



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월20일  
(11) 등록번호 10-2206029  
(24) 등록일자 2021년01월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/22 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2014-0009815  
(22) 출원일자 2014년01월27일  
심사청구일자 2019년01월09일  
(65) 공개번호 10-2015-0089329  
(43) 공개일자 2015년08월05일  
(56) 선행기술조사문헌  
JP2013500970 A\*  
KR1020100118143 A  
KR1020110068184 A  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
삼성전자주식회사  
경기도 수원시 영통구 삼성로 129 (매탄동)  
(72) 발명자  
김경은  
경기도 용인시 기흥구 농서로 84, 삼성종합기술원  
바이오랩 (농서동)  
이윤숙  
경기도 화성시 동탄반석로 156, 319호 (반송동)  
(74) 대리인  
팬코리아특허법인

전체 청구항 수 : 총 12 항

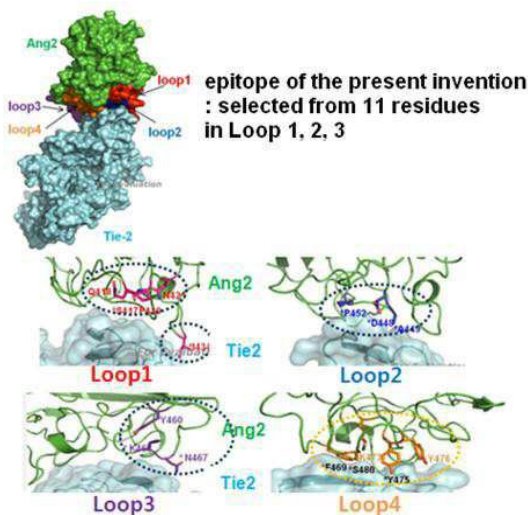
심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 Ang-2에 특이적으로 결합하는 항체 및 그의 용도

(57) 요약

신생혈관형성 유도인자인 엔지오포이에틴-2(Angiopoietin-2; Ang-2)에 특이적으로 결합하여 기능을 저해하는 항체와 관련된 것으로, 구체적으로, 엔지오포이에틴-2 특이적 항체, 상기 항체를 유효성분으로 포함하는 혈관신생 저해제 및 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 치료용 조성물, 및 상기 항체를 포함하는 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 진단용 조성물이 제공된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**한상열**

경기도 용인시 기흥구 탑실로 15, 108동 203호 (공세동, 탑실마을대주피오레1단지아파트)

**김형찬**

경기도 용인시 기흥구 중부대로746번길 21, 204-1702 (상하동, 지식마을진흥더루벤스2단지아파트)

**이광훈**

경기도 오산시 수청로 165, 903동 1402호 (금암동, 죽미마을휴먼시아휴튼아파트)

**이효선**

경기도 화성시 동탄반석로 41, 620동 2802호 (반송동, 나루마을신도브레뉴아파트)

**김석균**

서울특별시 용산구 청파로 213, A동 2502호 (문배동, 이안용산프리미어)

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드(CDR-H1), 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드(CDR-H2), 및 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드(CDR-H3)를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드(CDR-L1), 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드(CDR-L2), 및 서열번호 22의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드(CDR-L3)를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 37의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드(CDR-H1), 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드(CDR-H2), 및 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드(CDR-H3)를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드(CDR-L1), 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드(CDR-L2), 및 서열번호 24의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드(CDR-L3)를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 31의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 39의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 10**

제1항, 제5항, 제8항, 및 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항 Ang-2 항체는 단클론항체인, 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 11**

제1항, 제5항, 제8항, 및 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항 Ang-2 항체는 마우스 유래 항체, 마우스-인간 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 인간 항체인, 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 12**

제1항, 제5항, 제8항, 및 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 상기 항 Ang-2 항체의 scFv, (scFv)<sub>2</sub>, Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub>로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 13**

기탁번호 KCLRF-BP-00305, KCLRF-BP-00306, KCLRF-BP-00307, 또는 KCLRF-BP-00308의 하이브리도마.

**청구항 14**

제1항, 제5항, 제8항, 및 제9항 중 어느 한 항의 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는, 엔지오포이에틴-2 활성화 또는 과생성과 관련된 질병의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,

상기 엔지오포이에틴-2 활성화 또는 과생성과 관련된 질병은 암, 암전이, 미숙아 망막병증, 황반변성, 당뇨병성 망막병증, 혈관신생성 녹내장, 폐렴, 천식, 건선, 류마티스성 관절염, 만성 염증, 고혈압, 동맥경화, 또는 패혈증인, 엔지오포이에틴-2 활성화 또는 과생성과 관련된 질병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 엔지오포이에틴-2 활성화 또는 과생성과 관련된 질병은 암, 또는 암전이인, 엔지오포이에틴-2 활성화 또는 과생성과 관련된 질병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 16**

제1항, 제5항, 제8항, 및 제9항 중 어느 한 항의 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는, 엔지오포이에틴-2 활성화 또는 과생성과 관련된 질병의 진단용 약학 조성물로서,

상기 엔지오포이에틴-2 활성화 또는 과생성과 관련된 질병은 암, 암전이, 미숙아 망막병증, 황반변성, 당뇨병성 망막병증, 혈관신생성 녹내장, 폐렴, 천식, 건선, 류마티스성 관절염, 만성 염증, 고혈압, 동맥경화, 또는 패혈증인, 엔지오포이에틴-2 활성화 또는 과생성과 관련된 질병의 진단용 약학 조성물.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 상기 엔지오포이에틴-2 활성화 또는 과생성과 관련된 질병은 암, 또는 암전이인, 엔지오포이에틴-2 활성화 또는 과생성과 관련된 질병의 진단용 약학 조성물.

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 신생혈관형성 유도인자인 엔지오포이에틴-2(Angiopoietin-2; Ang-2)에 특이적으로 결합하여 기능을 저해하는 항체와 관련된 것으로, 구체적으로, 엔지오포이에틴-2 특이적 항체, 상기 항체를 유효성분으로 포함하는 혈관신생 저해제 및 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 치료용 조성물, 및 상기 항체

를 포함하는 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 진단용 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0002] 혈관 신생(angiogenesis)은 기존 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 기작을 의미하며, 기관의 형성, 정상적인 생리학적 성장, 상처 치유 등에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 비정상적인 혈관 신생은 종양의 성장과 전이, 연령 관련 황반변성, 당뇨병성 망막병증, 건선, 류마티스성 관절염, 만성 염증과 같은 질병에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0003] 혈관 신생은 종양의 성장과 전이에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 새로운 개념의 암 치료제를 개발하기 위해 혈관 신생 기작에 대한 다양하고 심도 있는 연구가 선진국 및 다국적 제약사들에 의해 진행되었다. 상기 연구의 표적이 된 단백질 중 하나가 혈관 발달 및 출생 후 혈관 신생에 관여하는 것으로 알려져 있는 엔지오포이에틴으로, Ang-1, Ang-2, Ang-3, Ang-4 등이 알려져 있다.
- [0004] 이 중 Ang-2(엔지오포이에틴-2)와 관련한 암 조직의 신생 혈관 형성 과정은 다음과 같다. 먼저, 암 조직에서 신생 혈관 형성을 위해 암세포가 기존의 혈관을 선택하는 혈관공용(cooption)이 발생한다. 그 후, 엔지오포이에틴-2 경로에 의해 기존의 혈관의 기능을 파괴시키는 혈관 퇴화가 일어난다. 기존 혈관의 퇴화로 인하여 암 조직 내의 환경은 저산소(hypoxia) 환경이 되어 신생 혈관이 형성될 수 있는 조건을 제공하게 된다. 상기 조건 하에서 혈관 내피 세포 성장 인자(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)의 발현이 증가되어 새로운 혈관이 생성된다. 이러한 이유로, Ang-2는 혈관신생 억제제 개발에 있어서 중요한 타겟 중 하나이며, 현재 다양한 종류의 혈관 신생 억제제가 개발되어, 전임상 또는 임상 시험이 활발히 진행되고 있다.
- [0005] Ang-2의 혈관신생 억제제 개발의 표적으로서의 중요성이 커져가고 있는 상황에서, 보다 효과적이고 강력한 Ang-2 표적 물질의 개발이 요구되고 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0006] 일 예는 신생혈관형성 유도인자인 엔지오포이에틴-2(Angiopoietin-2; Ang-2)에 특이적으로 결합하여 기능을 저해하는 항체를 제공한다.
- [0007] 다른 예는 상기 엔지오포이에틴-2 특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 혈관신생 저해제 및 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 치료용 조성물을 제공한다.
- [0008] 다른 예는 상기 항체를 포함하는 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 진단용 조성물을 제공한다.

**과제의 해결 수단**

- [0009] 본 발명은 신생혈관형성 유도인자인 엔지오포이에틴-2(Angiopoietin-2; Ang-2)의 기능을 저해시키는 항체 및 그의 용도에 관한 것이며, 더욱 구체적으로는 암조직내 암세포 성장에 필수적인 신생혈관형성을 유도하는 인자인 Ang-2가 그의 세포내 수용체(receptor)인 Tie-2와 결합하는 것을 방해함으로써 암조직내 신생혈관 형성을 억제하고 Ang-2의 활성화 및/또는 과생성과 연관된 질병의 진단 및 치료에 유용한 항체를 개발하고자 하는데 그 목적을 두고 있다.
- [0010] Ang-2 단백질은 혈관신생과 밀접한 관련이 있으며 혈액 내에 존재하는 가용성 리간드로서, 신약 개발에 있어서 주목받는 치료용 타겟 단백질이다. 본 발명자들은 신생혈관 생성(angiogenesis), 암전이(metastasis), 암세포 침투(invasion)에 광범위하게 작용하는 Ang-2 단백질, 예컨대 사람의 Ang-2 단백질을 인식하고, 그 수용체인 tie-2와의 결합을 억제함으로써 신생혈관 생성, 암 발생, 암세포의 전이를 억제하는 항체에 관한 것으로, 상기 항체는 Ang-2의 활성화 및/또는 과생성과 연관된 질병의 진단 및/또는 치료에 이용될 수 있다.
- [0011] 본 명세서에서 "항체"라 함은, 면역계 내에서 항원의 자극에 의하여 만들어지는 물질을 의미하는 것으로서 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에서 항체는 동물 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 완전 인간 항체를 모두 포함한다. 또한 본 발명에서 항체란 항원 결합능을 보유한 항체의 항원 결합 단편도 포함한다. 한편, 본 명세서에서 "상보성 결정부위 (Complementarity-determining regions, CDR)"라 함은, 항체의 가변 부위 중에서 항원과의 결합 특이성을 부여하는 부위를 의미한다. 앞서 설명한 항체의 항원 결합 단편

은 상기 상보성 결정부위를 하나 이상 포함하는 단편일 수 있다.

