

(19)대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.⁸

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(11) 공개번호

10-2006-0003860

(43) 공개일자

2006년01월11일

(21) 출원번호 10-2005-7016552
(22) 출원일자 2005년09월05일
번역문 제출일자 2005년09월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/006719
국제출원일자 2004년03월04일

(87) 국제공개번호

WO 2004/078942

국제공개일자

2004년09월16일

(30) 우선권주장 60/451,852 2003년03월04일 미국(US)
60/451,856 2003년03월04일 미국(US)
60/452,469 2003년03월06일 미국(US)
60/463,801 2003년04월18일 미국(US)
60/465,304 2003년04월24일 미국(US)
60/471,177 2003년05월16일 미국(US)

(71) 출원인 기린 비루 가부시키가이샤
일본 도쿄-도 츄오-구 신카와 2-쵸메 10-1
젠자임 코퍼레이션
미국, 매사추세츠, 플라밍햄, 15 플레전트 스트리트 커넥터

(72) 발명자 데이처, 비벌리
미국 01721 매사추세츠주 애쉬랜드 와즈워쓰 로드 1
로버츠, 브루스
미국 01772 매사추세츠주 사우쓰보로 파인힐 로드 108
가타오카, 시로
일본 370-0044 군마 다카사키-시 이와오시-마치 37-29
다하라, 도모유키
일본 370-0864 군마 다카사키-시 이시하라-마치 3703-5
혼마, 나카유키
일본 370-0853 군마 다카사키-시 시몬-아카이-마치 230 비-303

(74) 대리인 주성민
위혜숙

심사청구 : 없음

(54) 내피 세포 특이적 항체 및 그의 용도

요약

본 발명은 내피 세포의 증식, 이동 및 세관 형성을 억제하여 암, 다낭성 신장 질환, 당뇨병 망막병증, 류마티스성 관절염 및 건선을 비롯한 혈관형성(angiogenesis) 관련 질환을 치료하는데 유용한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본원은 종양 내피

표지자(TEM)에 특이적인 항체를 투여함으로써 내피 세포의 증식, 이동 및 관형성을 억제하는 방법을 개시한다. 또한, 본원은 TEM-특이적 항체를 투여함으로써 혈관형성 및 종양 성장을 억제하는 방법 및 이러한 방법에 유용한 항체 조성물을 개시한다.

색인어

종양 내피 표지자, 항체, 혈관형성, 하이브리도마 균주, 세포 증식, 세포 이동, 내피성 관형성

명세서

기술분야

본원에서 제공된 방법 및 조성물은 내피 세포에 의한 증식, 이동, 및(또는) 세관 형성을 억제하며, 따라서, 척추동물에서 암을 비롯한 혈관형성(angiogenesis) 관련된 질병 및 질환의 치료에 유용하다. 보다 특정하게는, 상기 방법은 콘주게이션(conjugation)된 또는 비콘주게이션된 형태에서의 종양 내피 표지자(tumor endothelial marker, TEM)에 특이적인 항체의 투여, 및 이들 방법에 유용한 조성물에 관한 것이다.

배경기술

혈관형성은 조직 또는 기관에서 새로운 혈관을 생성하는 것을 포함한다. 정상 생리적 조건하에서, 혈관형성은 상처 치유, 태아 발육, 및 황체, 자궁내막 및 태반의 형성과 같은 매우 특정한 상황에서 발생한다. 혈관형성 과정은 천연적으로 발생하는 자극인자, 예를 들면, 엔지오포이에틴-1, IL-8, 혈소판-유도된 내피 세포 성장 인자 (PD-ECGF), 및 종양 괴사 인자-알파 (TNF- α), 및 억제제, 예를 들면, 트롬보스폰딘, 인터페론, 및 메탈로프로테이나제 억제제의 시스템을 통하여 고도로 조절된다.

혈관형성은 또한 다수의 질환 상태에서 중요한 인자로서도 발생한다. 실제로, 제어되지 않은 혈관형성은 많은 질환과 연관된 병리적 손상에 직접적으로 기여한다. 이러한 제어되지 않은 또는 과도한 혈관형성은 혈관형성 인자 및 혈관형성 억제제 사이의 불균형이 일어나는 경우, 예를 들면, 과도한 양의 혈관형성 인자가 생성되는 경우에 발생한다. 불충분한 혈관형성도 특정 질환 상태에 기여한다. 예를 들면, 부적절한 혈관 성장은 관상 동맥 질환, 중풍, 및 지연된 상처 치유와 관련된 병리에 기여한다.

과도한 혈관형성은 예컨대 당뇨병 망막병증, 연령-관련된 반상 퇴행, 죽상경화증, 및 감염증상 예컨대 류마티스성 관절염 및 건선과 같은 질환에서 발생한다. 예를 들면, 류마티스성 관절염에서, 관절의 윤활 내층의 혈관이 부적절한 혈관형성을 겪는다. 새로운 혈관 네트워크를 형성하는 외에도, 내피 세포는 판누스 성장 및 연골 파괴를 일으키는 인자 및 반응성 산소종을 방출하고, 따라서, 류마티스성 관절염의 만성적 염증 상태에 기여하고 이를 유지하는데 도움이 될 수 있다. 예를 들면, 문헌[Bodolay, E., et al., J. Cell Mol. Med. 6: 357-76 (2002)] 참조. 유사하게, 골관절염에서는, 혈관형성-관련된 인자에 의한 연골세포의 활성화가 연골의 파괴에 기여할 수 있다. 예를 들면, 문헌[Walsh, D. A., et al., Arthritis Res. 3: 147-53 (2001)] 참조.

혈관형성은 암의 성장 및 전이에 결정적인 역할을 한다. 예를 들면, 문헌[B. R. Zetter, Ann. Rev. Med. 49: 407-24 (1998), J. Follcman, Sem. Oncol. 22: 15-18 (2002)] 참조. 먼저, 혈관형성은 1차 종양의 혈관형성(vascularization)을 일으켜서, 성장하는 종양 세포에 필요한 영양분을 공급한다. 두번째로, 종양의 증가된 혈관형성은 혈류로의 접근을 제공하고, 따라서 종양의 전이 가능성을 증가시킨다. 마지막으로, 전이성 종양 세포가 1차 종양 성장 부위를 떠난 후에는 혈관형성이 반드시 나타나서, 2차 부위에서 전이성 세포의 성장 및 팽창을 돕는다.

정상 및 질환-관련된 혈관형성은 유사한 방식으로 진행되는 것으로 보인다. 기저막에 둘러싸인 내피 세포 및 혈관주위세포는 모세 혈관을 형성한다. 질환 또는 손상은 프로(pro)-혈관형성 인자의 생성을 유도한다. 처음에는, 이들 인자는 내피 세포 및 백혈구를 활성화시켜 기존의 혈관의 기저막을 부식시키거나 용해시키는 효소를 방출한다. 혈관의 관내강 내부를 이루는 활성화된 내피 세포는 이어서 기저막을 통하여 튀어나온다. 이어서, 프로-혈관형성 자극자는 내피 세포가 손상된 기저막을 통하여 이동하도록 유도한다. 이동하는 세포는 모 혈관으로부터 "발아"를 형성하고, 여기서, 내피 세포가 증식하기 시작한다. 내피 발아물은 서로 합쳐져서 부착 인자를 사용하는 모세 루프를 형성하여, 새로운 혈관을 생성한다. 추가의 효소, 예를 들면, 매트릭스 메탈로프로테이나제는 이어서 발아하는 혈관의 끝에서 조직을 소화시켜, 활성 조직이 새로운 혈관 주위로 리모델링(remodeling)되도록 한다. 새로 형성된 혈관은 혈관주위세포 (즉, 분화된 평활근 세포)에 의해 안정화된다. 일단 안정화되면, 새로운 혈관은 혈류를 지지한다.

다수의 화합물이 혈관형성 억제제로서 확인되었다. 예시적 화합물은 프로타민(Taylor et al., Nature 297: 307 (1982)), 헤파린, 스테로이드(Folkman et al., Science 221: 719 (1983) 및 U. S. Pat. Nos. 5,001,116 및 4,994,443), 탈리도마이드(R. J. D'Amato, et al. Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 4082-85 (1994)), TNP-470(Ingmer, et al., Nature 348: 555-57 (1990)), 및 카르복시이미도트리아졸(CAI)(Kohn, et al., Cancer Res. 56: 569-73 (1996))을 포함한다. 내부적으로 생성된 억제제는 인터페론 알파 (IFN- α) (White et al., New England J. Med. 320: 1197-1200 (1989), Sidky et al., Cancer Res. 47:5155-61 (1987), 안지오스타틴(O'Reilly, et al., Cell 79 : 315-28 (1994)), 및 엔도스타틴(O'Reilly, et al., Cell 88 : 1-20 (1997))을 포함한다.

이들 화합물 중 많은 경우의 제한은 이들의 항-혈관형성 활성의 일반적인 성질에 있다. 달리 말하면, 대부분의 화합물은 정상 혈관형성과 질환-관련된 혈관형성을 구분할 수 있는 능력이 없다. 결과적으로, 정상 및 질환-관련된 혈관형성이 모두 억제되기 때문에, 현저한 독성 때문에 확인된 항-혈관형성제의 다수의 유용성이 임상적으로 제한된다. 따라서, 질환-관련된 혈관형성을 선택적으로 표적화하는 혈관형성 억제제는 감소된 독성 및 잠재적으로 증가된 장기간의 효용면에서 현저한 이점을 제공한다.

발명의 간단한 요약

본원은 종양 내피 표지자(TEM) 1 및 TEM 17로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 특이적으로 결합하여 세포 증식을 억제하는 유효량의 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편을 투여함을 포함하는, 세포 증식의 억제 방법을 제공한다.

본원은 또한 TEM 1, TEM 17, 및 TEM 9로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 특이적으로 결합하여 세포 이동을 억제하는 유효량의 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편을 투여함을 포함하는, 세포 이동의 억제 방법을 제공한다.

본원은 TEM 1 및 TEM 17로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 특이적으로 결합하여 내피 관형성(tube formation)을 억제하는 유효량의 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편을 투여함을 포함하는, 내피 관형성의 억제 방법을 제공한다.

본원에 제공된 방법의 항체는 인간 항체 또는 인간화된 항체일 수 있다. 완전한 항체 분자, 단일쇄 가변 영역, Fab 단편, 또는 F(ab')₂ 단편이 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 항체는 모노클로날 항체, 키메라 항체, 또는 폴리클로날 항체일 수 있다. 항체는 트랜스제닉(transgenic) 마우스에서 생산될 수 있다. 생물학적 제제에 콘주게이션된 항체도 본 발명의 방법에서 유용하다. 한 실시태양에서, 항체는 항원의 세포외 도메인에 특이적이다. 본 발명의 방법의 항체에 의해 매개된 억제는 시험관내 세포에서, 조직내에서, 또는 개체에서 발생할 수 있다.

본원은 또한 TEM 1, TEM 17, 및 TEM 9로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 특이적으로 결합하여 혈관형성을 억제하는 유효량의 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편을 치료가 필요한 개체에 투여함을 포함하는, 혈관형성의 억제 방법을 제공한다. 본 발명의 방법에 의해 치료된 개체는 관심의 대상인 TEM을 발현한다. 혈관형성은 신생혈관형성(neoangiogenesis)일 수 있다. 본 발명의 방법에 유용한 항체는 항혈관형성 제제 또는 항종양 제제에 콘주게이션된 항체를 포함한다. 본 발명에 의해 치료되는 개체는, 중추신경계의 신생물: 다형성아교모세포종, 별아교세포종, 희소돌기아교세포종, 뇌실막 및 맥락막 열기 종양, 송과체 종양, 신경 종양, 속질모세포종, 신경집종, 수막종, 수막육종; 눈의 신생물: 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 흑색종, 횡문근육종, 망막모세포종; 내분비선의 신생물: 뇌하수체 신생물, 갑상선의 신생물, 부신 피질의 신생물, 신경내분비계의 신생물, 위장궤장 내분비계의 신생물; 두부 및 경부의 신생물: 두부 및 경부 암, 구강 공동, 인두, 후두, 치아형성 종양; 흉부의 신생물: 큰 세포 폐 암종, 작은 세포 폐 암종, 비-작은 세포 폐 암종, 흉부의 신생물, 악성 중피암, 가슴샘종, 흉부의 1차 미생물 세포 종양; 소화관의 신생물: 식도의 신생물, 위의 신생물, 간의 신생물, 담낭의 신생물, 외분비 궤장의 신생물, 소장, 충수 및 복막의 신생물, 결장 및 직장의 선암종, 항문의 신생물; 비뇨생식관의 신생물: 신장 세포 암종, 신우 및 요관의 신생물, 방광의 신생물, 요도의 신생물, 전립선의 신생물, 음경의 신생물, 고환의 신생물; 여성 생식기관의 신생물: 음문 및 질의 신생물, 자궁경부의 신생물, 자궁 몸체의 선암종, 난소 암, 부인과 육종; 유방의 신생물; 피부의 신생물: 기저 세포 암종, 편평 암종, 피부섬유육종, 메르켈(Merkel) 세포 종양; 악성 흑색종; 골 및 연조직의 신생물: 골육종, 악성 피부섬유종, 연골육종, 유방 육종(Ewing's sarcoma), 원시신경외배엽 종양, 혈관육종; 조혈계의 신생물: 골수이상형성 증후군, 급성 골수형 백혈병, 만성 골수형 백혈병, 급성 림프모구 백혈병, HTLV-1, 및 T-cell 백혈병/림프종, 만성 림프모구 백혈병, 털모양 세포 백혈병, 호지킨 질환, 비-호지킨 림프종, 비만 세포 백혈병; 어린이의 신생물: 급성 림프모구 백혈병, 급성 골수구 백혈병, 신경모세포종, 골 종양, 횡문근육종, 림프종, 신장 및 간 종양을 포함하나 이로 제한되지 않는 질환을 가지는 개체를 포함한다. 기타 질환은 다낭성 신장 질환; 당뇨병성 망막병증; 류마티스성 관절염; 건선; 골관절염; 속귀신경집종, 신경섬유종, 트라코마 및 화농성아종; 황반 변성; 미숙아 망막병증; 각막 이식 거부반응; 신생혈관 녹내장 및 수정체위섬유증식을 포함한다. 기타 혈관형성과 관련된 질환은 유행성 각막결막염, 비타민 A 결핍, 아

토피성 각막염, 위각막가장자리 각막염, 익상편 건성 각막염, 쇼그렌병, 필렉테눌로시스(phlyctenulosis), 매독, 항산균 감염, 지질 퇴행, 화학 화상(burns), 세균성 궤양, 진균성 궤양, 단순 포진 감염, 대상 포진 감염, 원충 감염, 카포시 육종, 무렌 각막 궤양, 테리엔(Terrien's) 경계 변성, 경계 각질용해증, 전신루프스, 다발동맥염, 외상, 베게너 사르코이드증, 공막염, 스티븐스 존슨(Steven's Johnson) 질환, 페리피고이드(periphygoid) 방사상 각막절개술, 각막 이식 거부반응, 및 만성 염증 질환을 포함하나 이로 제한되지 않는다.

본원은 또한 TEM 1, TEM 17, 및 TEM 9로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 특이적으로 결합하여 종양 증식을 억제하는 유효량의 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편을 치료가 필요한 개체에 투여함을 포함하는, 종양 증식의 억제 방법을 제공한다. 본 발명의 방법에 의해 치료된 개체는 관심의 대상인 TEM을 발현한다. 본 발명의 방법에 유용한 항체는 항혈관 형성 제제 또는 항종양 제제에 콘주게이션된 항체를 포함한다. 본 발명에 의해 치료되는 개체는 선암종, 백혈병, 림프종, 흑색종, 육종, 또는 기형암종을 갖는 개체를 포함한다. 종양은 부신, 방광, 골, 골수, 뇌, 유방, 자궁경부, 담낭, 신경절, 위장관, 심장, 신장, 간, 폐, 근육, 난소, 췌장, 부갑상선, 음경, 전립선, 침샘, 피부, 지라, 고환, 흉선, 갑상선, 및 자궁의 암일 수 있다. 상기 종양은 중추신경계의 신생물: 다형성아교모세포종, 별아교세포종, 희소돌기아교세포종 종양, 뇌실막 및 맥락막 열기 종양, 송과체 종양, 신경 종양, 속질모세포종, 신경집종, 수막종, 수막육종; 눈의 신생물: 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 흑색종, 횡문근육종, 망막모세포종; 내분비샘의 신생물: 뇌하수체 신생물, 갑상선의 신생물, 부신 피질의 신생물, 신경 내분비계의 신생물, 위장췌장 내분비계의 신생물; 두부 및 경부의 신생물: 두부 및 경부 암, 구강 공동, 인두, 후두, 치아형성 종양; 흉부의 신생물: 큰 세포 폐 암종, 작은 세포 폐 암종, 비-작은 세포 폐 암종, 흉부의 신생물, 악성 종괴암, 가슴샘종, 흉부의 1차 미생물 세포 종양; 소화관의 신생물: 식도의 신생물, 위의 신생물, 간의 신생물, 담낭의 신생물, 외분비 췌장의 신생물, 소장, 충수 및 복막의 신생물, 결장 및 직장의 선암종, 항문의 신생물; 비뇨생식관의 신생물: 신장 세포 암종, 신우 및 요관의 신생물, 방광의 신생물, 요도의 신생물, 전립선의 신생물, 음경의 신생물, 고환의 신생물; 여성 생식기관의 신생물: 음문 및 질의 신생물, 자궁경부의 신생물, 자궁 몸체의 선암종, 난소 암, 부인과 육종; 유방의 신생물; 피부의 신생물: 기저 세포 암종, 편평 암종, 피부섬유육종, 메르켈 세포 종양; 악성 흑색종; 골 및 연조직의 신생물: 골육종, 악성 피부섬유종, 연골육종, 유방 육종, 원시신경외배엽 종양, 혈관육종; 조혈계의 신생물: 골수이상형성 증후군, 급성 골수형 백혈병, 만성 골수형 백혈병, 급성 림프모구 백혈병, HTLV-1, 및 T-cell 백혈병/림프종, 만성 림프모구 백혈병, 털모양 세포 백혈병, 호지킨 질환, 비-호지킨 림프종, 비만 세포 백혈병; 어린이의 신생물: 급성 림프모구 백혈병, 급성 골수구 백혈병, 신경모세포종, 골 종양, 횡문근육종, 림프종, 신장 및 간 종양을 포함하나 이로 제한되지 않는다.

