3-4.	1-2,5-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 June 2024

Date of mailing of the international search report

07 June 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOTIMES. [online article]. 파맙신, TIE2 활성 항체 FDA 희귀의약품 승인으로 돌파구 마련할까. 22 February 2023, pp. 1-5, non-official translation (Can PharmAbcine Inc. Make a Breakthrough with an Orphan Drug Designation (ODD) from the FDA for TIE2-Active Antibody). Retrieved from the Internet URL : https://www.biotimes.co.kr/news/articleView.html?idxno=9859 . See pages 1-2.	1-2
A	US 2017-0174789 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 22 June 2017 (2017-06-22) See entire document.	1-8
A	KR 10-2019-0066040 A (ASCLEPIX THERAPEUTICS, INC. et al.) 12 June 2019 (2019-06-12) See entire document.	1-8
PX	ABLOOGLU, A. J. et al. A ligand-independent Tie2-activating antibody reduces vascular leakage in models of Clarkson disease. Science Advances. 17 November 2023, vol. 9, thesis no. : eadi1394 (pp. 1-11). See entire document.	1-2,5-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/002554

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/002554

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR 10-2021-0020839	A		24 February 2021	CN	113993897	A	28 January 2022
				EP	3960763	A2	02 March 2022
				JP	2022-544433	A	19 October 2022
				JP	7447144	B2	11 March 2024
				US	2022-0213201	A1	07 July 2022
				WO	2021-029746	A2	18 February 2021
				WO	2021-029746	A3	07 October 2021
KR 10-2022-0131894	A		29 September 2022	CN	114901700	A	12 August 2022
				EP	4061852	A1	28 September 2022
				JP	2023-502725	A	25 January 2023
				US	2021-0155697	A1	27 May 2021
				WO	2021-102173	A1	27 May 2021
US 2017-0174789	A1		22 June 2017	CN	103874709	A	18 June 2014
				CN	103874709	B	21 December 2016
				CN	106963946	A	21 July 2017
				EP	2744827	A1	25 June 2014
				EP	2744827	B1	03 October 2018
				EP	3415533	A1	19 December 2018
				JP	2014-525934	A	02 October 2014
				JP	2017-186347	A	12 October 2017
				JP	6333174	B2	30 May 2018
				JP	6654165	B2	26 February 2020
				KR	10-2014-0054303	A	08 May 2014
				US	10023641	B2	17 July 2018
				US	10316105	B2	11 June 2019
				US	10442864	B2	15 October 2019
				US	10752702	B2	25 August 2020
				US	2013-0209492	A1	15 August 2013
				US	2015-0197578	A1	16 July 2015
				US	2017-0088622	A1	30 March 2017
				US	2018-0291105	A1	11 October 2018
				US	2019-0276559	A1	12 September 2019
				US	9017670	B2	28 April 2015
				US	9546218	B2	17 January 2017
				WO	2013-028442	A1	28 February 2013
KR 10-2019-0066040	A		12 June 2019	CN	110177563	A	27 August 2019
				EP	3522906	A1	14 August 2019
				EP	3522906	B1	23 March 2022
				JP	2019-535651	A	12 December 2019
				US	2019-0225670	A1	25 July 2019
				WO	2018-067646	A1	12 April 2018