- [0012] 암 조직의 신생혈관형성 과정을 보면, 먼저 암 조직에서 신생혈관형성을 위해 암세포가 기존의 혈관을 선택하는 혈관공용(cooption)이 발생한다. 그런 다음, 엔지오포이에틴-2(Angiopoietin-2, Ang-2) 경로에 의해 상기 공용된 기존의 혈관의 기능을 파괴시키는 혈관퇴화(vessel regression)가 일어난다. 기존 혈관의 퇴화로 인해 암 조직 내의 환경은 저산소(hypoxia) 환경이 되어 신생혈관이 형성될 수 있는 조건을 제공하게 된다. 이 조건 하에서 혈관내피세포성장인자(Vascular Endothelial Cell Growth Factor, VEGF)의 발현이 증가되어 새로운 혈관이 생성된다. 엔지오포이에틴에는 Ang-1, Ang-2, Ang-3 및 Ang-4 등이 알려져 있는데 그 중 Ang-2는 ANGPT2로도 알려져 있으며, 혈관 리모델링 부위에서 발현된다 Ang-2는 인간, 원숭이 등의 영장류, 래트, 마우스 등의 설치류를 포함하는 포유류 유래의 것일 수 있으며, 예컨대, 인간 유래의 Human Ang-2 (Accession # 015123), 마우스 유래의 Mouse Ang-2 (Accession # NP\_031452) 등일 수 있다.
- [0013] 항체는 최근에 질병 치료제의 용도로 많이 사용되고 있다. 항체는 생체 외뿐 아니라 생체 내에서도 매우 안정하고 반감기가 길기 때문에 대량 발현 및 생산에 유리하다. 또한, 항체는 본질적으로 이합체(dimer) 구조를 가지므로 접착능(avidity)이 매우 높다.
- [0014] 일 실시예에 있어서, 상기 항체는 Ang-2에 대한 결합 활성을 가지며, Ang-2가 자신의 세포내 수용체(receptor)인 Tie-2와 결합하는 것을 방해함으로써 암조직내 신생혈관형성을 억제하는 효과를 갖는 항체이다. 구체적으로, 일 실시예에 따른 항체는 Ang-2와의 결합에 있어서 Tie-2와 경쟁함으로써, Ang-2와 Tie-2와의 결합을 저해하는 것일 수 있으며, 예컨대, Ang-2의 Tie-2와의 결합 부위를 인식 및/또는 결합함으로써 Ang-2와 Tie-2와의 결합을 저해하는 것일 수 있다.
- [0015] 일 예에 있어서, 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다. 상기 항 Ang-2 항체는 인간 Ang-2 (hAng-2; 서열번호 27; Accession # 015123) 의 루프 3(서열번호 27 중 460번째 아미노산부터 468번째 아미노산까지의 부위; 하기 서열에서 밑줄로 표시) 부위의 전부, 일부(예컨대, 루프 3 중 외부에 노출된 아미노산 잔기들로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기), 또는 서열번호 27 중에서 루프 3의 외부에 노출된 아미노산 잔기를 하나 이상 포함하는 인접하는 2개 내지 20개, 2개 내지 15개, 2개 내지 10개, 또는 2개 내지 5개의 아미노산을 포함하는 아미노산 서열 부위를 에피토프로서 인식 및/또는 특이적으로 결합하는 것일 수 있다. 상기 루프 3 중 외부에 노출된 아미노산 잔기는 Y460 및 K468로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다(하기 서열에서 굵은 글씨로 표시).
- [0016] Ang-2 (서열번호 27)
- [0017] MWQIVFFTLS CDLVLAAYN NFRKSMDSIG KKQYQVQHGS CSYTFLLPEM DNCRSSSSPY
- [0018] VSNAVQRDAP LEYDDSVQRL QVLENIMENN TQWLMKLENY IQDNMKKEMV EIQQNAVQNQ
- [0019] TAVMIEIGTN LLNQTAEQTR KLTDVEAQLV NQTTRLELQL LEHSLSTNKL EKQILDQTSE
- [0020] INKLQDKNSF LEKKVLAMED KHI IQLQSIK EEKDLQVLV SKQNSIIEEL EKKIVTATVN
- [0021] NSVLQKQHD LMETVNNLLT MMSTNSAKD PTVAKEEQIS FRDCAEVFKS GHTTNGIYTL
- [0022] TFPNSTEEIK AYCDMEAGGG GWTIIQRRED GSVDFQRTWK EYKVGFGNPS GEYWLGNFV
- [0023] SQLTNQQRVY LKIHLKDWEG NEAYSLEYHF YLSSEELNYR IHLKGLTGTA GKISSISQPG
- [0024] NDFSTKGDGN DKCICKCSQM LTGGWFFDAC GPSNLNGMY Y PQRQNTN~~K~~FN GIKWYYWKGS
- [0025] GYSLKATTMM IRPADF
- [0026] 예컨대, 상기 항 Ang-2 항체는 루프 3에 위치하는 Y460 및 K468로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기, 또는 서열번호 27 내의 Y460, K468, 또는 이들 모두를 포함하는 인접하는 2개 내지 20개, 2개 내지 15개, 2개 내지 10개, 또는 2개 내지 5개의 아미노산을 포함하는 아미노산 서열 부위를 에피토프로 인식 및/또는 여기에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다.
- [0027] 상기 에피토프 부위는 Ang-2의 3차원 구조의 루프 3에 위치하는 노출된 아미노산 잔기 또는 상기 아미노산 잔기를 포함하는 아미노산 서열 부위로서, Tie-2와의 결합에 직접 참여하거나, Tie-2와의 결합 부위에 포함되거나 인접하여 위치한다 (도 2 참조). 따라서, 상기 에피토프들 중 하나 이상을 인식하고 결합하는 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Ang-2와의 결합에 있어서 Tie-2와 경쟁하게 되므로, Ang-2와 Tie-2의 결합을 저해

하게 된다.

- [0028] 상기 "인접하는 아미노산 서열 부위"는 단백질의 1차 구조 상에서 인접하거나, 또는 1차 구조상에서 인접하지 않더라도 2차 또는 3차 구조 상에서 인접하는 아미노산 서열 부위를 의미한다.
- [0029] 또한, 상기 에피토프 부위를 인식 및/또는 특이적으로 결합하는 항 Ang-2 항체뿐 아니라, 상기 항 Ang-2 항체와 경쟁적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 역시 Ang-2와의 결합에 있어서 Tie-2와 경쟁 가능하므로, Ang-2와 Tie-2의 결합을 저해할 수 있다. 이와 같이 경쟁적으로 결합하는 항체는 앞서 기술한 에피토프와 3차원 구조상의 인접한 부위를 에피토프로 인식하는 항체일 수 있다. 상기 경쟁적으로 결합하는 항체는 Ang-2와의 결합 친화도가 10 nM 이하, 예컨대 1 pM 내지 10 nM, 10 pM 내지 10 nM, 또는 100 pM 내지 10 nM 인 것일 수 있다.
- [0030] 따라서, 본 발명의 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 앞서 설명한 에피토프를 인식 및/또는 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편, 및 이와 경쟁적으로 Ang-2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0031] 구체예에서, 상기 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄(Heavy chain)의 상보성 결정 부위(complementarity determining region, CDR)로서,
- [0032] 서열번호 1 내지 서열번호 4로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-H1),
- [0033] 서열번호 5 내지 서열번호 8로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-H2), 및
- [0034] 서열번호 9 내지 서열번호 12로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-H3)
- [0035] 로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0036] 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 경쇄(Light chain)의 상보성 결정 부위로서,
- [0037] 서열번호 13 내지 서열번호 16으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L1),
- [0038] 일반식 1(서열번호 25)의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L2), 및
- [0039] 일반식 2(서열번호 26)의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L3)
- [0040] 로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다:
- [0041] [일반식 1]
- [0042]  $X_1-X_2-S-X_3-X_4-X_5-X_6$  (서열번호 25)
- [0043] 상기 서열번호 25에서,
- [0044]  $X_1$ 는 아르기닌(R) 또는 타이로신(Y)이고,
- [0045]  $X_2$ 은 알라닌(A) 또는 트레오닌(T) (예컨대, 알라닌(A))이며,
- [0046]  $X_3$ 은 아스파라진(N), 아르기닌(R), 또는 세린(S) (예컨대, 아스파라진(N))이고,
- [0047]  $X_4$ 는 류신(L) 또는 아르기닌(R)이며,
- [0048]  $X_5$ 은 아스파르트산(D), 히스티딘(H), 또는 타이로신(Y) (예컨대, 아스파르트산(D), 또는 타이로신(Y))이고,
- [0049]  $X_6$ 는 세린(S) 또는 프롤린(P)이며;
- [0050] [일반식 2]
- [0051]  $Q-Q-X_7-X_8-X_9-X_{10}-P-X_{11}-T$  (서열번호 26)
- [0052] 상기 서열번호 26에서,
- [0053]  $X_7$ 는 세린(S), 글라이신(G), 아스파르트산(D), 또는 타이로신(Y) (예컨대, 세린(S) 또는 아스파르트산(D))이고,

- [0054] X<sub>8</sub>은 아스파라진(N), 타이로신(Y), 또는 세린(S) (예컨대, 아스파라진(N) 또는 타이로신(Y))이며,
- [0055] X<sub>9</sub>은 글루탐산(E), 트레오닌(T), 또는 라이신(K) (예컨대, 글루탐산(E) 또는 트레오닌(T))이고,
- [0056] X<sub>10</sub>은 아스파르트산(D), 세린(S), 또는 류신(L) (예컨대, 아스파르트산(D) 또는 세린(S))이며,
- [0057] X<sub>11</sub>은 류신(L), 트립토판(W), 또는 타이로신(Y) (예컨대, 류신(L) 또는 트립토판(W))이다.
- [0058] 구체예에서, 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기한 중쇄 상보성 결정 부위, 경쇄 상보성 결정 부위, 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다.
- [0059] 구체적으로, 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0060] 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-H1), 서열번호 5 또는 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-H2), 및 서열번호 9 또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 (CDR-H3)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 상보성 결정 부위, 또는 상기 하나 이상의 중쇄 상보성 결정 부위를 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0061] 서열번호 13 또는 서열번호 14의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L1), 서열번호 25의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L2), 및 서열번호 26의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L3)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 상보성 결정 부위, 또는 상기 하나 이상의 경쇄 상보성 결정 부위를 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0062] 상기 중쇄 상보성 결정 부위와 경쇄 상보성 결정 부위의 조합; 또는
- [0063] 상기 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역의 조합
- [0064] 을 포함하는 것일 수 있다.
- [0065] 보다 구체적으로, 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0066] 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-H1), 서열번호 5 또는 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-H2), 및 서열번호 9 또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 (CDR-H3)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 상보성 결정 부위, 또는 상기 하나 이상의 중쇄 상보성 결정 부위를 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0067] 서열번호 13 또는 서열번호 14의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L1), 서열번호 17 또는 서열번호 18의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L2), 및 서열번호 21 또는 서열번호 22의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L3)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 상보성 결정 부위, 또는 상기 하나 이상의 경쇄 상보성 결정 부위를 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0068] 상기 중쇄 상보성 결정 부위와 경쇄 상보성 결정 부위의 조합; 또는
- [0069] 상기 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역의 조합
- [0070] 을 포함하는 것일 수 있다.
- [0071] 일 구체예에서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 28 또는 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 36 또는 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0072] 일 예에서, 상기 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 서열번호 14, 서열번호 18, 및 서열번호 22로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로만 이루어진 것이 아니거나, 서열번호 37의 아미노산 서열로만 이루어진 것이 아닐 수 있다.
- [0073] 다른 예에서, 상기 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,
- [0074] 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-H1), 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 (CDR-H2), 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 (CDR-H3)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 상보성 결정 부위, 또는 상기 하나 이상의 중쇄 상보성 결정 부위를 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0075] 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L1), 서열번호 19의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 (CDR-L2), 및 서열번호 23의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L3)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상



의 경쇄 상보성 결정 부위, 또는 상기 하나 이상의 경쇄 상보성 결정 부위를 포함하는 경쇄 가변 영역;

- [0076] 상기 중쇄 상보성 결정 부위와 경쇄 상보성 결정 부위의 조합; 또는
- [0077] 상기 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역의 조합
- [0078] 을 포함하는 것일 수 있다.
- [0079] 일 구체예에서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0080] 다른 예에서, 상기 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,
- [0081] 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-H1), 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-H2), 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-H3)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 상보성 결정 부위, 또는 상기 하나 이상의 중쇄 상보성 결정 부위를 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0082] 서열번호 16의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L1), 서열번호 20의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L2), 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L3)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 상보성 결정 부위, 또는 상기 하나 이상의 경쇄 상보성 결정 부위를 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0083] 상기 중쇄 상보성 결정 부위와 경쇄 상보성 결정 부위의 조합; 또는
- [0084] 상기 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역의 조합
- [0085] 을 포함하는 것일 수 있다.
- [0086] 일 구체예에서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0087] 구체적으로, 항 Ang-2 항체의 중쇄 CDR은 예컨대 다음의 표 1의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

**표 1**

[0088]