본원은 또한 본 발명의 방법에 유용한 항혈관형성 제제 또는 항종양 제제를 비롯한 생물활성 제제에 콘주게이션된 항체의 조성물을 제공한다.

본 발명은 또한, 종양을 포함하는 TEM 1-트랜스제닉 마우스를 시험 분자와 접촉시키는 단계; 및 종양 성장의 억제를 검출하는 단계를 포함하는(여기서, 시험 분자는 시험분자와 접촉된 마우스내의 종양 성장이 시험분자와 접촉하지 않은 마우스에서의 종양성장에 비하여 감소되는 경우 TEM 1을 조절하는 혈관형성 억제제 분자로서 확인된다), TEM 1을 조절하는 혈관형성 억제제 분자의 확인 방법을 제공한다.

본원은 종양을 포함하는 TEM 9-트랜스제닉 마우스를 시험 분자와 접촉시키는 단계; 및 종양 성장의 억제를 검출하는 단계를 포함하는(여기서, 시험 분자는 시험분자와 접촉된 마우스내의 종양 성장이 시험분자와 접촉하지 않은 마우스에서의 종양성장에 비하여 감소되는 경우 TEM 9를 조절하는 혈관형성 억제제 분자로서 확인된다), TEM 9를 조절하는 혈관형성 억제제 분자의 확인 방법을 제공한다.

본원은 종양을 포함하는 TEM 17-트랜스제닉 마우스를 시험 분자와 접촉시키는 단계; 종양 성장의 억제를 검출하는 단계를 포함하는(여기서, 시험 분자는 시험분자와 접촉된 마우스내의 종양 성장이 시험분자와 접촉하지 않은 마우스에서의 종양성장에 비하여 감소되는 경우 TEM 17을 조절하는 혈관형성 억제제 분자로서 확인된다), TEM 17을 조절하는 혈관형성 억제제 분자의 확인 방법을 제공한다.

본원에 모노클로날 항체, 또는 그의 생물학적 활성 단편이 더 제공되며, 이는 TEM 1과 특이 결합하고, 여기서 상기 항체는 하이브리도마에 의해 생성된다. 일 실시태양에서, 상기 하이브리도마는 TEM1-70이다. 또다른 실시태양에서, 상기 하이브리도마는 TEM1-7이다. 또다른 실시태양에서, 상기 하이브리도마는 TEM1-38이다. 본원에는 또한, 모노클로날 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편이 제공되며, 여기서 상기 항체는 TEM 1에 특이성인 항체의 가변 영역과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일 실시태양에서 상기 항체는 IgG항체이다. 특정 실시태양에서, 상기 IgG 항체는 IgG₁, IgG₂, IgG₃, 및 IgG₄로 이루어진 IgG 서브클래스(subclass)에서 선택된다. 항체의 중쇄의 하나 이상의 아미노산이, 결실, 첨가 또는 원래의 아미노산과 다른 아미노산으로 치환되어 변환될 수 있다. 또한, 항체는 항암제 또는 혈관형성 억제제에 콘주게이션될 수 있다. 일 실시태양에서, 항체는 혈관형성을 억제한다. 구체적인 실시태양에서, 혈관형성은 암을 촉진 또는 야기시킨다.

구체적인 실시태양에서, 혈관형성은 다낭성 신장질환을 촉진 또는 야기시킨다. 구체적인 실시태양에서, 혈관형성은 당뇨병성 망막병증을 촉진 또는 야기시킨다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 혈관형성은 류마티스관 관절염을 촉진 또는 야기시킨다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 혈관형성은 건선을 촉진 또는 야기시킨다. 일 실시태양에서, 상기 TEM1-특이성 항체는 종양 성장을 억제한다. 상기 종양은 선암종, 백혈병, 림프종, 흑색종, 육종, 또는 기형암종일 수 있다. 상기 종양은 부신선, 방광, 뼈, 골수, 두뇌, 유방, 경부, 담낭, 신경절, 위장관, 심장, 신장, 간, 폐, 근육, 난소, 췌장, 부갑상선, 음경, 전립선, 침샘, 피부, 지라, 고환, 흉선, 갑상선, 또는 자궁의 암일 수 있다.

본원에는 TEM1에 특이성인 모노클로날 항체 또는 이들의 생물학적 활성 단편의 일정량, 및 적절한 부형제를 포함하는 제약학적 조성물이 제공된다. 일 실시태양에서, 상기 항체는 TEM1-70이다. 또다른 실시태양에서, 상기 항체는 TEM1-38이다. 또다른 실시태양에서, 상기 항체는 TEM1-7이다.

본원에는 하이브리도마 균주 TEM1-70, 하이브리도마 균주 TEM1-7, 및 하이브리도마 균주 TEM1-38이 제공된다.

발명의 상세한 설명

본원에 개시된 방법 및 조성물은, 시험관내 및 생체내 내피 세포의 성장 및 기능에 관한 것이다. 구체적으로, 이들 방법 및 조성물은, 종양 내에서 발견된 내피 세포에 우선적으로 발현되고 종양 내피 표지자 또는 TEM으로서 알려진, 내피 세포상의 일부 표면 분자에 대해 특이성을 가진 항체를 사용한다. 따라서, 이들 항체는 우선적으로 질환에 관련된 혈관형성을 표적으로 한다. TEM을 표적으로 하는 항체 분자는 적어도 4개의 상이한 메카니즘을 통해 내피 세포 활성의 조절제(예컨대, 치료제로서) 유용할 수 있다. 첫째로, 항체는 그 표적 세포 상에서 중요한 거대분자 신호 전달 경로를 조절 또는 억제함으로써 직접 작용할 수 있다. 예컨대, 항체는 중요한 리간드 또는 그의 수용기에 결합하여 필요한 양성 자극을 억제하거나 다르게는 음성 신호 (예컨대, 아포프토시스를 유도하는)를 유도할 수 있다. 두번째, 항체는 그 표적에 단순히 결합함으로써 그 표적 세포 상에 간접적으로 작용하고 그 결합체로서 생물활성 제제 (예컨대 치료적 잇점을 가진 방사성 핵종 및 유효 독소)를 운반할 수 있다. 셋째로, 항체는 면역 체계의 다른 요소를 표적 세포 상에 작용하도록 끌어들이 수 있다. 예컨대, 항체는 항체-의존성 세포 독성 (ADCC) 또는 보체-의존성 세포용해 (CDC)를 유발하기 위해 사용될 수 있다. 넷째로, 상기 항체는 고유의 세포독성을 가질 수 있다.

종양 혈관구조 내피를 표적하는 것은 몇가지 고유한 장점이 있다. 첫째, 혈관 내피의 내강면과 정맥주사식 투여된 제제 사이의 배리어가 최소화되므로, 표적 세포로의 이송 효율이 향상된다. 둘째, 몇몇 내피 세포의 국소 손상은, 내피의 반응성 팽창의 결과로서 혈관 폐색을 야기하고 주위 내피 세포를 손상시켜, 국소 손상을 보다 광범위하게 확장시킬 수 있다. 셋째, 내피 세포는 항체에 대한 저항성을 발생시키지 않을 수 있어, 그 효능 감소 없이 항체의 투여를 반복할 수 있다.

임의의 종양 내피 표지자는 본원에 제공된 방법 및 조성물에서의 표적으로서 작용한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "종양 내피 표지자 (TEM)"는 종양 내피 세포상에 우선적으로 발현된 분자를 지칭한다. TEM의 발현은, 정상 (비종양) 혈관구조 상에서는 일어나지 않거나 현저히 낮다 (문헌[St. Croix, et al., Science 289: 1197-1202 (2000)], 미국 특허출원번호 09/918715 (특허공개번호 20030017157) 참조). TEM은 그 반감기의 적어도 일부동안 내피 세포의 표면에 발현되는 임의 타입의 분자를 포함한다. 그러한 분자로는, 이에 한정되지는 않으나, TEM 1, TEM 2, TEM 3, TEM 4, TEM 5, TEM 6, TEM 7, TEM 8, TEM 9, TEM 10, TEM 11, TEM 12, TEM 13, TEM 14, TEM 15, TEM 16, TEM 17, TEM 18, TEM 19, TEM 20, TEM 21, TEM 22, TEM 23, TEM 24, TEM 25, TEM 26, TEM 27, TEM 28, TEM 29, TEM 30, TEM 31, TEM 32, TEM 33, TEM 34, TEM 35, TEM 36, TEM 37, TEM 38, TEM 39, TEM 40, TEM 41, TEM 42, TEM 43, TEM 44, TEM 45, 및 TEM 46가 포함된다.

일 실시태양에서, 상기 표적 분자는 TEM 1이다. 엔도시알린은 165 kDa의 당단백질이다 (문헌[Rettig, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 89: 10832-36 (1992), Christian, et al., J. Biol. Chem. 276:7408-14 (2001)] 참조). TEM 1의 서열은 문헌[Science 289: 1197-1202 (2001)]에서 St. Croix 및 그 동료들에 의해 엔도시알린 단백질의 것으로 확인되었다. TEM 1은 C-타입 렉틴형의 타입 I 맴브레인 단백질로서, 신호 선도 펩티드, 5개의 구형 세포외 영역, 이어서 뮤신형 영역, 트랜스맴브레인 세그먼트(transmembrane segment) 및 단세포질의 미부를 가진 타입 I 맴브레인 단백질이다. N-말단은 혈액 응집 조절에 관여하는 수용기인 트롬보스플린, 및 보체 수용기 C1qRp에 상동성을 나타낸다 (문헌[Webster, et al., J. Leuk. Biol. 67: 109-16 (2000)] 참조). 마우스(murine) 및 인간 TEM 1은 77.5%의 아미노산 동일성을 가지며, 트랜스맴브레인 영역에서는 100% 동일하다 (문헌[Opavsky, et al., J. Biol. Chem. 276: 38795-807 (2001)] 참조). TEM 1은 아미노산 1-17에서 신호 서열을 가지고, 아미노산 686-708에서 트랜스맴브레인 영역을 가진다. 그의 세포외 영역은 잔기 1-685에 있다. TEM 1 발현은 세포 밀도 (또는 세포 사이클)에 따라 좌우된다 (문헌[Opavsky et al., supra (2001)] 참조). TEM 1은, 생체내 세포 사이클의 가장 관련된 단계인 융합성 (Go) 세포에서 최고로 발현된다. TEM 1의 DNA 서열은 미국 특허출원번호 09/918715 (공개번호 20030017157)에서 서열 196로 개시되어 있다.

또다른 실시태양에서, 표적 분자는 TEM 17이다. TEM 17은, 잔기 1-18에서 신호 서열, 니도젠의 G1 도메인에 유사한 N-말단 영역, 플렉신에 상동성인 100 아미노산 영역, 잔기 427-445에서 트랜스멤브레인 도메인, 및 짧은 세포질의 미부를 갖는 타입 I 멤브레인 단백질이다. 그의 세포외 영역은 잔기 1-426을 포함한다. 플렉신 패밀리는 세포 인도 신호를 매개하며, 이는 TEM 17이 이들 효능에 대해 기능할 수 있다는 것을 제안한다. 마우스의 TEM 17은 인간 TEM 17과 81%의 서열 동일성을 가진다. TEM 17의 DNA 서열은 미국 특허출원번호 09/918715 (공개번호 20030017157)에서 서열 230로 공지되어 있다.

또다른 실시태양에서, 표적 분자는 TEM 9이다. TEM 9는 세크레틴 패밀리의 7스팬(span) 트랜스멤브레인 G-단백질 연결된 수용기이다. 이 G-단백질 연결된 수용기 상동체는 잔기 1-26에서의 신호 서열 및 7 트랜스멤브레인 영역을 모두 갖는다. N-말단 세포외 영역은 류신-리치 반복 (LRR) 영역, 이어서 면역글로불린 영역, 펩티드 호르몬 수용기 영역, 및 GPCR 단백질 분해 부위 영역으로 이루어진다. 이 세포외 영역은 아미노산 1-769에 있으며, 그의 트랜스멤브레인 영역은 잔기 817-829 (TM2와 TM3), 잔기 899-929 (TM4와 TM5), 및 잔기 1034-1040 (TM6와 TM7)에 있다. 상기 트랜스멤브레인 영역은 기타 세크레틴 패밀리의 세르펜틴 (serpentine) 수용기의 트랜스멤브레인 영역과 상동성이다. 세포질 영역의 개시는 GPCR-팔미토일화에 대해 통상적인 2개의 근접 시스테인을 함유한다. 따라서, TEM 9은 세포 부착성 단백질의 세포외 영역 특성을 갖는 G-단백질 연결된 수용기이다. 마우스 오르토로그(ortholog)(다른 종에서 동일한 기능을 갖는 동일한 기능의 유전자)는 잔기 1-29에서 예측된 신호 펩티드를 가지고, 인간 TEM 9와 87%의 상동성을 가진다. TEM 9의 DNA 서열은 미국 특허출원번호 09/918715 (공개번호 20030017157)에서 서열 212로 공지되어 있다.

임의의 특정 항체가 본원에 제공된 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 경쇄 면역글로불린 분자로부터의 적어도 하나의 가변 영역 및 표적 항원에 대한 특정 결합 사이트를 함께 형성하는 중쇄 분자로부터의 하나 이상의 가변 영역을 포함하는 분자를 지칭한다. 항체는 Fab 단편, F(ab')₂ 단편, 단일쇄 가변 영역, 또는 완전한 항체 분자의 형태에서 유용할 수 있다. 완전한 분자의 단편은 당업계에서 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있고, 이로써 효소 소화 및 재조합 수단이 포함된다. 본원의 방법에 유용한 단편은 생물학적 활성 단편이다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "생물학적 활성"은 원하는 항원 에피토프(항원 결정기)와 결합하여 생물학적 효과를 직접적 또는 간접적으로 미칠 수 있는 항체 또는 항체 단편을 지칭한다. 직접적 효과로는, 이에 한정되지는 않으나, 성장 신호의 억제, 항-아포프토시스 신호의 억제, 아포프토시스 또는 괴사 신호의 유도, ADCC 다단반응의 개시, 및 CDC 다단반응의 개시가 포함된다. 간접적 효과로는, 이에 한정되지는 않으나, 결합체 (예컨대, 방사선 핵종, 독소, 약 또는 기타 생물학적 제제) 이송, 또는 2차 제제 (예컨대, 방사선 조사와 같은 부가제에의 노출 후 독성이 되는 제제의 이송)에의 민감성으로 인한 독성이 포함된다. 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "특이성"은 항체가 표적 항원 에피토프에 선택적 결합하는 것을 지칭한다. 항체는, 주어진 조건하에서 적절한 항체에의 결합을 관련없는 항원 또는 항원 혼합물에서의 결합과 비교함으로써, 결합의 특이성에 대해 시험될 수 있다. 항체가 관련없는 항원 또는 항원 혼합물에 비해 적절한 항원에 대해 적어도 2, 5, 7 및 바람직하게는 10 배이상 결합하는 경우, 특이성이라고 여겨진다. 일 실시태양에서 특이성 항체는, 인간 TEM 항원에 결합하지만, 비인간 TEM 항원, 예컨대 마우스 TEM 항원에는 결합하지 않는다. 또다른 실시태양에서, 특이성 항체는 인간 TEM 항원에는 결합하지만, 인간 TEM 항원과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 그 이상의 아미노산 상동성을 갖는 비인간 TEM 항원과 결합하지 않는다. 일 실시태양에서, 항체는 IgG 항체이다. 예컨대, 상기 항체는 IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄ 항체이다.

일 실시태양에서, 상기 항체는 TEM1에 특이성인 클론 7로서, 하이브리도마 TEM1-7에 의해 생성된다. 또다른 실시태양에서, 항체는 TEM 1에 특이성인 클론 70으로서 하이브리도마 TEM1-70에 의해 생성된다. 또다른 실시태양에서, 항체는 TEM1에 특이성인 클론 38로서, 하이브리도마 TEM1-38에 의해 생성된다. 클론 7 (TEM1-7), 클론 38(TEM1-38), 및 클론 70(TEM1-70)을 생성하는 하이브리도마는 2003년 5월 15일, 부다페스트 조약에 의거하여, 수탁번호 FERM BP-8380 (TEM1-7), FERM BP 8381(TEM1-38), 및 FERM BP-8382(TEM1-70)로 국제 특허 미생물 기탁기관 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 305-8566, Japan)에 국제 기탁되었다.

