

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2012년 12월 13일 (13.12.2012)



(10) 국제공개번호  
WO 2012/169822 A2

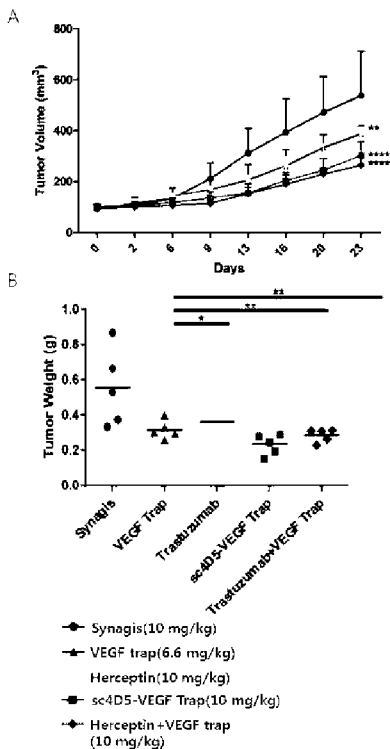
- (51) 국제특허분류:  
C07K 19/00 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)  
C12N 15/62 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/004531
- (22) 국제출원일: 2012년 6월 8일 (08.06.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2011-0056089 2011년 6월 10일 (10.06.2011) KR  
10-2012-0061054 2012년 6월 7일 (07.06.2012) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 강원대학교산학협력단 (KNU-INDUSTRY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 강원도 춘천시 강원대학길 1, 220-701 Gangwon-do (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 홍효정 (HONG, Hyo Jeong) [KR/KR]; 서울특별시 강남구 삼성동 78-4 청구아파트 101-405, 135-090 Seoul (KR). 썬로히트
- (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: FUSION PROTEIN FOR SUPPRESSING CANCER CELL GROWTH AND SUPPRESSING VASCULOGENESIS, AND ANTICANCER COMPOSITION COMPRISING SAME

(54) 발명의 명칭 : 암세포 증식 억제와 혈관신생 억제를 위한 융합 단백질 및 이를 포함한 항암 조성물

[Fig. 11]



(57) Abstract: The present invention relates to a fusion protein resulting from the bonding of a cancer-specific antibody and a vasculogenesis suppressing agent, and relates to a composition for treating cancer comprising same. More specifically, in the present invention it is preferable that the cancer-specific antibody is trastuzumab or a fragment thereof, and the vasculogenesis suppressing agent is a VEGF-Trap. When the fusion protein according to the present invention is used, there are advantages in that vasculogenesis and cancer cell growth can be effectively suppressed even at lower doses than with trastuzumab or a VEGF-Trap, and side effects can also be minimised.

(57) 요약서: 본 발명은 암 특이적 항체와 혈관신생 억제제가 결합된 융합 단백질 및 이를 포함하는 암 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로, 본 발명에 따른 바람직한 암 특이적 항체는 트라스투주맙 또는 이의 단편이며, 혈관신생 억제제는 VEGF-트랩이다. 본 발명에 따른 융합 단백질을 이용하면 트라스투주맙이나 VEGF-트랩에 비해 낮은 용량으로도 효율적으로 혈관신생 및 암 세포의 증식을 억제할 수 있으며, 부작용도 최소화될 수 있다는 장점이 있다.

WO 2012/169822 A2



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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**공개:**

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

## 명세서

### 발명의 명칭: 암세포 증식 억제와 혈관신생 억제를 위한 융합 단백질 및 이를 포함한 항암 조성물

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 암세포 증식 억제와 혈관신생 억제를 위한 융합 단백질 및 이를 포함한 항암 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 암 특이적 항체와 혈관신생 억제제가 결합된 융합 단백질 및 이를 포함한 암 치료용 조성물에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 암세포가 증식 및 성장하기 위해서는 산소와 영양을 공급하는 새로운 혈관이 필요하게 된다. 새로운 혈관 형성에는 여러 인자들이 관여하지만 그 중에서 가장 중추적인 조절인자로서 역할을 하는 것이 혈관내피세포 성장인자(VEGF; vascular endothelial growth factor)로 알려져 있다(Ferrara and Davis-Smyth(1997) *Endocrine Rev.* 18: 4-25; Ferrara (1999) *J. Mol. Med.* 77:527-543).
- [3] VEGF는 약 23 kDa의 분자량을 갖는 서브유닛으로 구성된 약 46 KDa의 이량체로서, 성체에서의 혈관 생성(angiogenesis) 뿐만 아니라, 배아 발생에서의 혈관발달(vasculogenesis)을 조절하는 기능을 하며, 포유동물에서는 현재 다섯 종류의 VEGF들(VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PLGF)이 밝혀져 있다. 이들은 VEGF 수용체(VEGFR) -1, -2, -3 라고 알려진 세 개의 수용체 타이로신 인산화 효소(RTK)와 헤파린 설페이트 프로테오글리칸(HSPGs: heparin sulphate proteoglycans), 뉴로필린(NRPs) 등의 보조 수용체들에 중복적으로 결합한다. VEGF 수용체는 많은 성장인자 수용체가 그러하듯이 세포이동, 생존, 증식 등을 유발하는데, 다른 RTK 등에는 없는 삼차원의 혈관을 형성할 수 있는 신호를 전달하거나 혈관투과성을 조절하는 기능을 가진다.
- [4] 마우스에서의 표적 유전자 불활성화 연구를 통해 VEGF가 혈관 신생의 초기 단계에 필요한 인자임이 밝혀졌으며, VEGF 분자는 종양 세포에서 상향조절되고 그의 수용체는 종양 침윤 혈관 내피세포에서 상향조절되지만, VEGF 및 그의 수용체의 발현은 혈관신생에 관련되지 않은 정상 세포에서 낮게 유지된다는 것이 밝혀짐에 따라 (Brown et al., *Cancer Res.* 53: 4727-4735 (1993); Mattern et al., *Brit. J. Cancer.* 73: 931-934 (1996)), 새로운 혈관 형성을 촉진하는 VEGF가 암의 치료 및 예방의 타겟으로서 주목받고 있다.
- [5] 따라서, 최근에는 암세포 자체보다는 암세포에 영양을 공급하는 혈관의 생성을 차단하는 새로운 항암 치료법이 개발되고 있으며, 항-VEGF 수용체 항체, 가용성 수용체 구조체, 안티센스, VEGF에 대한 RNA 앵타머 및 저분자량 VEGF 수용체 타이로신 키나제 (RTK) 억제제 등이 VEGF 시그널링 방해에 사용하기 위해 제안되었다 (Siemeister et al. *Cancer Metastasis Rev.* 17: 241-248(1998)). 실제로, 항-VEGF 중화 항체는 누드 마우스에서 다양한 인간 종양 세포주의 성장을

억제하는 것으로 밝혀졌다 (Warren et al. J. Clin. Invest. 95: 1789-1797 (1995); Borgstrom et al. Cancer Res. 56: 4032-4039 (1996); 및 Melnyk et al. Cancer Res. 56: 921-924 (1996)).

- [6] 이러한 VEGF 억제제와 관련된 특허문헌을 살펴보면, 미국등록특허 제6,011,003호에는 VEGF에 대해 억제 효과를 나타내는 면역글로블린 도메인을 포함하는 FLT 폴리펩티드의 변형된 가용성 형태가 개시되어 있으며, 국제출원공개 제98/13071호에는 VEGF와 결합하는 가용성 수용체 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 유전자 전이를 통한 제1차 종양 성장 및 악성종양의 억제를 위한 유전자 요법이 개시되어 있다. 또한, 국제출원공개 제97/13787호에는 혈관 신생에 수반된 질환의 치료에서 유용한 저분자 VEGF 억제제가, 국제출원공개 00/75319호에는 VEGF 수용체의 일종인 Flt 1과 Flt 4를 변형한 서열을 포함한 융합 폴리펩타이드가 개시되어 있다.
- [7] 그러나, 상기 종래의 혈관신생 억제제는 암세포 증식에 필요한 혈관 신생을 억제하여 암치료에 유용한 점은 있으나, 종양세포에 대한 표적 기능이 없기 때문에 암세포 특이적인 항암 효능을 나타낼 수 없으며 정상적인 혈관에 유해효과를 일으킬 수 있다. 실제로, VEGF에 대한 인간화 항체로서 상품화된 베바시주마브(Bevacizumab, 상품명: 아바스틴(Avastin™))의 경우, 제넨테크사(Genentech)가 수행한 임상 3상 시험에서, 부작용으로서 장내 과다출혈, 각혈, 뇌출혈, 코출혈, 기침할 때 토혈 등이 관찰되었으며, 이 외에도 두통, 혈압상승, 코에 부종, 단백뇨, 피부건조, 눈물과다, 허리통증, 피부부종 등이 관찰되었음이 발표된 바 있다. 이러한 부작용은 종래의 혈관신생 억제제에 종양세포에 대한 표적 기능이 없기 때문에 나타나는 것으로 볼 수 있다.
- [8] 따라서, 혈관신생 억제제를 암세포로의 선택적인 타겟팅을 통하여 효과적으로 암에 전달함으로써 부작용을 최소화하고, 암의 성장에 필수적으로 수반되는 혈관신생을 효율적으로 억제할 뿐 아니라 암세포에 직접 결합하여 암세포를 저해함으로써, 암을 효과적으로 치료할 수 있는 항암제의 개발이 요구되고 있다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [9] 본 발명의 목적은 상기와 같은 부작용을 최소화하고 암의 성장에 필수적으로 수반되는 혈관신생을 효율적으로 억제할 뿐 아니라 암세포에 직접 결합하여 암세포를 저해함으로써 암을 효과적으로 치료할 수 있는 항암제를 제공하기 위한, 암 특이적 항체를 혈관신생 억제제와 융합시킨 융합 단백질을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 상기 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드, 이를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 배양하여,

암 표적 항체와 혈관신생 억제제가 융합된 융합 단백질을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

- [12] 본 발명의 다른 목적은 상기 융합 단백질을 포함하는 암 치료용 약학적 조성물 및 이를 이용한 암 치료방법을 제공하는 것이다.

### 과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 암 특이적 항체와 혈관신생 억제제가 결합된 융합 단백질을 제공한다.
- [14] 본 발명에서의 용어, “혈관신생”은 혈관 내피세포가 증식하고 재구성되어 기존에 존재하는 혈관 네트워크로부터 새로운 혈관을 형성하는 세포 현상을 의미한다. 이러한 혈관신생에는 혈관 신생, 내피세포 성장, 혈관 안정성 및 혈관 형성을 촉진하는 혈관신생 인자가 관여한다. 상기 혈관신생 인자는 예를 들어 VEGF 및 VEGF 패밀리, PIGF(placental growth factor), PDGF(platelet-derived growth factor) 패밀리의 멤버, 섬유아세포 성장 인자 패밀리(FGF), TIE 리간드(엔지오포이에틴), 에프린, Del-1, 섬유아세포 성장 인자(산성(aFGF) 및 염기성(bFGF)), 폴리스타틴, 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF), 간세포 성장 인자(HGF)/산란 인자(SF), 인터루킨-8(IL-8), 랩틴, 미드카인, 태반 성장 인자, 혈소판 유래 내피세포 성장 인자(PD-ECGF), 혈소판 유래 성장 인자, 특히 PDGF-BB 또는 PDGFR-베타, 플레이오토로핀(PTN), 프로그라눌린, 프로리페린, 형질전환 성장 인자-알파(TGF-알파), 형질전환 성장 인자-베타(TGF-베타), 종양 괴사 인자-알파(TNF-알파), 혈관 내피 성장 인자(VEGF)/혈관 투과 인자(VPF) 등이 포함되며, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [15] 본 발명에서의 용어, “혈관신생 억제제” 혈관신생, 혈관형성, 또는 바람직하지 않은 혈관 투과성을 직접 또는 간접적으로 억제하는 저분자량 물질, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 단리된 단백질, 재조합 단백질, 항체, 또는 이들의 컨쥬게이트 또는 융합 단백질을 의미한다. 또한 상기 혈관신생 억제제는 혈관신생 인자 또는 그의 수용체에 결합하여 혈관신생 활성을 차단하는 물질을 포함한다. 예를 들어, 혈관신생 억제제는 혈관형성제에 대한 항체 또는 다른 길항제, 예를 들어 VEGF-A 또는 VEGF-A 수용체(예를 들어, KDR 수용체 또는 Flt-1 수용체)에 대한 항체, VEGF-트랩, 엔지오포에이틴(Angiopoietin) 2를 포함한다.
- [16] 바람직하게, 본 발명에 따른 융합 단백질에는 혈관신생 억제제로서 VEGF-트랩이 사용된다. 본 발명에서 VEGF-트랩은 VEGF에 결합할 수 있는 다중 결합 단백질을 의미하며 VEGF의 제거, 억제 또는 감소에 의해 향상, 경감, 또는 억제되는 VEGF-관련 상태 및 질병을 치료하는데 유용한 물질을 의미한다. 바람직하게, 본 발명에 따른 VEGF-트랩은 서열번호 13 또는 서열번호 14의 아미노산 서열을 가지며, VEGF와 결합할 수 있는 VEGF-트랩의 특성이 유지되는 한, 서열번호 13 또는 서열번호 14의 단편으로 이루어진

폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질도 본 발명의 권리범위에 포함된다.