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 16/28(2006.01)j; A61P 43/00(2006.01)j; A61P 9/14(2006.01)j; A61K 39/00(2006.01)j		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 16/28(2006.01); A61K 38/39(2006.01); A61K 39/00(2006.01); C07K 16/10(2006.01); C07K 16/40(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Tie2 수용체 활성화 제제(Tie2 receptor activating agent), 항체(antibody), 전신 모세혈관 누출 증후군(systemic capillary leak syndrome), 예방(prevention), 치료(treatment), 중쇄 가변영역(heavy chain variable region), 경쇄 가변영역(light chain variable region), 혈관 누출 유도제(vascular leak inducer), 호흡기 바이러스 감염(respiratory viral infection), 투과성 항진(vascular hyperpermeability), 완화(alleviation)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y A	약업신문 인터넷 기사, “파맵신, ‘PMC-403’ FDA 회귀의약품 지정”, 2023.02.22, 인터넷 URL : http://m.yakup.com/news/index.html?mode=view&nid=278894 , 페이지 1-5 페이지 1-2	1-2,8 5-7 3-4
Y	KR 10-2021-0020839 A (주식회사 파맵신) 2021.02.24 단락 [0160]-[0170], 도면 5A, 9	5-7
X	KR 10-2022-0131894 A (유니티 바이오테크놀로지, 인크.) 2022.09.29 요약, 청구항 1, 36, 38, 41, 단락 [0072], [0074], [0077], [0135]-[0136], [0257]-[0260], 도면 3-4	1-2,5-7
X	BIOTIMES 인터넷 기사, “파맵신, TIE2 활성 항체 FDA 회귀의약품 승인으로 돌파구 마련할까”, 2023.02.22, 인터넷 URL : https://www.biotimes.co.kr/news/articleView.html?idxno=9859 , 페이지 1-5 페이지 1-2	1-2
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년06월05일(05.06.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년06월07일(07.06.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2017-0174789 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 2017.06.22 전체 문헌	1-8
A	KR 10-2019-0066040 A (아스킬리픽스 테라퓨틱스, 인크. 등) 2019.06.12 전체 문헌	1-8
PX	ABLOOGLU, A. J. 등, “A ligand-independent Tie2-activating antibody reduces vascular leakage in models of Clakson disease”, Science Advances, 2023.11.17, 제9권, 논문번호 : eadi1394(페이지 1-11) 전체 문헌	1-2,5-8

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2021-0020839 A	2021/02/24	CN 113993897 A	2022/01/28
		EP 3960763 A2	2022/03/02
		JP 2022-544433 A	2022/10/19
		JP 7447144 B2	2024/03/11
		US 2022-0213201 A1	2022/07/07
		WO 2021-029746 A2	2021/02/18
		WO 2021-029746 A3	2021/10/07
KR 10-2022-0131894 A	2022/09/29	CN 114901700 A	2022/08/12
		EP 4061852 A1	2022/09/28
		JP 2023-502725 A	2023/01/25
		US 2021-0155697 A1	2021/05/27
		WO 2021-102173 A1	2021/05/27
US 2017-0174789 A1	2017/06/22	CN 103874709 A	2014/06/18
		CN 103874709 B	2016/12/21
		CN 106963946 A	2017/07/21
		EP 2744827 A1	2014/06/25
		EP 2744827 B1	2018/10/03
		EP 3415533 A1	2018/12/19
		JP 2014-525934 A	2014/10/02
		JP 2017-186347 A	2017/10/12
		JP 6333174 B2	2018/05/30
		JP 6654165 B2	2020/02/26
		KR 10-2014-0054303 A	2014/05/08
		US 10023641 B2	2018/07/17
		US 10316105 B2	2019/06/11
		US 10442864 B2	2019/10/15
		US 10752702 B2	2020/08/25
		US 2013-0209492 A1	2013/08/15
		US 2015-0197578 A1	2015/07/16
		US 2017-0088622 A1	2017/03/30
		US 2018-0291105 A1	2018/10/11
		US 2019-0276559 A1	2019/09/12
		US 9017670 B2	2015/04/28
		US 9546218 B2	2017/01/17
		WO 2013-028442 A1	2013/02/28
KR 10-2019-0066040 A	2019/06/12	CN 110177563 A	2019/08/27
		EP 3522906 A1	2019/08/14
		EP 3522906 B1	2022/03/23
		JP 2019-535651 A	2019/12/12
		US 2019-0225670 A1	2019/07/25
		WO 2018-067646 A1	2018/04/12