본원의 방법 및 조성물에 유용한 항체는 세포 배양, 파아지(phage), 다양한 동물 (이에 제한되는 것은 아니지만 소, 토끼, 염소, 마우스, 래트, 햄스터, 기니피그, 양, 개, 고양이, 원숭이, 침팬지, 영장류가 포함됨)에서 생성될 수 있다. 따라서, 본원의 방법에 유용한 항원은 포유동물 항체이다. 파아지 기술은 초기 항체를 분리하기 위해, 또는 변형된 특이성 또는 결합특성 (avidity)을 갖는 변이체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 기술은 통상적이고, 당업계에 공지되어 있다. 일 실시태양에서, 항체는 당업계에서 공지된 재조합 수단에 의해 생성된다. 예컨대, 재조합 항체는 항체를 부호화한 DNA 서열을 포함하는 벡터를 가진 숙주 세포를 형질감염함으로써 생성될 수 있다. 하나 이상의 벡터가 숙주 세포에서 적어도 하나의 VL 및 VH 영역에서 발현하는 DNA 서열을 형질감염하기 위해 사용될 수 있다. 항체 생성 및 생산의 재조합 수단의 예시적인 기재로는, 문헌들 [Delves, ANTIBODY PRODUCTION: ESSENTIAL TECHNIQUES (Wiley, 1997); Shephard, et

al., MONOCLONAL ANTIBODIES (Oxford University Press, 2000) ; 및 Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (Academic Press, 1993)]이 있다. 본원 방법에 유용한 항체는 재조합 수단에 의해 변형되어 원하는 기능을 매개하는데 항체의 효능을 보다 증가시킬 수 있다. 또한, 항체가 재조합 수단을 사용한 치환에 의해 변형될 수 있다는 것도 고려될 수 있다. 통상적으로, 상기 치환은 보존성 치환일 것이다. 예컨대, 항체의 일정 영역에서 적어도 하나의 아미노산은 상이한 잔기로 치환될 수 있다 (미국특허 5,624,821, 미국특허 6,194,551, 국제특허공개번호 WO9958572, 및 문헌[Angal, et al., Mol. Immunol. 30: 105-08 (1993)] 참조). 아미노산의 변형으로는, 아미노산의 결실, 첨가, 치환이 포함된다. 몇 가지 경우에, 그러한 변화는 바람직하지 않은 활성, 예컨대 보체의존성 세포독성을 감소시키기 위해 이루어진다.

상기 항체는 인간화된 항체일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간화된 항체"는, 그 본래 항원 특이성을 유지하면서도 인간 항체와 더 흡사해지도록 비항원 결합 영역에서의 아미노산 서열이 변형된 항체를 지칭한다. 통상적으로, 상기 가변 영역은 하나의 종 (예컨대, 마우스)의 것이고, 상기 일정 영역은 본래 인간의 것이다. 상기 항체는 키메라 항체일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "키메라 항체"는, 그 본래 항원 특이성을 유지하면서도 1종 이상의 포유동물로부터의 서열을 포함하도록 아미노산 서열이 변형된 항체를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단일쇄 변이 단편 (ScFv)"는, 가요성 펩티드 링커에 의해 함께 결합된 면역글로불린의 변이 중쇄 (VH)와 경쇄 (VL)으로 이루어진 유전자 조작된 항체를 지칭한다.

임의의 형태의 항원이, 생물학적 활성 항체를 생성하기에 충분한 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 유도 항원은 단일 에피토프, 다중 에피토프, 또는 전체 단백질 단독 또는 당업계에서 공지된 1종 이상의 면역원성 개선제와 함께 일 수 있다. 상기 유도 항원은 단리된 전체 길이 단백질, 세포 표면 단백질 (예컨대, 항원의 적어도 일부로 형질감염된 세포로 면역화), 또는 가용성 단백질 (단백질의 세포외 도메인 부분으로만 면역화)일 수 있다. 항원은 유전적으로 변형된 세포에서 생성될 수 있다. 항원을 부호화한 DNA는 게놈형 (genomic) 또는 게놈형이 아닐 수 있으며, 세포외 도메인의 적어도 일부를 부호화한다. 본원에서 사용하는 바와 같이, 용어 "일부"는 관심있는 항원의 면역원성 에피토프를 구성하기 위해 필요한 만큼의 최소 아미노산 또는 핵산을 지칭한다. 관심있는 세포의 변환에 적절한 임의의 유전 벡터가 사용될 수 있으며, 이로써, 아데노바이러스 벡터, 플라스미드, 및 비바이러스성 벡터 (예컨대, 양이온성 지질)이 포함된다. 일 실시태양에서, 본원의 방법 및 조성물의 항체는 관심있는 TEM의 세포외 영역의 적어도 일부에 특이성있게 결합한다.

본원의 방법 및 조성물의 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이 용어 "모노클로날 항체"는 단일 B 세포에 의해 생성되는 단일 항체를 지칭한다. 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "폴리클로날 항체"는 동일한 항원 특이성을 가지나 1종 이상의 B 세포 클론에 의해 생성되는 모노클로날 항체의 혼합물을 지칭한다. 일 실시태양에서, 상기 폴리클로날 항체는 상이한 에피토프 특이성, 친화성, 결합특성을 갖는 모노클로날 항체를, 다중 항원 에피토프를 함유하는 단일 항원 내에 함유한다.

일 실시태양에서, 본원에 제공된 항체는 인간 항체이다. 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 상보적 결정 영역 (CDR)을 포함하는 경쇄 및 중쇄 서열의 실질적인 전체 서열이 인간 유전자로부터 온 항체를 지칭한다. 일 실시태양에서, 인간 모노클로날 항체는 트리오마 기술, 인간 B-세포 기술 (문헌[Kozbor, et al., Immunol. Today 4: 72(1983)] 참조), EBV 변환 기술 (문헌[Cole et al. MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY 77-96 (1985)] 참조), 또는 파아지 디스플레이 (문헌[Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581 (1991)] 참조)를 사용하여 제조된다. 구체적인 실시태양에서, 인간 항체는 트랜스제닉 마우스에서 생성된다. 그렇게 부분적인 것에서 완전한 것까지의 인간 항체를 제조하기 위한 기술은 당업계에서 공지되어 있고, 임의의 그러한 기술이 사용될 수 있다. 특히 바람직한 일 실시태양에서, 완전한 인간 항체 서열은 인간의 중쇄 및 경쇄 항체 유전자를 발현하도록 조작된 트랜스제닉 마우스에서 제조된다. 인간 항체를 생성하는 트랜스제닉 마우스를 제조하는 예시적인 기제는 PCT 공개번호 WO 02/43478에서 찾을 수 있다. 원하는 항체를 생성시키는 트랜스제닉 마우스로부터의 B 세포는 이어서 항체의 연속 생산을 위한 하이브리도마 세포주를 제조하기 위해 융합될 수 있다 (미국 특허번호 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, 5,545,806; 및 문헌[Jakobovits, Adv. Drug Del. Rev. 31:33-42(1998); Green, et al., J. Exp.Med. 188:483-495 (1998)] 참조).

이특이적 항체는 또한 본 발명의 방법 및 조성에서 유용하다. 본원에서 사용된 용어 "이특이적 항체"는 두개 이상의 상이한 항원 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 항체, 일반적으로 모노클로날 항체를 말한다. 일 실시태양에서, 에피토프는 동일한 항원에서 유래한다. 또 다른 실시태양에서, 에피토프는 두개의 상이한 항원에서 유래한다. 이특이적 항체를 만드는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 이특이적 항체는 두개의 면역글로불린 중쇄/경쇄 쌍의 공발현을 이용하여 재조합적으로 생산될 수 있다 [Milstein et. al., Nature 305: 537-39 (1983) 참조]. 별법으로, 이특이적 항체는 화학적 연결을 이용하여 제조될 수 있다 [Brennan, et al. Science 229: 81 (1985) 참조]. 이특이적 항체는 이특이적 항체 단편을 포함한다 [Hollinger, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6444-48 (1993), Gruber, et. al., J. Immunol. 152: 5368 (1994) 참조].

헤테로콘주게이트 항체(heteroconjugate antibody)는 본 발명의 방법 및 구성에 유용하다. 본원에서 사용된 용어 "헤테로콘주게이트 항체"는 공유적으로 연결된 두개의 항체를 의미한다. 그러한 항체들은 가교제를 이용하는 것을 포함하는 기지의 합성 단백질 화학을 이용하여 제조될 수 있다 [미국 특허 제4,676,980호 참조].

본원에서 제공되는 항체들은 생물활성 제제(bioactive agent)에 콘주게이션될 것이다. 본원에서 사용된 용어 "생물활성 제제"란 바람직한 생물학적 효과를 증진시키거나 매개하는 천연 화합물 또는 합성 화합물을 의미한다. 일 실시태양에서, 바람직한 생물학적 효과는 스타시스 (stasis) 또는 세포사 (예컨대, 아포프토시스)이다. 또 다른 실시태양에서, 바람직한 생물학적 효과는 스타시스 또는 세포사를 유도하는 이차 제제로 표적 세포를 자극하는 항체에서 유래한다. 생물활성 제제는 예컨대 화학요법 약물 또는 독신과 같은 제약학적 제제를 포함한다. 이들은 사이토킨, 리간드 또는 다른 항체를 포함할 수 있다. 일 실시태양에서, 상기 제제는 항종양제이다. 본원에서 사용된 용어 "항종양제 (antitumor agent)"는 면역 반응, 스타시스, 세포사 또는 괴사의 유도를 통해 종양 성장을 억제하는 제제를 말한다. 일 실시태양에서, 상기 제제는 항혈관형성제이다. 본원에서 사용된 용어 "항혈관형성제 (antiangiogenic agent)"는 면역 반응, 스타시스, 세포사, 또는 괴사의 유도를 통해 내피 세포 증식, 이동, 관형성 또는 이들의 일부 조합을 억제하는 제제를 말한다. 항체와의 결합에 적당한 제제는 사이토킨, 예컨대 인터루킨 2 (IL-2), 인터페론 (IFN), 종양 괴사 인자 (TNF); 알루미늄 (III) 프탈로시아닌 테트라술포네이트, 헤마토포피린 및 프탈로시아닌을 비롯한 광각증감물질 (광역학 요법에서 사용하기 위함); 방사핵, 예컨대 요오드-131 (^{131}I), 이트륨-90 (^{90}Y), 비스무스-212 (^{212}Bi), 비스무스-213 (^{213}Bi), 테크네튬-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), 레늄-186 (^{186}Re), 및 레늄-188 (^{188}Re); 항생제, 예컨대 독소루비신, 아드리아미신, 다우노루비신, 메토티렉세이트, 다우노마이신, 네오크지노스타틴 및 카보플라틴; 박테리아, 식물 및 기타 독신, 예컨대 디프테리아 독신, 수도모나스 에톡신 A, 스타필로코칼 엔테로톡신 A, 아브린-A 독신, 리신 A (데클리코실레이티드 리신 A 및 천연 리신 A), TGF- α 독신, 중국 코브라의 사이토톡신 (나자 나자 아트라), 및 젤로닌 (일종의 식물 독신); 식물, 박테리아 및 진균 유래의 리보솜 비활성 단백질, 예컨대 레스트릭토신 (아스페르길루스 레스트릭투스에 의해 생산되는 리보솜 비활성 단백질), 사포린 (사포나리아 오피시날리스의 리보솜 비활성 단백질), 및 RNase; 티로신 키나아제 억제제; ly207702 (디플루오르화 퓨린 뉴클레오시드); 리포솜 함유 항종양제 (예컨대 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 플라스미드 코딩 독신, 메토티렉세이트 등); 및 기타 항체 또는 항원 단편, 예컨대 F(ab)를 포함한다.

본원에서 제공되는 항체는 본 방법의 TEMS의 존재 또는 발현을 확인하는 방법에 유용하다. 일 실시태양에서 본원에서 제공되는 방법은, 샘플을 TEM-특이적 항체와 착물을 형성하기에 충분한 시간동안 접촉시키고, 착물을 검출하여 착물이 검출되면 TEM이 샘플내에 존재하는 것으로 하는 것을 포함하는 TEM 폴리폴리펩티드를 검출하는 방법이다. 그러한 검정의 예는 방사선면역검정, ELISA, 면역화학, 면역침전, 및 기타 공지의 면역검정을 포함하고, 예컨대 문헌 [USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Harlow, et al., ed. s 1999)]에서 확인할 수 있다. 상기 샘플은 세포, 단백질 또는 세포의 막 추출물, 생물학적 유체 (예컨대 가래, 혈액, 혈청, 혈장 또는 소변), 또는 포르말린 고정 또는 동결 조직 부분과 같은 생물학적 샘플을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 분석을 위해 그러한 샘플을 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 본원에 개시된 항체를 이용하여 분석된 샘플은 검정 포맷, 검출 방법의 성질, 및 검정될 조직, 세포 또는 세포 추출물에 따라 다양할 수 있다. 그러한 제조 및 변형은 당업계에 공지되어 있다. 임의의 적당한 검출 시스템이 이용될 수 있다. 구체적인 실시태양에서, 본원에서 제공되는 검출 방법은 질병 진단을 진단, 상연, 또는 모니터링(monitoring)하거나 치료요법 개입에의 반응성을 모니터링하기 위해 이용될 수 있다.

일 실시태양에서, 본원에서 제공되는 방법의 검정을 수행하기 위해 필요한 시약을 함유한 키트가 제공된다. 구체적으로는, 제1 콘테이너가 TEM에 특이적인 하나 이상의 항체를 포함하는 하나 이상의 콘테이너를 포함하고 하나 이상의 다른 콘테이너는 세척 시약, 결합 항체의 존재를 검출할 수 있는 시약을 하나 이상 포함하는, 구획 키트를 제공한다. 상기 콘테이너들은 유리, 플라스틱 또는 플라스틱이나 종이의 스트립일 수 있다. 검출 시약의 종류는 표지화된 제2 항체, 기타 표지화된 제2 결합제, 또는 다르게는 제1 항체가 표지화된 경우 효소 시약 또는 항체 결합 시약 (표지화된 항체와 반응할 수 있음)을 포함한다.

본원에서는 유효량의 인간 항체 또는 그들의 생물학적 활성 단편 (종양 내피 표지자 (TEM) 1 및 TEM 17로 이루어지는 군에서 선택되는 항원에 결합하여, 상기 항체가 세포의 증식을 억제함)을 투여하는, 세포의 증식을 억제하는 방법이 제공된다. 세포 증식을 측정할 수 있는 임의의 적당한 방법이 사용될 수 있다. 일 실시태양에서, 세포의 증식을 억제하는 방법은 내피 세포를 상기 기술한 TEM 특이적 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편과 접촉시키는 단계, 일정 기간 동안, 그리고 그 이후에 항체로 처리되지 않은 세포에 대한 증식을 측정하는 단계를 포함한다.

항체는 그것이 항체의 부재하 또는 비결합 항체의 존재하의 세포의 증식에 비해 세포의 증식을 억제하는 경우, 증식에 대해 억제성이다. 증식은 임의의 적당한 방법을 이용하여 정량화될 수 있다. 구체적으로, 증식은 방사선-표지 뉴클레오타이드

의 DNA (예컨대, ^3H -티미딘) 내 혼입을 평가함으로써 측정할 수 있다. 일 실시태양에서, 증식을 ATP 발광에 의해 측정한다. 구체적인 일 실시태양에서, 증식은 프로메가(Promega)의 셀타이터-글로™ 루미네센트 셀 비아빌리티 어세이 (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay)를 이용하여 측정한다. 세포의 증식은 또한 항체를 조직 또는 아래 기술한 개체에 투여하여 억제될 수 있다.

종양 내피 세포의 증강된 증식과 연관된 TEM의 기능을 억제하는 항체들이, 악성 질환이 순환하는 내피 전구 세포를 낮은 수준으로 발생시키거나 전혀 발생시키지 않는 (따라서, 그들의 질환의 종양 혈관계가 대부분 공동-선택된 기존 혈관상의 내피 세포의 증식으로부터 유래됨을 나타냄) 개체에 가장 유익하다. 종양 내피 세포의 증식의 억제는 치료에 동력학적으로 느리게 반응하기 때문에, 종양 내피 세포의 증식과 관련된 TEMS의 기능을 방해하는 것은 또한 상대적으로 낮은 종양 부담을 갖는 개체에 유익하다.

본원에서는 유효량의 인간 항체, 또는 그의 생물학적 활성 단편을 투여하는 방법이 제공되는데, 구체적으로는 TEM 1, TEM 17 및 TEM 9으로 이루어지는 군에서 선택되는 항원에 결합하고 그에 의해 항체는 세포의 이동을 억제한다. 세포 이동을 평가하는 임의의 적당한 방법이 본 방법에서 사용될 수 있다. 일 실시태양에서, 세포의 이동을 억제하는 방법은 내피 세포를 화학유인물질이 없는 챔버 내에서 TEM 특이적 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편과 접촉시키는 단계, 내피 세포 및 항체를 다공성막에 의해 분리된 챔버 내에서 화학유인물질을 갖는 제2 챔버로부터 인큐베이션(incubation)하는 단계, 항체의 존재 또는 부재하에서 화학유인물질을 갖는 제2 챔버에 들어간 세포의 수를 측정하는 단계 (여기서, 항체는 항체의 부재하 이동하는 세포의 수가 항체의 존재하 이동하는 수보다 클 경우 이동에 대해 억제성이다)를 포함한다.

항체의 존재하에서 이동하는 세포의 수가 항체의 부재하 또는 비결합 항체 또는 기타 관련없는 항체의 존재하의 세포의 이동에 비해 작은 경우, 항체는 이동에 대해 억제성이다. 이동은 임의의 적당한 방법을 이용하여 정량화될 수 있다. 특히, 이동은 화학유인물질을 갖는 챔버 내의 세포의 수 대 원 챔버 내에 남아있는 세포의 수를 평가하여 측정한다. 일 실시태양에서, 세포는 제조자의 지시에 따라, PKH67 녹색 염료로 미리 표지화된다. 또 다른 실시태양에서, 세포는 칼세인(Calcein) AM으로 표지화된다. 인큐베이션 후, 세포를 형광 도립상 현미경을 이용해 계수한다. 세포의 이동은 아래 기술하였듯이, 항체를 조직이나 개체에 투여함으로써 억제할 수 있다.

종양 내피 세포의 증강된 이동과 관련된 TEM의 기능을 방해하는 항체가, 악성 질환이 비교적 느리게 진전되거나 무활동인 개체 및/또는 기지의 전이 질환을 가지고 있는 개체에게 가장 유익한데, 이는 이들 개체의 질환 부위에서의 혈관형성이 질환의 보통 조직 부위로부터의 내피 세포 뿐 아니라 척수로부터의 내피 전구 세포에 이르게 될 가능성이 매우 크고, 따라서 주요 작용으로서 내피 세포의 이동이 요구되기 때문이다.