- [17] 또한 본 발명에 따른 VEGF-트랩은 상기 VEGF-트랩의 C-말단에 서열번호 15의 인간 항체 Fc영역이 더 융합(VEGF-트랩(Fc))될 수 있으며, 상기 VEGF-트랩(Fc)은 서열번호 1 또는 서열번호 12의 아미노산 서열을 가지며, VEGF와 결합할 수 있는 VEGF-트랩의 특성이 유지되는 한, 서열번호 1 또는 서열번호 12의 단편으로 이루어진 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질도 본 발명의 권리범위에 포함된다.
- [18] 본 발명에서 용어, “암 특이적 항체”는 암 세포 표면 또는 조직에서 특이적으로 발현되거나 과다하게 발현되는 암-관련 항원을 인식하여 암 세포에 특이적으로 결합함으로써 암 세포의 증식을 억제할 수 있는 능력을 가지는 항체를 의미하며, 다클론 항체 및 단클론 항체를 모두 포함한다. 암 특이적 항체로는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 단편도 사용될 수 있다. 항체 분자의 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 단일 사슬(single-chain) Fv(scFv), Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, 단일 도메인(single domain) 등을 포함한다.
- [19] 본 발명에 따른 융합 단백질에 포함될 수 있는 바람직한 암 특이적 항체는 암 세포 표면의 특이 항원을 인식하여 암 세포 특이적으로 결합할 수 있는 항체라면 제한되지 않으며, 항-HER2 모노클로날 항체, 특히 트라스투주맙(trastuzumab, 상품명 Herceptin™)이며, 그중에서도 트라스투주맙의 scFv가 바람직하다. 트라스투주맙의 scFv는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변영역과, 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변영역으로 구성되는 것이 바람직하지만, 트라스투주맙의 HER2에 대한 결합능력을 보유하는 한, 이의 단편 또는 아미노산 변이가 일어난 것을 이용하는 경우도 본 발명의 권리범위에 포함된다. 또한, 트라스투주맙의 scFv는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변영역과 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변영역이 링커로 서로 연결된 형태로 사용될 수 있으며, 서열번호 4에 기재된 서열을 가지는 링커로 서로 연결되는 것이 바람직하다. 특히 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 가지는 트라스투주맙의 scFv(이하 ‘sc4D5’라 한다)가 본 발명에서의 바람직한 암 특이적 항체이다.
- [20] 본 발명에서 용어, “HER2”는 유방암 세포의 증식과 생존에 관계하는 중요한 신호전달체계 중의 하나인 상피세포 성장인자수용체(epidermal growth factor receptor; EGFR) 패밀리를 의미한다. EGFR 패밀리의 티로신 인산화효소 수용체(receptor tyrosine kinases)는 erb1, erb2/HER2, erb3, erb4의 4개로 되어 있으며 세포 증식과 생존 외에도 세포의 부착, 이동 및 분화를 조절하는데 관여하는 것으로 알려져 있다. 4개의 erb 패밀리 중 erb2/HER2가 결합하는 리간드는 없지만 유방암에서 가장 강력한 암유전자(oncoprotein)로 알려져 있다. HER2가 정상적인 수준인 경우에는 정상적인 유선조직의 성장과 발달에 관여하지만, 비정상적으로 HER2가 과발현 되면 정상세포 조절이 붕괴되어

유선조직에서는 악성(malignant) 암세포가 형성되게 된다. 즉, HER2가 다른 EGFR 패밀리와 올리고머화(oligomerization)되어 활성화되면 많은 하부 분자(downstream molecules)를 인산화하여 차례로 여러 가지 신호전달계(signaling cascades)를 활성화시키는데, 세포증식에 관여하는 SOS-Ras-Raf-MEK-MAPK 경로와 세포사멸을 억제하는 PI-3K/Akt 경로가 암 증식에 관여하는 대표적인 기전이다.

- [21] 전임상과 임상 실험 결과 HER2 과발현은 암 발생 단계의 초기부터 나타나는 중요한 현상이며, 이는 암의 성장과 진행에 중요한 역할을 하고 있다. HER2 과발현은 침윤성 유방암의 약 20 내지 30%에서 나타나고 있으며 과발현은 유방암 환자의 불량예후와도 관계가 있는 것으로 알려지고 있다.
- [22] 본 발명에서 용어, “트라스투주맵”은 HER2의 세포외 도메인을 타겟으로 하는 재조합 인간화 단일클론 항체를 의미한다. 상기 트라스투주맵이 암세포에서 과발현된 HER2의 세포외 도메인에 결합하면 신호전달계의 활성화를 억제한다. 따라서, 본 발명에 따른 혈관신생 억제제와 융합항암 특이적 항체로서 항-HER2 모노클로날 항체, 바람직하게는 트라스투주맵을 사용하여 융합 단백질은 트라스투주맵에 의해 HER2를 억제하고, 혈관신생 억제제에 의해 혈관신생을 효율적으로 억제하여 암을 치료하고 암의 증식을 억제할 수 있다.
- [23] 본 발명의 융합 단백질은 상기 암 특이적 항체가 혈관신생 억제제에 결합되어 있으므로, 혈관신생 억제제를 전달함에 있어서 암 세포로의 선택적인 타겟팅이 가능하므로, 낮은 용량(dose)로도 목적하는 효과를 거둘 수 있으며, 암 세포의 증식을 억제하는 능력이 탁월한 항체를 사용할수록 효과적인 혈관신생 억제 효능 및 암 세포 성장 억제 효능을 나타낼 수 있다. 또한 암 표적 항체가 항암 효능이 있을 경우 혈관신생 억제 효능과 상승효과(synergistic effect)를 기대할 수 있다. 본 발명의 상기 암 특이적 항체는 암 표적 기능뿐만 아니라, 환자에게 투여함으로써 암세포에서 과발현되어 암의 발생, 성장, 전이에 관련되는 항원 분자의 활성을 억제하여 암 치료 기능도 가질 수 있다.
- [24] 본 발명에서의 용어 “융합 단백질”은 일반적으로 기원이 다른 이중 펩타이드가 연결된 형태의 펩타이드를 의미하며, 본 발명에서는 암 특이적 항체와 혈관신생 억제제가 연결된 형태의 펩타이드를 의미한다. 본 발명에 따른 융합 단백질은 암 특이적 항체와 혈관신생 억제제가 결합되어 있어, 혈관신생 억제제를 전달함에 있어서 암 세포로의 선택적인 타겟팅이 가능하므로 효과적인 혈관신생 억제 효능 및 암 세포 성장 억제 효능을 나타낸다.
- [25] 본 발명의 융합 단백질은 상기 암 특이적 항체가 혈관신생 억제제의 N-말단 또는 C-말단에 연결된 것일 수 있다. 이러한 융합 단백질을 코딩하는 유전자 서열은 직접 연결되거나 링커와 같은 연결자를 통해 연결될 수 있다. 본 발명에 따른 융합 단백질은 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 가지는 sc4D5의 C-말단에 서열번호 13에 따른 아미노산 서열을 가지는 VEGF-트랩의 N-말단이 융합된 것으로, 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이다.

- [26] 또한, 본 발명에 따른 융합 단백질은 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 가지는 sc4D5의 C-말단에 서열번호 14에 따른 아미노산 서열을 가지는 VEGF-트랩의 N-말단이 융합된 것으로, 서열번호 21에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이다.
- [27] 특히 본 발명에 따른 바람직한 융합 단백질은 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 가지는 sc4D5의 C-말단에 서열번호 1에 따른 아미노산 서열을 가지는 VEGF-트랩의 N-말단이 융합되고, 상기 VEGF-트랩의 C-말단에 서열번호 15에 따른 아미노산 서열을 가지는 Human Fc가 융합된 것으로, 서열번호 18에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이다.
- [28] 또한, 본 발명에 따른 바람직한 융합 단백질은 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 가지는 sc4D5의 C-말단에 서열번호 12에 따른 아미노산 서열을 가지는 VEGF-트랩의 N-말단이 융합되고, 상기 VEGF-트랩의 C-말단에 서열번호 15에 따른 아미노산 서열을 가지는 Human Fc가 융합된 것으로, 서열번호 23에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이다.
- [29] 이러한 융합 단백질은 유전자 재조합 방법으로 발현 및 정제하여 수득하는 것이 바람직하다. 구체적으로, 암 특이적 항체를 코딩하는 유전자 서열과 혈관신생 억제제를 코딩하는 유전자 서열을 연결한 유전자를 세포 발현 시스템에서 발현시켜서 제공할 수 있다.
- [30] 또한 본 발명에서는 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및 이를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [31] 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 상기 서열번호 6, 서열번호 18, 서열번호 21 및 서열번호 23에 기재된 아미노산 서열로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 용이하게 도출 가능하다. 특히 서열번호 10 및 서열번호 24에 따른 폴리뉴클레오타이드 서열을 가지는 것이 바람직하다. 또한 서열번호 7에 따른 리더 서열(leader sequence)를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 융합 단백질의 N-말단에 위치하도록, 서열번호 10 또는 서열번호 24에 따른 폴리뉴클레오타이드 서열의 5' 말단에 서열번호 11에 따른 폴리뉴클레오타이드 서열이 위치된 폴리뉴클레오타이드 서열이 본 발명에 따른 융합 단백질의 생산에 이용될 수 있다.
- [32] 본 발명에서의 용어, “재조합 벡터”란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.
- [33] 본 발명에서 “작동가능하게 연결된(operably linked)”는 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용하여 용이하게 할 수 있다.

- [34] 본 발명의 적합한 발현 벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 면역원성 표적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 일반 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 원핵 세포에는 lac, tac, T3 및 T7 프로모터가 있으나 이로 제한되지는 않는다. 진핵세포에는 원숭이 바이러스 40(SV40), 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 사람 면역 결핍 바이러스(HIV), 예를 들면 HIV의 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, 폴로니 바이러스, 시토메갈로바이러스(CMV), 엡스타인 바 바이러스(EBV), 로우스 사코마 바이러스(RSV) 프로모터 뿐만 아니라,  $\beta$ -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈, 사람 근육 크레아틴, 사람 메탈로티오네인 유래의 프로모터가 있으나 이것으로 제한되지는 않는다.
- [35] 상기 발현 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함할 수 있다. 선택마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하므로 형질전환된 세포가 선별 가능하다. 또한, 벡터는 복제가능한 발현벡터인 경우, 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인 복제원점(replication origin)을 포함할 수 있다.
- [36] 외래 유전자를 삽입하기 위한 재조합 발현 벡터로는 플라스미드, 바이러스, 코즈미드 등 다양한 형태의 벡터를 사용할 수 있다. 재조합 벡터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포의 각종 숙주세포에서 원하는 유전자를 발현하고 원하는 단백질을 생산하는 기능을 하는 한 특별히 한정되지 않지만, 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 바람직하다.
- [37] 본 발명에 따른 융합 단백질을 발현시키기 위해 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵숙주에 적합한 발현 벡터로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus), 시토메갈로바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열이 포함된다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현 벡터에는 pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, pUC 벡터, col E1, pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체와 같이 대장균(*Escherichia coli*)에서 얻어지는 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드,  $\lambda$ gt10과  $\lambda$ gt11, NM989와 같은 매우 다양한 파지 람다(phage lambda) 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA, 및 M13과 필라멘트성 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지가 포함된다. 효모 세포에 유용한 발현 벡터는 2°C 플라스미드 및 그의 유도체이다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL941이다.

- [38] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 숙주세포에 삽입되어 형질전환체를 형성한다. 상기 벡터의 적합한 숙주세포는 대장균, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스 속(*Staphylococcus* sp.)과 같은 원핵 세포일 수 있다. 또한, 아스페르길러스 속(*Aspergillus* sp.)과 같은 진균, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스 속(*Schizosaccharomyces* sp.) 및 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)와 같은 효모, 그 밖의 하등진핵 세포, 및 곤충으로부터의 세포와 같은 고등 진핵생물의 세포와 같은 진핵 세포일 수 있다. 또한 식물, 포유동물로부터 유래할 수 있다. 바람직하게는, 원숭이 신장 세포7(COS7:monkey kidney cells)세포, NSO 세포, SP2/0, 차이나이즈 햄스터 난소(CHO:chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린 햄스터 신장(BHK:baby hamster kidney)세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 및 HEK293 세포 등이 이용가능하지만 이에 한정되지 않는다. 특히 바람직하게는 CHO 세포이다.
- [39] 본 발명에서 숙주세포로의 “형질 전환”은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘( $\text{CaPO}_4$ ) 침전, 염화 칼슘( $\text{CaCl}_2$ ) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로 박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.
- [40] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기한 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 배양하여 본 발명에 따른 융합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.
- [41] 상기 융합 단백질의 제조방법은 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 형질전환시켜 배양하는 단계; 상기 형질전환체의 배양액으로부터 융합 단백질을 분리, 정제하는 단계를 포함할 수 있다.
- [42] 구체적으로, 재조합 벡터가 발현되는 형질전환체를 영양배지에서 배양함으로써 융합 단백질을 대량으로 생산할 수 있으며, 배지와 배양조건은 숙주 세포에 따라 관용되는 것을 적당히 선택 이용할 수 있다. 배양시 세포의 생육과 단백질의 대량 생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양시간 등의 조건들을 적절하게 조절할 수 있다.
- [43] 상기와 같이 재조합적으로 생산된 펩타이드 또는 단백질은 배지 또는 세포 분해물로부터 회수될 수 있다. 막 결합형인 경우, 적합한 계면활성제 용액(예, 트리톤-X 100)을 사용하거나 또는 효소적 절단에 의해 막으로부터 유리될 수 있다. 융합 단백질 발현에 사용된 세포는 동결-해동 순화, 음파처리, 기계적 파괴

또는 세포 분해제와 같은 다양한 물질적 또는 화학적 수단에 의해 파괴될 수 있으며, 통상적인 생화학 분리 기술에 의해서 분리, 정제가 가능하다(Sambrook et al., *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deucher, M., *Guide to Protein Purification Methods Enzymology*, Vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA(1990)). 전기영동, 원심분리, 겔여과, 침전, 투석, 크로마토그래피(이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 면역흡착 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 등), 등전점 포커싱 및 이의 다양한 변화 및 복합 방법 등이 이용가능하지만 이에 한정되지 않는다.

[44] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 융합 단백질을 포함하는 혈관신생억제용 또는 암 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명에서 용어, “항암”이란 “예방” 및 “치료”를 포함하며, 여기서 “예방”이란 본 발명의 항체를 포함하는 조성물 투여에 의해 암이 억제되거나 지연되는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명의 항체 투여에 의해 암의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[45] 본 발명의 조성물로 치료할 수 있는 암 또는 암종은 특별히 제한되지 않으며, 고형암 및 혈액암을 포함한다. 바람직하게 위암, 유방암, 폐암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 결장암, 이자암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 식도암, 담도암, 고환암, 직장암, 두경부암, 경추암, 요관암, 골육종, 신경세포아종, 흑색종, 섬유육종, 횡문근육종, 성상세포종, 신경모세포종 또는 신경교종 등을 포함한다. 더욱 바람직하게는, HER2가 발현되는 모든 암을 포함한다. 본 발명의 조성물은 상기 유전자의 발현이 있는 모든 암을 치료할 수 있으나, 보다 바람직하게는, 유방암, 위암 등을 들 수 있다.

[46] 본 발명의 항암 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 유허제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 또한, 상기 항암 조성물은 전형적으로 막을 통과한 이동을 용이하게 하는 계면활성제를 포함할 수 있다. 이러한 계면활성제는 스테로이드에서 유도된 것이거나 N-[1-(2,3-디올레오일)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드(DOTMA) 등의 양이온성 지질, 또는 콜레스테롤 헤미숙시네이트, 포스파티딜 글리세롤 등의 각종 화합물 등이 있다.