중쇄 아미노산 서열		
CDRH1-KABAT	CDRH2-KABAT	CDRH3-KABAT
SYWLE (서열번호1)	EILPGSGSTNYNEKFRG (서열번호5)	GNHNSYYYAMDY (서열번호9)
DYYMK (서열번호2)	EINPKNGDTFYNQIFKG (서열번호6)	ENDYDVGFFDY (서열번호10)
NYGMN (서열번호3)	WINTYTGEPTYADDFKG (서열번호7)	DHDGYLMDY (서열번호11)
DPYIH (서열번호4)	RIDPANGNTKYDPKFKQG (서열번호8)	RWDGGGFDY (서열번호12)

[0089] 또한 항 Ang-2 항체의 경쇄 CDR은 예컨대 다음의 표 2의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

**표 2**

[0090]

경쇄 아미노산 서열		
CDRL1-KABAT	CDRL2-KABAT	CDRL3-KABAT
RASESVDSYGNSFMH (서열번호13)	RASNLDS (서열번호17)	QQSNEDPLT (서열번호21)
KASQSVSNDA (서열번호14)	YASNRYP (서열번호18)	QQDYTSPWT (서열번호22)
STSQGISNYLN (서열번호15)	YTSSLHS (서열번호19)	QQYSKLPYT (서열번호23)
RASQDISNYLN (서열번호16)	YTSRLHS (서열번호20)	QQGNTLPWT (서열번호24)

[0091] 원하는 항원을 피면역 동물에게 면역시켜 생산하는 동물 유래 항체는 일반적으로 치료 목적으로 인간에 투여 시

면역거부반응이 일어날 수 있으며, 이러한 면역거부반응을 억제하고자 키메라 항체(chimeric antibody)가 개발되었다. 키메라 항체는 유전공학적 방법을 이용하여 항-아이소타입(anti-isotype) 반응의 원인이 되는 동물 유래 항체의 불변 영역을 인간 항체의 불변 영역으로 치환한 것이다. 키메라 항체는 동물 유래 항체에 비하여 항-아이소타입 반응에 있어서 상당 부분 개선되었으나, 여전히 동물 유래 아미노산들이 가변 영역에 존재하고 있어 잠재적인 항-이디오타입(anti-idiotypic) 반응에 대한 부작용을 내포하고 있다. 이러한 부작용을 개선하고자 개발된 것이 인간화 항체(humanized antibody)이다. 이는 키메라 항체의 가변 영역 중 항원의 결합에 중요한 역할을 하는 CDR(complementarity determining regions) 부위를 인간 항체 골격(framework)에 이식하여 제작된다.

- [0092] 인간화 항체를 제작하기 위한 CDR 이식(grafting) 기술에 있어서 가장 중요한 것은 동물 유래 항체의 CDR 부위를 가장 잘 받아들일 수 있는 최적화된 인간 항체를 선정하는 것이며, 이를 위하여 항체 데이터베이스의 활용, 결정구조(crystal structure)의 분석, 분자모델링 기술 등이 활용된다. 그러나, 최적화된 인간 항체 골격에 동물 유래 항체의 CDR 부위를 이식할지라도 동물 유래 항체의 골격에 위치하면서 항원 결합에 영향을 미치는 아미노산이 존재하는 경우가 있기 때문에, 항원 결합력이 보존되지 못하는 경우가 상당수 존재하므로, 항원 결합력을 복원하기 위한 추가적인 항체 공학 기술의 적용은 필수적이라고 할 수 있다.
- [0093] 일 구체예에 따르면, 상기 항체는 마우스 유래 항체, 마우스-인간 키메라 항체 또는 인간화 항체일 수 있다.
- [0094] 완전한 항체는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합으로 연결되어 있다. 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나뉘어지며, 중쇄 불변 영역은 감마( $\gamma$ ), 뮤( $\mu$ ), 알파( $\alpha$ ), 델타( $\delta$ ) 및 엡실론( $\epsilon$ ) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1( $\gamma 1$ ), 감마2( $\gamma 2$ ), 감마3( $\gamma 3$ ), 감마4( $\gamma 4$ ), 알파1( $\alpha 1$ ) 및 알파2( $\alpha 2$ )를 가진다. 경쇄의 불변 영역은 카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ ) 타입을 가진다.
- [0095] 용어, "중쇄(heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인  $V_H$  및 3개의 불변 영역 도메인  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  및  $C_{H3}$ 과 힌지(hinge)를 포함하는 전장 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다. 또한, 용어 "경쇄(light chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인  $V_L$  및 불변 영역 도메인  $C_L$ 을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.
- [0096] 용어, "CDR(complementarity determining region)"은 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역(hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다. 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR을 포함할 수 있다(CDRH1, CDRH2, CDRH3 및 CDRL1, CDRL2, CDRL3). 상기 CDR은 항체가 항원 또는 에피토프에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공할 수 있다. 한편, 본 명세서에 있어서, 용어, "특이적으로 결합" 또는 "특이적으로 인식"은 당업자에게 통상적으로 공지되어 있는 의미와 동일한 것으로서, 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 면역학적 반응을 하는 것을 의미한다.
- [0097] 일 구체예에 따르면, 상기 항체는 scFv, (scFv)<sub>2</sub>, Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub>로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원 결합 단편일 수 있다.
- [0098] 용어, "항원 결합 단편"은 면역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩타이드의 일부를 의미한다. 예를 들어, scFv, (scFv)<sub>2</sub>, Fab, Fab' 또는 F(ab')<sub>2</sub>일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 항원 결합 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역( $C_{H1}$ )을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다.
- [0099] Fab'는 중쇄  $C_{H1}$  도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다.
- [0100] F(ab')<sub>2</sub> 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다.
- [0101] 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되

거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다.

- [0102] 상기 항원 결합 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.
- [0103] 용어 "힌지 영역(hinge region)"은 항체의 중쇄에 포함되어 있는 영역으로서, CH1 및 CH2 영역 사이에 존재하며, 항체 내 항원 결합 부위의 유연성(flexibility)를 제공하는 기능을 하는 영역을 의미한다.
- [0104] 동물 유래 항체가 키메라화(chimerization) 과정을 거치게 되면, 동물 유래의 IgG1 힌지는 인간 IgG1 힌지로 치환되지만, 동물 유래 IgG1 힌지는 인간 IgG1 힌지에 비하여 그 길이가 짧고, 두 개의 중쇄 사이의 이황화결합(disulfide bond)이 3개에서 2개로 감소하여 힌지의 경직성(rigidity)이 서로 상이한 효과를 보이게 된다. 따라서, 힌지 영역의 변형(modification)은 인간화 항체의 항원 결합 효율성을 증가시킬 수 있다. 상기 힌지 영역의 아미노산 서열을 변형시키기 위한 아미노산의 결실, 부가 또는 치환 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0105] 항 Ang-2 항체는 단클론 항체일 수 있다. 단클론 항체는 당 업계에 널리 알려진 방법대로 제조될 수 있다. 예컨대, phage display 기법을 이용해서 제조될 수 있다. 또는, 항 Ang-2 항체는 이용해서 Schwaber 등의 논문에서 기재된 방법에 의하여 마우스 유래의 단클론 항체로 제조될 수 있다(Schwaber, J and Cohen, E. P., "Human x Mouse Somatic Cell Hybrid Clones Secreting Immunoglobulins of Both Parental Types," Nature, 244 (1973), 444-447).
- [0106] 한편, 전형적인 ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 포맷을 이용하여 Ang-2와의 결합능에 기초하여 개별 단클론항체들을 스크리닝할 수 있다. 결합체들에 대해 분자적 상호작용을 검증하기 위한 경쟁적 ELISA(Competitive ELISA)와 같은 기능성 분석 또는 세포-기반 분석(cell-based assay)과 같은 기능성 분석을 통해 저해 활성에 대해 검증할 수 있다. 그런 다음 강한 저해 활성에 기초하여 선택된 단클론항체 멤버들에 대해 Ang-2에 대한 각각의 친화도(Kd values)를 검증한다.
- [0107] 최종 선택된 항체들은 항원결합부를 제외한 나머지 부분이 인간의 면역글로블린 항체화된 항체뿐만 아니라, 인간화 항체로서 제조하여 사용할 수 있다. 인간화 항체의 제조방법은 당 업계에 잘 알려져 있다 (Almagro, J. C. and Fransson, J., "Humanization of antibodies," Frontiers in Bioscience, 13(2008), 1619-1633).
- [0108] 다른 예는 상기 항체를 생산하는 하이브리도마를 제공한다. 구체예에 있어서, 상기 하이브리도마는 기탁번호 KCLRF-BP-00305, KCLRF-BP-00306, KCLRF-BP-00307, 또는 KCLRF-BP-00308인 것일 수 있다.
- [0109] 또 다른 예는 상기 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 저해용 약학 조성물을 제공한다. 또 다른 예는 상기 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0110] 또 다른 예에서, 상기 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 치료적 유효량을 혈관신생 저해를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 혈관신생 저해 방법이 제공된다. 상기 혈관신생 저해 방법은 상기 투여 단계 이전에 혈관신생 저해를 필요로 하는 환자를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 상기 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 치료적 유효량을 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 예방 및/또는 치료 방법이 제공된다. 상기 예방 및/또는 치료 방법은 상기 투여 단계 이전에 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0111] 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 담체는 약물의 제제화에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학 조성물은 또한 약학 조성물 제조에 통상적으로 사용되는 희석제, 부형제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [0112] 상기 약학 조성물, 또는 상기 항체 또는 이의 항원결합단편의 유효량은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐

내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0113] 상기 약학 조성물 내의 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 함유량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 간격, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 예컨대, 상기 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 1일 투여량은 0.001 내지 1000mg/kg, 구체적으로 0.01 내지 100mg/kg, 보다 구체적으로 0.1 내지 50 mg/kg, 더욱 구체적으로 0.1 내지 20 mg/kg 범위일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 1일 투여량은 단위 용량 형태로 하나의 제제로 제제화되거나, 적절하게 분량하여 제제화되거나, 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 상기 약학 조성물은 다른 혈관신생 저해제 또는 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 치료제와 같은 다른 약물과 병용 투여 가능하며, 그 투여량, 투여 방법 및 다른 약물의 종류는 환자의 상태에 따라서 적절하게 처방될 수 있다.

[0114] 상기 약학적 조성물은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 액스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 등의 형태로 제형화될 수 있으며, 제형화를 위하여 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0115] 특히, 상기 항 Ang-2 항체 또는 그 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성물은 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하므로, 면역 리포솜으로 제형화될 수 있다. 항체를 포함하는 리포솜은 당업계에서 널리 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 면역 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 폴리에틸렌글리콜-유도체화된 포스파티딜에탄올아민을 포함하는 지질 조성물로서 역상 증발법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fab' 단편은 디설파이드-교체 반응을 통해 리포솜에 접합될 수 있다.

[0116] 한편, 상기 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 엔지오포이에틴-2에 특이적으로 결합하므로, 이를 이용하여 엔지오포이에틴-2의 활성화 및/또는 과생성 여부를 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명의 또 다른 예는 상기 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성 및/또는 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 진단용 약학 조성물을 제공한다. 또 다른 예에서, 환자로부터 얻어진 생물 시료에 상기 항 Ang-2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 처리하는 단계; 항원-항체 반응 여부를 확인하는 단계; 및 항원-항체 반응이 탐지되는 경우 상기 환자를 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성 증상이 존재하거나, 엔지오포이에틴-2의 활성화 및/또는 과생성 관련 질병을 갖는 것으로 판단하는 단계를 포함하는, 진단 방법 또는 진단에 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 상기 생물 시료는 환자로부터 얻어진 세포, 조직, 체액 등으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[0117] 상기 항원-항체 반응 여부를 확인하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 수행할 수 있다. 예컨대, 통상적인 효소 반응, 형광, 발광 및/또는 방사선 검출을 통하여 하여 측정될 수 있으며, 구체적으로, 면역크로마토그래피(Immunochromatography), 면역조직화학염색(Immunohistochemistry), 효소결합 면역흡착 분석(enzyme linked immunosorbent assay: ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay: RIA), 효소 면역분석(enzyme immunoassay: EIA), 형광면역분석(Floresence immunoassay: FIA), 발광면역분석(luminescence immunoassay: LIA), 웨스턴블라팅(Western blotting) 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의하여 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0118] 상기 약학 조성물의 투여 또는 진단 대상 환자는 인간, 원숭이 등을 포함하는 영장류, 마우스, 래트 등을 포함하는 설치류 등을 포함하는 포유류일 수 있다.