본원에서는 또한 TEM 1 및 TEM 17으로 이루어진 군에서 선택되는 항원에 특이적으로 결합하여 내피성 관형성을 억제하는 유효량의 인간 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편을 투여하는 것을 포함하는, 내피성 관형성의 억제 방법이 제공된다. 세관 형성을 평가하는 임의의 적당한 방법이 본원의 방법에 이용될 수 있다. 일 실시태양에서, 세포의 내피 세관 형성을 억제하는 방법은 적당한 기질 존재하에서 상기 언급한 것 처럼 내피 세포를 TEM 특이적 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편과 접촉시키는 단계, 내피 세포와 항체를 상기 기질 내에서 인큐베이션 하는 단계, 세관 형성을 평가하는 단계를 포함하고, 여기서 항체의 부재하에서 형성된 세관의 수 또는 세관의 특징이 항체의 존재하의 세관의 수 또는 세관의 특징에 비해 크거나 또는 현저하게 바뀐 경우 항체는 세관 형성에 억제성이다.

항체의 존재하에서 형성된 세관의 수가 항체의 부재하 또는 비결합 항체의 존재하에서 형성된 세관의 수보다 적은 경우 항체는 세관 형성에 억제성이다. 항체의 존재하에서 형성된 세관의 특징이 항체의 부재하에서 또는 비결합 항체의 존재하에서 형성된 세관의 특징에 비해 변경된 경우, 항체는 세관 형성에 대해 억제성이다. 본원에서 사용된 용어 "세관의 특성"은 기질 내에서 형성된 세관 네트워크의 강건함 및 지속성을 말한다. 세관 형성은 임의의 적당한 방법을 이용하여 정량화할 수 있다. 특히, 세관 형성은 현미경에 의해 평가한다. 일 실시태양에서, 세포는 제조자의 지시에 따라 PKH67 염료로 미리 표지화된다. 또 다른 실시태양에서 세포는 칼세인 AM으로 표지화한다. 기질 내에서 항체가 있거나 없는 인큐베이션 후에, 세관을 형광 도립상 현미경을 이용하여 검사한다. 세포에 의한 세관 형성은 또한 아래 기술한 것 처럼 항체를 조직 또는 개체에 투여함으로써 억제할 수 있다.

내피 세포의 증강된 관형성과 관련있는 TEM의 작용을 방해하는 항체는, 악성 질환이 내피 전구 세포의 높은 순환 수준을 발생시키는 (따라서 대부분 내피 전구 세포를 순환시킴으로써 확립되는 혈관의 발생으로부터 그들 질환의 종양 혈관계가 유래함을 나타내는) 개체에 가장 유익하다. 종양 내피 세포의 증강된 관형성과 관련있는 TEM의 작용을 방해하는 것은 또한 상대적으로 빠르게 성장하는 종양을 갖는 개체에도 유익하고, 여기서 혈관 관형성의 방해 또는 억제는 종양의 양의 지속적인 팽창을 막는다.

혈관형성, 증식, 이동 및(또는) 내피 세관 형성을 억제하는 방법에서, 관심 TEM을 발현하는 임의의 세포, 관심 TEM 발현을 유도할 수 있는 임의의 세포, 또는 비인간 TEM 동족(예컨대, 마우스, 소 등)을 발현하는 임의의 세포가 이용될 수 있다. 일 실시태양에서 상기 세포는 관심 TEM을 내인성으로 발현하는 세포주이다. 구체적인 실시태양에서, 상기 세포는 마우스 2H11 내피 세포주(ATCC)이다. 또 다른 실시태양에서, 상기 세포는 관심 TEM을 발현시키기 위해 유도된다. 구체적인 실시태양에서, 상기 세포는 기본 FGF (bFGF), VEGF 및 헤파린의 존재하에서 배양되어 실시예 1에 기술된 내피 전구 세포(EPC)를 발생시키는 AC133+/CD34+ 인간 척수 세포이다. 또 다른 실시태양에서, 상기 세포는 관심 TEM으로 형질감염 또는 형질도입된다. 구체적인 실시태양에서, 인간 제정맥 내피 세포(HUVEC) 또는 인간 미세혈관 내피 세포는 관심 TEM을 코딩하는 아데노바이러스 벡터로 형질도입된다. 또 다른 구체적인 실시태양에서, COS 또는 293 세포가 관심 TEM을 코딩하는 혈장으로 형질감염된다. 일부 실시태양에서, TEM-발현 세포는 다른 세포에 의해 조절되는 성장 인자 또는 배지와 접촉될 수 있다. 예를 들어, 콜론 암종 조절된 배지는 혈청 유리 배지에서 3일 동안 성장한 인간 HCT116 콜론 암종 세포 또는 인간 HT29 콜론 암종 세포의 융합성 배양체를 이용하여 제조될 수 있다. 배지를 보충하기에 유용한 인자들은 VEGF 및 bFGF를 포함한다. 일 실시태양에서, 상기 세포는 인간 또는 포유동물 개체로부터 유래한다(또는 이들내에 존재한다).

TEM-발현 세포는 임의의 적당한 방식으로 임의의 적당한 시간 동안 항체와 접촉될 수 있다. 상기 세포는 상기 항체와 인큐베이션 또는 처리 동안 한번 이상 접촉할 수 있다. 전형적으로, 요구되는 용량은 약 $1 \mu\text{g/ml}$ 내지 $1000 \mu\text{g/ml}$, 더욱 전형적으로는 $100 \mu\text{g/ml}$ 내지 $800 \mu\text{g/ml}$ 의 범위이다. 추출 용량은 세포를 시험관 내에서 배양하고 세포를 항체의 여러 용량에 노출시킴으로써 용이하게 측정될 수 있다. 전형적으로, 세포가 항체와 접촉하는 시간의 길이는 1 시간 내지 3일이고, 더욱 전형적으로는 24 시간이다. 임의의 적당한 기질이 이용될 수 있다. 일 실시태양에서, 기질은 기질은 재구성된 기저막 MatrigelTM 기질 (BD Sciences)이다.

본원에서는 TEM 1, TEM 17 및 TEM 9로 이루어지는 군에서 선택되는 항원에 특이적으로 결합함으로써 혈관형성을 억제하는 유효량의 인간 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편을 그것이 필요한 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 혈관형성의 억제 방법을 제공한다. 본원에서 사용된 용어 "혈관형성"은 혈관의 발생을 의미한다. 혈관은 기존 또는 새로운 혈관일 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "신생혈관형성"은 새로운 혈관의 발생을 의미한다.

본원에서는 TEM1, TEM 17 및 TEM 9로 이루어지는 군에서 선택된 항원에 특이적으로 결합함으로써 종양 성장을 억제하는 유효량의 인간 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편을 그것이 필요한 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 종양 성장의 억제 방법을 추가로 제공한다.

이들 방법에 의해 처리된 개체들은 관심 TEM 항원을 발현한다. 환자 샘플의 스크리닝 또는 진단 분석은 TEM-특이성 방법을 이용하는 치료의 개시 전에 수행될 수 있다. 그러한 진단 분석은, 세포, 단백질 또는 세포의 막 추출물, 가래, 혈액, 혈청, 혈장 또는 소변과 같은 생물학적 유체, 또는 본 발명의 항체를 이용하는 포르말린-고정 또는 동결 조직 부분과 같은 생물학적 샘플을 포함하는(그러나 이에 한정되지는 않음) 임의의 샘플을 이용하여 수행할 수 있다. TEM 발현의 검출 및 분석을 위한 임의의 적당한 방법이 이용될 수 있다.

임의의 개체가 본원에서 제공되는 방법 및 조성으로 처리될 수 있다. 그러한 개체는 질환 또는 증상과 관련된 혈관형성을 갖는 포유동물, 바람직하게는 인간이다. 개시된 방법 및 조성의 수의학적 이용 또한 고려된다. 그러한 용도는 가축 및 순혈 종 말의 혈관형성 관련 질환 또는 암의 치료를 포함할 것이다.

본원에서 사용된 "억제" 또는 "처리" 또는 "치료"는 비제어적인 혈관형성, 종양 성장 및(또는) 나타날 또는 나타날 것으로 예상되는 그러한 증상의 감소와 관련된 증후의 발생의 지연을 포함한다. 상기 용어들은 추가적인 증상을 예방하고 증상의 근본적인 대사 원인을 개선시키거나 예방하는, 기존의 비제어된 또는 바람직하지 않은 혈관형성-관련 또는 종양 성장-관련 증상을 개선시키는 것을 추가적으로 포함한다. 따라서, 상기 용어는 혈관형성-관련 질환 또는 증상, 특히 암을 가지고 있거나 이러한 질환 또는 증상이 발생할 가능성이 있는 척추동물 개체에게 부여되는 유의한 결과를 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료상으로 유효한 양" 또는 "유효량"은 단독으로 또는 부가적인 치료제와 함께 세포, 조직, 또는 가에 투여될 때 혈관형성- 및(또는) 종양-관련 질환 상태 또는 질환의 진행을 예방 또는 개선하는데 효과적인 항-TEM 항체의 양을 의미한다. 치료상으로 유효한 용량은 추가로 증상의 개선, 예를 들면, 관련 의학 상태의 치료, 치유, 예방 또는 개선, 또는 상기 상태의 치료, 치유, 예방 또는 개선의 비율의 증가를 초래하기에 충분한 화합물의 양을 의미한다.

활성 성분이 단독으로 투여된 개인에게 적용하는 경우, 치료상으로 유효한 용량은 성분 단독을 의미한다. 혼합되어 적용되는 경우, 혼합되어, 연속적으로 또는 동시에 투여되든지 간에, 치료상으로 유효한 용량은 치료 효과를 초래하는 활성 성분의 혼합된 양을 의미한다.

본 방법에 있어서 유용한 항체(어떠한 출처로부터 유래하든지 간에, 재조합형 및 비-재조합형 출처로부터 제한 없이 포함하는)는 그것을 필요로 하는 개체에게, 혼자 힘으로 투여될 수 있거나, 또는 그것이 적합한 담체 또는 부형제와 다양한 질병을 치료 또는 개선할 수 있는 용량으로 혼합된 제약 조성물로 투여될 수 있다. 상기 조성물은 또한 (단백질 및 담체 이외에) 희석제, 충전제, 염, 완충제, 안정화제, 가용화제, 당업계에 공지된 다른 물질들을 포함할 수 있다. 용어 "제약학적으로 허용가능한"은 활성 성분(들)의 생물학적 활성의 유효성을 저해하지 않는 비-독성 물질을 의미한다. 담체의 특성은 투여 경로에 의존할 것이다. 본 발명의 제약 조성물은 또한 사이토킨 같은 다른 항-혈관형성 및 항-종양제 또는 화학치료제를 포함할 수 있다.

본원에 제공된 치료 방법 또는 용도를 실시하는데 있어서, 본원에서 제공되는 치료상으로 유효한 양의 항체가 치료되어야 할 상태를 갖는 포유동물에 투여된다. 항체는 본원의 방법에 따라 단독으로 또는 다른 조혈성 인자(예를 들면, 사이토킨), 화학치료제, 항-혈관형성제 등을 사용하는 치료와 같은 다른 요법과 함께 투여될 수 있다. 하나 이상의 생물학적으로 활성인 제제와 함께 투여되는 경우, 본원에서 제공되는 항체는 생물학적으로 활성인 제제(들)와 동시에, 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 순차적으로 투여되는 경우, 주치의는 생물학적으로 활성인 제제와 본 발명의 단백질의 투여 순서를 결정할 것이다. 상기 화합물의 독성 및 효능은, 예를 들면, LD₅₀(집단의 50%에 대한 치사량) 및 ED₅₀(집단에 50%에 대한 치료상으로 유효한 용량)을 결정하기 위한, 세포 배양 또는 실험 동물 내의 표준 제약학적 절차에 의해 결정될 것이다. 독성 및 치료 효과 사이의 용량 비율이 치료 지수이고 그것은 LD₅₀과 ED₅₀ 사이의 비율로서 표현될 수 있다. 높은 치료 지수를 보이는 항체들이 바람직하다. 이들 세포 배양 분석 및 동물 연구로부터 얻어진 데이터는 인간에게 사용하기 위한 복용량의 범위를 공식화하는데 사용될 수 있다. 상기 화합물의 복용량은 바람직하게는 약간의 독성과 함께 또는 독성이 없이 ED₅₀을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다. 복용량은 이 범위 내에서 사용된 복용 형태 및 사용된 투여 경로에 의존하여 변할 수 있다. 정확한 공식, 투여 경로 및 복용량은 환자의 상태를 고려하여 각 의사에 의해 선택될 수 있다. 문헌[Fingl et al., THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS 1 (1975)]을 참조한다. 복용량 및 복용 간격은 바람직한 치료 효과를 유지하기에 충분한 활성 잔기의 플라즈마 수준, 또는 최소한의 효과적인 농도(MEC)를 제공하도록 개별적으로 조절될 수 있다. MEC는 각각의 화합물에 대해 변할 것이지만 시험관 내 데이터로부터 추정될 수 있다: 예를 들면, 본원에 기술된 분석을 사용한 50 내지 90%의 이동 활성의 억제를 달성하기 위해 필요한 농도이다.

투여 방식은 특별히 중요한 것은 아니다. 하나의 실시태양에 있어서, 투여 방식은 정맥내 볼루스(bolus)이다. 처방을 하는 의사는 보통 본원에서 제공된 항체의 복용량을 결정할 것이다. 복용량은 환자의 나이, 중량 및 반응에 따라 변할 것이다.

본 방법의 항체의 제형 및 투여 기술은 문헌[REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 최종판]에서 발견될 수 있다. 투여의 적합한 경로는, 예를 들면, 경구, 직장, 경점막, 또는 장관 투여; 근육 내, 피하, 척수 내 주사, 및 수막강 내, 직접 심실 내, 정맥, 복강 내, 비강, 또는 안구 내 주사를 포함하는 비경구 운반을 포함할 수 있다. 제약 조성물에 사용되거나 또는 본 발명의 방법을 실시하기 위해 사용된 항체의 투여는 경구 섭취, 흡입, 국부 응용 또는 피부, 피하, 복강 내, 비경구, 동맥 또는 정맥 주사와 같은 다양한 통상적인 방법에 의해 수행될 수 있다. 환자에게 정맥 주사하는 것이 바람직하다.

별법으로, 항체를 전신 방법보다는 국부 방법으로, 예를 들면, 항체를 직접 관절염에 걸린 관절, 섬유 조직, 또는 종양에, 중 중 디포(depot) 또는 서방성 제형으로 주사하는 것에 의해 투여할 수 있다. 더욱이, 항체는 조직-특이성 항체로 피복한 리포솜과 같은 표적화된 약물 운반 시스템, 관절염 또는 섬유 조직 또는 조양과 같은 표적화를 사용하여 투여될 수 있다. 리포솜이 고통받는 조직에 의해 선택적으로 표적화되고 취해질 수 있다.

본 방법에 따른 사용을 위한 제약 조성물은 따라서 활성 화합물을 제약학적으로 사용될 수 있는 제제 내로 처리하는 것을 촉진하는 부형제 및 보조제를 포함하는 하나 이상의 생리적으로 허용 가능한 담체를 사용한 통상적인 방법으로 제형될 수 있다. 이들 제약 조성물은 그 자체로서 공지된 방법에 의해, 예를 들면, 통상적인 혼합, 용해, 조립, 당의정(dragee)-제조, 가루화, 유화, 캡슐화, 트랩화 또는 동결 건조 처리의 수단에 의해 제조될 수 있다. 적절한 제형은 선택된 투여 경로에 의존한다. 액체 형태로 투여되는 경우, 물, 석유, 동물성 오일 또는 땅콩 오일, 광유, 대두유, 또는 참기름 같은 식물성 오일, 또는 합성 오일 같은 액체 담체가 첨가될 수 있다. 제약 조성물의 액체 형태는 추가로 생리 식염수, 텍스트로스 또는 다른 단당류 용액, 또는 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 글리콜을 함유할 수 있다. 액체 형태로 투여되는 경우, 제약 조성물은 약 0.5 내지 90 중량%의 본 발명의 단백질, 및 바람직하게는 약 1 내지 50%의 본 발명의 단백질을 함유한다.

본원 발명의 치료상으로 유효한 양의 항체가 정맥, 피부 또는 피하 주사에 의해 투여되는 경우, 본 발명의 단백질은 발열 물질이 없는, 비경구적으로 허용 가능한 수용액의 형태일 것이다. pH, 등장성, 안정성 등과 관련된, 상기 비경구적으로 허용 가능한 단백질 용액의 제조는 당업계 범위 내이다. 정맥, 피부, 또는 피하 주사를 위해 바람직한 제약 조성물은 본 발명의 단백질 이외에 염화나트륨 주사, 링거 주사, 텍스트로스 주사, 텍스트로스 및 염화나트륨 주사, 유산을 가한 링거 주사, 또는 당업계에 공지된 다른 비히클(vehicle)과 같은 등장 비히클을 함유해야 한다. 본 발명의 제약 조성물은 또한 안정화제, 방부제, 완충제, 항산화제, 또는 당업자에게 공지된 다른 첨가제를 함유할 수 있다. 주사를 위해, 본 발명의 제제는 수용액 내에서, 바람직하게는 헥스 용액, 링거 용액, 또는 생리 식염수 완충제와 같은 생리적으로 합당한 완충제 내에서 제형될 수 있다. 경점막 투여를 위해, 투과될 장벽에 적절한 침투제가 제형 내에 사용될 수 있다. 상기 침투제는 일반적으로 당업계에 공지되어 있다.