[47] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 융합 단백질, 또는 융합 단백질을 포함한

조성물을 개체에 투여하여 암을 치료하고 암의 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 융합 단백질을 포함하는 조성물은 암세포 또는 그들의 전이를 치료하기 위하여, 또는 암의 성장을 억제하기 위하여 약학적으로 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 암 종류, 환자의 연령, 체중, 증상의 특성 및 정도, 현재 치료법의 종류, 치료 회수, 투여 형태 및 경로 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 해당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 상기한 약리학적 또는 생리학적 성분을 함께 투여하거나 순차적으로 투여할 수 있으며, 또한 추가의 종래의 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 이러한 투여는 단일 또는 다중 투여일 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[48] 본 발명에서, “개체”는 본 발명의 융합 단백질을 투여하여 경감, 억제 또는 치료될 수 있는 상태 또는 질환을 앓고 있거나 그러한 위험이 있는 포유동물을 의미하며, 바람직하게 사람을 의미한다.

[49] 본 발명에서, “투여”는 어떠한 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하면 본 발명의 융합 단백질을 포함하는 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여시, 단백질은 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 또한, 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

### 발명의 효과

[50] 본 발명에 따른 융합 단백질은 암 특이적 항체와 혈관신생 억제제가 연결된 것으로서, 특히 암세포에 대한 타겟팅 능력이 뛰어난 트라스투주맵, 또는 이의 단편을 암 표적 항체로 이용함으로써 암세포에 특이적으로 작용하여 암세포의 증식을 억제하고, 암세포 주변의 혈관신생을 선택적으로 억제시킴으로써 낮은 용량으로도 혈관신생을 억제하고, 암의 성장을 억제함으로써 암에 대한 높은 치료효과와 함께 부작용이 현저히 저하된다는 효과가 있다.

### 도면의 간단한 설명

[51] 도 1은 sc4D5-VT와 VEGF-트랩의 발현을 위한 발현 벡터의 개열지도를 나타내는 도면이고,

[52] (A : pJK-dhfr2-sc4D5-VEGF-Trap 벡터의 지도, B : pJK-dhfr2-VEGF-Trap 벡터의 지도)

[53] 도 2는 sc4D5-VT와 VEGF-트랩의 VEGF에 대한 결합능력을 나타내는

도면이며,

- [54] (A : VEGF-A에 대한 결합 능력, B : VEGF-B에 대한 결합 능력)
- [55] 도 3은 sc4D5-VT의 HER2/neu에 대한 결합능력을 나타내는 도면이고,
- [56] 도 4는 sc4D5-VT가 HER2/neu와 VEGF에 동시에 결합할 수 있음을 나타내는 도면이며,
- [57] (A : VEGF에 결합된 sc4D5-VT의 HER2/neu에 대한 결합능, B : HER2/neu에 결합된 sc4D5-VT의 VEGF에 대한 결합능)
- [58] 도 5는 암세포주의 HER2/neu의 세포 표면 발현 여부를 나타내는 도면이고,
- [59] (A : MDA-MB231을 이용한 HER2/neu의 세포 표면 발현 분석 결과, B : SNU-216를 이용한 HER2/neu의 세포 표면 발현 분석 결과, C : NCI-N87를 이용한 HER2/neu의 세포 표면 발현 분석 결과)
- [60] 도 6은 BrdU 혼입 방법을 이용한 암세포 증식 분석 결과를 나타내는 도면이며,
- [61] (A : NCI-N87 세포를 이용한 결과, B : MDA-MB231 세포를 이용한 결과)
- [62] 도 7은 WST-1 방법을 이용한 암세포 증식 분석 결과를 나타내는 도면이고,
- [63] (A : NCI-N87 세포를 이용한 결과, B : MDA-MB231 세포를 이용한 결과)
- [64] 도 8은 혈관내피세포(HUVEC)의 증식 분석 결과를 나타내는 도면이며,
- [65] 도 9는 혈관내피세포(HUVEC)의 이동 분석 결과를 나타내는 도면이고,
- [66] 도 10은 혈관내피세포(HUVEC)의 분화 분석 결과를 나타내는 도면이며,
- [67] 도 11은 sc4D5-VT의 동물실험을 통해 항암효과를 나타내는 도면이고,
- [68] (A : NCI-N87 xenograft 암의 크기를 측정한 결과, B : NCI-N87 xenograft 암의 무게를 측정한 결과)
- [69] 도 12는 sc4D5-R2D2D3-hFc의 발현을 위한 발현 벡터의 개열지도를 나타내는 도면이며,
- [70] 도 13은 정제된 sc4D5-R2D2D3-hFc와 sc4D5-VT를 SDS-PAGE로 분석한 결과이고,
- [71] 도 14는 sc4D5-R2D2D3-hFc의 VEGF165 및 HER2/neu에 대한 결합능력을 나타내는 도면이며,
- [72] (A : VEGF165에 대한 결합능, B : HER2/neu에 대한 결합능)
- [73] 도 15는 sc4D5-R2D2D3-hFc이 VEGF165와 HER2/neu에 동시에 결합할 수 있음을 나타내는 도면이다.

#### 발명의 실시를 위한 형태

- [74] 이하 본 발명을 실시예와 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명한다. 그러나 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [75] [실시예 1] sc4D5와 VEGF-트랩 융합 단백질의 제조
- [76] 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 가지는 트라스투주맵의 scFv(sc4D5)의 C-말단에 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 VEGF-트랩(Fc) 1의

N-말단이 연결된 서열번호 18에 따른 아미노산 서열을 가지는 융합 단백질(이하 'sc4D5-VT'라 한다)을 제조하기 위하여, 도 1(A)에 도시된 바와 같이 벡터를 제조하였으며, 비교 시험을 위해 도 1(B)와 같이 VEGF-트랩만을 제조하기 위한 벡터도 제조하였다.

[77] 본 발명에 따른 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 VEGF-트랩(Fc) 1은 VEGFR1의 도메인 2(Domain 2)-VEGFR2 도메인 3(Domain

3)-힌지(hinge)-인간 항체의 Fc 영역(C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3)이 순서대로 연결된 형태이다(미국 등록특허 7,087,411호 등 참조). 도 1(A)에서의 sc4D5는 트라스투주맙의 scFv를 인코딩하는 유전자 서열로, 서열번호 8에 따른 폴리뉴클레오티드 서열을 가지며, 도 1에서의 R1D2-R2D3-Hinge-CH2-CH3는 VEGF-트랩(Fc) 1을 인코딩하는 유전자 서열로, 서열번호 9에 따른 폴리뉴클레오티드 서열을 가진다. 상기 sc4D5-VT와 VEGF-트랩(Fc) 1을 각각 인코딩하는 유전자는 독일의 진아트(Geneart)사에 합성을 의뢰하여 얻었다. 합성된 sc4D5-VT와 VEGF-트랩(Fc) 1 유전자를 각각 *EcoRI*-*ApaI*으로 절단한 후, pJK-dhfr2-L1-monomer(대한민국 특허출원 제10-2006-0079969호 참조)의 *EcoRI*-*ApaI* 위치에 서브클로닝(subcloning)하여 발현벡터 pJK-dhfr2-sc4D5-VEGF-Trap과 pJK-dhfr2-VEGF-Trap을 각각 얻었다.

[78] 상기 도 1(A) 및 도 1(B)에 따른 벡터를 이용하여 HEK293T 세포를 형질전환시키기 위하여, 2×10<sup>6</sup> 개의 세포를 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 포함된 DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)가 들어있는 10 mm 조직배양 플레이트에서 36시간 동안 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 곳에서 배양한 후, 세포들에게 pJK-dhfr2-sc4D5-VEGF-Trap이나 pJK-dhfr2-VEGF-Trap 벡터 DNA와 PEI (Polyethylenimine, 폴리사이언스사, 미국)와의 혼합물을 가했다. 6시간 후에, 단백질이 없는 배지인 CD293(인비트로젠사, 미국)으로 교체해주었다. 상층액은 매 72시간 후에 3번 모아두었고, Protein-A 컬럼(피어스사, 미국)으로 단백질을 정제하였다. PBS(pH 7.4)로 투석 후, 단백질 농도는 나노드롭(Nanodrop)으로 측정하였다. 그 결과, 정상적으로 본 발명에 따른 융합 단백질이 발현됨을 확인할 수 있었다.

[79] [실시예 2] sc4D5-VT의 VEGF에 대한 결합 능력 검증

[80] sc4D5-VT이 VEGF-트랩(Fc) 1과 유사하게 VEGF에 대한 결합능력을 유지하고 있는지 확인하기 위하여, 엘라이자(ELISA) 플레이트에 0.5 M 카보네이트/바이카보네이트 버퍼(carbonate bicarbonate buffer, pH 9.6)를 이용하여 VEGF-A와 VEGF-B(R&D Systems)를 50 ng/well로 4°C에서 하루 동안 코팅한 다음, 2% 탈지분유가 포함된 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 37°C에서 1시간 동안 블로킹한 후에, 여러 농도의 sc4D5-VT과 VEGF 트랩(Fc) 1을 각각 넣어주고, 한 시간 동안 반응시켰다. 그 후에 2차 항체인 1:5000로 희석된 염소 항-인간 IgG(Goat Anti-human IgG) Fc-HRP(Horseradish Peroxidase) (피어스사, 미국)와 기질인 TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)를 넣어, OD를 450nm에서

측정하였다.

- [81] 그 결과 sc4D5-VT는 VEGF-A 및 VEGF-B 모두에 대해서 VEGF-트랩(Fc) 1과 유사한 결합능력을 나타냄을 확인할 수 있었으며(도 2(A) 및 도 2(B) 참조), 이로부터 VEGF-트랩(Fc) 1을 트라스투주맵의 scFv 단편과 융합한 경우에도 VEGF에 대한 VEGF-트랩(Fc) 1의 결합능력 및 결합특성이 유지됨을 확인할 수 있었다.
- [82] [실시예 3] sc4D5-VT의 HER2/neu에 대한 결합 능력 검증
- [83] sc4D5-VT이 HER2/neu에 대한 결합능력을 유지하고 있는지 확인하고자, ELISA 플레이트에 0.5 M 카보네이트/바이카보네이트 버퍼(carbonate bicarbonate buffer, pH 9.6)를 이용하여 HER2/neu-Fc 단백질을 100 ng/well로 4°C에서 하루 동안 코팅하였다. 2% 탈지분유가 포함된 PBS로 37°C에서 1시간동안 블로킹한 후에, 여러 농도로 희석된 sc4D5-VT와 트라스투주맵을 각각 웰에 넣어주고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음, 0.01% 트윈(Tween)-20이 포함된 PBS(PBST)로 3번 씻어준 후에, 200 nM 트라스투주맵 100  $\mu$ l를 ELISA 플레이트에 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 그 후에 2차 항체인 1:5000로 희석된 염소 항-인간 IgG(Fab')<sub>2</sub>-HRP(피어스사, 미국)와 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 기질인 TMB를 넣어, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [84] 그 결과 sc4D5-VT는 HER2/neu에 대한 결합능력을 유지하고 있음을 확인할 수 있었으며(도 3 참조), 이로부터 VEGF-트랩(Fc) 1을 트라스투주맵의 scFv를 VEGF-트랩(Fc)과 융합한 경우에도 HER2/neu에 대한 결합능력 및 결합특성이 유지됨을 확인할 수 있었다.
- [85] [실시예 4] sc4D5-VT의 HER2/neu와 VEGF에 대한 동시 결합 능력 검증
- [86] sc4D5-VT의 한 분자가 HER2/neu와 VEGF를 다 같이 결합할 수 있는지 확인하기 위하여 다음과 같은 두 가지의 경쟁적 ELISA를 수행하였다.
- [87] 첫 번째, VEGF가 결합된 sc4D5-VT의 HER2/neu에 대한 결합능이 free한 sc4D5-VT의 HER2/neu에 대한 결합능과 유사한지를 분석하고자, 트라스투주맵을 0.5 M carbonate buffer(pH 9.6)로 희석하여 0.5  $\mu$ g을 ELISA plate의 각 웰에 가하여 4°C, overnight 코팅하였다. 이후, plates는 2% skim milk(Difco)와 0.05% Tween 20이 섞인 1xPBS의 200  $\mu$ l로 블로킹하였고, 0.05% PBST로 3번 세척하였다. 다양한 농도의 sc4D5-VT을 VEGF165(1  $\mu$ g/ml of PBS, R&D Systems) 또는 PBS와 37°C 1시간 preincubation한 후, 각각 최종 농도 100 ng/ml PBS의 Her2-6His(Sino biologicals)와 섞고 37°C 2시간 반응시켰다. 이 혼합 용액을 트라스투주맵이 코팅된 ELISA 웰에 첨가하여 37°C 1시간 반응시킨 후, 결합된 Her2-6His에 0.05% Tween 20가 섞인 PBS로 1/5,000 희석된 anti-6His-HRP(Abcam) 100  $\mu$ l를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음, 기질인 TMB를 넣어, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [88] 그 결과 VEGF가 결합된 sc4D5-VT와 free한 sc4D5-VT는 HER2-6His의 트라스투주맵에 대한 결합능을 거의 동일하게 저해시킴을 확인하였다(도 4A