[0119] 상기 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병은 암; 암전이; 미숙아 망막병증, 황반변성 (예컨대, 연령 관련 황반변성), 당뇨병성 망막병증, 혈관신생성녹내장 등의 안질환; 천식; 류마티스성 관절염; 건선; 폐렴, 만성 염증 등의 염증성 질환; 고혈압, 동맥경화 등의 심혈관질환 또는 폐혈증 등일 수 있다. 상기 암은 엔지오포이에틴-2를 과발현하는 것일 수 있고, 고형암 또는 혈액암일 수 있으며, 이에 제한되지 않지만, 편평상피세포암, 소세포암, 비소세포암, 폐의 선암, 폐의 편평상피암, 복막암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 간세포암, 위장암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁암, 침샘암, 신장암, 간암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 간암, 두경부암, 뇌암, 골육종 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 암은 원발성 암 또는 전이성 암일 수 있다.

- [0120] 또 다른 예에서, 상기한 에피토프를 이용하여 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 진단, 예방 및/또는 치료를 위한 후보 물질을 스크리닝하는 방법이 제공된다. 상기 스크리닝 방법은,
- [0121] (a) 상술한 엔지오포이에틴-2의 3차 구조의 에피토프에 시료를 접촉시키는 단계; 및
- [0122] (b) 상기 에피토프와 시료와의 결합력을 측정하는 단계
- [0123] 를 포함할 수 있다. 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 에피토프와 시료가 10nM 이하, 예컨대, 1 pM 내지 10 nM 범위, 또는 10 pM 내지 10 nM, 또는 100 pM 내지 10 nM 범위의 결합력을 보이는 경우에는, 상기 시료를 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 진단, 예방, 및/또는 치료를 위한 후보 물질로 판단할 수 있다.
- [0124] 상기 에피토프는 인간 Ang-2 (hAng-2; 서열번호 27; Accession # O15123) 의 루프 3(서열번호 27 중 460번째 아미노산부터 468번째 아미노산까지의 부위) 의 전부, 일부(예컨대, 루프 3 중 외부에 노출된 아미노산 잔기 부위로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상), 또는 서열번호 27 중에서 루프 3의 외부에 노출된 아미노산 잔기를 하나 이상 포함하는 인접하는 2개 내지 20개, 2개 내지 15개, 또는 2개 내지 10개의 아미노산을 포함하는 아미노산 서열 부위 일 수 있으며, 예컨대, 인간 Ang-2의 루프 3에 위치하는 Y460, K468, 및 서열번호 27 내의 Y460, K468, 또는 이들 모두를 포함하는 인접하는 2개 내지 20개, 2개 내지 15개, 2개 내지 10개, 또는 2개 내지 5개의 아미노산을 포함하는 아미노산 서열 부위로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0125] 상기 시료는 인공적으로 합성되거나 천연의 각종 화합물, 폴리펩타이드, 올리고펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, shRNA(short hairpin RNA), siRNA(small interference RNA), 압타머, 천연물 추출물 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0126] 상기 에피토프와 시료와의 결합력을 측정하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, 상기 결합력은 Biacore 장치를 사용하여 측정할 수 있다. 일반적으로, 치료용 약품으로서 상기 결합력이 인정되는 범위는 결합 상수인  $K_D$  값이 10 nM 이하로 정의될 수 있다. 즉, 예를 들어, 상술한 엔지오포이에틴-2의 에피토프와 분석하고자 하는 시료(예를 들어, 항체)의 결합력은 Biacore 장치와 같은 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance) 방법으로 측정하였을 때, 1 pM 내지 10 nM, 또는 10 pM 내지 10 nM, 또는 100 pM 내지 10 nM인 경우, 상기 시료(예를 들어, 항체)를 엔지오포이에틴-2 활성화 및/또는 과생성과 관련된 질병의 진단, 예방 및/또는 치료용 후보 물질로 판단할 수 있다.
- [0127] 다른 예에서, 앞서 설명한 항 Ang-2 항체의 중쇄 상보성 결정 부위, 경쇄 상보성 결정 부위, 또는 이들의 조합; 또는 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역, 또는 이들의 조합을 포함하는 폴리펩타이드 분자가 제공된다. 상기 폴리펩타이드 분자는 항 Ang-2 항체의 전구체로서 항체 제작에 사용될 수 있을 뿐 아니라 항체와 유사한 구조를 갖는 단백질 골격체 (protein scaffold; 예컨대, 펩티바디, 나노바디 등), 이중 특이 항체, 다중 특이 항체 등의 다양한 Ang-2 길항제의 구성 성분으로 포함될 수 있다.
- [0128] 상기 폴리펩타이드 분자는 서열번호 1 내지 서열번호 4로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드, 서열번호 5 내지 8로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드, 및 서열번호 9 내지 12로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상; 서열번호 13 내지 서열번호 16으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드, 일반식 1 (서열번호 25)의 아미노산 서열 (예컨대, 서열번호 17 내지 서열번호 20으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열)을 갖는 폴리펩타이드, 및 일반식 2 (서열번호 26)의 아미노산 서열 (예컨대, 서열번호 21 내지 서열번호 24로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열)을 갖는 폴리펩타이드로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상; 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다. 구체예에서, 상기 폴리펩타이드 분자는 서열번호 28 내지 서열번호 31로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열; 서열번호 36 내지 서열번호 39로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열; 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다.
- [0129] 일 예에서, 상기 폴리펩타이드 분자는 서열번호 서열번호 14, 서열번호 18, 및 서열번호 22로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로만 이루어진 것이 아니거나, 서열번호 37의 아미노산 서열로만 이루어진 것이 아닐 수 있다.
- [0130] 상기 이중 특이 항체 또는 다중 특이 항체는, 서로 다른 2종 또는 그 이상의 항원에 대한 각각의 항원 결합 부위를 포함하여, 2종 또는 그 이상의 항원을 동시에 인식하는 항체로서, 상기 항원 결합 부위 중 하나는 앞서 설명한 폴리펩타이드 분자를 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, Ang-2 항원 결합 부위 역할을 하는 상기 폴리

펩타이드 분자는 다른 항원에 대한 항원 결합 부위와 이합체 또는 다합체를 형성하여 이중 특이 항체 또는 다중 특이 항체를 구성할 수 있다. 따라서, 일 구체에서, Ang-2 항원 결합 부위로서 상기 폴리펩타이드 분자를 포함하는 이중 특이 항체 또는 다중 특이 항체가 제공된다.

[0131] 또 다른 예에서, 앞서 설명한 폴리펩타이드 분자 하나 이상 또는 상기 폴리펩타이드 분자가 링커에 의하여 반복하여 연결된 반복체 (이하, '제1 펩타이드')와 구조적 기능을 하는 폴리펩타이드 (이하, '제2 펩타이드'; 예컨대, 항체의 중쇄 불변부위 또는 경쇄의 불변부위, 또는 항체의 Fc 단편)를 포함하는 펩타이드 복합체를 하나 이상 (예컨대 1 내지 5개, 구체적으로 2 내지 4개) 포함하고, 상기 하나 이상의 펩타이드 복합체가 제2 펩타이드 (예컨대 Fc 단편) 부위에서 결합되어 다합체 구조를 갖는 단백질 골격체가 제공된다.

[0132] 또 다른 예에서, 상기 폴리펩타이드 분자를 암호화 하는 폴리뉴클레오타이드 분자 또는 상기 폴리펩타이드 분자를 포함하는 재조합 벡터가 제공된다. 구체적으로 상기 폴리뉴클레오타이드 분자는 서열번호 28 내지 서열번호 31로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 암호화 하는 염기서열, 또는 서열번호 36 내지 서열번호 39로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 암호화 하는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다. 예컨대, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 32 내지 서열번호 35로 이루어진 군에서 선택된 염기서열을 포함하거나, 서열번호 40 내지 서열번호 43으로 이루어진 군에서 선택된 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0133] 용어 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다. 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λgt4 λB, λ-Charon, λ Δz1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

[0134] 상기 재조합 벡터에서 상기 단백질 복합체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다. 용어 "작동 가능하게 연결된(operatively linked)"은 뉴클레오타이드 발현 조절 서열(예를 들어, 프로모터 서열)과 다른 뉴클레오타이드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 상기 조절 서열은 "작동 가능하게 연결(operatively linked)"됨으로써 다른 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다.

[0135] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.

[0136] 상기 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들어, pL<sup>A</sup> 프로모터, CMV 프로모터, *trp* 프로모터, *lac* 프로모터, *tac* 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 계놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 *tk* 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0137] 다른 예는 상기 재조합 벡터를 포함하는 재조합 세포를 제공한다.

[0138] 상기 재조합 세포는 상기 재조합 벡터를 적절한 숙주 세포에 도입시킴으로써 얻어진 것일 수 있다. 상기 숙주 세포는 상기 재조합 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 세포로서 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 원핵 세포로는, 예를 들어, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 슈린젠시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내 균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO(Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK 세포주 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0139] 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 이를 포함하는 재조합 벡터의 숙주 세포 내로의 운반(도입)은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl<sub>2</sub> 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포솜-매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.

[0140] 상기 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.

**발명의 효과**

[0141] 본 발명은 암조직내 신생혈관형성 및 성장에 관여하는 인자들 중 최근 그 분자적 기전이 밝혀지면서 새롭게 각광받고 있는 Ang-2에 대한 표적 치료용 항 Ang-2 항체를 제공하는 것으로, 기존의 항체 약물보다 우수한 효과를 지닌 혁신적인 항체 신약 또는 진단제로서 유용하게 개발될 수 있다. 또한 상기 개발된 항 Ang-2 항체는 다중 특이적 항체의 개발 등으로 그 이용 분야를 확대시킬 수 있을 것으로 기대된다.

**도면의 간단한 설명**

[0142] 도 1은 일 실시예에 따른 항 Ang-2 항체의 Ang-2 상의 결합 부위(epitope)를 보여주는 모식도이다.  
 도 2는 일 실시예에 따른 항 Ang-2 항체 처리에 따른 Tie2 인산화 정도를 보여주는 사진이다.  
 도 3은 일 실시예에 따른 항 Ang-2 항체 처리에 따른 혈관내피세포의 이동 정도를 보여주는 그래프이다.  
 도 4는 일 실시예에 따른 항 Ang-2 항체 처리에 따른 혈관내피세포 튜브(tube) 총길이를 보여주는 그래프이다.  
 도 5a 및 5b는 일 실시예에 따른 항 Ang-2 항체 처리에 따른 대장암 크기 변화를 관찰한 그래프로써, 5a는 항체 투여 일수 (x축: day after grouping) 에 따른 종양 크기를 나타낸 그래프이고, 5b는 항체 투여 18일째의 종양 크기를 항체 종류에 따라서 나타낸 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0143] 이하에서는 실시예를 들어 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하고자 하나, 이는 예시적인 것에 불과할 뿐 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다. 아래 기재된 실시예들은 발명의 본질적인 요지를 벗어나지 않는 범위에서 변형될 수 있음은 당 업자들에게 있어 자명하다.

**[0144] 실시예 1. 항 Ang-2 항체의 제조**

[0145] 항 Ang-2 항체는 5주령의 BALB/c 마우스에 인간 Ang-2 단백질 (R&D systems)를 adjuvant와 함께 투여하여 면역반응을 유도한 후 Schwaber 등의 논문에 기재된 공지된 방법에 의해 개별 항체를 생산하는 하이브리도마들을 제조하였다(Schwaber, J and Cohen, E. P., "Human x Mouse Somatic Cell Hybrid Clones Secreting Immunoglobulins of Both Parental Types," Nature, 244 (1973), 444-447).