흡입에 의한 투여를 위해, 본 방법에 의한 사용을 위한 항체는, 적합한 추진제, 예를 들면, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로메탄, 이산화 탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압된 팩 또는 분무기로부터 제공된 에어로졸 분무의 형태로 편리하게 운반된다. 가압된 에어로졸의 경우 복용량 단위는 측정된 양을 운반하기 위한 밸브를 제공하는 것에 의해 결정되어 질 수 있다. 예를 들면, 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위한 젤라틴의 캡슐 및 카트리지는 화합물의 분말 믹스 및 락토스 또는 전분과 같은 적합한 분말 기체를 포함하여 제형될 수 있다. 화합물은 주사, 예를 들면, 일시 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구 투여를 위해 제형될 수 있다. 주사용 제형은 단위 복용량의 형태, 예를 들면, 앰플 또는 다용량 용기를 사용하여, 방부제의 투여와 함께 제공될 수 있다. 조성물은 현탁액, 유성 또는 수성 비히클 내의 용액 또는 에멀전과 같은 형태를 취할 수 있고, 현탁제, 안정화제 및(또는) 분산제와 같은 제형제(formulatory agent)를 함유할 수 있다.

비경구 투여를 위한 제약 제형은 수용성 형태의 활성 화합물의 수용액을 포함한다. 부가적으로, 활성 화합물의 현탁액이 적절한 유성 주사 현탁액으로 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클은 참기름 같은 지방 기름, 또는 에틸 올레이트 또는 트리글리세라이드 같은 합성 지방산 에스테르, 또는 리포솜을 포함한다. 수성 주사 현탁액은, 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스, 소르비톨, 또는 텍스트란과 같은, 현탁액의 점도를 증가시키는 물질들을 함유할 수 있다. 임의로, 현탁액은 고농축 용액의 제조를 가능하게 하기 위해 화합물의 용해도를 증가시키는 적합한 안정화제 또는 제제를 함유할 수 있다. 별법으로, 활성 성분은, 사용 전, 적합한 비히클, 예를 들면, 멸균의 발열 물질이 없는 물로 구성하기 위해 분말 형태일 수 있다.

본 발명의 제약 조성물에 있어서 개시된 방법에 유용한 항체의 양은 치료되는 상태의 성질 및 독성, 및 환자가 받은 사전 치료의 성질에 의존할 것이다. 결국, 주치의는 개별적인 환자를 치료하면서 본 발명의 단백질의 양을 결정할 것이다. 초기에, 주치의는 본 방법의 항체의 적은 양을 투여할 것이고 환자의 반응을 관찰할 것이다. 본 발명의 항체의 보다 많은 양이 환자에 대해 최적의 치료 효과가 얻어질 때까지 투여될 것이고, 그 시점에 복용량은 더 이상 증가하지 않는다. 본원의 방법을 실시하는데 사용된 다양한 제약 조성물은 1kg의 신체 중량 당 약 0.01 μ g 내지 약 100mg(바람직하게는 약 0.1 μ g 내지 약 10mg, 더 바람직하게는 약 0.1 μ g 내지 약 1mg)의 본 발명의 항체를 함유해야 한다고 의도된다. 투여되는 경우, 본 발명에 사용되기 위한 치료 조성물은, 물론, 발열 물질이 없는, 생리적으로 허용 가능한 형태이다. 상기한 바와 같은 조성물에 임의로 포함될 수 있는 본 방법의 항체 이외에 치료상으로 유용한 제제는, 별법으로 또는 부가적으로, 본 발명의 방법의 조성물과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

본원에서 제공된 항체는 단독으로 또는 다른 치료 기법과 함께 투여될 수 있다. 예를 들면, 치료 방법은 추가로 전리 방사선을 항체와 접촉하는 세포에 운반하는 단계를 포함할 수 있다. 전리 방사선은 악성 증식성 세포 사이에서 실질적인 정도로 세포를 죽이는 것을 유발하기에 충분한 양(생존 가능한 악성 세포의 분석 측정에 의해 정해진다)으로 운반된다. 유발된 세포를 죽이는 정도는 실질적으로 항체 단독 또는 전리 방사선 단독에 의해 유발된 것보다 크다. 전리 방사선의 전형적인 형태는 베타선, 감마선, 알파 입자, 및 X-선을 포함한다. 이들은 X-선 기계 또는 감마 카메라와 같은 외부 출처로부터 운반될 수 있거나, 또는 환자에게 방사성핵종 투여로부터 악성 조직에 운반될 수 있다. 방사성핵종의 사용은 당업계에 널리 이해되고 더 이상 상세히 설명할 필요가 없다. 악성의 치료에 전리 방사선을 사용하는 것은, 예를 들면, 문헌[S. Hellman, *Principles of Radiation Therapy, in CANCER: PRINCIPLES & PRACTICE OF ONCOLOGY* 248(V. T. DeVita, Jr., et al., eds., 4th ed., 1993)]에 기술된다. 사용될 수 있는 조사량의 범위는 약 1 내지 500cGy(즉, 약 1 내지 약 500rads)이다.

본원에서 제공된 항체는 또한 본원에 개시된 방법을 사용하여 단독으로 또는 내피성 세포 증식, 이동, 및(또는) 세관 형성의 억제제로서 확인된 다른 항체와 함께 투여될 수 있다. 공동-투여된 항체는 동일한 TEM의 상이한 에피토프, 상이한 TEM, 또는 TEM 및 또다른 혈관형성-억제 또는 항종양 표적에 특이적일 수 있다.

혈관형성과 관련된 임의의 질환은 본 방법을 사용하여 치료될 수 있다. 상기 질환들은 중추신경계의 신생물: 다형성아교모세포종, 희소돌기아교세포종 종양, 뇌실막 및 맥락막 열기 종양, 송과체 종양, 신경 종양, 속질모세포종, 신경집종, 수막종, 수막육종; 눈의 신생물: 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 흑색종, 횡문근육종, 망막모세포종; 내분비선의 신생물: 뇌하수체 신생물, 갑상선의 신생물, 부신 피질의 신생물, 신경내분비계의 신생물, 위장췌장 내분비계의 신생물, 생식선의 신생물; 두부 및 경부의 신생물: 두부 및 경부 암, 구강 공동, 인두, 후두, 치아형성 종양; 흉부의 생생물: 큰 세포 폐 암종, 작은 세포 폐 암종, 비-작은 세포 폐 암종, 흉부의 신생물, 악성 증피암, 가슴샘종, 흉부의 1차 미생물 세포 종양; 소화관의 신생물: 식도의 신생물, 위의 신생물, 간의 신생물, 쓸개의 신생물, 외분비 췌장의 신생물, 소장, 충수 및 복막의 신생물, 결장 및 직장의 샘암종, 항문의 신생물; 비뇨생식관의 신생물: 신장 세포 암종, 신우 및 요관의 신생물, 방광의 신생물, 요도의 신생물, 전립선의 신생물, 음경의 신생물, 고환의 신생물; 여성 생식 기관의 신생물: 음문 및 질의 신생물, 자궁경부의 신생물, 자궁 몸체의 샘암종, 난소 암, 부인과 육종; 유방의 신생물; 피부의 신생물: 기저 세포 암종, 편평 암종, 피부섬유육종, 메르켈 세포 종양; 악성 흑색종; 골 및 연조직의 신생물: 골육종, 악성 피부섬유종, 연골육종, 유방 육종, 원시신경외배엽 종양, 혈관육종; 조혈계의 신생물: 골수이상형성 증후군, 급성 골수형 백혈병, 만성 골수형 백혈병, 급성 림프모구 백혈병, HTLV-1 및 T-세포 백혈병/림프종, 만성 림프모구 백혈병, 털모양 세포 백혈병, 호지킨 질환, 비-호지킨 림프종, 비만 세포 백혈병; 어린이의 신생물: 급성 림프모구 백혈병, 급성 골수형 백혈병, 신경모세포종, 골종양, 횡문근육종, 림프종, 신장 및 간 종양을 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니다. 다른 질환들은 다낭신장 질환; 당뇨병 망막병증; 류마티스성 관절염; 건선; 골관절염; 선암; 백혈병; 림프종; 흑색종; 육종; 기형암종; 속귀신경집종, 신경섬유종, 트라코마(trachoma) 및 화농육아종; 황반 변성; 미숙아 망막병증; 각막 이식 거부; 신생혈관 녹내장 및 수정체뒤섬유증식을 포함한다. 혈관형성과 관련된 다른 질환들은 유행성 각결막염, 비타민 A 결핍증, 아토피성 각막염, 위각막가장자리 각막염, 익상편 건성 각막염, 쇼그렌병, 필렉테넬로시스, 매독, 항산균 감염, 지질 퇴행, 화학 화상, 세균성 궤양, 진균성 궤양, 단순 포진 감염, 대상 포진 감염, 원충 감염, 카포시 육종, 무관각막궤양, 테리엔 경계 변성, 경계 각질 용해증, 전신루푸스, 다발동맥염, 외상, 베게너 사르코이드증, 공막염, 스티븐스 존슨 질환, 페리피고이드 방사상 각막 절개술, 각막 이식 거부반응, 및 만성 염증 질환을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

본원에서 제공된 방법은 또한 지혈(angiostasis) 및 혈관형성의 생물학적 분석에 있어서처럼 중요한 비-임상 용도를 가진다. 혈관형성의 분석에 있어서 양성 및 음성 조절 모두를 제공하는 것에 의해, 방법들은 통상적인 혈관형성 상의 잠재적인 독성 효과를 평가하면서 후보 혈관형성성 분자의 유효성을 조사하고 특징지운다.

항-혈관형성성 분자는 혈관형성을 감소 또는 제거하는 분자이다. 상기 억제제는 하나 이상의 항-혈관형성성 신호, 입체 장애, 감소된 세포 표면 발현 등을 초래하는 TEM 단백질의 임계 결합 잔류물의 직접 결합을 통해 발생한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항-혈관형성성 분자"는 단백질 및 비-단백질 잔기 모두를 포함한다. 하나의 실시태양에 있어서, 제제는 작은 분자이다. 또다른 실시태양에 있어서, 제제는 단백질이다.

종양을 갖는 TEM-트랜스제닉 마우스를 시험 분자와 접촉시키는 단계; 및 종양 성장의 억제를 검출하는 단계를 포함하는 TEM 단백질을 조절하는 혈관형성 억제 분자의 확인 방법을 본원에서 제공하는데, 여기서 시험 분자는 시험 분자와 접촉된 마우스내 종양 성장이 시험 분자와 접촉되지 않은 마우스내 종양 성장에 비해 감소될 때, TEM 단백질 또는 활성을 조절하는 혈관형성 억제 분자로서 확인된다. 한 실시태양에서, TEM은 TEM 1이다. 또다른 실시태양에서, TEM은 TEM 9이다. 또다른 실시태양에서, TEM은 TEM 17이다.

TEM 트랜스제닉 마우스는 통상의 트랜스제닉 방법을 사용해 생성된다. 한 실시태양에서, RPCI11-867G23 BAC 클론 (진뱅크 기탁 번호 AP001107 인비트로젠 코프 (Invitrogen Corp.))내의 인간 TEM 1 cDNA를 트랜스진(transgene)으로 사용했다. C57B1/6 마우스의 배아내 주입은 와이에스 뉴 테크놀로지 인스티튜트, 인크. (YS New Technology Institute, Inc.)에 의해 실시되었다. 얻어진 TEM 1 트랜스제닉 마우스를 그 후 C57B1/6 마우스 (Japan SLC, Inc.)로 교차교배하여 추가의 트랜스제닉 후대를 생성한다.

임의의 적절한 종양은 임의의 적절한 방식으로 주입되어 항-혈관형성 분자의 시험에 대한 모델을 제공할 수 있다. 종양의 마우스 수용체는 임의의 적절한 균주일 수 있다. 종양은 종양에 대해 동계(syngeneic), 동종(allogeneic), 또는 이종(xenogenic)일 수 있다. 수용체는 nu/nu, scid, 및 베이지 마우스를 포함하나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 면역-관련 기능에 면역적격 또는 면역손상(immunocompromised) 될 수 있다. 한 실시태양에서, 수용체는 트랜스제닉 마우스이다. 한 특정 실시태양에서, 트랜스제닉 마우스는 인간 TEM 1 트랜스진을 갖는 C57B1/6 마우스이다. 인간 TEM 1 트랜스진은 RPCI11-867G23 BAC 클론 (진뱅크 기탁 번호 AP001107, 인비트로젠 코프)내 TEM 1의 DNA 서열을 포함한다. TEM 1 트랜스진은 그 후 업계의 통상의 방법을 사용해 C57BL/6 마우스 배아내로 주입된다. TEM 1 트랜스제닉 마우스는 그 후 트랜스제닉 후대 수를 증폭시키기 위해 비-트랜스제닉 균주-동일한 마우스와 교차교배될 수 있다. TEM 1 트랜스제닉 마우스는 동계 종양 세포, 예를 들면, B16 멜라노마 (ATCC)로 접종될 수 있다. 항체 투여의 종양 성장에 대한 효과

는 통상적 방법을 사용해 원발성 또는 전이성 종양 성장을 정량화하여 확인될 수 있다. 항체 투여량은 하나 이상의 투여에서 $1\mu\text{g}$ /마우스 내지 1mg /마우스이다. 항체는 임의의 적절한 경로로 투여될 수 있다. 한 실시태양에서, 항체의 투여량은 일주에 2번 $100\mu\text{g}$ /마우스이다. 한 특정 실시태양에서, B16 멜라노마 종양은 0일째에 C57B1/6 인간 TEM 1 트랜스제닉 마우스의 피하내로 주입되고, 원발성 종양의 부피가 칼리퍼를 사용해 지정된 시점에서 측정된다. 임의의 적절한 대조군 항체를 사용할 수 있다. 한 실시태양에서, 대조군 항체는 헵테인 디니트로페닐에 대해 유발된 정제된 IgG1 이소타입 대조군 항체이다.

다양한 상이한 시험 항-혈관형성 분자는 본원에서 제공된 방법을 사용해 확인될 수 있다. 항-혈관형성 분자는 수많은 화합물을 포함할 수 있다. 소정의 실시태양에서, 이는 유기 분자, 바람직하게 50 초과 약 2,500 달톤 미만의 분자량을 가진 소 유기 분자이다. 항-혈관형성 분자는 단백질과의 구조적 상호작용, 특히 수소결합에 필요한 관능기를 포함할 수 있고, 하나 이상의 아민, 카르보닐, 히드록실 또는 카르복실기, 바람직하게 두개 이상의 관능적 화학기를 포함할 수 있다. 항-혈관형성 분자는 하나 이상의 상기 관능기로 치환된 시클릭 탄소 또는 헤테로시클릭 구조 및/또는 방향족 또는 다가 방향족 구조를 포함할 수 있다. 항-혈관형성 분자는 또한 펩티드, 당류, 지방산, 스테로이드, 퓨린, 피리미딘과 같은 생체분자, 그의 유도체, 구조적 유사체 또는 조합물을 포함한다. 관심대상인 시험 항-혈관형성 분자는 또한 펩티드 및 단백질제, 예를 들면 항체 또는 그의 결합 단편 또는 유사작용제(mimetics), 예를 들면, Fv, F(ab')₂ 및 Fab를 포함할 수 있다.

시험 항-혈관형성 분자는 또한 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리를 비롯한 다양한 출처로부터 얻을 수 있다. 예를 들면, 무작위 올리고뉴클레오타이드 및 올리고펩티드의 발현을 비롯한 다양한 수단이 다양한 유기 화합물 및 생체 분자의 무작위 및 직접 합성에 이용가능하다. 별법적으로, 박테리아, 진균, 식물 및 동물 추출물 형태의 천연 화합물의 라이브러리는 이용가능하거나 쉽게 생산될 수 있다. 추가로, 천연 또는 합성적으로 생산된 라이브러리 및 화합물은 통상의 화학적, 물리적 및 생화학적 수단으로 쉽게 변형되고, 조합 라이브러리를 생산하기 위해 사용될 수 있다. 공지된 제약학적 약제는 구조 유사체를 생산하기 위해 아실화, 알킬화, 에스테르화, 아미드화등의 직접 또는 무작위 화학 변형이 부여될 수 있다.

시험 항-혈관형성 분자는 20% 이상, 종종 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90% 이상, 및 종종 100%로 종양의 성장을 특이적으로 억제할 수 있을 때 억제제로서 확인된다. 성장 억제는 임의의 통상의 측정법을 사용해 정량화될 수 있다. 예를 들면, 원발성 종양 성장에서, 종양 부피를 계산하기 위해 종양 질량을 수직 측정했다. 전이 성장은 적절시 현미경적 분석 또는 육안상의 분석으로 확인할 수 있다. 종양은 트랜스제닉 동물에 동계, 동종, 또는 이종일 수 있다. 시험 분자는 원발성 종양 성장의 성립 후 또는 국소 및/또는 원격의 전이의 성립 후에 종양 접종의 시점에 투여될 수 있다. 시험 분자의 단일 또는 복수 투여는 정맥내, 복막내, 종양내, 피하내 및 표피내를 포함하나 이에 제한되지 않은 임의의 통상의 투여 방식으로 주어질 수 있다.

하기 실시예들은 본 발명을 예시하기 위함이고 제한하려는 의도는 아니다.