- 참조). 상기 결과는 VEGF에 결합된 sc4D5-VT의 HER2/neu에 대한 결합능과 free한 sc4D5-VT의 HER2/neu에 대한 결합능과 동일함을 증명하는 것이다.
- [89] 두 번째, HER2/neu가 결합된 sc4D5-VT의 VEGF에 대한 결합능이 free한 sc4D5-VT의 VEGF에 대한 결합능과 유사한지를 분석하고자, VEGF 트랩(Fc) 1을 0.5 M carbonate buffer(pH 9.6)로 희석하여 0.5  $\mu$ g을 ELISA plate의 각 웰에 가하여 4°C, overnight 코팅하였다. 이후, plates는 2% skim milk(Difco)와 0.05% Tween 20이 섞인 1xPBS의 200  $\mu$ l로 블로킹하였고, 0.05% PBST로 3번 세척하였다. 다양한 농도의 sc4D5-VT을 Her2-6His(1  $\mu$ g/ml of PBS) 또는 PBS와 37°C 1시간 preincubation한 후, 각각 최종 농도 100 ng/ml PBS의 VEGF165와 섞고 37°C 2시간 반응시켰다. 이 혼합 용액을 VEGF 트랩(Fc) 1이 코팅된 ELISA 웰에 첨가하여 37°C 1시간 반응시킨 후, 결합된 VEGF에 0.05% Tween 20이 섞인 PBS로 1/5,000 희석된 anti-VEGF-HRP 100  $\mu$ l를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음, 기질인 TMB를 넣어, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 anti-VEGF-HRP는 goat anti-human VEGF165 polyclonal antibody (R&D Systems)를 EZ-Link Plus Activated Peroxidase kit(Thermo Scientific)를 이용하여 제작하였다.
- [90] 그 결과 Her2-6His가 결합된 sc4D5-VT와 free한 sc4D5-VT는 VEGF의 VEGF 트랩(Fc) 1에 대한 결합능을 거의 동일하게 저해시킴을 확인하였다(도 4B 참조). 상기 결과는 Her2가 결합된 sc4D5-VT의 VEGF에 대한 결합능이 free한 sc4D5-VT의 VEGF에 대한 결합능과 동일함을 증명하는 것이다.
- [91] [실시예 5] sc4D5-VT의 암세포 증식 억제 효과 확인
- [92] 상기 실시예 2 및 실시예 3의 결과에 같이 sc4D5-VT는 VEGF 및 HER2/neu에 대한 결합능력을 유지하고 있음을 확인할 수 있었으며, 이후, 실제로 sc4D5-VT가 Her2를 발현하고 있는 세포 표면에 결합하는지를 FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 방법을 이용하여 분석하였다. 구체적으로는 세포주로는 유방암 세포주인 MDA-MB231(ATCC HTB-26)과 위암 세포주인 SNU-216(ATCC CRL-5974) 및 NCI-N87 (ATCC CRL-5822)을 사용하였으며, 1차 항체로는 호흡기 세포융합 바이러스(Respiratory Syncytial Virus, RSV)에 대한 인간화항체인 팔리비주맵 (Palivizumab, 상품명 Synagis)을 음성대조군으로, 트라스투주맵을 양성 대조군으로 사용하였고, 2차 항체로는 염소 항-인간 IgG와 FITC(Fluorescein isothiocyanate)의 복합체(goat anti-human IgG(Fc)-FITC conjugate)(시그마, 미국)를 이용하였다. 세포들은 효소가 없는 세포 분리용 Hank-베이스드 버퍼(Hank's-based buffer, 인비트로젠사, 미국)를 이용하여 떼어주고,  $2 \times 10^5$  cells/ml PBA(PBS에 3% BSA, 0.09% NaN<sub>3</sub> 추가)에 다시 넣은 다음, 0.01% 포르말데히드(formaldehyde)로 15분 동안 고정 시켰다. 세포들은 4°C에서 20분 동안 1차 항체를 반응 시킨 후 2차 항체를 4°C에서 20분 동안 처리하여 세포들에 대한 결합 능력을 분석하였다.
- [93] 그 결과, 도 5와 같이 양성대조군으로서 사용된 트라스투주맵은 MDA-MB231, SNU-216, NCI-N87 세포에 각각 약하게, 중간, 강하게 결합하는 것으로 나타났다.

이 결과는 Her2 세포 표면 발현 수준이 MDA-MB231, SNU-216, NCI-N87 세포 순으로 높음을 의미한다. sc4D5와 sc4D5-VT도 위 세포주에 대하여 트라스투주맵과 같은 정도의 결합력을 나타내었다. 따라서, sc4D5와 sc4D5-VT가 위암세포 증식 억제 효능을 나타내는지 Her2 발현 수준이 높은 NCI-N87 세포를 가지고 실험하였다. 이 때 Her2 발현 수준이 낮은 MDA-MB231 세포를 음성대조군으로 사용하였다.

- [94] 특히 Her2/neu가 과다발현된 암세포주에 트라스투주맵을 처리했을 때 세포 분열 정지를 유도한다고 보고된 바 있으므로(Gong et al., 2004, Cancer Lett. 214(2): 215-24), BrdU 혼입(bromodeoxyuridine incorporation) 방법을 이용하여 sc4D5와 sc4D5-VT의 위암세포 증식 저해 효과를 분석하였다. 구체적으로 NCI-N87 세포들과 MDA-MB231 세포들을 각각 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640(Gibco) 배지나 DMEM 배지에서 배양하다가 80% 컨플루언트(confluent)가 되었을 때 sc4D5-VT, 트라스투주맵, VEGF-트랩(Fc) 1을 농도 별로 첨가하고 48시간 동안 배양한 후, 10  $\mu$ M BrdU를 가하고 6시간 동안 배양하였다. 세포를 트립신(trypsin)으로 떼어주고 APC BrdU 플로우 키트(Flow Kit, BD 파미젠, 미국)를 사용하여 염색한 다음, BD FACS 칼리버(BD 바이오사이언스, 미국)를 이용한 플로우 사이토메트리(flow cytometry)를 수행하여 세포 증식이 진행되고 있는 BrdU 혼입 세포수를 측정하였다. 음성대조군으로서 항체 대신 PBS를 사용하였다.
- [95] 그 결과, 도 6(A)에 나타난 바와 같이 NCI-N87 세포들은 sc4D5-VT나 트라스투주맵을 처리한 경우, PBS를 사용한 경우에 비하여 암세포의 증식이 억제되었으나 Her2 결합능력이 없는 VEGF-트랩(Fc) 1의 경우에는 암세포의 증식을 억제하지 못하였다. 상기 결과는 sc4D5-VT나 트라스투주맵이 NCI-N87 세포 표면의 Her2에의 결합을 통하여 세포의 증식을 억제함을 의미한다. 반면, Her2 발현 정도가 낮은 MDA-MB231 세포의 증식은 억제하지 못한 것으로 확인되었다(도 6B).
- [96] 추가적으로 세포 수와 비례관계를 나타내는 WST-1 분석을 수행하였다. 이를 위하여, 세포를 96-웰 플레이트(well plate)의 각 웰 당  $5 \times 10^3$  cells 씩을 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24 시간 동안 배양한 다음 여러 농도의 항체 시료나 PBS를 가한 후 72 시간 동안 배양하였다. 각 웰당 10  $\mu$ l의 WST-1 용액(로슈 어플라이드 사이언스, 미국)을 가한 후 37°C에서 4 시간 동안 배양한 다음, 610 nm를 기준값(reference)으로 하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. % 생존율(viability)은 PBS를 사용한 세포의 생존율을 100%로 기준하여 그 비율을 나타낸 값이다.
- [97] 그 결과, sc4D5-VT나 트라스투주맵은 NCI-N87 세포의 증식을 최대 약 40% 저해하였으나, VEGF-트랩(Fc) 1이나 IgG는 저해 효과를 보이지 않았다(도 7A). 반면 sc4D5-VT나 트라스투주맵에 의한 MDA-MB231 세포의 증식 억제 효과는 거의 나타나지 않았다 (도 7B).

- [98] 이러한 결과로부터 sc4D5-VT는 트라스투주맵과 마찬가지로 위암세포의 증식을 효율적으로 억제하여 암치료를 위해 매우 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [99] **[실시예 6] sc4D5-VT의 혈관신생 억제 효능**
- [100] sc4D5-VT가 혈관신생을 억제하는지 알아보기 위해 혈관내피세포 (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)의 증식, 이동, 분화 분석 실험을 실시하였다.
- [101] **(1) 혈관내피세포(HUVEC)의 증식 억제 효능 분석**
- [102] 혈관내피세포(HUVEC)를 96-웰 플레이트의 각 웰에 EBM-2 배지(론자사, 스위스), VEGF-A(50ng/ml)를 첨가한 EBM-2 배지, 또는 VEGF-A (50 ng/ml)와 항체 시료를 농도 별로 첨가한 EBM-2 배지 100  $\mu$ l 에 10,000개가 되도록 각각 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 72 시간 배양한 후, 10  $\mu$ l의 WST-1 용액을 넣은 다음 37°C에서 4 시간 동안 배양하였다. 이 후 610 nm를 기준값으로 하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [103] 그 결과, 도 8에서와 같이 트라스투주맵은 IgG와 마찬가지로 혈관내피세포의 증식을 억제하지 않았으나 VEGF-트랩(Fc) 1이나 sc4D5-VT 또는 VEGF 중화 항체인 베바시주맵(Bevacizumab, 상품명 Avastin)은 혈관내피세포의 증식을 억제하는 것으로 나타났다.
- [104] **(2) 혈관내피세포(HUVEC)의 이동 억제 효능 분석**
- [105] 8- $\mu$ m의 포어 사이즈(pore size)를 갖는 트랜스웰(Transwells, 코닝사, 미국)의 아랫면을 0.1% 젤라틴(gelatin)으로 코팅한 후에 24-웰 플레이트에 장착하고 아래쪽 챔버(chamber)를 600  $\mu$ l의 EBM-2 배지, VEGF-A(50 ng/ml)를 첨가한 EBM-2 배지, 또는 VEGF-A(50ng/ml)와 항체 시료를 농도별로 첨가한 EBM-2 배지로 각각 채웠다. 위쪽 챔버에는 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 혈관내피세포 세포가 들어있는 100  $\mu$ l EBM-2 배지를 넣었다. 플레이트를 37°C 세포배양기에서 4시간 동안 방치한 다음, 필터(filter)를 떼어내어 메탄올로 1분 동안 고정시킨 후 헤마톡실린/에오신(Hematoxylin/Eosin)으로 염색하였다. 트랜스웰의 윗면에 머물러 있는 이동하지 않은 세포들은 면봉으로 잘 제거하였다. 필터를 통하여 이동한 세포는 광학현미경( $\times$ 100) 하에서 5개를 무작위로 추출하여 계수하였다.
- [106] 그 결과, 도 9에서와 같이 트라스투주맵은 혈관내피세포의 이동을 억제하지 않았으나 VEGF-트랩(Fc) 1이나 sc4D5-VT 또는 VEGF 중화 항체인 베바시주맵은 혈관내피세포의 이동을 억제하는 것으로 나타났다.
- [107] **(3) 혈관내피세포(HUVEC)의 분화 저해 효능 분석**
- [108] sc4D5-VT의 혈관신생 억제 효능을 알아보기 위해 VEGF-A를 포함한 상태에서 트라스투주맵과 VEGF-트랩(Fc) 1 융합 단백질을 첨가하여, 혈관내피세포의 혈관으로의 분화정도를 튜브 형성 분석(tube formation assay)에 의하여 분석하였다.
- [109] 구체적으로, 96-웰 플레이트를 성장인자가 감소된 매트릭스 겔(Growth Factor

Reduced Matrigel, BD사, 미국)로 코팅 한 후, 15,000개의 혈관내피세포가 들어있는 100  $\mu$ l의 EBM-2 배지, VEGF-A(50 ng/ml)를 첨가한 EBM-2 배지, 또는 VEGF-A(50 ng/ml)와 항체 시료를 첨가한 EBM-2 배지를 각 웰에 가한 후 37°C 세포배양기에서 6시간 동안 배양하였다. 이후 튜브 생성 여부를 역위 현미경(inverted microscopy)로 관찰하였다.

[110] 그 결과 도 10에서와 같이 트라스투주맵은 혈관내피세포의 분화를 저해하지 않았으나 VEGF-트랩(Fc) 1이나 sc4D5-VT는 혈관내피세포의 튜브 형성을 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 위 결과를 하기 표 1에 정리하였다.

[111] [표 1] 각 단백질의 암세포 증식 및 혈관 신생 억제 효능

구분	암세포 증식 억제 효능	혈관신생 억제 효능
sc4D5-VT	+	+
트라스투주맵	+	-
VEGF 트랩(Fc) 1	-	+

[112] 이상에서 본 바와 같이, sc4D5-VT는 위암세포 증식 억제 효능과 혈관신생 억제 효능을 다 나타내고 있어 암세포 증식 억제 효능만 나타내는 트라스투주맵이나 혈관신생 억제 효능만 나타내는 VEGF-트랩(Fc) 1에 비해서 훨씬 더 높은 암 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[113] [실시예 7] sc4D5-VT, VEGF 트랩(Fc) 1, 트라스투주맵의 동물실험

[114] sc4D5-VT의 항암 효능을 VEGF-트랩(Fc) 1이나 트라스투주맵과 비교하기 위하여, 실시예 1에서와 같이 sc4D5-VT과 VEGF-트랩(Fc) 1을 발현 및 정제하였다. 정제된 단백질의 순도를 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies)를 사용하여 결정한 결과 sc4D5-VT은 93.3%, VEGF-트랩(Fc) 1은 96.8%임을 확인하였다. 정제된 sc4D5-VT이나 VEGF-트랩(Fc) 1(1 mg/ml)의 endotoxin 함유량을 Lumulus Amebocyte Lysate Kit(lonza)에 의해 측정된 결과 0.25 EU/ml 미만으로 나타나 endotoxin 오염이 없는 것으로 확인하고 다음과 같은 동물실험에 사용하였다.

[115] NCI-N87 세포들( $5 \times 10^6$ )을 BALB/c Slc-nu 누드 마우스(일본 SLC, Inc)의 피하에 주입한 후, 약 1 주일 후 생착된 암의 크기(약 90 mm<sup>3</sup>)를 쥘 다음, 66.66 nM/kg of body weight의 Synagis(음성대조군으로서 isotype control 항체), VEGF-트랩(Fc) 1, 트라스투주맵, sc4D5-VT, 또는 66.66 nM/kg VEGF-트랩(Fc) 1과 66.66 nM/kg 트라스투주맵의 혼합액을 각각 7 마리의 쥐에 1 주 당 3회씩 4주 동안 정맥주사하였다. 매주 2회씩 calipers로 volume (Volume =  $a \times b^2 / 2$ , a= width at the widest point of tumor, b= width perpendicular to a)을 측정하여 암 성장이 저해되었는지를 확인하였다.