[0146] 보다 구체적으로, 하이브리도마 세포주의 개발에 필요한 면역화 된 마우스를 얻기 위하여, 5마리의 5주령의 BALB/c 마우스(Japan SLC, Inc.)에 한 마리당 100 ug 의 인간의 Ang-2 단백질(R&D Systems)과 동량의 완전 프로인드 어주번트(Freund's adjuvant)를 혼합하여 4-6 주된 BALB/c 마우스(Japan SLC, Inc.)의 복강 내에 주사하였다. 2주 후에 상기와 동일한 방법으로 항원(먼저 주사한 양의 절반)을 불완전 프로인드 어주번트(incomplete Freund's adjuvant)와 혼합하여 마우스의 복강 내에 주사하였다. 일주일 후 마지막 부스팅(boosting)이 수행되고 3일 후에 상기 마우스의 꼬리에서 채혈하여 혈청을 얻은 뒤 1/1000로 PBS에 희석하여 ELISA로 Ang-2 을 인지하는 항체의 역가가 증가됨을 확인하였다. 상기의 결과로 항체의 양이 충분히 얻어지는 마우스를 선별하여 세포융합과정을 수행하였다.

[0147] 세포융합 실험 3일 전에 50 ug의 PBS에 인간 Ang-2 단백질 (R&D systems) 100 ug을 혼합한 혼합물을 BALB/c 마우스(Japan SLC, Inc.)의 복강 내에 주사하고, 면역화 된 마우스를 마취한 후 몸통의 좌측에 위치한 비장(spleen)을 적출하였다. 적출한 비장을 메쉬로 갈아서 세포를 분리하고, 배양배지(DMEM, Hyclon)와 혼합하여 비

장세포 현탁액을 만들었다. 상기 현탁액을 원심분리하여 세포층을 회수하였다. 상기 얻어진 비장세포  $1 \times 10^8$  개와 골수종세포(Sp2/0)  $1 \times 10^7$  개를 혼합한 다음 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 원심분리된 침전물을 천천히 분산시키고, 배양배지(DMEM)에 들어있는 45 % 폴리에틸렌 글리콜(PEG 1500) 1 ml을 처리하고, 37 °C에서 1분 동안 유지시킨 후, 배양배지(DMEM) 1 ml을 첨가하였다. 이후 배양배지(DMEM) 10 ml을 1분 동안 첨가하고, 37°C의 물에서 5분 동안 방치한 후 50 ml로 맞추어 다시 원심분리하였다. 세포 침전물을 분리배지(HAT 배지)에  $1 \sim 2 \times 10^5$  / ml 정도로 재현탁시키고, 96-웰(well) 플레이트에 0.1 ml씩 분주한 후 37°C 이산화탄소 배양기에서 배양하여 하이브리도마 세포군을 제작하였다.

[0148]

[0149]

**실시예 2. 항-Ang-2 항체 생산 클론 선별 및 항체 정제**

[0150]

상기 얻어진 개별 항체 생산 하이브리도마들로부터 전형적인 ELISA 포맷을 이용하여 Ang-2와의 결합능에 기초하여 모 하이브리도마로부터 분화시킨 하이브리도마 중 95개의 항 Ang-2 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 선별하였다.

[0151]

보다 구체적으로, 상기 실시예 1에서 제조된 하이브리도마 세포군 중에서 Ang-2 단백질에만 특이적으로 반응하는 하이브리도마 세포를 선별하기 위하여 인간의 Ang-2 단백질을 항원으로 이용한 ELISA 분석 방법을 통하여 스크리닝하였다.

[0152]

마이크로타이터 플레이트에 인간의 Ang-2 단백질을 한 웰당 각각 100 ng씩 가하여 플레이트 표면에 부착시키고, 반응하지 않은 항원은 세척하여 제거하였다. 상기 실시예 1에서 얻어진 하이브리도마 세포의 배양액을 각각 웰에 50  $\mu$ l씩을 가하여 1 시간 동안 반응시킨 후 인산 완충용액-트윈 20(TBST) 용액으로 충분히 세척하여 반응하지 않은 배양액을 제거하였다. 여기에 염소 항-마우스 IgG-호스래디쉬 퍼옥시다제(goat anti-mouse IgG-HRP)를 가하여 1 시간 동안 실온에서 반응시킨 다음, TBST 용액으로 충분히 세척하였다. 이어서 퍼옥시다제의 기질용액(OPD)을 가하여 반응시키고, 그 반응정도는 엘리자 해독기(ELISA Reader)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 인간의 Ang-2 단백질에만 특이적으로 높은 결합력을 갖는 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주들을 반복하여 선별하였다. 반복 선별을 통해 얻은 하이브리도마 세포주를 제한 희석(limiting dilution)하여 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주 58개의 클론을 최종적으로 얻었다.

[0153]

상기 얻어진 각각의 하이브리도마를 DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium)에서 배양한 후 배양액을 모아 프로테인 G-친화성 크로마토그래피법으로 각각의 하이브리도마에서 생산되는 항 Ang-2 단클론 항체를 정제하였다.

[0154]

먼저 10% (v/v) FBS이 포함된 배양배지(DMEM) 배지 50 ml에서 배양된 상기 하이브리도마 세포를 원심분리하여 세포 침전물을 20 ml PBS로 2회 이상 세척하여 FBS가 제거된 상태에서 배양배지(DMEM) 배지 50 ml을 세포 침전물에 재현탁시킨 후 3일 동안 37°C 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 이후 원심분리를 통해 항체를 생산하는 세포를 제거하고 항체들이 분비된 배양액을 분리하여 4°C에 보관하거나 바로 모아서 50 ml 내지 300 ml의 배양액으로부터 친화성 칼럼(Protein G agarose column; Pharmacia, USA)을 장착한 AKTA 정제 기기(GE Healthcare)를 이용하여 항체를 순수 정제한 후 단백질 응집용 필터(Amicon)를 사용하여 PBS로 상층액을 치환하여 정제된 항체를 보관하고, 이후의 실험에 사용하였다.

[0155]

**실시예 3. Ang-2:Tie-2 결합 억제 시험**

[0156]

상기 실시예 2에서 제작된 Ang-2에 결합하는 항체들이 실제로 Ang-2와 Tie-2의 결합을 억제하는 중화 항체인지 여부를 확인하기 위하여, Ang-2:Tie-2 binding competition ELISA를 수행하였다.

[0157]

보다 구체적으로, 96-웰의 MaxiSorp™ flat-bottom 플레이트 (Nunc)를 4 ug(microgram)/ml의 인간 IgG1의 Fc를 결합시킨 단백질인 hTie2-Fc(R&D Systems)로 코팅하였다. 그런 다음, 0.05%(v/v) Tween-20이 포함된 PBS(Phosphate Buffer Saline)로 상기 플레이트를 5회 씻은 후, 1%(v/v) BSA(Bovine serum albumin; Sigma)가 함유된 PBS로 상온에서 2시간 동안 블로킹시켰다.

[0158]

Ang-2:Tie-2 competition ELISA를 위해, 상기 실시예 2에서 제작된 각각의 항 Ang-2 항체를 400nM ~ 0.001nM의 다양한 농도로 1% (v/v)의 BSA와 400 ng/ml 의 FLAG-Tagging 된 hAng-2과 함께 상기 hTie-2/Fc 용합 단백질이 코팅된 각각의 웰에 넣어 준 후, 플레이트를 상온에서 2시간 반응시킨 후, 상기 플레이트를 PBST로 5회 세척



하였다. HRP 가 Conjugation 된 항-FLAG 항체 (Sigma)를 1% (v/v)의 BSA가 함유된 PBS로 1:5,000 (v/v) 비율로 희석하여 100 ul 의 양으로 각각의 웰에 넣어주고 상온에서 1시간 반응시킨 후, PBST로 5회 씻어 주었다. 마지막으로 상기 플레이트의 각 웰에 100 ul(microliter)의 TMB 기질 (Cell Signaling)을 첨가하여 3분간 발색반응을 유도시켰으며, 이후, Stop 용액 (Cell Signaling) 100 ul를 첨가하여 반응을 중지시키고, OD450 값을 plate 리더(Molecular Devices) 상에서 측정하였다.

[0159] 이를 통해 Ang-2:Tie-2의 결합력에 50% 저해 농도(50% inhibition concentration, IC50)를 구하여, 항-Ang-2 항체가 Ang-2와 Tie-2간의 결합력을 중화(neutralization)시킬 수 있음을 확인하였다. 상기 얻어진 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0160]

항체 명칭	Ang-2:Tie-2 결합에 대한 50% 저해 농도 (IC50, nM)
SAIT-ANG-2-AB-m1A10	1.34
SAIT-ANG-2-AB-m1B6	2.89
SAIT-ANG-2-AB-m3E2	0.55
SAIT-ANG-2-AB-m8D3	0.99

[0161] 실시예 4. 항 Ang-2 항체의 hAng-2, 및 hAng-1와의 결합력 시험

[0162] 항 Ang-2 항원에 대한 정확한 친화도를 측정하기 위하여 BIAcore T100 (GE Healthcare)을 이용한SPR 방식으로 항원 친화도를 측정하였다. SPR 방식은 센서칩에 코팅된 물질의 상태에 따라 칩을 지나는 빛의 굴절률이 변화하는 원리를 이용한 것으로, 칩에 항원 또는 항체가 코팅된 상태에서 항체 또는 항원을 흘리면 이들간 결합으로 인한 굴절률의 변화가 발생하고, 이를 측정한 수치로부터 Kd 값을 계산한다.

[0163] 먼저 pH 5.0 아세트이트 용액과 아민 커플링 키트(amine coupling kit; GE Healthcare)를 이용하여 anti-His 항체를 8,000 RU 레벨까지 CM5 센서칩(GE Healthcare)에 고정화시켰다. 여기에 6 ug/ml 농도의 재조합 hAng-2 (C-His, R&D Systems) 단백질을 흘려 보내 100 ~ 200 RU 레벨로 capture시켰다. 여기에 상기 실시예 2에서 얻어진 항체를 100 nM 농도로부터 순차적으로 2배씩 희석시킨 후, 각각 흘려 보내는 방법으로 센서칩에 capture된 항원과 결합 (on), 분리 (off), 해리 (regeneration, 10 mM NaOH 용액 사용)시키며 항원-항체간 친화도를 측정하였다. hAng1에 대하여 위와 같은 방법으로 실험하였으며, 그 결과는 하기 표 4와 같다.

표 4

[0164]

항체 명칭	hAng-2 (Kd, nM)	hAng1(Kd, nM)
SAIT-ANG-2-AB-m1A10	4.2	No binding
SAIT-ANG-2-AB-m1B6	2.3	No binding
SAIT-ANG-2-AB-m3E2	1.3	No binding
SAIT-ANG-2-AB-m8D3	4.0	No binding

[0165] 상기 4 종의 항체를 발현하는 하이브리도마를 2013년 12월 20일자로 대한민국 서울시 종로구 연건동에 소재하는 한국세포주연구재단에 기탁하여 수탁번호 KCLRF-BP-00305 (SAIT-ANG-2-AB-m3E2), KCLRF-BP-00306 (SAIT-ANG-2-AB-m1A10), KCLRF-BP-00307 (SAIT-ANG-2-AB-m1B6), 및 KCLRF-BP-00308 (SAIT-ANG-2-AB-m8D3)를 각각 부여받았다.