실시예

실시예 1

내피 전구 세포(EPC)

내피 세포 계통 표지자 AC133 및 CD34를 발현하는 골수 세포는 피브로넥틴 또는 콜라겐 단층 배양물내의 VEGF, bFGF 및 헤파린으로 자극되어 내피 전구 세포(EPC)로 기술된 표현형으로 분화될 수 있다. 요약하면, 골수 세포를 EPC로 분화시키기 위해, AC133⁺/CD34⁺ 골수 집단을 통상의 수단으로 단리했다. 현탁 배양물에서, AC133⁺/CD34⁺ 세포를 15% FBS로 보충된 IMDM 배지내 50ng/ml VEGF₁₆₅, 10-50 ng/ml bFGF, 및 50/ml 헤파린으로 자극했다. 세포는 신속한 증식 및 분화를 진행한다. 얻어진 부착 세포 집단에 그 후 TEM 기능을 검사하는 시험관내 분석을 수행했다. 상기 EPC를 12 번의 수행에 걸쳐 배양물에서 증식하고 이는 골수의 줄기 세포와 완전히 분화된 내피 세포 사이의 중간체인 것으로 보인다. 상기 EPC의 특성은 HMVEC 및 HUVEC 같은 성숙 내피 세포처럼 많은 동일한 성질을 가진 것을 예시된다. 시험관내에서, EPC는 매트릭셀상에서 관를 형성하고 이주하고 침투할 수 있는데, 이들은 종양의 미세 환경내에서 신규한 혈관의 형태로 중요한 성질이다. EPC의 SAGE 분석을 자극(+ VEGF) 및 비자극(-VEGF) 조건하에서 유전자 발현을 비교 수행하여 주목할 만한 차이를 관찰했다. 생체내에서 인간 EPC는 면역결핍 마우스의 매트릭셀 플러그내에 이식될 때 관를 형성할 수 있어 마우스내 인간 내피의 혈관형성 모델을 얻게 해준다. EPC는 유세포 분석에 의해 분석된 HUVEC 및 HMVEC의 것과 유사한 농도로 CD31, PIH12, 및 CD105를 비롯한 많은 내피 세포 표면 표지자를 발현하는 것으로 알려졌다. 추가로,

EPC는 정상 결장 점막의 내피와 비교해 결장 종양의 새로운 수술 시험편 유래 내피 세포내 고농도로 발현되는 것으로 확인된 결장 종양의 내피 표지자 (TEM)인 mRNA를 발현한다. 인간 EPC내 발현된 TEM mRNA 농도는 MHVEC 및 HUVEC에서 관찰된 농도보다 현저히 높게 발현되었다. 사실, 많은 TEM은 HUVEC 및 MHVEC에서 검출되지 않았다.

실시예 2

TEM 1 항체

TEM 1에 대한 마우스의 폴리클로날 항체를 생성하기 위해, C57B1/6 마우스를 TEM 1의 전장 인간 유전자를 함유하는 pcDNA 3.1 인간 TEM 1 (hTEM 1) 플라스미드로 근육내 면역화했다. 인간 TEM1 코딩 서열을 3' 및 5' TEM1 특이 프라이머를 사용한 RT-PCR로 인간 태아 뇌 RNA로부터 클로닝했다. 5' 말단 프라이머를 변형하여 ATG 개시 코돈의 5'에 있는 컨센서스 코작 서열 CCACC을 함유하도록 했다. 미국 특허출원 09/918715의 서열 195 (공개 번호 20030017157)(진뱅크 번호 NM_020404)의 뉴클레오티드 (nt) 6-nt 2279에 상응하는 증폭된 산물인 2273개 염기쌍 (bp) 단편의 서열을 확인하고 pCDNA3.1 벡터(인비트로젠)내로 서브클로닝했다. 상기 벡터 pcDNA3.1 hTEM1는 757개 아미노산의 전장 단백질을 코딩한다.

TEM 1 세포외 도메인에 특이한 폴리클로날을 생성하기 위해, TEM 1의 전장 인간 유전자의 nt102 내지 nt1963을 벡터내 5' 말단에 5' 신호 서열과 myc-TAG 및 3'에 GPI 트랜스멤브레인 앵커 모티프를 갖는 VV-1 벡터 (Genovac AG, Freiburg, Germany) 프레임내로 서브클로닝하여 VV-1 TEM1을 생성했다. 벡터내 포함된 세포외 부분은 미국 특허출원 09/918715의 서열 195 (공개 번호 20030017157)(진뱅크 번호 NM_020404)의 아미노산 33 내지 684로부터 TEM1을 코딩한다. 토끼를 VV-1 TEM1 벡터로 면역화했다. 토끼 폴리클로날의 IgG 분획을 그 후 통상의 방법을 사용해 정제했다.

세포 표면 발현: TEM 1이 세포 표면에서 발견되는지 결정하기 위해, COS 세포 (ATCC)를 플라스미드 벡터인 pCFA-TEM1로 일시적으로 형질감염했다. 전장 인간 TEM 1을 pCFA 벡터 골격내로 클로닝했다 (Yew et al., Hum. Gene Ther. 10: 223-34 (1999)). 세포 (비-투과성)를 그 후 토끼 항-TEM 1 폴리클로날로 염색한 후 CY3-표지 항-토끼 Ig 항체로 염색했다. 세포를 그 후 핵 염색(DAPI)로 반대 염색하고 형광 광학 현미경으로 검사했다. 형광 염색은 COS 세포의 세포 표면으로 한정되어, TEM 1이 형질감염된 세포 표면에 발현됨을 증명했다.

유세포 분석(flow cytometric analysis)을 사용해, TEM 1의 세포 표면 발현을 2H11 내피 세포 (2H11 세포는 내재적으로 마우스 TEM 1을 발현함)에 대한 마우스 폴리클로날 항-인간 TEM 1 항체를 사용하고 VV1-TEM 1로 형질감염되고 토끼 폴리클로날 항 인간 TEM 1로 처리된 Hek-293 세포를 사용해 확인했다. 양 세포는 항-TEM 1 항체로 양성적으로 염색되었다. 이들 실험은 처음으로 TEM 1이 세포의 막 국소 단백질임을 증명한다.

증식 분석: 증식을 문헌[Crouch et al., J. Immunol. Meta. 160: 81 (1993) and Kangas et al., Med. Biol. 62:338 (1984)]에 기술된 방법에 의해 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조된 인간 내피 전구 세포 (EPC)를 사용해 분석했다. 2% 우태아 혈청으로 보충된 배지내 2×10^3 세포/웰을 사용해 96웰 플레이트 시스템내에서 증식을 평가했다. ATP 발광 분석 (CellTiter GloTM Luminescent Cell Viability kit, Promega)을 토끼 폴리클로날 항-인간 TEM 1에 노출된 인간 EPC에 대한 성장 억제 중점으로서 사용했다. 세포를 48-시간 동안 100-800 $\mu\text{g/ml}$ 의 증가하는 항체 농도로 인큐베이션했다. 대조군 IgG 항체는 시그마로부터 구입한 토끼 혈청 IgG 분획이었다. 항체의 부재하에, $3,662 \pm 354$ 개 EPC를 검출했다. 200, 400 및 800 $\mu\text{g/ml}$ 항체에서, 대조군 IgG의 존재하에 관찰된 세포수는 각각 $4,185 \pm 117$, $4,418 \pm 38$, 및 $4,611 \pm 165$ 개이었다. 대조적으로, 200, 400 및 800 $\mu\text{g/ml}$ 항-TEM 1 항체의 존재하에 관찰된 세포수는 각각 $3,756 \pm 92$, $3,881 \pm 97$, 및 $3,773 \pm 127$ 개이어서, 항-TEM 1 항체의 항-증식 효과를 증명했다. 상기 항-증식 효과는 토끼 항-TEM 1 폴리클로날 항체로 처리된 마우스 2H11 내피 세포에서도 관찰되었다. 항체의 부재하에, 2H11 세포는 $9,216 \pm 102$ 개 세포를 생산했다. 200, 400 및 800 $\mu\text{g/ml}$ 대조군 IgG로 인큐베이션된 2H11 세포는 $10,672 \pm 292$ 개 세포, $10,846 \pm 475$ 개 세포, 및 $11,977 \pm 267$ 개 세포를 각각 생산했다. 그러나, 200, 400 및 800 $\mu\text{g/ml}$ 항-TEM 1 항체의 존재하에 세포수는 $10,205 \pm 113$ 개 세포, $10,269 \pm 114$ 개 세포, 및 $8,725 \pm 97$ 개 세포로 각각 감소했다.

이동 분석: 이동을 문헌[Glaser et al., Nature 288: 483-84 (1983) and Alessandri et al., Cancer Res. 43: 1790-97 (1983)]에 기술된 바와 같이 인간 EPC (실시예 1에 기술된 바와 같이 제조)를 8 미크론 다공 막 위의 상부 챔버내 혈청 없는 배지에 챔버당 5×10^4 로 평판했다. 0.5% 우태아 혈청으로 보충된 배지를 하부 챔버에 화학-유인제로서 배치했다. 세포를 800 $\mu\text{g/ml}$ 항-인간 TEM 1 토끼 폴리클로날 항체 또는 대조군 토끼 IgG 분획의 부존재하에서 48-시간 동안 막의 하부면을 통해 이동되게 했다. 시험 웰의 상부 및 하부 챔버에 항체를 배치했다. 막을 통해 이동한 세포를 그 후 칼세인으로

염색하고 형광 강도로 정량화했다. 48 시간 후, 항체 없이 또는 대조군 IgG의 존재하에 인큐베이션될 때 이동 세포는 각각 7000 및 7750 RFU를 생성했다. 그러나, 항-TEM 1 항체의 존재하에, RFU는 4200로 감소되어, 이동 세포수의 상당한 감소를 예시했다.

내피성 관형성 분석: 전장 인간 TEM 1 (Ad2CMV-TEM1)을 코딩하는 유전자를 함유하는 아데노바이러스를 문헌[Souza, et al., Biotechniques, 26: 502-08 (1999)]에 기술된 바와 같이 pAD (vantage) 시스템을 사용해 제작했다. Ad2CMV-TEM1을 사용해 인간 미세혈관 내피 세포 (HMVEC)를 MOI 300로 감염했다. 바이러스 감염 72 시간 후, HMVEC를 트립신 처리하고 관 형성 분석을 위해 매트릭젤™ 상에 평판했다. 분석을 24시간 동안 24 웰 플레이트에서 수행했다. 세포를 그 후 칼세인 AM (Molecular Probes)으로 30-60 분간 37℃에서 염색하고, 관의 형광 이미지를 캡처했다. 관이 차지한 면적은 메타모र्फ (MetaMorph) 영상 분석을 사용해 정량화했다. 세포를 250 μ l 매트릭젤™로 3x10⁴ 세포/웰의 밀도로 평판했다. 항체의 부재하에, 비감염, 빈 벡터 (EV)-감염, 및 TEM 1-감염 세포의 관 면적은 각각 90000, 61000, 및 110000 픽셀이었다. 대조군 항체의 존재하에, 비감염, 빈 벡터 (EV)-감염, 및 TEM 1-감염 세포의 관 면적은 각각 38000, 62000, 및 61000 픽셀이었다. 800 μ g/ml 항-TEM 1 토끼 폴리클로날 항혈청의 존재하에, 사전 면역 토끼 혈청으로 노출된 세포에 비해 아데노-TEM 1 감염-HMVEC에서 관 형성의 감소가 관찰되었다. 비감염, 빈 벡터 (EV)-감염, 및 TEM 1-감염 세포의 관 면적은 각각 38000, 80000, 및 42000이었다. 항-TEM 1 항체 처리 세포는 항-TEM 1 항체로 노출되지 않은 세포내 관 면적에 비해 관 면적이 63% 감소하였다.

실시예 3

TEM 17 항체

TEM 17 세포의 도메인에 대해 특이적인 폴리클로날 항체를 생성하기 위해, TEM 17의 전장 인간 유전자의 nt 152 내지 nt 1318을, 벡터내 5' 말단에 5' 신호 서열과 myc-TAG 및 3'에 GPI 트랜스메브레인 앵커 모티프를 갖는 VV-1 벡터 (Genovac AG, Freiburg, Germany) 프레임내로 서브클로닝하여 VV-1 TEM17을 생성했다. 벡터내 포함된 세포의 부분은 미국 특허출원 09/918715의 서열 230 (공개 번호 20030017157)의 아미노산 24 내지 412로부터 TEM17을 코딩한다. 토끼를 VV-1 TEM17 벡터로 면역화했다.

TEM 17에 대한 마우스의 폴리클로날 항체를 생성하기 위해, C57B1/6 마우스를 TEM 17의 전장 인간 유전자를 함유하는 pcDNA 3.1 hTEM 17 플라스미드로 근육내 면역화했다. 인간 TEM17 코딩 서열을 3' 및 5' TEM 17 특이 프라이머를 사용한 RT-PCR로 인간 태아 뇌 RNA로부터 클로닝했다. 5' 말단 프라이머를 변형하여 ATG 개시 코돈의 5'에 있는 컨센서스 코작 서열 CCACC를 함유하도록 했다. 미국 특허출원 09/918715의 서열 229 (공개 번호 20030017157)(진뱅크 번호 AF279144)의 뉴클레오타이드 (nt) 83-nt 1585에 상응하는 증폭된 산물인 1503 bp 단편의 서열을 확인하고 pCDNA3.1 벡터(인비트로젠)내로 서브클로닝했다. 따라서, pcDNA3.1 hTEM17은 500개 아미노산의 전장 단백질을 코딩한다. 토끼 및 마우스 폴리클로날의 IgG 분획을 그 후 통상의 방법을 사용해 정제했다.

세포 표면 발현: TEM 17이 세포 표면에서 발견되는지 결정하기 위해, COS 세포 (ATCC)를 플라스미드 벡터인 pCFA-TEM17로 일시적으로 형질감염했다. 전장 인간 TEM 17을 pCFA 벡터 골격내로 클로닝했다. pCFA 벡터 골격은 문헌[Yew et al., Hum. Gene Ther. 10: 223-34 (1999)]에 기술되어 있다. 세포 (비-투과성)를 그 후 토끼 항-TEM 17 폴리클로날로 염색한 후 CY3-표지 항-토끼 Ig 항체로 염색했다. 세포를 그 후 핵 염색(DAPI)로 반대 염색하고 형광 광학 현미경으로 검사했다. 형광 염색은 COS 세포의 세포 표면으로 한정되어, TEM 17이 형질감염된 세포 표면에 발현됨을 증명했다.

유세포 분석을 사용하여, 2H11 내피 세포 상의 마우스 폴리클로날 항 인간 TEM 17 항체 (2H11 세포는 마우스 TEM 17을 내재적으로 발현함)를 사용하고, VV1-TEM 17으로 형질감염되고 토끼 폴리클로날 항 인간 TEM 17으로 처리된 Hek-293 세포를 사용하여 TEM 17의 세포 표면 발현을 확인하였다. 두 세포 유형은 항-TEM 17 항체를 사용하여 양성으로 염색하였다. 이들 실험은 처음으로 TEM 17이 세포의 및 막 위치 단백질이라는 것을 증명하였다.

증식 분석: 증식은 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조된 인간 내피 전구체 세포 (EPC's)를 사용하여 문헌[Crouch et al., J. Immunol. Meth. 160: 81 (1993)] 및 [Kangas et al., Med. Biol. 62: 338 (1984)]에 기재된 방법에 의하여 분석하였다.

증식은 2% 태아 소 혈청을 보충한 배지 중에서 2x10³ 세포/웰을 사용한 96 웰 플레이트 시스템에서 분석하였다. ATP 발광 분석 (CellTiter Glo™ Luminescent Cell Viability kit, 프로메가 (Promega))은 토끼 폴리클로날 항-인간 TEM 17에 노출된 인간 EPC에 대한 성장 억제 종말점으로서 사용하였다. 세포를 48 시간 동안 100-800 μ g/ml로 증가하는 농도의 항체와 인큐베이션하였다. 대조군 IgG 항체는 시그마 (Sigma)에서 구매한 토끼 혈청 IgG 분획이었다. 항체가 없는 경우에

는, $3,662 \pm 354$ EPC가 검출되었다. 200, 400 및 800 $\mu\text{g/ml}$ 의 항체에서는, 대조군 IgG의 존재시에 관찰되는 세포수는 각각 $4,185 \pm 117$, $4,418 \pm 38$ 및 $4,611 \pm 165$ 이었다. 반대로, 200, 400 및 800 $\mu\text{g/ml}$ 에서 항-TEM 17 항체의 존재시에 관찰되는 세포수는 각각 $3,480 \pm 190$, $3,472 \pm 35$ 및 $3,536 \pm 166$ 으로, 항-TEM 17 항체의 항-증식 효과를 나타내었다. 이 항-증식 효과는 토끼 항-TEM 17 폴리클로날 항체를 처리한 마우스 2H11 내피 세포에서는 관찰되지 않았다.

이동 분석: 이동은 챔버 당 5×10^4 으로 8 마이크론 세공 막 위의 상부 챔버에 혈청이 없는 배지에 플레이팅한 인간 EPC (실시예 1에 기재된 바와 같이 제조)를 사용하여 문헌[Glaser et al., Nature 288: 483-84 (1983)] 및 [Alessandri et al., Cancer Res. 43: 1790-97 (1983)]에 기재된 바와 같이 분석하였다. 0.5% 태아 소 혈청을 보충한 배지를 하부 챔버에 화학-주성물질로서 위치시켰다. 세포를 800 $\mu\text{g/ml}$ 항-인간 TEM 17 토끼 폴리클로날 항혈청 또는 대조군 토끼 IgG 분획의 존재 또는 부재 중에 48-시간에 걸쳐 막의 하부측을 통하여 이동시켰다. 항체를 실험 웰의 상부 및 하부 챔버 둘다에 위치시켰다. 그 후 막을 통하여 이동한 세포를 칼세인으로 염색하고, 형광 강도로 정량하였다. 48 시간 후에, 항체가 없이 또는 대조군 IgG의 존재시에 인큐베이션하였을 때, 이동 세포는 각각 4500 및 10,000 RFU를 생성하였다. 그러나, 항-TEM 17 항체의 존재시에, RFU는 3500으로 감소하였고, 이는 대조군 항체 처리된 세포에 비교하여 이동 세포의 수가 현저하게 감소하였다는 것을 나타낸다.