- [116] 그 결과 도 11에서와 같이, sc4D5-VT은 VEGF 트랩(Fc) 1이나 트라스투주맵 단독보다 더 좋은 종양 억제 효능을 나타냈고, 같은 농도의 VEGF 트랩(Fc) 1과 트라스투주맵의 혼합 치료(combination treatment)와 비슷한 효능을 나타내었다. 상기의 결과는 실시예 4에서 나타난 바와 같이 sc4D5-VT이 VEGF를 트랩한 상태에서 Her2에 결합함으로써, sc4D5-VT이 혈관신생의 저해를 통하여 암의 성장을 억제하고 동시에 암세포에 직접 결합하여 암세포를 억제하기 때문임을 확인한 것이다.
- [117] [실시예 8] sc4D5-R2D2D3-hFc의 제조 및 효능 확인
- [118] VEGF 트랩(Fc)의 다른 한 형태(VEGF-트랩(Fc) 2)로서 VEGF의 수용체 VEGFR2의 도메인 2-도메인 3(R2D2D3)을 포함하는, 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열을 가지는 sc4D5-R2D2D3-hFc를 제조하기 위하여 sc4D5-R2D2D3-hFc를 암호화하는 유전자를 독일의 진아트(Geneart)사에 합성을 의뢰하여 얻었다. 합성된 유전자를 *EcoRI-ApaI*으로 절단한 후, 실시예 1의 pJK-dhfr2-sc4D5-VEGF-Trap의 *EcoRI-ApaI* 위치에 서브클로닝하여 발현 벡터 pJK-dhfr2-sc4D5-R2D2D3-hFc를 얻었다(도 12). 실시예 1에서와 같이 pJK-dhfr2-sc4D5-R2D2D3-hFc를 HEK293T 세포에 도입시켜 sc4D5-R2D2D3-hFc를 발현시킨 후, 배양액으로부터 Protein-A 컬럼을 통하여 정제하였다. 정제된 sc4D5-R2D2D3-hFc를 10% SDS-PAGE로 확인할 수 있었다(도 13).
- [119] sc4D5-R2D2D3-hFc의 VEGF에 대한 결합능을 확인하기 위하여, 실시예 2에서와 같은 방법으로 sc4D5-VT, VEGF 트랩(Fc) 2, sc4D5-R2D2D3-hFc의 VEGF165에 대한 결합능을 ELISA로 분석하였다. 그 결과 sc4D5-VT, VEGF 트랩(Fc) 2, sc4D5-R2D2D3-hFc의 VEGF165에 대한 결합능이 유사함을 확인할 수 있었다(도 14A).
- [120] sc4D5-R2D2D3-hFc의 HER2/neu에 대한 결합능을 확인하기 위하여 실시예 3에서와 같은 방법으로 sc4D5-VT, VEGF 트랩(Fc) 2, sc4D5-R2D2D3-hFc의 HER2/neu-Fc에 대한 결합능을 ELISA로 분석하였다. 그 결과 sc4D5-VT, VEGF 트랩(Fc) 2, sc4D5-R2D2D3-hFc의 HER2/neu-Fc에 대한 결합능이 유사함을 확인할 수 있었다(도 14B).
- [121] [실시예 9] sc4D5-R2D2D3-hFc의 HER2/neu와 VEGF에 대한 동시 결합 능력 검증
- [122] sc4D5-R2D2D3-hFc의 한 분자가 HER2/neu와 VEGF에 다 같이 결합할 수 있는지 확인하기 위하여 경쟁적 ELISA를 수행하였다.
- [123] HER2/neu가 결합된 sc4D5-R2D2D3-hFc의 VEGF에 대한 결합능이 free한 sc4D5-R2D2D3-hFc의 VEGF에 대한 결합능과 유사한지를 분석하고자, VEGF 트랩(Fc) 1을 0.5 M carbonate buffer(pH 9.6)로 희석하여 0.5  $\mu$ g을 ELISA plate의 각 웰에 가하여 4°C, overnight 코팅하였다. 이후, plates는 2% skim milk(Difco)와 0.05% Tween 20이 섞인 1×PBS의 200  $\mu$ l로 블로킹하였고, 0.05% PBST로 3번

세척하였다. 다양한 농도의 sc4D5-R2D2D3-hFc을 Her2-6His(1 ug/ml of PBS) 또는 PBS와 37°C 1시간 preincubation한 후, 각각 최종 농도 100 ng/ml PBS의 VEGF165와 섞고 37°C 2시간 반응시켰다. 이 혼합 용액을 VEGF 트랩(Fc) 1이 코팅된 ELISA 웰에 첨가하여 37°C 1시간 반응시킨 후, 결합된 VEGF에 0.05% Tween 20이 섞인 PBS로 1/5,000 희석된 실시예 4의 anti-VEGF-HRP 100  $\mu$ l를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음, 기질인 TMB를 넣어, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[124] 그 결과, Her2-6His가 결합된 sc4D5-R2D2D3-hFc와 free한 sc4D5-R2D2D3-hFc는 VEGF의 VEGF 트랩(Fc) 1에 대한 결합능을 거의 동일하게 저해시킴을 확인하였다(도 15 참조).

[125] 상기 결과는 Her2가 결합된 sc4D5-R2D2D3-hFc의 VEGF에 대한 결합능이 free한 sc4D5-R2D2D3-hFc의 VEGF에 대한 결합능과 동일함을 증명하는 것이며, 이는 sc4D5-R2D2D3-hFc가 VEGF를 트랩한 상태에서도 Her2에 결합함으로써, sc4D5-R2D2D3-hFc가 혈관신생의 저해를 통하여 암의 성장을 억제하고 동시에 암세포에 직접 결합하여 암세포를 억제할 수 있음을 확인한 결과이다.

### 서열목록 Free Text

- [126] 서열목록 1은 VEGF-트랩(Fc) 1의 아미노산 서열
- [127] 서열목록 2는 트라스투주맵의 scFv의 중쇄 가변영역의 아미노산 서열
- [128] 서열목록 3은 트라스투주맵의 scFv의 경쇄 가변영역의 아미노산 서열
- [129] 서열목록 4는 VH와 VL의 링커 서열
- [130] 서열목록 5는 트라스투주맵의 scFv 서열
- [131] 서열목록 6은 sc4D5-VEGF-트랩 1 융합단백질 전체 서열
- [132] 서열목록 7은 리더 서열
- [133] 서열목록 8은 scFv를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- [134] 서열목록 9는 VEGF-트랩(Fc) 1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- [135] 서열목록 10은 sc4D5-VEGF-트랩(Fc) 1 융합단백질을 코딩하는 서열
- [136] 서열목록 11은 리더 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- [137] 서열목록 12는 VEGF-트랩(Fc) 2의 아미노산 서열
- [138] 서열목록 13은 VEGF-트랩 1의 아미노산 서열
- [139] 서열목록 14는 VEGF-트랩 2의 아미노산 서열
- [140] 서열목록 15는 Human Fc의 아미노산 서열
- [141] 서열목록 16은 VEGF-트랩(Fc) 2를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- [142] 서열목록 17은 VEGF-트랩 1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- [143] 서열목록 18은 sc4D5-VEGF-트랩(Fc) 1 융합단백질 전체 서열
- [144] 서열목록 19는 VEGF-트랩 2를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- [145] 서열목록 20은 sc4D5-VEGF-트랩 1 융합단백질을 코딩하는 서열
- [146] 서열목록 21은 sc4D5-VEGF-트랩 2 융합단백질 전체 서열

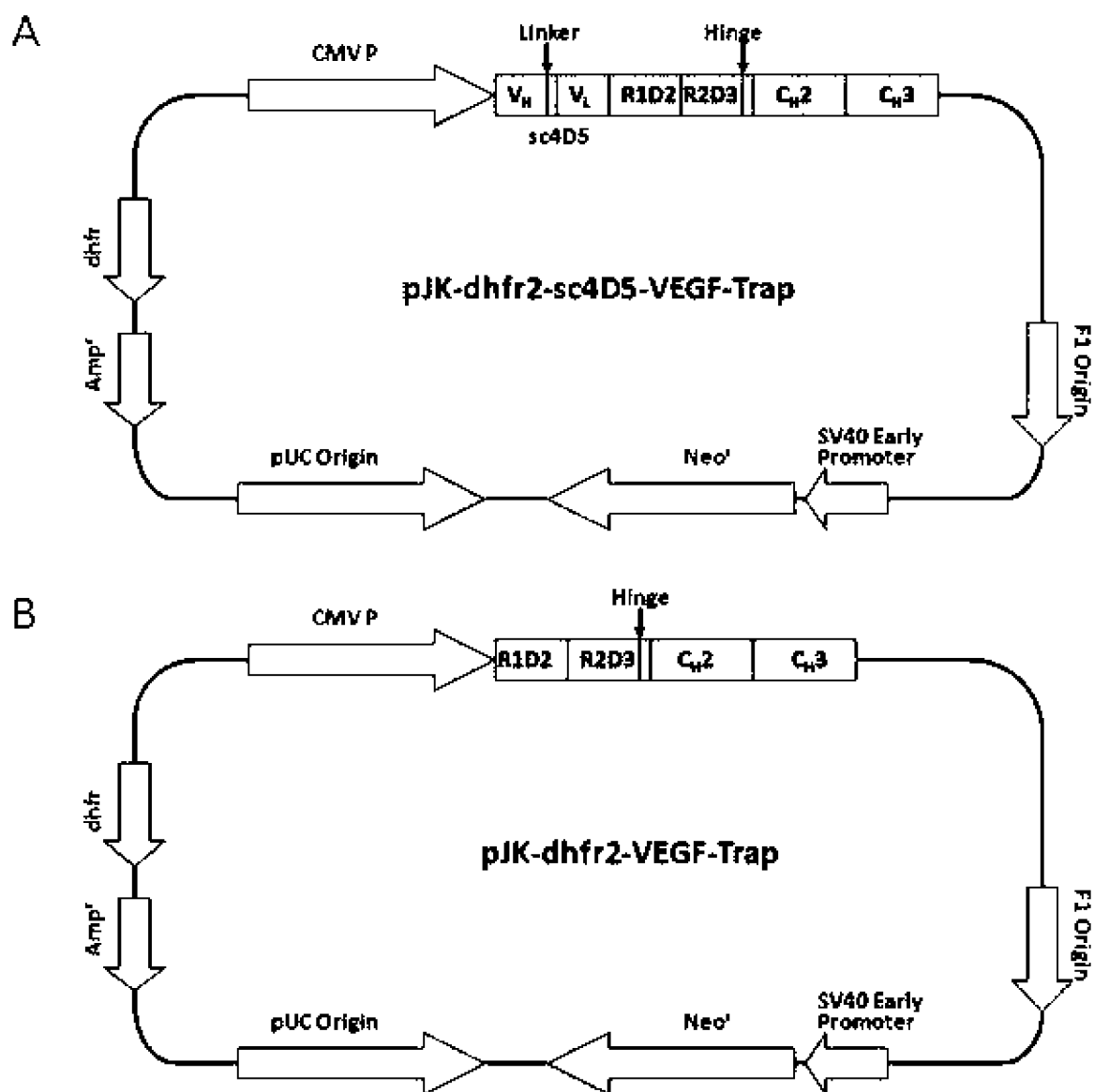
- [147] 서열목록 22는 sc4D5-VEGF-트랩 2 융합단백질을 코딩하는 서열
- [148] 서열목록 23은 sc4D5-VEGF-트랩(Fc) 2 융합단백질 전체 서열
- [149] 서열목록 24는 sc4D5-VEGF-트랩(Fc) 2 융합단백질을 코딩하는 서열

## 청구범위

- [청구항 1] 암세포 특이 항원에 결합능을 가지는 항체, 또는 이의 단편과 VEGF-트랩(trap)의 융합 단백질.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 Her2에 결합하는 항체, 또는 이의 단편과 VEGF-트랩의 융합 단백질.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 융합 단백질은 트라스투주맵(trastuzumab), 또는 이의 단편과 VEGF-트랩의 융합 단백질.
- [청구항 4] 제 3항에 있어서, 상기 융합 단백질은 트라스투주맵의 scFv와 VEGF-트랩이 융합된 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 융합 단백질은 트라스투주맵의 scFv의 C-말단과 VEGF-트랩의 N-말단이 융합된 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 6] 제 4항에 있어서, 상기 트라스투주맵의 scFv는 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 7] 제 4항에 있어서, 상기 VEGF-트랩은 서열번호 13 또는 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서, 상기 VEGF-트랩의 C-말단에 인간 항체의 Fc 영역이 더 융합되어 있는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 VEGF-트랩의 C-말단에 인간 항체의 Fc 영역이 더 융합되어 있는 것은 서열번호 1 또는 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 10] 제 4항에 있어서, 서열번호 6 또는 서열번호 21에 기재된 아미노산 서열을 가지는 융합단백질.
- [청구항 11] 제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질을 포함하는 혈관신생 억제용 조성물.
- [청구항 12] 제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질을 포함하는 암 치료용 조성물.
- [청구항 13] 제 12항에 있어서, 상기 암은 위암 또는 유방암 임을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

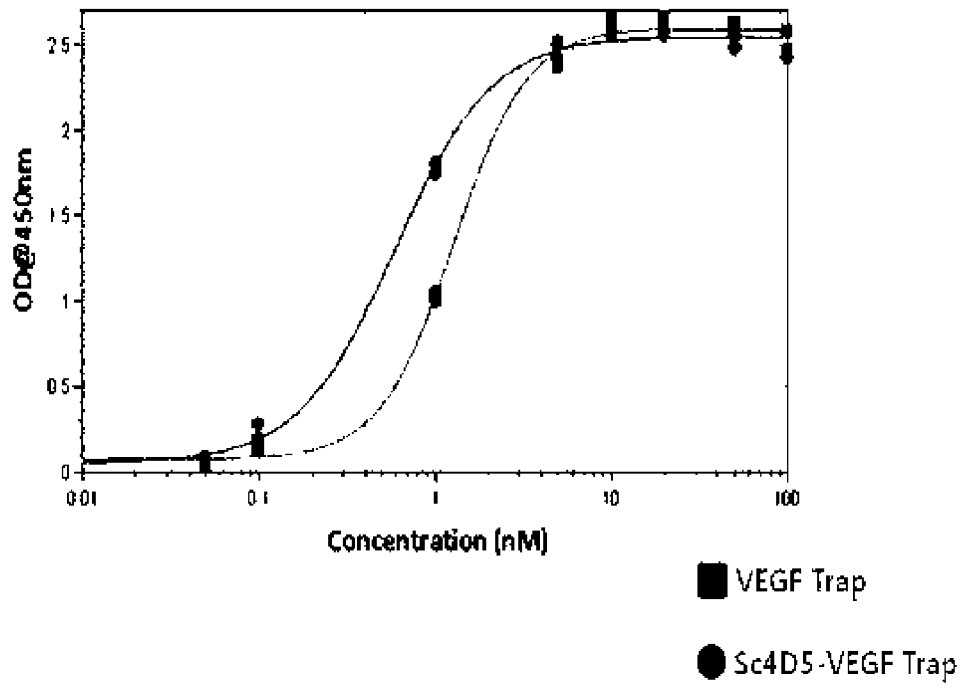
- [청구항 14] 제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 15] 제 14항에 있어서,  
상기 폴리뉴클레오티드 서열번호 10, 서열번호 20, 서열번호 22 및 서열번호 24로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 16] 제 14항 또는 제 15항에 따른 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 5' 말단에 서열번호 7에 따른 아미노산 서열을 가지는 리더 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가적으로 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 17] 제 14항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.
- [청구항 18] 제 17항에 따른 재조합 벡터를 포함하는 형질전환 세포.
- [청구항 19] 제 18항에 있어서,  
상기 형질전환 세포는 동물세포, 식물세포, 효모, 대장균, 곤충세포 임을 특징으로 하는 형질전환 세포.
- [청구항 20] 제 19항에 있어서,  
상기 형질전환 세포는 원숭이 신장 세포7(COS7: monkey kidney cells) 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, 차이나이즈 햄스터 난소(CHO: chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린 햄스터 신장(BHK: baby hamster kidney) 세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 및 HEK293 세포에서 선택됨을 특징으로 하는 형질전환 세포.
- [청구항 21] 제 20항에 있어서,  
상기 형질전환 세포는 대장균, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스 속(*Staphylococcus* sp.), 아스페르길러스 속(*Aspergillus* sp.), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스 속 (*Schizosaccharomyces* sp.) 및 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)에서 선택됨을 특징으로 하는 형질전환 세포.
- [청구항 22] 제 17항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 따른 벡터 또는 형질전환 세포를 이용한 트라스투주맵(trastuzumab), 또는 이의 단편과 VEGF-트랩(trap)의 융합 단백질의 생산방법.