[0166] 실시예 5. 항 Ang-2 항체의 mAng-2와의 결합력 시험

[0167] 상기 실시예 2에서 제작된 항체의 생쥐 Ang-2에 대한 결합력을 측정하기 위한 ELISA를 수행하였다. 96-웰의 MaxiSorp™ flat-bottom 플레이트 (Nunc)를 5~20 ug/ml의 마우스 Ang-2(Mouse Ang-2; Accession # NP\_031452) (R&D Systems)로 코팅하였다. 그런 다음, 0.05%(v/v) Tween-20이 포함된 PBS (PBST)로 플레이트를 5회 씻은 후, 1%(v/v) BSA가 함유된 PBS로 상온에서 2시간 동안 블로킹시켰다. 상기 제작된 각각의 항-Ang-2 항체를 상기 플레이트의 각각의 웰에 넣어 준 후, 플레이트를 상온에서 2시간 반응시켰다.

[0168] 그런 다음, PBST로 5회 씻어준 후, HRP 가 Conjugation 된 anti-mouse IgG 항체 (Santacruz)를 1%(v/v)의 BSA

가 함유된 PBS로 1:1,000 비율(v/v)로 희석하여 상기 플레이트의 각 웰에 50  $\mu$ l씩 넣어주고, 상온에서 1시간 반응시킨 후, PBST로 5회 씻어 주었다. 마지막으로 상기 플레이트의 각 웰에 100  $\mu$ l TMB 기질 (cell signal)을 첨가하여 실온에서 3분 동안 발색반응을 유도시켰으며, 이후 Stop 용액 (cell signal) 100  $\mu$ l로 반응을 중지시키고, OD450 값을 플레이트 리더(Molecular Devices) 상에서 측정하였다. 이를 통하여 마우스 Ang-2 단백질에 대한 50% 결합 농도(Kd)를 구함으로써 anti-Ang-2 항체가 각각의 단백질에 대한 결합력 정도를 측정하였다. 상기 얻어진 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

[0169]

항체 명칭	mAng-2 (Kd, nM)
SAIT-ANG-2-AB-m1A10	No binding
SAIT-ANG-2-AB-m1B6	2.1
SAIT-ANG-2-AB-m3E2	130
SAIT-ANG-2-AB-m8D3	141

[0170]

**실시예 6. Ang-2 항체의 항원인지부위 (epitope) 확인**

[0171]

상기 실시예 2에서 제작된 각각의 항 Ang-2 항체들에 대해 각각의 에피토프를 확인하기 위하여 Flag이 tagging 된 형태의 Ang-2 단백질의 수용체 결합 부위 또는 full-length Ang-2를 인위적으로 돌연변이를 일으킨 재조합 단백질을 이용하여 ELISA를 수행하였다.

[0172]

96-웰의 MaxiSorp™ flat-bottom 플레이트 (Nunc)의 각 웰을 400 nM의 각각의 항체 50  $\mu$ l로 코팅하였다. 그 후, 0.05%(v/v) Tween-20이 포함된 PBS (PBST)로 플레이트를 5회 씻은 후, 1%(v/v) BSA가 함유된 PBS로 상온에서 2시간 동안 블로킹시켰다. Ang-2 단백질(서열번호 27)의 S417, P419, N421, I434, D448, A449, P452, Y460, N467, K468, 또는 F469 잔기를 알라닌으로 치환(mutation)시키고, 상기 플레이트의 각각의 웰에 각각 250ng씩 넣어준 후, 상기 플레이트를 상온에서 2시간 동안 반응시켰다.

[0173]

0.05%(v/v)의 Tween-20이 포함된 PBS로 5회 씻어준 후, HRP가 Conjugation된 항-FLAG 항체 (SIGMA)를 1%(v/v)의 BSA가 함유된 PBS로 1:5,000 (v/v) 비율로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, 0.1%(v/v)의 Tween-20이 함유된 PBS로 5회 씻어 주었다.

[0174]

마지막으로, 상기 플레이트의 각 웰에 100  $\mu$ l의 TMB 기질 (Cell signaling)을 첨가하여 상온에서 3분동안 발색 반응을 유도시켰으며, 이후, 100 $\mu$ l의 Stop 용액 (Cell signaling) 첨가하여 반응을 중지시키고, OD450 값을 플레이트 리더(Molecular Devices) 상에서 측정하였다. Mutation을 시킨 Ang-2와의 결합력을 mutation을 시키지 않은 Ang-2와 비교함으로써 Ang-2 항체들에 대한 각각의 에피토프를 확인하였다. 상기 얻어진 native Ang-2와의 결합력에 대한 Mutant Ang-2와의 결합력(%) 결과를 하기 표 6 및 도 1에 나타내었다:

표 6

[0175]

	Binding (%)											
	Loop1				Loop2				Loop3			Loop4
RBD mutant	S417	Q418	P419	N421	I434	D448	A449	P452	Y460	N467	K468	F469
1A10	99.96	97.2	101.6	89.3	93.2	95.3	95.6	104.7	8.3	79.4	27.3	77.9
Ang2 mutant	-	-	-	-	I434	-	-	-	-	-	K468	F469
8D3					137.3						20.5	41.9

[0176]

(상기 표 중, "RBD mutant"는 Ang2 중에서 수용체 결합부위(Receptor Binding Domain, 276-496 amino acid 서열부위)만을 이용하여 mutant를 제작한 것을 의미함)

[0177]

상기 표 중, 결합이 30% 이하로 저하된 것만 노란색으로 나타내었으며, 1A10 및 8D3는 항체 명칭으로 각각 SAIT-ANG-2-AB-m1A10 및 SAIT-ANG-2-AB-m8D3를 나타낸다.

[0178] 실시예 7. Ang-2 항체의 Ang-2 수용체 활성 저해 시험

[0179] Ang-2는 혈관내피세포에 발현된 Tie-2 수용체와 결합하여 수용체의 인산화를 유도하여 활성화함으로써 혈관내피세포의 변화를 유도하는 작용을 하므로, 세포기반 분석법을 이용한 항 Ang-2 항체의 기능성 분석을 통하여 상기 항체의 Ang-2 저해 활성을 검증하였다.

[0180] 이를 위하여, 60mm culture dish에서, Tie2 수용체가 과발현된 CHO (Chinese hamster ovary) 세포 (Kim et al., *Biochim Biohys Acta.*, 2009) 1X10<sup>6</sup>개를 5%(v/v) FBS (Gibco)가 첨가된 IMDM 배지 (Gibco)를 이용하여 37°C에서 배양 후, 80~90% confluency를 보이면, 무혈청 IMDM 배지로 바꾸어 16시간 37°C에서 배양한다. PBS로 한 번 세척한 뒤, 0.1nM의 sodium orthovanadate 가 혼합된 IMDM 배지로 바꾸어 10분간 더 배양하였다. PBS로 한 번 세척한 뒤, 상기 실시예 2에서 제작된 항 Ang-2 항체를 다양한 농도로 20nM Ang-2 단백질(R&D systems)과 혼합하여 20분간 둔 뒤, 상기 배양된 세포에 처리하고 10분간 더 배양하였다.

[0181] 차가운 PBS를 이용하여 상기 세포를 세척한 뒤, 300ul의 lysis buffer (Roche) 를 처리한 후, 세포를 tube에 모으고, 4°C에서 30분간 용해시킨 후, 13,000 rpm 으로 15분간 원심분리하여 상층액을 정량하였다. 세포용해물 0.5mg 에 2ug의 항 Tie-2 항체 (R&D system)를 넣고 4°C에서 밤새도록(overnight) 반응 시킨 후, protein A bead (GE Healthcare)를 넣어 면역침강(immunoprecipitation)시켰다.

[0182] 상기 얻어진 반응물을 13,000 rpm 으로 15분간 원심분리하여 펠렛을 얻은 후, lysis buffer (Roche)로 2 내지 3회 세척하고, reducing agent가 혼합된 sample buffer (Invitrogen) 를 넣고 95°C에서 5분간 끓인 뒤, NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris gel running하고(Invitrogen), Nitrocellulose membrane (Invitrogen)에 transfer하였다.

[0183] Tie-2 인산화 여부의 확인을 위하여, 위의blot을 3%(v/v) skim milk (Sigma)가 혼합된 PBST로 30분간 blocking한 뒤, HRP-conjugated anti-phospho tyrosine 항체 (Millipore)를 이용하여 확인하였다. Tie-2 확인을 위하여, blot을 stripping buffer (Thermo)에 15분간 반응시킨 뒤, 다시 blocking하여 항 Tie-2 항체 (Santa cruz)를 이용하여 확인하였다. Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) 를 이용하여 band intensity를 측정 후, Ang-2 단독 처리군 대비 anti-Ang-2 항체 처리후 Tie2 인산화의 저해 정도를 %로 나타내었으며, 결과는 하기 표 7 및 도 2에 나타내었다.

표 7

[0184]

항체 명칭 및 처리량(50nM)	Tie2 인산화 저해정도 (%)
SAIT-ANG-2-AB-m1A10	82.01 %
SAIT-ANG-2-AB-m3E2	76.89 %
SAIT-ANG-2-AB-m8D3	76.69 %

[0185] 표 7 및 도 2에 나타난 바와 같이, 항체 처리에 의하여 Tie2의 인산화가 효과적으로 저해됨이 확인되었다.

[0186] 실시예 8. 항 Ang-2 항체의 혈관내피세포 이동 저해 효과

[0187] Ang-2에 의한 혈관내피세포의 이동이 상기 제작된 항 Ang-2 항체에 의하여 저해되는지 여부를 확인하기 위하여, Oris cell migration kit (Platypus technology)을 이용하여 assay를 수행하였다.

[0188] P3-6의 혈관내피세포 (HVUEC, ATCC)를 EGM-2 배지 (Lonza)를 이용하여 sub-confluent하게 배양 후, 2.5X10<sup>4</sup> 개의 혈관내피세포를 계수하여 stopper가 장착된 migration plate의 각 well에 분주 한 뒤, 24시간 동안 배양하였다. confluent하게 자란 세포에서 stopper를 제거하여 cell free zone을 만든 뒤에 PBS로 한번 세척하였다.

[0189] 무혈청 배지에 다양한 농도의 상기 실시예 2에서 제작된 항 Ang-2 항체와 40nM Ang-2 단백질 (R&D systems)을 혼합하여 20분간 반응 시킨 후, 상기 배양된 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 무혈청 배지에 Calcein (BD)을 8 ug/ml의 농도로 혼합하여 50ul씩 각 well에 첨가한 뒤, 30분간 반응하여 세포를 염색하였다. 그 후, plate 뒤에 blocker를 장착하여 InCell analyzer6000 (GE Healthcare)을 이용하여 형광 이미지를 얻은 후,

Migration zone 내의 fluorescence intensity를 정량하여 하기 도 3에서와 같이 Migration index로 나타내었다. 도 3에 나타난 바와 같이, 항체 처리에 의하여 세포 이동이 효과적으로 저해됨이 확인되었다.

[0190]

**실시예 9. 항 Ang-2 항체의 in vitro 혈관 형성 저해 효과**

[0191]

[0192] 상기 제작된 항 Ang-2 항체에 의하여 Ang-2에 의한 혈관내피세포의 tube formation 저해 여부를 확인하기 위하여, HUVEC tube formation assay를 수행하였다.

[0193]

P3~6의 혈관내피세포 (HVUEC, ATCC)를 EGM-2 배지 (Lonza)를 이용하여 sub-confluent하게 배양 후, 무혈청 배지로 바꾸어 6시간 동안 배양한다. 무혈청 배지에 80nM의 Ang-2 단백질 (R&D systems)과 상기 실시예 2에서 제작된 항 Ang-2 항체 200nM을 혼합한 혼합액과,  $8 \times 10^5$  cells/ml 혈관내피세포 현탁액을 1:1의 비율로 혼합하여 Matrigel-coated 96-well plate(BD BioCoat Angiogenesis System-Endothelial Cell Tube Formation)의 각 well에 50ul씩 분주하였다. 18시간 배양 후, 무혈청 배지에 Calcein (BD)을 8 ug/ml의 농도로 혼합하여 50ul씩 각 well에 첨가한 뒤, 30분간 반응하여 세포를 염색하였다. 형광 현미경 (Zeiss)을 이용하여 얻은 이미지에서 형성된 tube의 길이를 측정하여 (AxioVision, Zeiss) 총 길이의 합을 도 4에 타나 내었다.