내피성 관형성 분석: 내피 세포 관형성의 항-TEM 17 항체의 영향을 조사하기 위하여, 인간 EPC (실시예 1에 기재된 바와 같이 제조)를 토끼 항-인간 TEM 17 폴리클로날 항체의 존재시에 밤새 전-인큐베이션하고, 그 후 매트릭셀 (MatrigelTM)으로 미리 코팅한 48 웰 디쉬 중에 2×10^4 세포/웰에서 0.5% 및 2% 태아 소 혈청 (FBS)을 보충한 기본 배지에 2×10^4 세포/웰로 플레이팅하였다. 24 시간 후에, 세포를 칼세인 AM (몰레큘라 프로브스 (Molecular Probes))로 30-60 분 동안 37 °C에서 염색하고, 관의 형광 영상을 포획하였다. 관이 점유한 면적을 메타모르프 (MetaMorph) 영상 분석을 사용하여 정량하였다. 대조군 항체의 존재시에, 0.5% 및 2% FBS의 존재시에 EPC의 관 면적은 각각 3000 및 2800 픽셀이었다. 800 $\mu\text{g/ml}$ 항-TEM 17 토끼 폴리클로날 항혈청의 존재시에, EPC의 관면적은 0.5% 및 2% FBS의 존재시에 각각 2200 및 600 픽셀이었으며, 이는 항-TEM 17 항체의 강력한 억제 효과를 나타낸다. 유사하게, 2H11 내피 세포에 의한 관형성이 토끼 폴리클로날 항-TEM 17의 존재시에 억제되었다. 2H11 세포를 800 $\mu\text{g/ml}$ 의 항체로 전-인큐베이션하고, 그 후 5 시간 동안 매트릭셀 중에서 네트워크/관을 형성하도록 하였다. 대조군 IgG의 존재 시에 관 면적은 6000 픽셀이었으며, 항-TEM 17 항체의 존재시에 면적은 2300 픽셀이고, 이는 항-TEM 17 항체가 인간 EPC 및 2H11 내피 세포 둘다에서 튜블 형성에 억제 효과를 제공한다는 것을 나타내었다.

실시예 4

TEM 9 항체

TEM 9에 대한 마우스 폴리클로날 항체를 형성하기 위하여, C57B1/6 마우스를 TEM 9에 대한 전장 인간 유전자를 함유하는 pcDNA 3.1 hTEM9 플라스미드를 근육내로 면역화하였다. 인간 TEM9cDNA를 pCMV Sport2 중에 인간 태아 신장 cDNA 라이브러리의 콜로니 혼성화에 의하여 클로닝하였다. cDNA를 TEM9 서열을 코딩하는 1100bp PCR 분획을 사용하여 스크리닝하고, 양성 클론을 완전히 시퀀싱하였다. cDNA 라이브러리를 cDNA의 3' 및 5' 말단에서 Not1 및 Sal1 부위를 첨가하여 형성하였다. 미국 일련 번호 제09/918715호 (공개 번호 제20030017157호) (AF 378755)의 서열 번호 211의 nt 35 내지 nt 4030와 동일한 3996 bp의 전장 TEM9 ORF를 함유하는 하나의 클론 pCMV Sport-2 TEM9 (클론 9-1)를 선택하였다. pCMV Sport-2 TEM9의 전장 서열은 pCDNA3.1 벡터 (Invitrogen)로 서브클로닝하여 pcDNA3.1 hTEM9를 생성하고, 이를 마우스의 면역화에 사용하였다.

TEM 9 세포의 도메인에 특이적인 폴리클로날을 형성하기 위하여, TEM 9에 대한 nt 127 내지 nt 2290의 전장 인간 유전자를 5' 신호 서열 및 5' 말단에 myc-tag 및 3' 말단에 GPI 경막 앵커 모티프 (anchor motif)를 갖는 VV-1 벡터 (제노박 아게 (Genovac AG), 독일, 프리부르그)로 서브클로닝하여 WW-1 TEM 9을 형성하였다. 벡터에 포함된 세포의 부분은 미국 일련 번호 제09/918715호 (공개 번호 제20030017157호)의 서열 212의 아미노산 32 내지 752로부터 TEM9을 코딩하였다. 토끼를 VV1-TEM 9 벡터로 면역화하였다. 그 후 토끼에 대한 IgG 분획 및 마우스 폴리클로날을 통상의 방법을 사용하여 정제하였다.

세포 표면 발현: TEM 9가 세포 표면에서 발견되는지를 결정하기 위하여, COS 세포 (ATCC)을 플라스미드 벡터, pCFA-TEM9로 일시적으로 형질감염하였다. 전장 인간 TEM 9을 pCFA 벡터 주체로 클로닝하였다. pCFA 벡터 주체는 문헌 [Yew et al., Hum. Gene Ther. 10: 223-34 (1999)]에 기재되었다. 그 후, 세포 (비-투과)를 토끼 항-TEM 9 폴리클로날

로 염색하고, CY3-표지된 항-토끼 Ig 항체로 염색하였다. 이후 세포를 핵 염색 (DAPI)으로 대비염색하고, 형광 현미경으로 검사하였다. 형광 염색은 COS 세포의 세포 표면을 한정하므로, TEM 9은 형질감염된 세포의 표면에 발현한다는 것을 나타내었다.

유세포 분석을 사용하여, 2H11 내피 세포 상의 마우스 폴리클로날 항 인간 TEM 9 항체 (2H11 세포는 마우스 TEM 9을 내재적으로 발현함)를 사용하고, VV1-TEM 9로 형질감염되고 토끼 폴리클로날 항 인간 TEM 9로 처리된 Hek-293 세포를 사용하여 TEM 9의 세포 표면 발현을 확인하였다. 두 세포 유형을 항-TEM 9 항체로 양성으로 염색하였다. 이들 실험은 처음으로 TEM 9가 세포의 막 위치 단백질이라는 것을 증명하였다.

증식 분석: 증식은 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조된 인간 내피 전구체 세포 (EPC's)를 사용하여 문헌[Crouch et al., J. Immunol. Meth. 160: 81 (1993)] 및 [Kangas et al., Med. Biol. 62: 338 (1984)]에 기재된 방법으로 분석하였다. 증식은 2% 태아 소 혈청을 보충한 배지에서 2×10^3 세포/웰을 사용하여 96 웰 플레이트 시스템에서 측정하였다. ATP 발광 분석 (세포Titer GloTM Luminescent Cell Viability kit, 프로메가)을 토끼 폴리클로날 항-인간 TEM 9에 노출된 인간 EPC's에 대한 성장 억제 종말점으로서 사용하였다. 세포를 48 시간 동안 100-800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 증가하는 농도의 항체로 인큐베이션하였다. 대조군 IgG 항체는 시그마에서 구매한 토끼 혈청 IgG 분획이었다. 인간 EPCs 또는 마우스 2H11 세포에서는 증식이 관찰되지 않았다.

이동 분석: 이동은 챔버 당 5×10^4 으로 8 마이크론 세공 막 위의 상부 챔버에 혈청이 없는 배지에 플레이팅한 인간 EPC's (실시예 1에 기재된 바와 같이 제조)를 사용하여 문헌[Glaser et al., Nature 288: 483-84 (1983)] 및 [Alessandri et al., Cancer Res. 43: 1790-97 (1983)]에 기재된 바와 같이 분석하였다. 2H11 세포를 플레이팅에 앞서 30 분 동안 항체로 전-인큐베이션하였다. 0.5% 태아 소 혈청을 보충한 배지를 하부 챔버에 화학-주성물질로서 위치시켰다. 세포를 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 항-인간 TEM 9 토끼 폴리클로날 항혈청 또는 대조군 토끼 IgG 분획의 존재 또는 부재 중에 48-시간 및 4-시간에 걸쳐 막의 하부측을 통하여 이동시켰다. 항체를 실험 웰의 상부 및 하부 챔버 둘다에 위치시켰다. 이후 막을 통하여 이동한 세포를 칼세인으로 염색하고, 형광 강도로 정량하였다. 대조군 혈청 단독으로 인큐베이션하면 이동 2H11 세포에 의하여 생성된 1000 RFU를 얻었고, 항-TEM 9 항체는 상대 형광이 820 RFU로 감소되었으며, 이는 TEM 항체에 의하여 이동이 억제된다는 것을 나타내었다. 항-TEM 9 항체가 존재할 때, EPC에서 유사한 억제가 관찰되었다. 항-TEM 9 항체에 의한 이동의 억제를 추가로 하기와 같이 제조된 아데노-TEM 9 감염된 (Ad2CMV-TEM9) HMVEC을 사용하여 확인하였다. 대조군 IgG의 존재시에, 이동 아데노-TEM 9-감염된 EPC는 1899의 형광 강도를 갖는다. 항-TEM 9 항체의 존재시에 형광 강도는 1254로 감소하였다.

내피성 관형성 분석: 전장 인간 TEM 9를 코딩하는 유전자를 함유하는 아데노바이러스 벡터 (Ad2CMV-TEM9)를 문헌 [Souza, et al., Biotechniques, 26: 502-08 (1999)]에 기재된 pAD (vantage) 시스템을 사용하여 구성하였다. Ad2CMV-TEM9를 사용하여 300의 MOI로 인간 모세혈관 내피 세포 (HMVEC)을 감염하였다. 바이러스 감염 72 시간 후에, HMVEC을 트립신화하고, 관 형성 분석을 위하여 매트릭젤TM 상으로 플레이팅하였다. 분석을 24 시간 동안 24 웰 플레이트에서 수행하였다. 이후 세포를 칼세인 AM (Molecular Probes)로 30-60 분 동안 37 °C에서 염색하고, 관의 형광 영상을 포획하였다. 관이 점유한 면적을 메타모르포 (MetaMorph) 영상 분석을 사용하여 정량하였다. 세포를 매트릭젤TM 250 μl 으로 3×10^4 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 항-TEM 9 항체에 노출되지 않은 세포에 비하여 항-TEM 9 처리 세포에서는 관 면적이 감소하지 않았다.

실시예 5

인간 항-TEM 1 항체

TEM 1의 인간 항체를 TEM 1-발현 FM3A 세포 (FM3A/TEM1) 또는 TEM 1-발현 L929 세포 (L929/TEM 1)를 면역화하여 KM 마우스TM (W002/043478)로부터 얻었으며, 이들 둘다는 인간 TEM1에 시약 토끼 폴리클로날 항체를 사용한 유세포분석 (FACS)로 측정한 바와 같이 높은 수준으로 인간 TEM 1를 발현하였다. FM3A/TEM 1의 확립을 위하여, 마우스 FM3A 유방 암종 세포 (ATCC)를 전기천공에 의하여 인간 TEM 1cDNA 함유 플라스미드로 형질감염하였다. BstXI 부위를 이용하여 pcDNA3.1 인간 TEM 1를 pTracerEF-Bsd (인비트로젠 (Invitrogen))로 서브클로닝하여 플라스미드를 구성하였다. L929/TEM1의 확립을 위하여, 마우스 L929 섬유모세포 (ATCC)를 TransIT-LT1 (Mirus)를 이용한 리포펙션에 의하여 동일한 플라스미드로 형질감염하였다. 이후 TEM 1-발현 세포를 세포 분류기, FACSVantage (BD Biosciences)를 사용하여 시약 토끼 폴리클로날 항체로 염색된 형질감염체로부터 수집하였다. FM3A/TEM 1를 10% 태아 소 혈청 (FBS) 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 블라스티시딘 S를 보충한 변형된 이글스 배지 (modified Eagle's medium)에서 유지시키

고, L929/TEM 1를 10% FBS 및 10 $\mu\text{g/ml}$ of 블라스티시딘 S을 보충한 돌베코 변형된 이글스 배지 (Dulbecco's Modified Eagle's medium)에서 유지시켰다. 마우스를 5×10^6 세포의 FM3A/TEM1 또는 1×10^6 세포의 L929/TEM1으로 2 주 간격으로 3회 복강내로 면역화하였다. 마지막 면역화에서, 세포 융합 3일 전에, 5 μg 의 인간 인터루킨-6을 면역화 마우스로 복강내 주사하였다. 하이브리도마를 융합 파트너로서 SP2/O-Ag14 골수종 세포 (ATCC)를 사용한 면역화 동물의 비장으로부터 준비하였다. 인간 TEM 1에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마를 EM 1-발현 FM3A 세포를 사용한 그 상등액을 FACS 분석하여 스크리닝하였다. 요약하면, TEM 1-발현 FM3A 세포를 1 시간 동안 0 °C에서 상등액으로 인큐베이션하였다. 세척 후에, 세포를 1 시간 동안 0°C에서 RPE-컨주게이션된 항-인간 카파 채 특이적 항체 또는 RPE-컨주게이션된 항-인간 감마 채 특이적 항체와 인큐베이션하였다. 세척 후에, 세포를 FACS 분석하였다. 선택된 하이브리도마를 한계 희석법 (limiting dilution method)으로 클로닝하였다.

항체의 정제: 항체의 정제를 위하여, 1% Low IgG FBS (Hyclone), 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 인슐린, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 트랜스페린, 10 μM 의 에탄올아민 및 25 nM의 소듐 셀레나이트를 보충한 eRDF 배지 (교부토 파마시 (Kyokuto Pharmacy))로 적응시켰다. 발효 브로쓰로부터의 IgG의 정제를 항체 생산에 대하여 통상적으로 사용되는 종래 기술의 조합을 이용하여 수행하였다. 정제 과정을 시작하기에 앞서 배양 수확물을 정화하여 세포 및 세포 파편을 제거하였다. 이는 수확물의 여과를 사용하여 달성하였다. 정화 후에, 항체를 포획하고, 프로테인 A 매트릭스 (Protein A matrix) (MabSelect; 아마삼 바이오사이언시스 (Amersham Biosciences)) 상에서 친화도 크로마토그래피를 사용하여 현저하게 정제하였다. 항체를 프로테인 A 매트릭스에 결합시키고, 매트릭스를 세척하고, pH를 감소시켜서 용리하였다. 그후, 항체의 추가 정제는 음이온 교환 크로마토그래피 (Q Sepharose Fast Flow; 아마삼 바이오사이언시스) 및 양이온 교환 크로마토그래피 (SP Sepharose Fast Flow; 아마삼 바이오사이언시스)에 의하여 달성하였다. 불순물 제거 뿐 아니라, 이 단계는 PBS로 완충액을 교환하기 위하여 사용할 수도 있다.

증식 분석: 인간 내피 전구체 세포 (EPC) 증식을 2% 태아 소 혈청을 보충한 배지 중에서 2×10^3 세포/웰을 사용하여 96 웰 플레이트 시스템에서 측정하였다. ATP 발광 분석 (CellTiter GloTM Luminescent Cell Viability kit, 프로메가)을 인간 항체로 인큐베이션한 EPC에 대한 성장 억제 종말점으로서 사용하였다. 세포를 48 시간 동안 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 인간 항-TEM 1 상등액으로 인큐베이션하였다. 다수의 항체 상등액은 EPC 증식을 억제하였다.

인간 TEM 1 항체에 의한 종양 성장 억제: 인간 TEM 1에 대한 인간 TEM 1 항체를 세포내 측정하기 위하여, 인간 TEM 1 형질전환 마우스를 형질전환유전자로서 RPC11-867G23 BAC 클론 (Invitrogen Corporation)을 사용하여 확립하였다. C57BL/6 배아로의 형질전환유전자의 주사는 YS 뉴 테크놀로지 인스티튜트, 인크 (YS New Technology Institute, Inc.)에서 수행하였다. 그후, TEM 1 형질전환 마우스를 비-형질전환 C57BL/6 마우스 (제팬 SLC, 인크 (Japan SLC, Inc.))와 교배하여 형질전환 자손을 확장하였다. 성체 TEM 1 형질전환 마우스를 제0일에 피하로 1×10^6 세포의 B16 흑색종 (ATCC)을 접종하고, 각 실험군으로부터의 개별의 마우스의 종양 부피를 캘리퍼스를 사용하여 표시된 시점에서 측정하였다. 클론 7, 클론 38, 및 클론 70으로부터의 정제된 TEM1 항체, 및 헵텐 (즉, 디니트로페닐)에 대하여 특이적인 정제된 IgG1 이소타입 대조군 항체를 제1일에 시작하여 100 μg /마우스 용량으로 주 2회 투여하였다. 제6일에, 대조군 IgG1 항체 (n=6), 클론 TEM1-7 항체 (n=6), 클론 TEM1-70 (n=4), 및 클론 TEM1-38 (n=6)을 받은 마우스의 종양 부피는 각각 4.88 ± 3.629 , 6.12 ± 6.12 , 3.56 ± 3.56 , $36.83 \pm 15.15 \text{ mm}^3$ (값은 평균 $\pm$ SEM으로 나타냄)이었다. 제9일에, IgG 대조군 항체를 받은 마우스의 종양 부피는 $378.02 \pm 112.90 \text{ mm}^3$ 의 종양 부피를 가지며, 클론 TEM1-7, 클론 TEM1-70 및 클론 TEM1-38 항-TEM 1 항체를 받은 마우스는 각각 221.82 ± 54.12 , 130.08 ± 25.14 및 $467.41 \pm 185.19 \text{ mm}^3$ 이었다. 제13일에, 항-TEM 1 항체는 B16 종양 성장을 더욱더 급격하게 억제하였다. 대조군 항체만을 받은 마우스의 종양 부피는 $944.04 \pm 402.19 \text{ mm}^3$ 까지 증가시키고, 반면 항-TEM 1 항체를 받은 마우스에서는 종양 부피는 각각 클론 TEM1-7, TEM1-70 및 TEM1-38 항체에 있어서 204.88 ± 31.56 , 128.67 ± 62.46 및 $513.92 \pm 174.40 \text{ mm}^3$ 였다.