[Fig. 1]

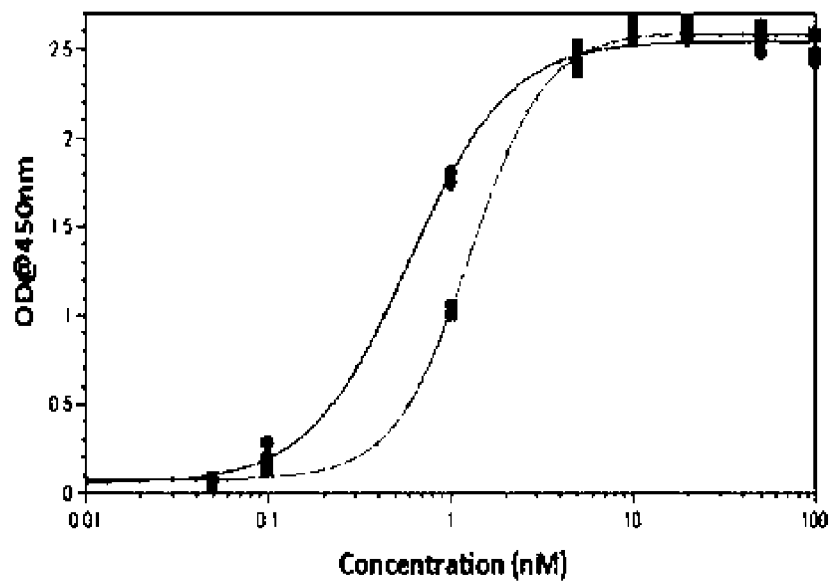


[Fig. 2]

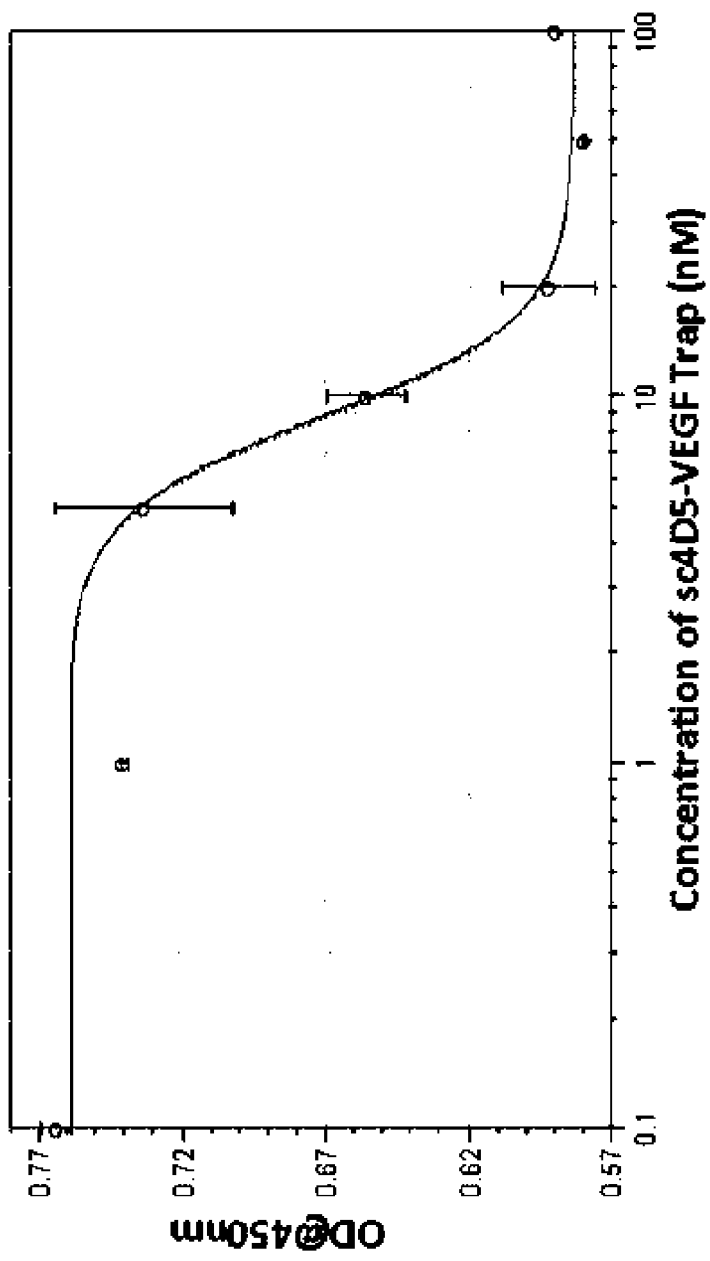
A



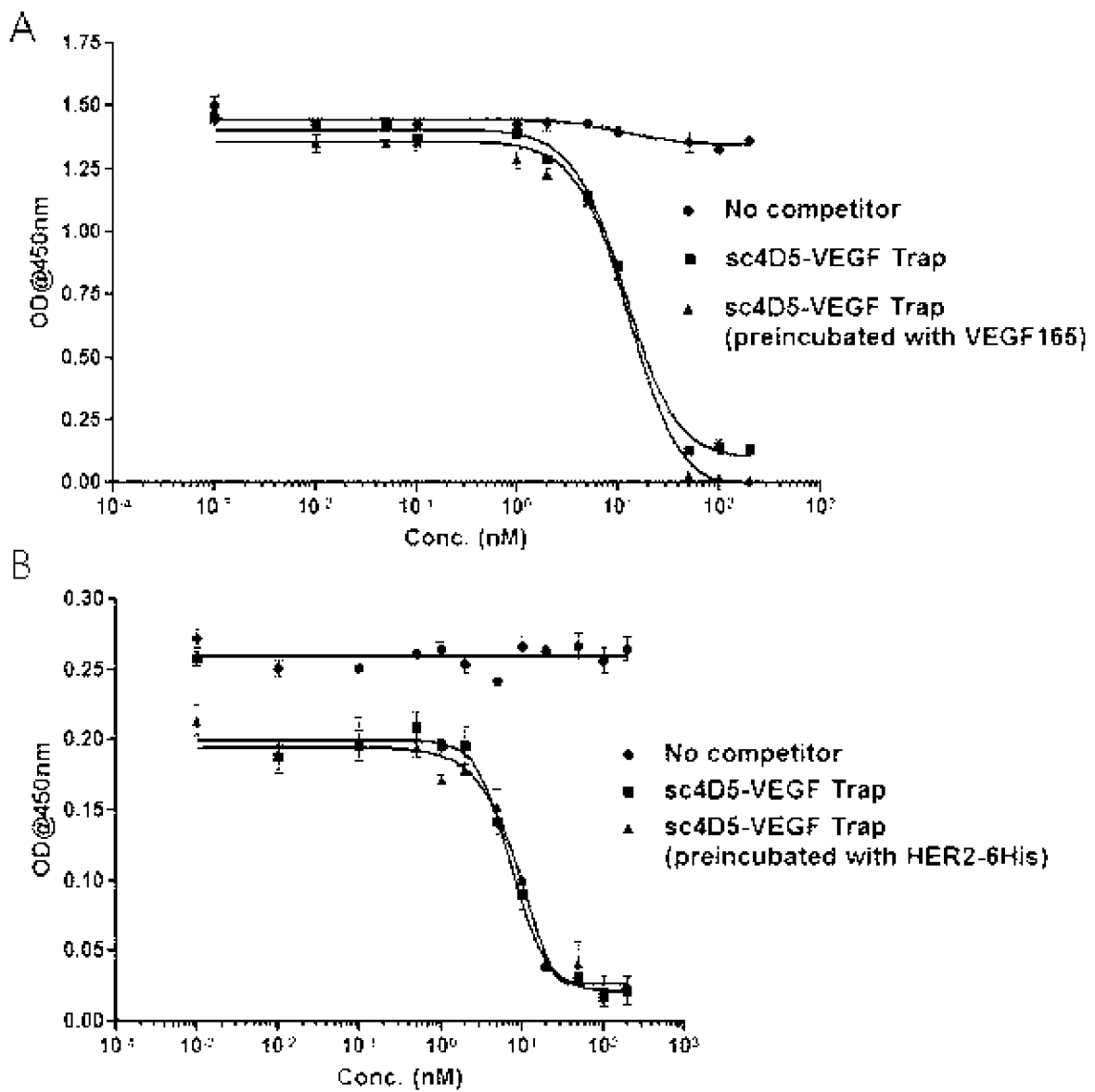
B



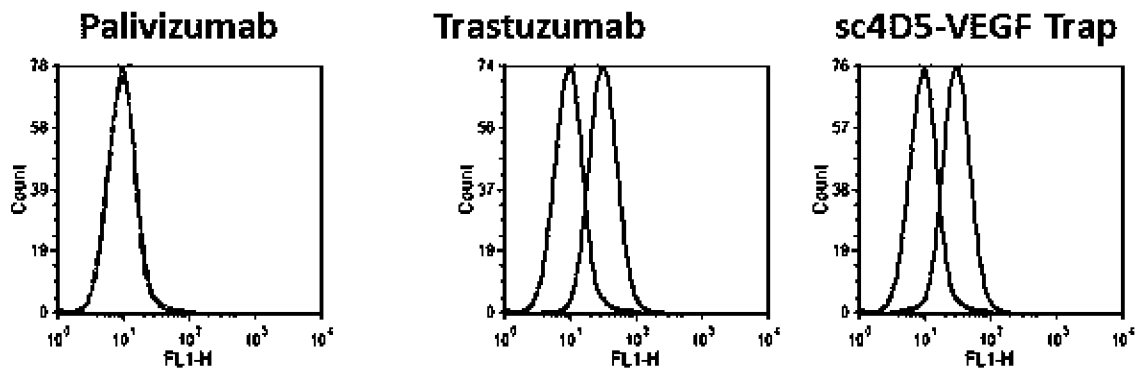
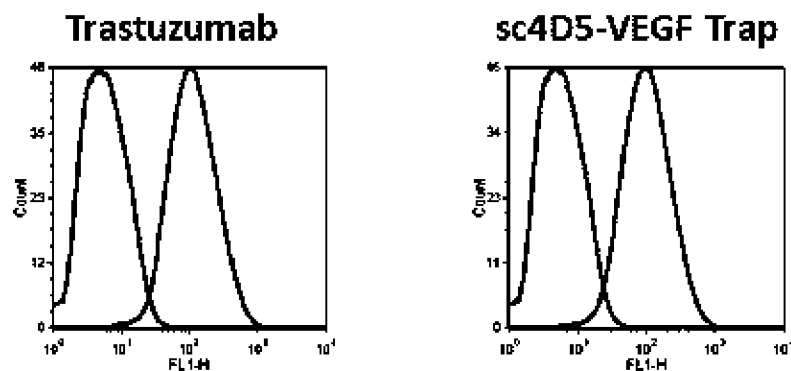
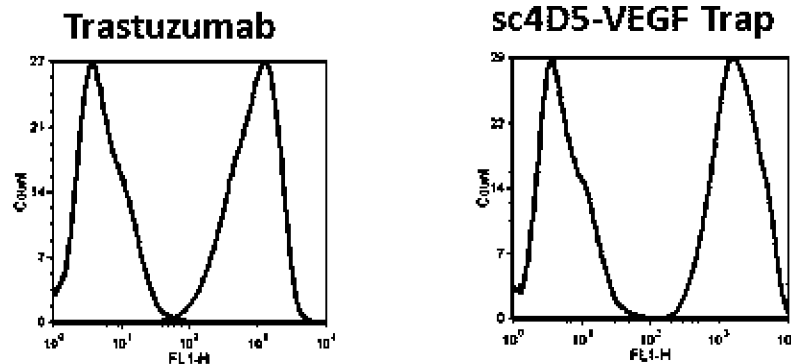
[Fig. 3]