[0194]

**실시예 10. 항 Ang-2 항체의 Colo205 종양 성장 저해 효과**

[0195]

Ang-2항체의 종양 성장 억제 효과를 확인하기 위하여 인간 대장암 세포주인 Colo205 (ATCC)를 이용한 대장암 Xenograft model이 이용되었다. Colo205 세포주는 10% FBS(Gibco)가 첨가된 RPMI-1640 (Gibco) 배지를 이용하여 배양하였다. 100 ul의 serum-free 배지에  $5 \times 10^5$  Colo205 세포주를 resuspension한 뒤, 1~2% isoflurane을 이용하여 마취된 4~5 주령의 BALB/c nude 생쥐 (Shanghai SLAC Laboratory Animal Co. Ltd.)에 피하주사하였다. 종양의 크기가  $100 \sim 200 \text{mm}^3$ 에 이르면 10mg/kg의 농도로 일주일에 2번씩 상기 실시예 2에서 제작된 항 Ang-2 항체를 복강내 주사한 후, 종양의 크기를 측정한다. 종양의 크기 (V)는 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였으며  $V = (\text{length} \times \text{width}^2) / 2$ , 그 결과를 도 5a (항체 투여 일수에 따른 종양 크기 변화) 및 도 5b (항체 투여 18일째의 항체 종류에 따른 종양 크기 변화)에 나타내었다. 도 5a의 x축은 Days after grouping으로 항체 처리가 이루어진 날을 의미한다.

[0196]

**실시예 11. 항 Ang-2 항체의 유전자 클로닝**

[0197]

상기 얻어진 각각의 항체 생산 하이브리도마( $2 \times 10^6$  세포)로부터 RNeasy mini kit (Qiagen)를 이용하여 전체 RNA를 얻었다. 그런 다음, 이를 주형(template)으로 하여 OneStep RT-PCR kit (Qiagen)과 Mouse Ig-Primer Set (Novagen)를 이용하여 써모사이클러(GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystem)를 사용하여 하기 프로그램을 가동시켜 각 하이브리도마에서 생산되는 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변영역(variable region) 유전자 서열만 증폭시켰다: 94℃에서 5분간; [50℃에서 30분, 95℃에서 15분], [94℃에서 1분, 50℃에서 1분, 72℃에서 2분]x 35 사이클; 72℃에서 6분간; 4℃로 냉각.

[0198]

각 반응으로부터 얻어진 PCR 산물에 대하여 직접 DNA 염기서열분석(Sequencing)을 수행하여, 각 항체의 CDR 서열, 중쇄 가변영역 서열, 및 경쇄가변영역 서열을 확보하였다. 상기 얻어진 각 항체의 CDR 서열, 중쇄 가변영역 서열, 및 경쇄가변영역 서열을 표 8(중쇄 CDR), 표 9(경쇄 CDR), 및 표 10 (중쇄 가변영역 서열 및 경쇄가변영역 서열)에 나타내었다.

**표 8**

[0199]

항체명칭	중쇄 CDR 아미노산 서열		
	CDRH1-KABAT	CDRH2-KABAT	CDRH3-KABAT
SAIT-ANG-2-AB-m1A10	SYWLE (서열번호1)	EILPGSGSTNYNEKFRG (서열번호5)	GNHNSYYIAMDY (서열번호9)
SAIT-ANG-2-AB-m8D3	DYYMK (서열번호2)	EINPKNGDTFYNQIFKG (서열번호6)	ENDYDVGFFDY (서열번호10)

SAIT-ANG-2-AB-m1B6	NYGMN (서열번호3)	WINTYTGEPTYADDFKG (서열번호7)	DHDGYLMDY (서열번호11)
SAIT-ANG-2-AB-m3E2	DPYIH (서열번호4)	RIDPANGNTKYDPKFKQG (서열번호8)	RWDGGGFDY (서열번호12)

표 9

[0200]

항체명칭	경쇄 CDR 아미노산 서열		
	CDRL1-KABAT	CDRL2-KABAT	CDRL3-KABAT
SAIT-ANG-2-AB-m1A10	RASESVDSYGNFSFMH (서열번호13)	RASNLD (서열번호17)	QQSNEDPLT (서열번호21)
SAIT-ANG-2-AB-m8D3	KASQSVSNDVA (서열번호14)	YASNRYP (서열번호18)	QQDYTSPWT (서열번호22)
SAIT-ANG-2-AB-m1B6	STSQGISNYLN (서열번호15)	YTSSLHS (서열번호19)	QQYSKLPYT (서열번호23)
SAIT-ANG-2-AB-m3E2	RASQDISNYLN (서열번호16)	YTSRLHS (서열번호20)	QQGNTLPWT (서열번호24)

표 10

[0201]

	중쇄 가변 영역	경쇄 가변 영역
SAIT-ANG-2-AB-m1A10	<p>QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATDYTFSSYWLEWLI                      QRPGHGLEWIGELPGSGSTNYNEKFRGKATFTEDTSS                      NTAYMQLSSLTSEDSAVVYCARGNHNSYYYAMDYWGQG                      TSVTVSS (서열번호 28)</p> <p>cagggtcagctgcagcagctctggagctgagc                      tgatgaagcctggggcctcagtgaagatatcc                      tgaaggctactgactacacattcagtagctactggct                      agagtggtaatacagaggcctggacatggccttgagt                      ggattggagagattttacctggaagtggtagtactaac                      tacaatgagaagctcaggggcaaggccacattcactga                      agatacatcctccaacacagcctacatgcaactcagca                      gcctgacatctgaggactctgccgtctattactgtgca                      agaggtaacacaactcctattactatgctatggacta                      ctggGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCTCA (서                      열번호 32)</p>	<p>DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNFS                      MHWYQQKPGQPPLLIYRASNLDSGIPARFSGSGSR                      TDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPLTFGAGTKL                      ELK (서열번호 36)</p> <p>gacattgtgctgaccacatctccagcttctctggct                      gtgtctctaggctcagaggccacatctcctgcaga                      gccagtgaaagtgtgatagttatggcaatagttt                      atgactggtagcagcagaaaccaggacagccacc                      aaactcctcatctatcgtgcatccaactagattct                      gggatcctgccaggttcagtgccagtggtctagg                      acagactcaccctcacatatactctgtggaggct                      gatgatgtgcaacctattactgtcagcaagtaaat                      gaggatcctctcacgttcggtgctgggaccaagctg                      gagctgaaa (서열번호 40)</p>
SAIT-ANG-2-AB-m8D3	<p>EVQLQQSGPELVKPGDSVKMSCKASGYTFDYYMKWVR                      QSHGKSLQWVGEINPKNGDTFYNQIFK GKATLTVDKSS                      STAYMQLTSLTSEDSAVVYCTRENDYDVGFFDYWGQGT                      SVTVSS (서열번호 29)</p> <p>Gaggtccagctgcaacagctctggacctgagctggtgaa                      gcctggggattcagtgaaagtgtcctgcaaggcttctg                      gatacaccttcaactgactactacatgaagtgggtgagg                      cagagccatggaaagagccttcagtggttggagaat                      taactctaagaatggtgatctttctacaaccagatat                      tcaaggcaaggccacattgactgtagacaaatcctcc                      agcacagcctacatgcaactcaccagcctgacatctga                      ggactctgcagctctattactgtacagtgagaatgatt                      acgagctgggattctttgactactggGGTCAAGGAACC                      TCAGTCACCGTCTCTCTCA (서열번호 33)</p>	<p>TIVMTQTPKFLLVSA GDRITITCKASQSVSNDVAWY                      QKPGQSPKLLIYYASNRYPGVPDRFTGSGYGTDF                      FTISTVQAEDLAVYFCQQDYTSPWTFGGGTELEIK                      (서열번호 37)</p> <p>ActattgtgatgaccagactcccaattcctgCtt                      gtatcagcaggagacaggttaccataacctgcaag                      gccagtcagagtgtgagtatgatgtagcctggtat                      caacagaagccagggcagctcctaaactgctgata                      tactatgcatccaatcgctaccctggagtcctgat                      cgcttcaactggcagtgatgggacggatttact                      ttaccatcagcactgtgaggctgaagacctggca                      gtttatttctgtcagcaggattatacctctcggtgg                      acgttcggtggaggcaccgagctggaatcaaa                      (서열번호 41)</p>

<p>SAIT-ANG-2-AB-m1B6</p>	<p>QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNVVK QAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAPSLETS STAYLQINNLIKNETATYFCARDHDGYLMDYWGQTSV TVSS (서열번호 30)</p> <p>cagatccagttggtgcagctggacctgagctgaagaa gcctggagagacagctcaagatctcctgcaaggcttctg gataatccttcacaaactatggaatgaactgggtgaag caggctccaggaaagggtttaagtggatggctggat aaacacctacactggagagccaacatagctgatgact tcaaggagcgttttgcttctcttggaaacctctgcc agcactgcctattingcagatcaacaacctcaaaaatga ggacacggctacatattctgtgcaagagatcatgatg gttaccttatggactactggGTCAAGGAACCTCAGTC ACCGTCTCCTCA (서열번호 34)</p>	<p>DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSSTSGQISNYLNWY QQKPDGTVKLLIFYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYS LTI SNLEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGKLEIK (서열번호 38)</p> <p>Gat atccagatgacacagactacatcctcctgtct gcctctctgggagacagagt caccatcagttgtagt acaagt caggcat tagcaat t at t gaactggat cagcagaaccagatggaactgttaaactcctgatc ttttacacatcaagtttacactcaggagtcctca aggttcagtggcagtggtctgggactgattatct ctcaccatcagcaacctggaacctgaagatattgcc acttactatgtcagcagatagtaagcttccgtac acgttcggggggggaccacagctggaaataaaa (서열번호 42)</p>
<p>SAIT-ANG-2-AB-m3E2</p>	<p>EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDPYIHWVK QRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQKATITADTSS NTAYLQLSSLTSEDTAVYYCVRRWDGGGFDYWGQTSV TVSS (서열번호 31)</p> <p>gaggttcagctgcagcagctggggcagagcttgtgaa gccagggcctcagccaagttgtcctgcacagcttctg gcttcaacat taagaccctat at acactgggtgaaa cagaggcctgaacaggcctggagtgat tggaggat tgatcctgcgaatggtaat actaaat at gaccgaagt tcagggcaaggcact at aacggcagacacat cctcc aacacagcctacctccagctcagcagcctgacatctga ggacactgccgtct at tactgtgt tagaaggtgggacg gggggggctttgactactggGTCAAGGAACCTCAGTC ACCGTCTCCTCA (서열번호 35)</p>	<p>DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWY QQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYS LTI TNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGKLEIK (서열번호 39)</p> <p>gat atccagatgacacagactacatcctcctgtct gcctctctgggagacagagt caccatcagttgcagg gcaagtcaggacat tagcaat t at t aaactggat cagcagaaccagatggaactgttaaactcctgatc tactacacatcaagat tacactcaggagtcctca aggttcagtggcagtggtctggaacagattatct ctcaccat t accaacctggagcaagaagatattgcc acttacttttgccaacagggtaat acgcttccgtgg acgttcggtggaggcaccacagctggaaataaaa (서열번호 43)</p>

수탁번호

[0202]