본 발명의 기본적인 면에서 벗어나지 않고 상기의 것에 변형을 가할 수 있다. 본 발명을 하나 이상의 특이적인 실시태양에 대하여 상세하게 설명하였지만, 당업자는 본 출원에 특이적으로 개시된 실시태양에 변화를 가할 수 있다는 것을 인식할 것이며, 이러한 변형 및 개선은 하기 청구항에서 설명된 본 발명의 범위 및 본질 내에 있을 것이다.

상기 공개 또는 문헌의 인용은 임의의 상기의 것들이 적절한 선행 기술이라는 것을 인정하려는 의도가 아니며, 이들 공개 또는 문헌의 내용 또는 일자에 있어서 인정을 얻으려는 것도 아니다. 본원에 참조된 미국 특허 및 다른 공개들은 참조문헌으로 삽입되어 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

종양 내피 표지자(TEM) 1 및 TEM 17로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 특이적으로 결합하여 세포 증식을 억제하는 유효량의 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편을 투여함을 포함하는, 세포 증식의 억제 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편이 항원의 세포의 도메인에 특이적으로 결합하는 것인 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 항원이 TEM 1인 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, 항원이 TEM 17인 방법.

청구항 5.

제1항에 있어서, 항체가 인간 항체인 방법.

청구항 6.

제1항에 있어서, 항체가 인간화된 항체 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 7.

제1항에 있어서, 항체가 완전한 항체 분자, 단일쇄 가변 영역, Fab 단편 또는 $F(ab')_2$ 단편인 방법.

청구항 8.

제1항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체인 방법.

청구항 9.

제1항에 있어서, 항체가 트랜스제닉(transgenic) 마우스에서 생산된 것인 방법.

청구항 10.

제1항에 있어서, 세포 증식이 시험관내에서 억제되는 것인 방법.

청구항 11.

제1항에 있어서, 항체가 생물활성 제제(bioactive agent)에 콘쥬게이션(conjugation)된 것인 방법.

청구항 12.

TEM 1, TEM 17 및 TEM 9로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 특이적으로 결합되어 세포 이동을 억제하는 유효량의 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편을 투여함을 포함하는, 세포 이동의 억제 방법.

청구항 13.

제12항에 있어서, 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편이 항원의 세포외 도메인에 특이적으로 결합하는 것인 방법.

청구항 14.

제12항에 있어서, 항원이 TEM 1인 방법.

청구항 15.

제12항에 있어서, 항원이 TEM 17인 방법.

청구항 16.

제12항에 있어서, 항원이 TEM 9인 방법.

청구항 17.

제12항에 있어서, 항체가 인간 항체인 방법.

청구항 18.

제12항에 있어서, 항체가 인간화된 항체 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 19.

제12항에 있어서, 항체가 완전한 항체 분자, 단일쇄 가변 영역, Fab 단편 또는 $F(ab')_2$ 단편인 방법.

청구항 20.

제12항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체인 방법.

청구항 21.

제12항에 있어서, 항체가 트랜스제닉 마우스에서 생산된 것인 방법.

청구항 22.

제12항에 있어서, 세포 이동이 시험관내에서 억제되는 것인 방법.

청구항 23.

제12항에 있어서, 항체가 생물활성 제제에 콘쥬게이션된 것인 방법.

청구항 24.

TEM 1 및 TEM 17로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 특이적으로 결합하여 내피성 관형성(endothelial tube formation)을 억제하는 유효량의 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편을 투여함을 포함하는, 내피성 관형성의 억제 방법.

청구항 25.

제24항에 있어서, 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편이 항원의 세포외 도메인에 특이적으로 결합하는 것인 방법.

청구항 26.

제24항에 있어서, 항원이 TEM 1인 방법.

청구항 27.

제24항에 있어서, 항원이 TEM 17인 방법.

청구항 28.

제24항에 있어서, 항체가 인간 항체인 방법.

청구항 29.

제24항에 있어서, 항체가 인간화된 항체 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 30.

제24항에 있어서, 항체가 완전한 항체 분자, 단일쇄 가변 영역, Fab 단편 또는 F(ab')₂ 단편인 방법.

청구항 31.

제24항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체인 방법.

청구항 32.

제24항에 있어서, 항체가 트랜스제닉 마우스에서 생산된 것인 방법.

청구항 33.

제24항에 있어서, 항체가 내피성 관형성을 시험관내에서 억제하는 것인 방법.

청구항 34.

제24항에 있어서, 항체가 생물활성 제제에 콘쥬게이션된 것인 방법.

청구항 35.

종양을 지닌 TEM 1 트랜스제닉 마우스를 시험 분자와 접촉시키는 단계; 및

종양 성장의 억제를 검출하는 단계

를 포함하고, 이때 상기 시험 분자와 접촉한 마우스에서의 종양 성장이 시험 분자와 접촉하지 않은 마우스에서의 종양 성장에 비해 감소될 때 상기 시험 분자를 TEM 1을 조절하는 혈관형성(angiogenesis) 억제제 분자로서 확인하는, TEM 1을 조절하는 혈관형성 억제제 분자의 확인 방법.

청구항 36.

종양을 지닌 TEM 9 트랜스제닉 마우스를 시험 분자와 접촉시키는 단계; 및

종양 성장의 억제를 검출하는 단계

를 포함하고, 이때 상기 시험 분자와 접촉한 마우스에서의 종양 성장이 시험 분자와 접촉하지 않은 마우스에서의 종양 성장에 비해 감소될 때 상기 시험 분자를 TEM 9를 조절하는 혈관형성 억제제 분자로서 확인하는, TEM 9를 조절하는 혈관형성 억제제 분자의 확인 방법.

청구항 37.

종양을 지닌 TEM 17 트랜스제닉 마우스를 시험 분자와 접촉시키는 단계; 및

종양 성장의 억제를 검출하는 단계

를 포함하고, 이때 상기 시험 분자와 접촉한 마우스에서의 종양 성장이 시험 분자와 접촉하지 않은 마우스에서의 종양 성장에 비해 감소될 때 상기 시험 분자를 TEM 17을 조절하는 혈관형성 억제제 분자로서 확인하는, TEM 17을 조절하는 혈관형성 억제제 분자의 확인 방법.

청구항 38.

TEM 1, TEM 17 및 TEM 9로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 특이적으로 결합하여 혈관형성을 억제하는 유효량의 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편을 혈관형성의 억제가 필요한 개체에게 투여함을 포함하는, 혈관형성의 억제 방법.

청구항 39.

제38항에 있어서, 개체가 항체에 의해 결합되는 항원을 발현시키는 것인 방법.

청구항 40.

제38항에 있어서, 혈관형성이 신생혈관형성(neoangiogenesis)인 방법.

청구항 41.

제38항에 있어서, 항원이 TEM 1인 방법.

청구항 42.

제38항에 있어서, 항원이 TEM 17인 방법.

청구항 43.

제38항에 있어서, 항원이 TEM 9인 방법.

청구항 44.

제38항에 있어서, 항체가 인간 항체 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 45.

제38항에 있어서, 항체가 인간화된 항체인 방법.

청구항 46.

제38항에 있어서, 항체가 완전한 항체 분자, 단일쇄 가변 영역, Fab 단편 또는 F(ab')₂ 단편인 방법.

청구항 47.

제38항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체인 방법.

청구항 48.

제38항에 있어서, 항체가 IgG 항체인 방법.

청구항 49.

제48항에 있어서, 항체가 IgG₁ 항체인 방법.

청구항 50.

제48항에 있어서, 항체가 IgG₂ 항체인 방법.

청구항 51.

제48항에 있어서, 항체가 IgG₃ 항체인 방법.

청구항 52.

제48항에 있어서, 항체가 IgG₄ 항체인 방법.

청구항 53.

제38항에 있어서, 항체가 항혈관형성제 또는 항종양제에 콘쥬게이션된 것인 방법.

청구항 54.

제38항에 있어서, 개체가 암을 가진 것인 방법.

청구항 55.

제38항에 있어서, 개체가 다낭성 신장 질환을 가진 것인 방법.

청구항 56.

제38항에 있어서, 개체가 당뇨병 망막병증을 가진 것인 방법.

청구항 57.

제38항에 있어서, 개체가 류마티스성 관절염을 가진 것인 방법.

청구항 58.

제38항에 있어서, 개체가 건선을 가진 것인 방법.

청구항 59.

TEM 1, TEm 17 및 TEM 9로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 특이적으로 결합하여 종양 성장을 억제하는 유효량의 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편을 종양 성장의 억제가 필요한 개체에게 투여함을 포함하는, 종양 성장의 억제 방법.

청구항 60.

제59항에 있어서, 개체가 항체에 의해 결합되는 항원을 발현시키는 것인 방법.

청구항 61.

제59항에 있어서, 항원이 TEM 1인 방법.

청구항 62.

제59항에 있어서, 항원이 TEM 17인 방법.

청구항 63.

제59항에 있어서, 항원이 TEM 9인 방법.

청구항 64.

제59항에 있어서, 항체가 인간 항체인 방법.

청구항 65.

제59항에 있어서, 항체가 인간화된 항체 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 66.

제59항에 있어서, 항체가 완전한 항체 분자, 단일쇄 가변 영역, Fab 단편 또는 F(ab')₂ 단편인 방법.

청구항 67.

제59항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체인 방법.

청구항 68.

제59항에 있어서, 항체가 IgG 항체인 방법.

청구항 69.

제68항에 있어서, 항체가 IgG₁ 항체인 방법.

청구항 70.

제68항에 있어서, 항체가 IgG₂ 항체인 방법.

청구항 71.

제68항에 있어서, 항체가 IgG₃ 항체인 방법.

청구항 72.

제68항에 있어서, 항체가 IgG₄ 항체인 방법.

청구항 73.

제59항에 있어서, 항체가 항종양제 또는 항혈관형성제에 콘쥬게이션된 것인 방법.

청구항 74.

제59항에 있어서, 종양이 선암종, 백혈병, 림프종, 흑색종, 육종 또는 기형암종인 방법.

청구항 75.

제59항에 있어서, 종양이 부신, 방광, 골, 골수, 뇌, 유방, 자궁경부, 담낭, 신경절, 위장관, 심장, 신장, 간, 폐, 근육, 난소, 췌장, 부갑상선, 음경, 전립선, 침샘, 피부, 지라, 고환, 흉선, 갑상선 또는 자궁의 암인 방법.

청구항 76.

하이브리도마 TEM1-70에 의해 생산되고 TEM 1에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편.

청구항 77.

제76항의 항체의 가변 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 모노클로날 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편.

청구항 78.

제77항에 있어서, IgG 항체인 항체.

청구항 79.

제78항에 있어서, IgG 항체가 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 및 IgG₄로 이루어진 IgG 서브클래스(subclass)의 일원들로부터 선택된 것인 항체.

청구항 80.

제79항에 있어서, IgG₁ 항체인 항체.

청구항 81.

제79항에 있어서, IgG₂ 항체인 항체.

청구항 82.

제79항에 있어서, IgG₃ 항체인 항체.

청구항 83.

제79항에 있어서, IgG₄ 항체인 항체.

청구항 84.

제76항에 있어서, 중쇄의 하나 이상의 아미노산이 결실되거나 부가되거나 원 아미노산과 상이한 아미노산으로 치환된 것인 항체.

청구항 85.

제76항에 있어서, 항종양제 또는 항혈관형성제에 콘쥬게이션된 항체.

청구항 86.

제76항에 있어서, 혈관형성을 억제하는 항체.

청구항 87.

제86항에 있어서, 혈관형성이 암을 촉진시키거나 야기시키는 것인 항체.

청구항 88.

제86항에 있어서, 혈관형성이 당뇨병 신장 질환을 촉진시키거나 야기시키는 것인 항체.

청구항 89.

제86항에 있어서, 혈관형성이 당뇨병 망막병증을 촉진시키거나 야기시키는 것인 항체.

청구항 90.

제86항에 있어서, 혈관형성이 류마티스성 관절염을 촉진시키거나 야기시키는 것인 항체.

청구항 91.

제86항에 있어서, 혈관형성이 건선을 촉진시키거나 야기시키는 것인 항체.

청구항 92.

제76항에 있어서, 종양 성장을 억제하는 항체.

청구항 93.

제92항에 있어서, 종양이 선암종, 백혈병, 림프종, 흑색종, 육종 또는 기형암종인 항체.

청구항 94.

제92항에 있어서, 종양이 부신, 방광, 골, 골수, 뇌, 유방, 자궁경부, 담낭, 신경절, 위장관, 심장, 신장, 간, 폐, 근육, 난소, 췌장, 부갑상선, 음경, 전립선, 침샘, 피부, 지라, 고환, 흉선, 갑상선 또는 자궁의 암인 항체.

청구항 95.

일정량의 제76항의 모노클로날 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편 및 적절한 부형제를 포함하는 제약 조성물.

청구항 96.

하이브리도마 균주 TEM1-70.

청구항 97.

하이브리도마 TEM1-7에 의해 생산되고 TEM 1에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편.

청구항 98.

제97항의 항체의 가변 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 모노클로날 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편.

청구항 99.

제98항에 있어서, IgG 항체인 항체.

청구항 100.

제99항에 있어서, IgG 항체가 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 및 IgG₄로 이루어진 IgG 서브클래스의 일원들로부터 선택된 것인 항체.

청구항 101.

제100항에 있어서, IgG₁ 항체인 항체.

청구항 102.

제100항에 있어서, IgG₂ 항체인 항체.

청구항 103.

제100항에 있어서, IgG₃ 항체인 항체.

청구항 104.

제100항에 있어서, IgG₄ 항체인 항체.

청구항 105.

제97항에 있어서, 중쇄의 하나 이상의 아미노산이 결실되거나 부가되거나 원 아미노산과 상이한 아미노산으로 치환된 것인 항체.

청구항 106.

제97항에 있어서, 항종양제 또는 항혈관형성제에 콘쥬게이션된 항체.

청구항 107.

제97항에 있어서, 혈관형성을 억제하는 항체.

청구항 108.

제107항에 있어서, 혈관형성이 암을 촉진시키거나 야기시키는 것인 항체.

청구항 109.

제107항에 있어서, 혈관형성이 다낭성 신장 질환을 촉진시키거나 야기시키는 것인 항체.

청구항 110.

제107항에 있어서, 혈관형성이 당뇨병 망막병증을 촉진시키거나 야기시키는 것인 항체.

청구항 111.

제107항에 있어서, 혈관형성이 류마티스성 관절염을 촉진시키거나 야기시키는 것인 항체.

청구항 112.

제107항에 있어서, 혈관형성이 건선을 촉진시키거나 야기시키는 것인 항체.

청구항 113.

제97항에 있어서, 종양 성장을 억제하는 항체.

청구항 114.

제113항에 있어서, 종양이 선암종, 백혈병, 림프종, 흑색종, 육종 또는 기형암종인 항체.

청구항 115.

제113항에 있어서, 종양이 부신, 방광, 골, 골수, 뇌, 유방, 자궁경부, 담낭, 신경절, 위장관, 심장, 신장, 간, 폐, 근육, 난소, 췌장, 부갑상선, 음경, 전립선, 침샘, 피부, 지라, 고환, 흉선, 갑상선 또는 자궁의 암인 항체.

청구항 116.

일정량의 제97항의 모노클로날 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편 및 적절한 부형제를 포함하는 제약 조성물.

청구항 117.

하이브리도마 균주 TEM1-7.

청구항 118.

하이브리도마 TEM1-38에 의해 생산되고 TEM 1에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편.

청구항 119.

제118항의 항체의 가변 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 모노클로날 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편.

청구항 120.

제119항에 있어서, IgG 항체인 항체.

청구항 121.

제120항에 있어서, IgG 항체가 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 및 IgG₄로 이루어진 IgG 서브클래스의 일원들로부터 선택된 것인 항체.

청구항 122.

제121항에 있어서, IgG₁ 항체인 항체.

청구항 123.

제121항에 있어서, IgG₂ 항체인 항체.

청구항 124.

제121항에 있어서, IgG₃ 항체인 항체.

청구항 125.

제121항에 있어서, IgG₄ 항체인 항체.

청구항 126.

제118항에 있어서, 중쇄의 하나 이상의 아미노산이 결실되거나 부가되거나 원 아미노산과 상이한 아미노산으로 치환된 것인 항체.

청구항 127.

제118항에 있어서, 항종양제 또는 항혈관형성제에 콘쥬게이션된 항체.

청구항 128.

제118항에 있어서, 혈관형성을 억제하는 항체.

청구항 129.

제128항에 있어서, 혈관형성이 암을 촉진시키거나 야기시키는 것인 항체.

청구항 130.

제128항에 있어서, 혈관형성이 다낭성 신장 질환을 촉진시키거나 야기시키는 것인 항체.

청구항 131.

제128항에 있어서, 혈관형성이 당뇨병 망막병증을 촉진시키거나 야기시키는 것인 항체.

청구항 132.

제128항에 있어서, 혈관형성이 류마티스성 관절염을 촉진시키거나 야기시키는 것인 항체.

청구항 133.

제128항에 있어서, 혈관형성이 건선을 촉진시키거나 야기시키는 것인 항체.

청구항 134.

제118항에 있어서, 종양 성장을 억제하는 항체.

청구항 135.

제134항에 있어서, 종양이 선암종, 백혈병, 림프종, 흑색종, 육종 또는 기형암종인 항체.

청구항 136.

제113항에 있어서, 종양이 부신, 방광, 골, 골수, 뇌, 유방, 자궁경부, 담낭, 신경절, 위장관, 심장, 신장, 간, 폐, 근육, 난소, 췌장, 부갑상선, 음경, 전립선, 침샘, 피부, 지라, 고환, 흉선, 갑상선 또는 자궁의 암인 항체.

청구항 137.

일정량의 제118항의 모노클로날 항체 또는 그의 생물학적 활성 단편 및 적절한 부형제를 포함하는 제약 조성물.

청구항 138.

하이드리도마 균주 TEM1-38.