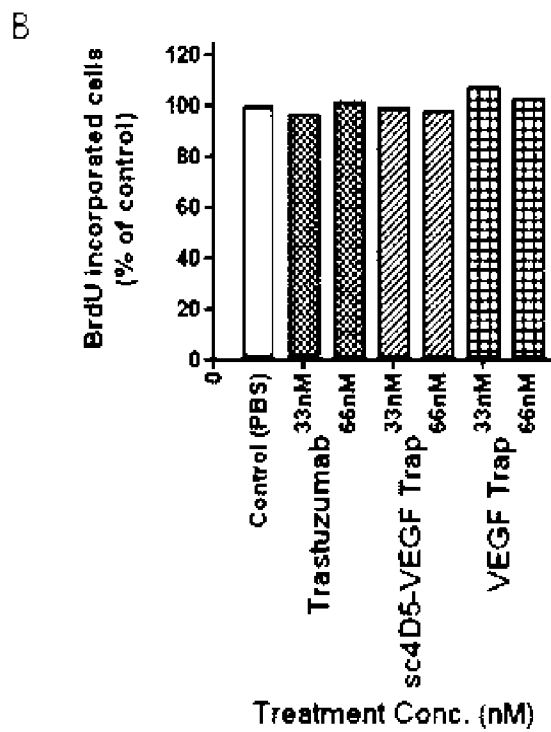
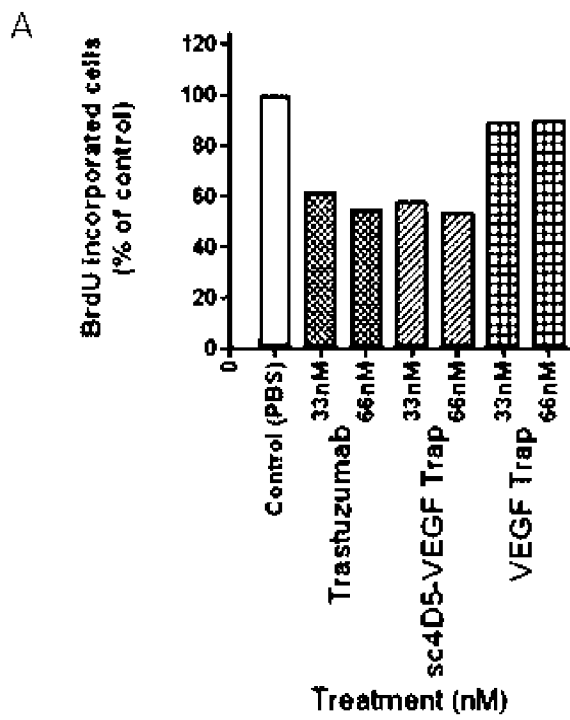
[Fig. 4]



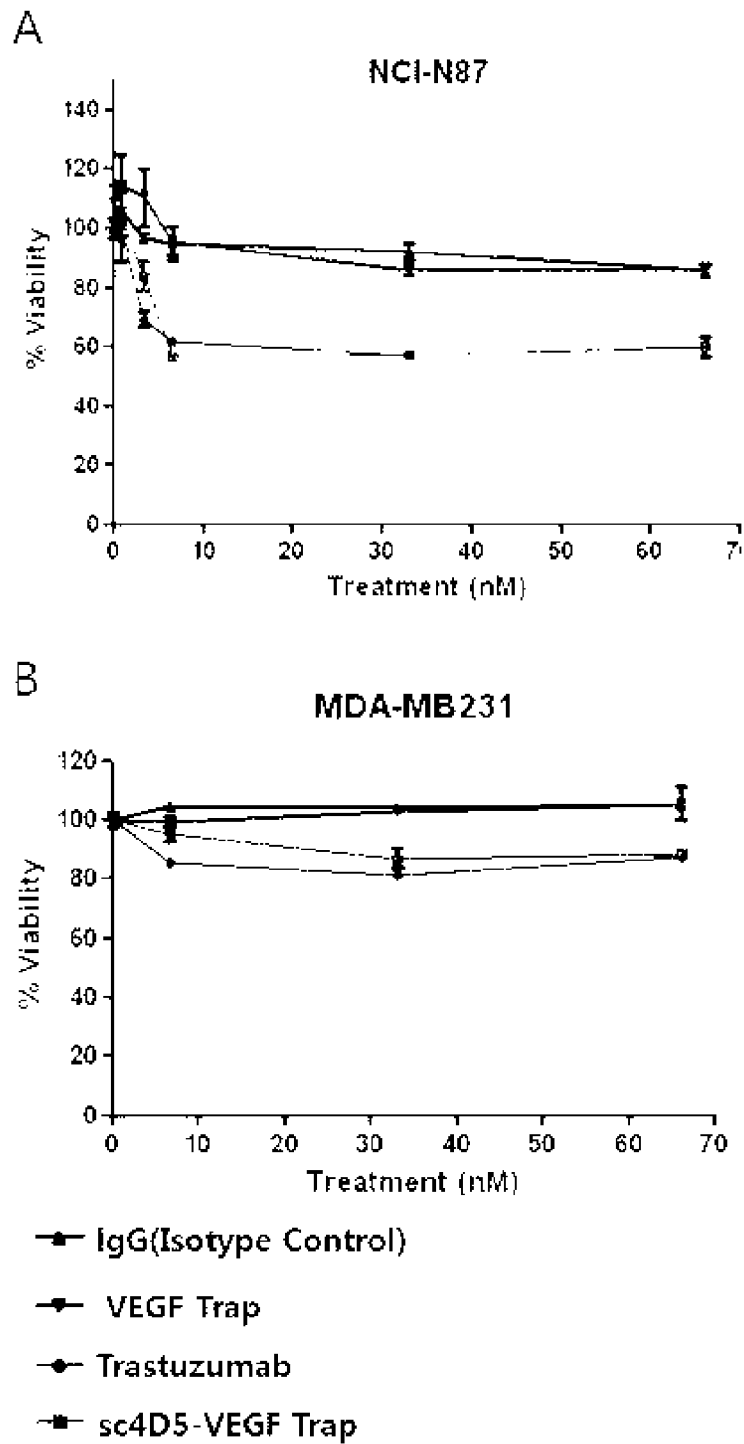
[Fig. 5]

**MDA-MB231 cell line****SNU-216 cell line****NCI-N87 cell line**

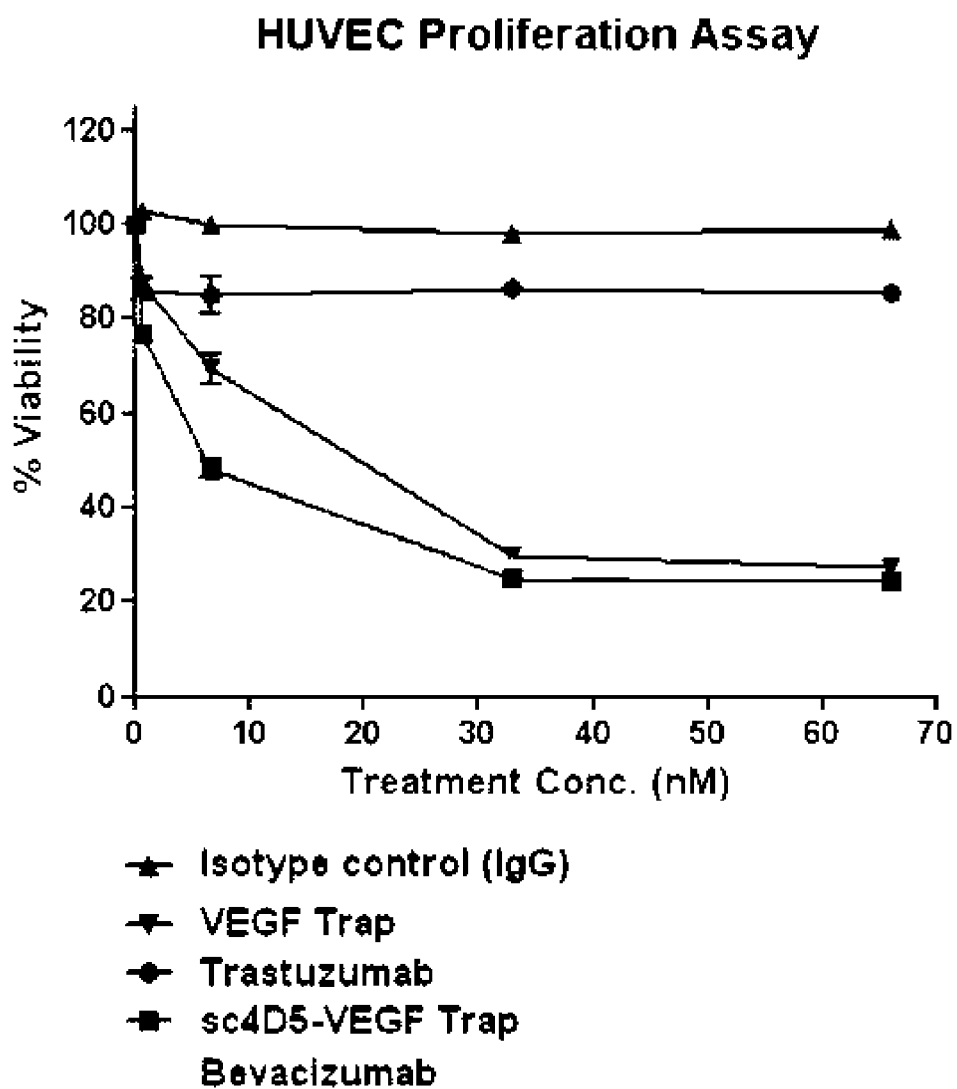
[Fig. 6]



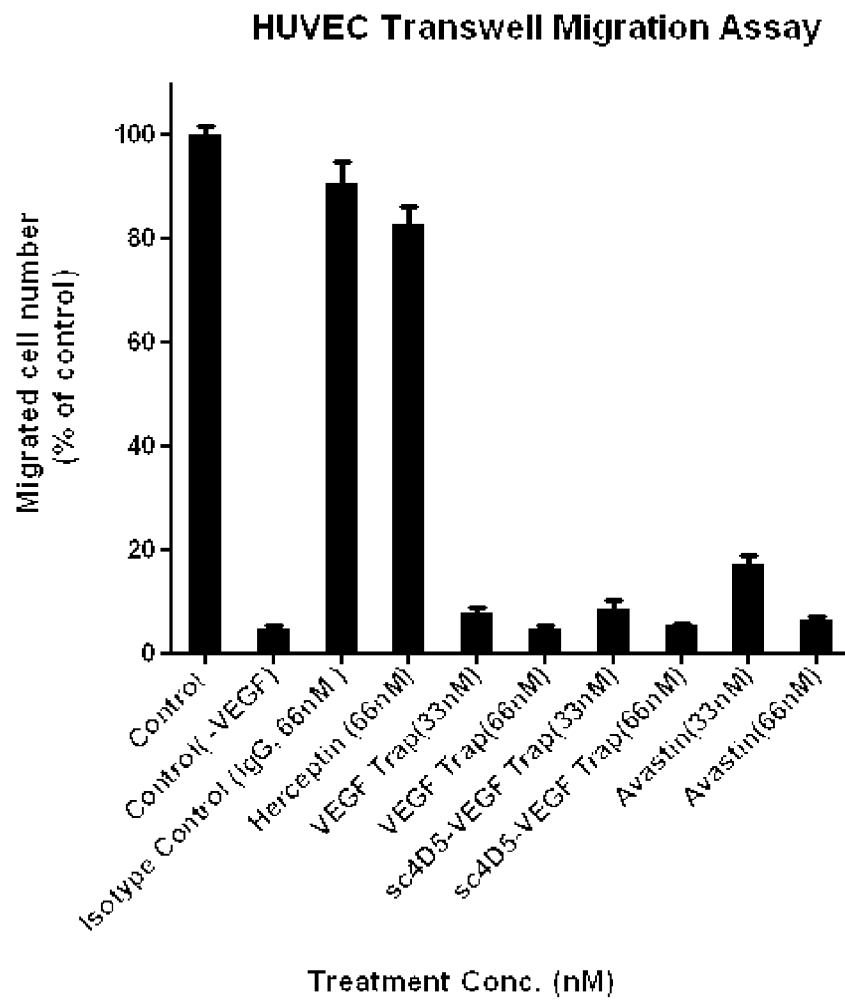
[Fig. 7]



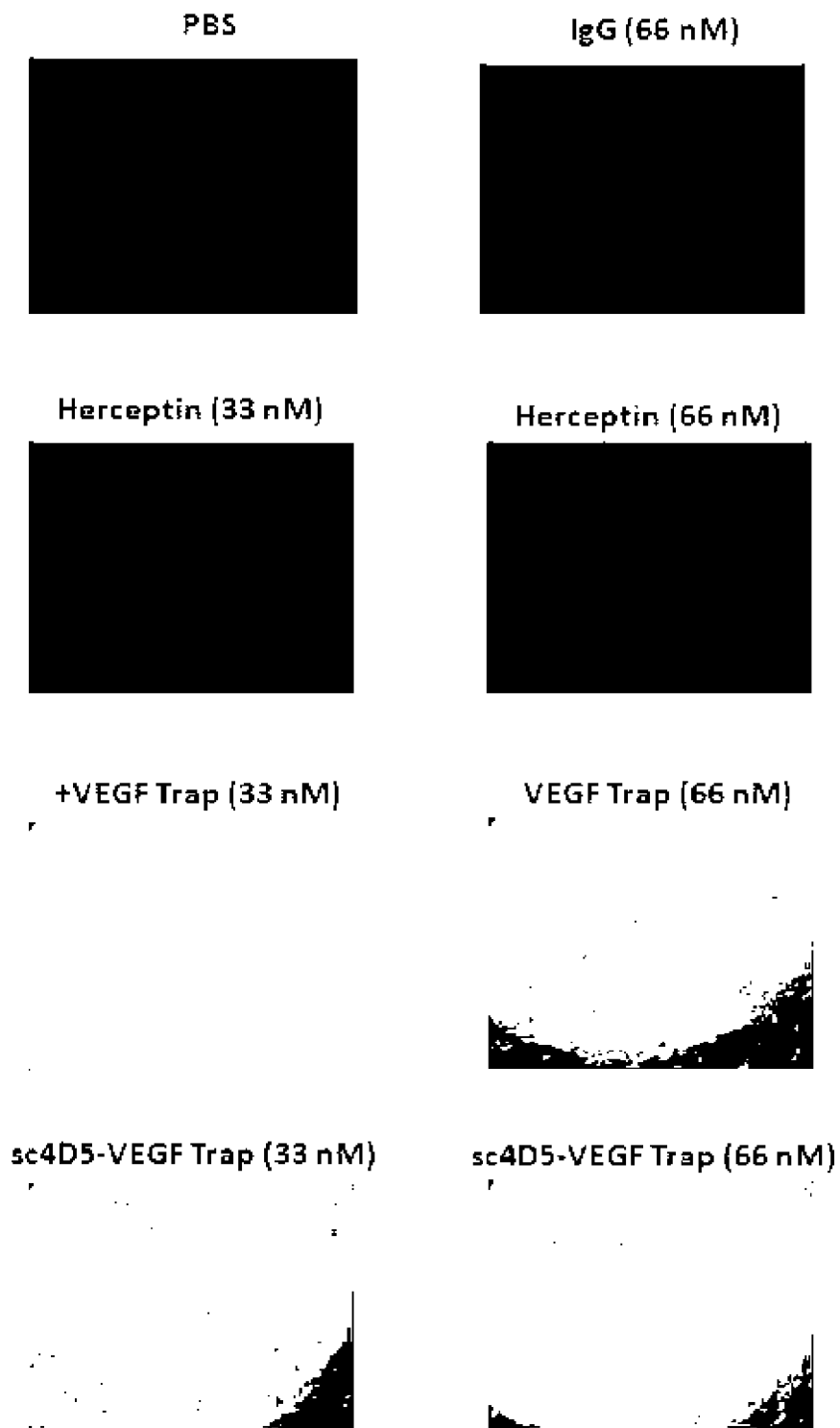
[Fig. 8]



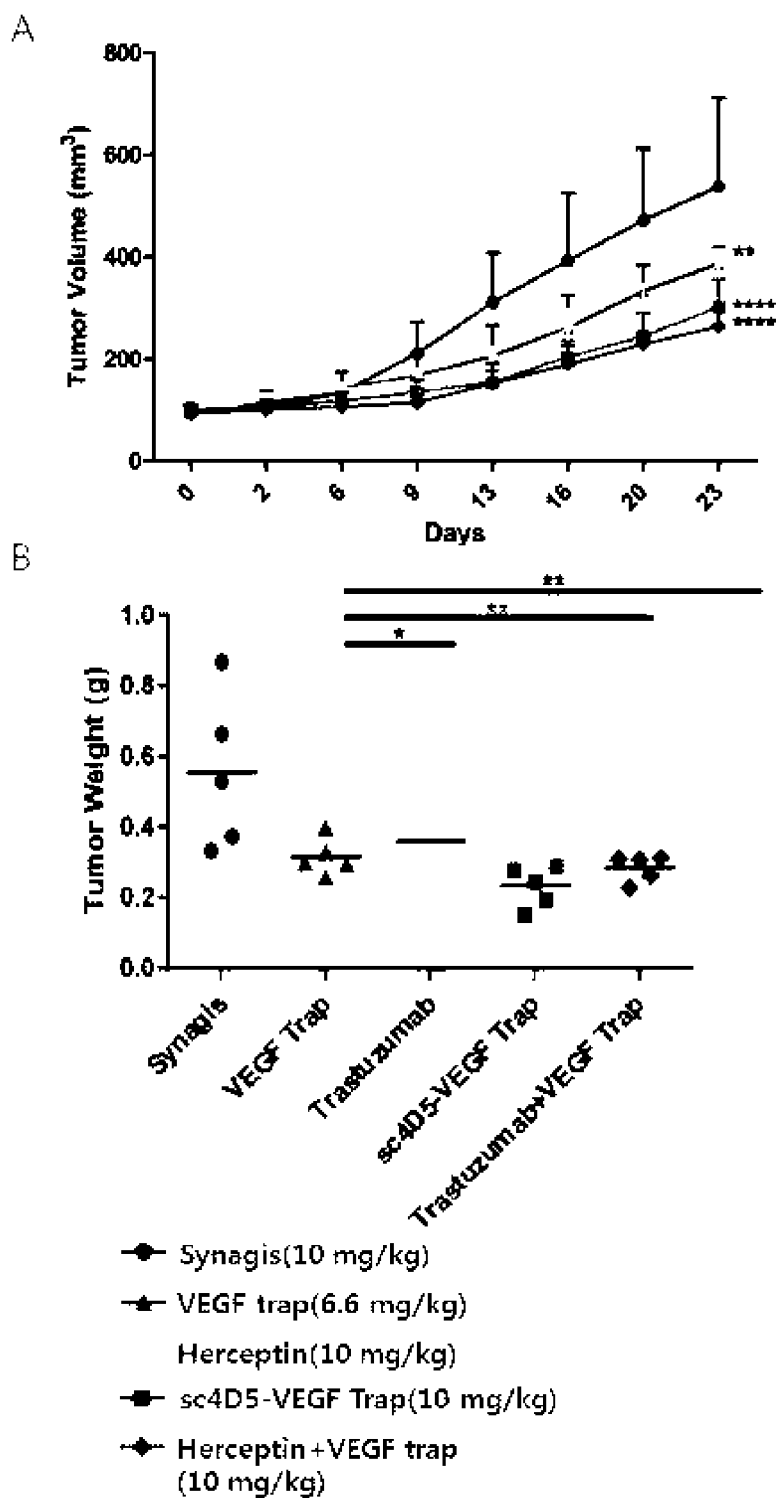
[Fig. 9]



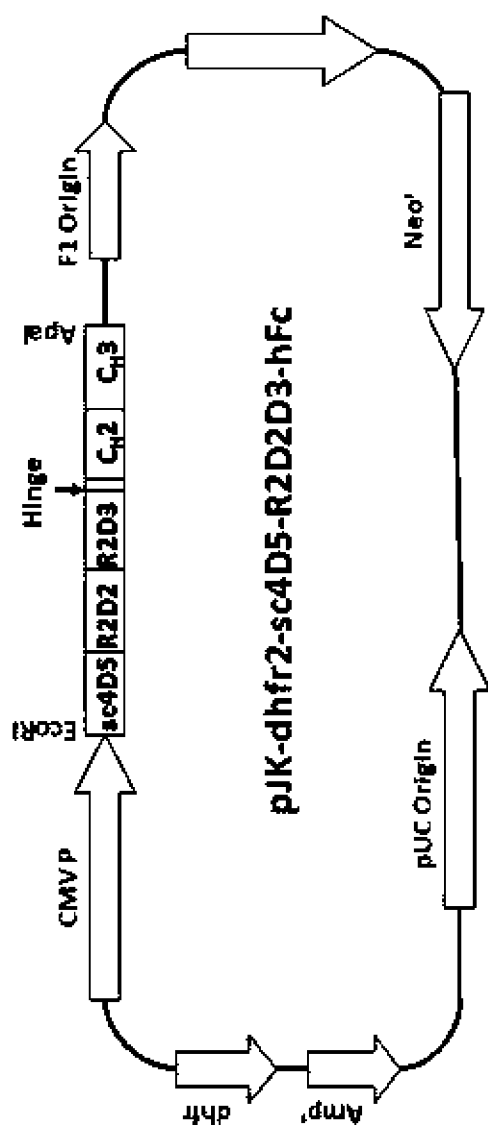
[Fig. 10]



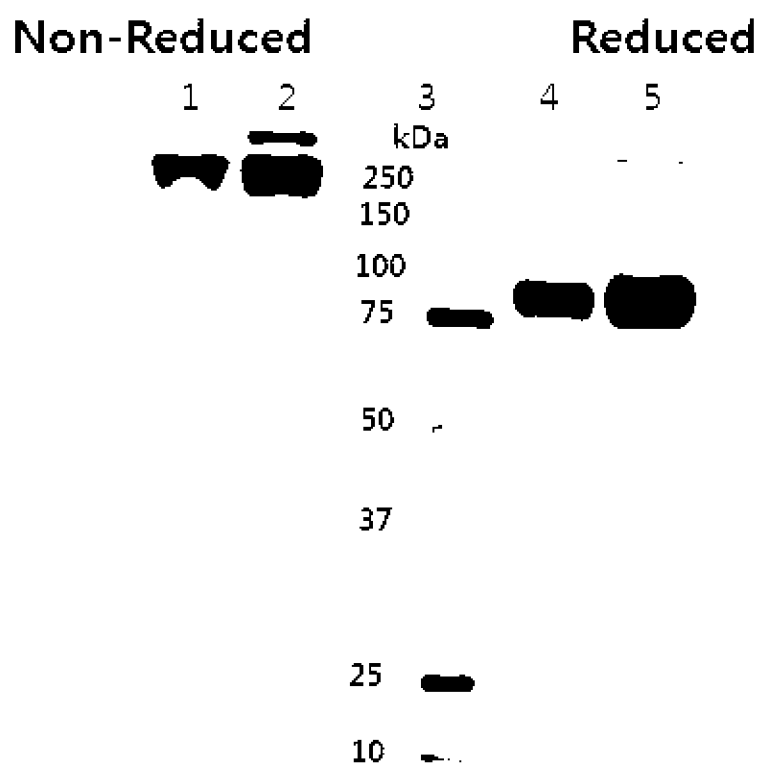
[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13]



Lane1: sc4D5-VEGF Trap

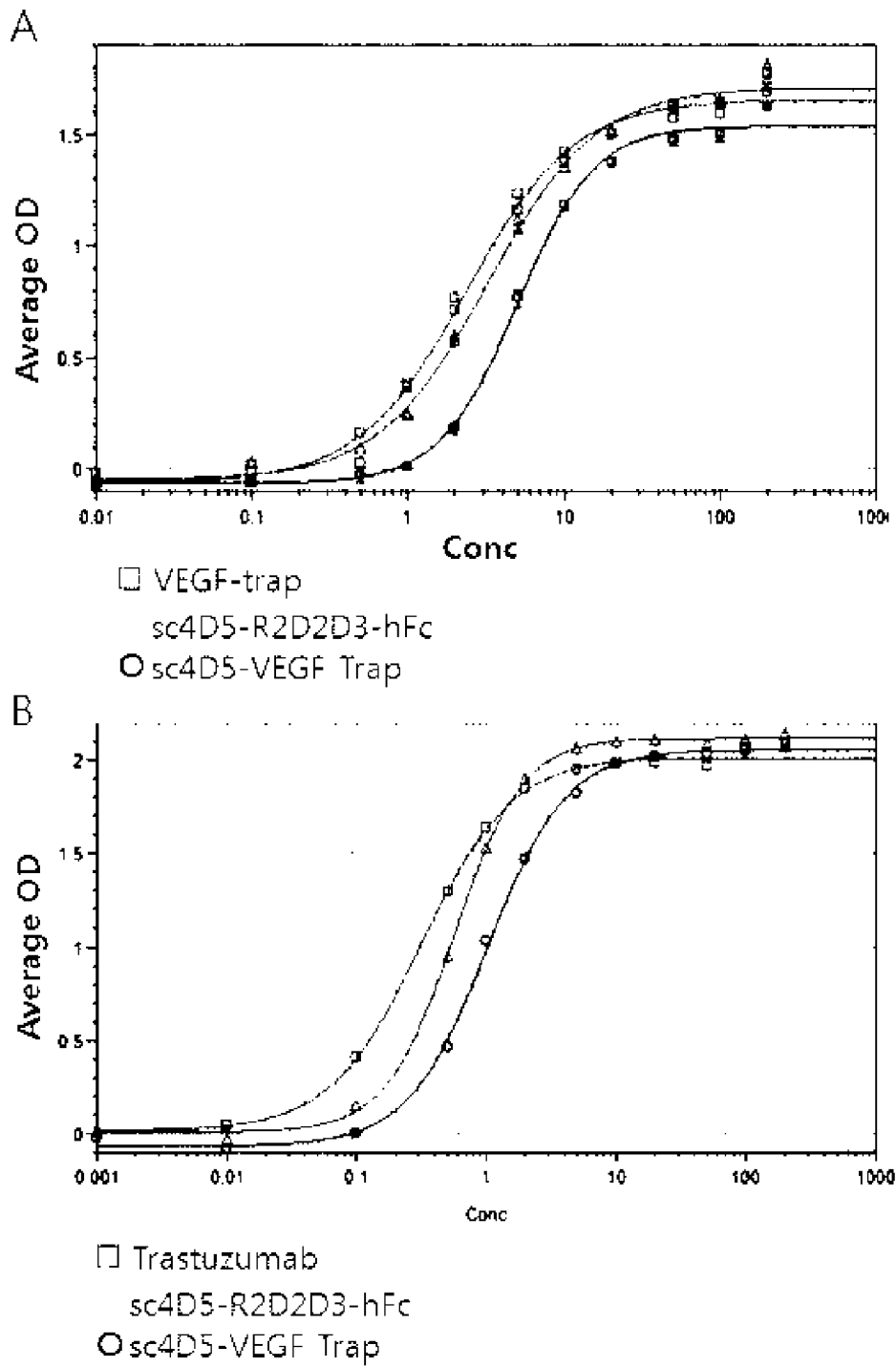
Lane2: sc4D5-R2D2D3-hFc

Lane3: Protein Marker

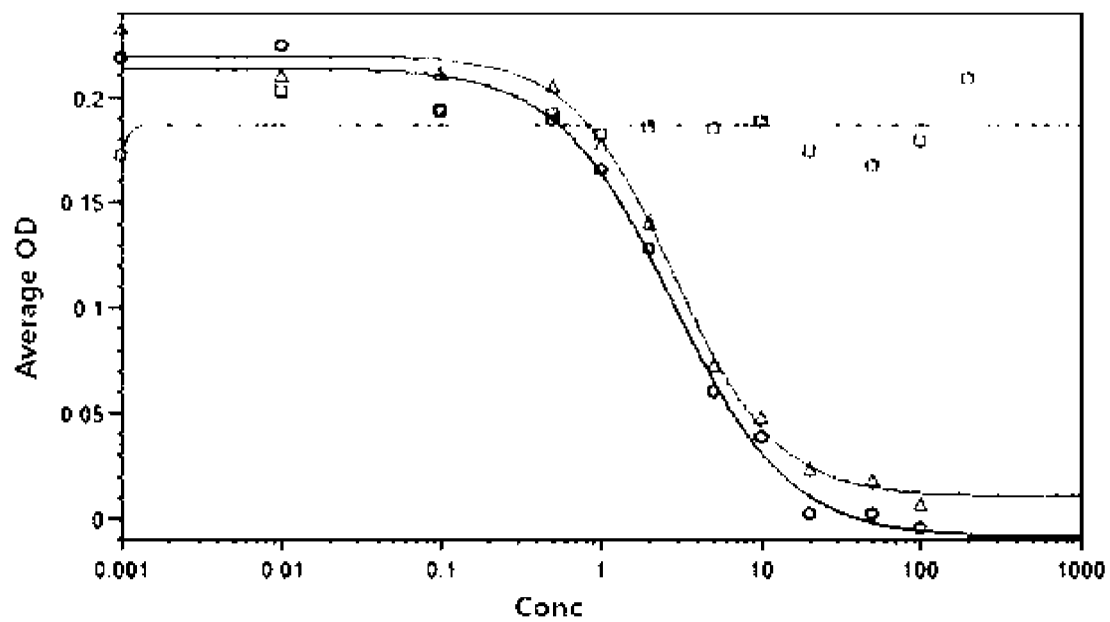
Lane4: sc4D5-VEGF Trap

Lane5 sc4D5-R2D2D3-hFc

[Fig. 14]



[Fig. 15]



□ No competitor

sc4D5-R2D2D3-hFc

○ sc4D5-R2D2D3-hFc  
(preincubated with Her2-6His)