기탁기관명 : 한국세포주연구재단

수탁번호 : KCLRFBP00305

수탁일자 : 20131220

기탁기관명 : 한국세포주연구재단

수탁번호 : KCLRFBP00306

수탁일자 : 20131220

기탁기관명 : 한국세포주연구재단

수탁번호 : KCLRFBP00307

수탁일자 : 20131220

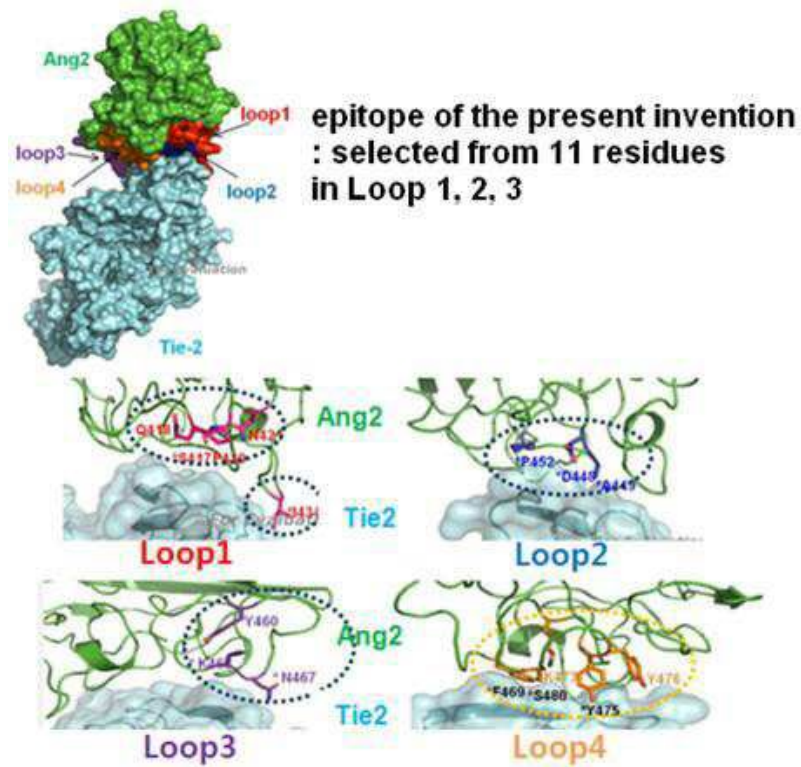
기탁기관명 : 한국세포주연구재단

수탁번호 : KCLRFBP00308

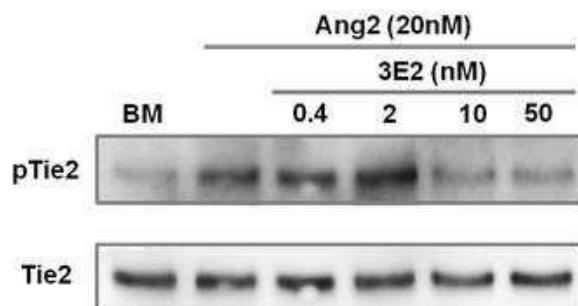
수탁일자 : 20131220

도면

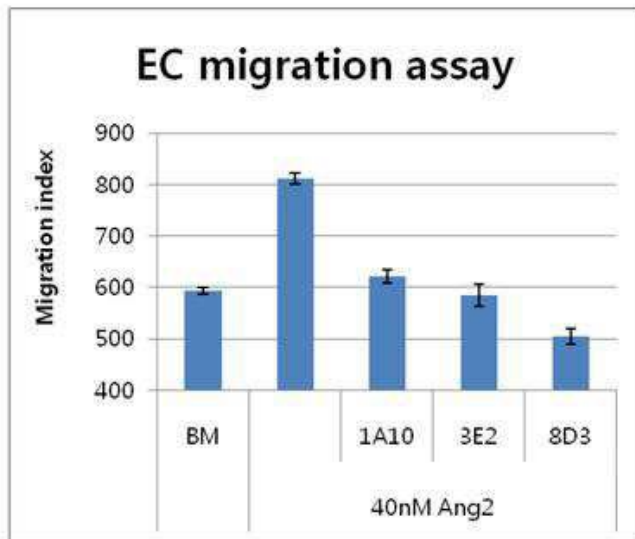
도면1



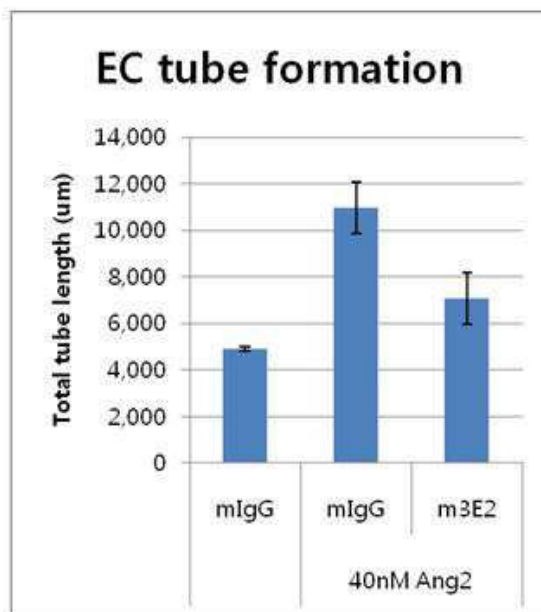
도면2



도면3

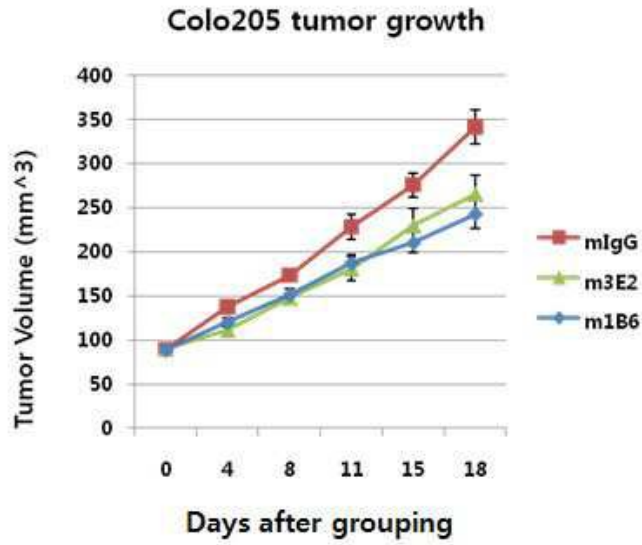


도면4

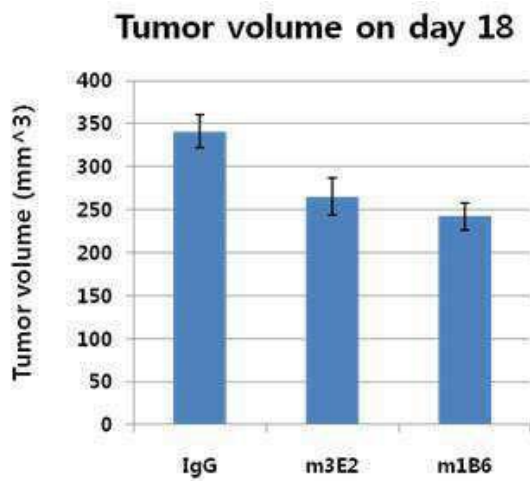




도면5a



도면5b



서열목록

- <110> SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.
- <120> Antibody specifically binding to Ang-2 and use thereof
- <130> DPP20124970KR
- <160> 43
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> CDR-H1 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m1A10)

<400> 1  
 Ser Tyr Trp Leu Glu  
 1 5  
 <210> 2  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR-H1 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m8D3)  
 <400> 2  
 Asp Tyr Tyr Met Lys  
 1 5  
 <210> 3  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR-H1 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m1B6)  
 <400> 3  
 Asn Tyr Gly Met Asn  
 1 5  
 <210> 4  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR-H1 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m3E2)  
 <400> 4  
 Asp Pro Tyr Ile His  
 1 5  
 <210> 5  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR-H2 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m1A10)  
 <400> 5

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Arg  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 6  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR-H2 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m8D3)  
 <400> 6

Glu Ile Asn Pro Lys Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Ile Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 7  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223>  
 > CDR-H2 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m1B6)  
 <400> 7

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 8  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR-H2 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m3E2)  
 <400> 8

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 9  
 <211> 12  
 <212> PRT  
  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR-H3 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m1A10)  
 <400> 9  
 Gly Asn His Asn Ser Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
     1                  5                  10  
 <210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR-H3 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m8D3)  
 <400> 10  
 Glu Asn Asp Tyr Asp Val Gly Phe Phe Asp Tyr  
     1                  5                  10  
 <210> 11  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223>  
 > CDR-H3 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m1B6)  
 <400> 11  
 Asp His Asp Gly Tyr Leu Met Asp Tyr  
     1                  5  
 <210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR-H3 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m3E2)  
 <400> 12  
 Arg Trp Asp Gly Gly Gly Phe Asp Tyr  
     1                  5  
 <210> 13

<211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR-L1 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m1A10)  
 <400> 13  
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His

1 5 10 15

<210> 14  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR-L1 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m8D3)  
 <400> 14

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala

1 5 10

<210> 15  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR-L1 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m1B6)  
 <400> 15

Ser Thr Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 16  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR-L1 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m3E2)  
 <400> 16

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 17  
 <211> 7

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR-L2 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m1A10)  
 <400> 17  
 Arg Ala Ser Asn Leu Asp Ser  
     1                    5  
 <210> 18  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 ><223> CDR-L2 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m8D3)  
 <400> 18  
 Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Pro  
     1                    5  
 <210> 19  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR-L2 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m1B6)  
 <400> 19  
 Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser  
     1                    5  
 <210> 20  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR-L2 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m3E2)  
 <400> 20  
 Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser  
     1                    5  
  
 <210> 21  
 <211> 9  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L3 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m1A10)

<400> 21

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L3 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m8D3)

<400> 22

Gln Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR-L3 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m1B6)

<400> 23

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L3 (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m3E2)

<400> 24

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L2

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)

<223> X is arginine (R) or tyrosine (Y)

<220><221> MOD\_RES

<222> (2)

<223> X is alanine (A) or threonine (T) (e.g., A)

<220><221> MOD\_RES

<222> (4)

<223> X is asparagine (N), arginine (R), or serine (S) (e.g., N)

<220><221> MOD\_RES

<222> (5)

<223> X is leucine (L) or arginine (R)

<220><221> MOD\_RES

<222> (6)

<223> X is aspartic acid (D), histidine (H), or tyrosine (Y) (e.g., D or Y)

<220><221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> X is serine (S) or proline (P)

<400> 25

Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L3

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)

<223> X is serine (S), glycine (G), aspartic acid (D), or tyrosine (Y) (e.g., S or D)

<220><221> MOD\_RES

<222> (4)



<223> X is asparagine (N), tyrosine (Y), or serine (S) (e.g., N or Y)

<220><221> MOD\_RES

<222> (5)

<223> X is glutamic acid (E), threonine (T), or lysine (K) (e.g., E or T)

<220

><221> MOD\_RES

<222> (6)

<223> X is aspartic acid (D), serine (S), or leucine (L) (e.g., D or S)

<220><221> MOD\_RES

<222> (8)

<223> X is leucine (L), tryptophan (W), or tyrosine (Y) (e.g., L or W)

<400> 26

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr

1 5

<210> 27

<211> 496

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human Ang-2 (Accession # O15123)

<400> 27

Met Trp Gln Ile Val Phe Phe Thr Leu Ser Cys Asp Leu Val Leu Ala

1 5 10 15

Ala Ala Tyr Asn Asn Phe Arg Lys Ser Met Asp Ser Ile Gly Lys Lys

20 25 30

Gln Tyr Gln Val Gln His Gly Ser Cys Ser Tyr Thr Phe Leu Leu Pro

35 40 45

Glu Met Asp Asn Cys Arg Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Val Ser Asn Ala

50 55 60

Val Gln Arg Asp Ala Pro Leu Glu Tyr Asp Asp Ser Val Gln Arg Leu

65 70 75 80

Gln Val Leu Glu Asn Ile Met Glu Asn Asn Thr Gln Trp Leu Met Lys

85 90 95

Leu Glu Asn Tyr Ile Gln Asp Asn Met Lys Lys Glu Met Val Glu Ile  
 100 105 110  
 Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn Gln Thr Ala Val Met Ile Glu Ile Gly  
 115 120 125  
 Thr Asn Leu Leu Asn Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys Leu Thr Asp  
 130 135 140  
 Val Glu Ala Gln Val Leu Asn Gln Thr Thr Arg Leu Glu Leu Gln Leu  
 145 150 155 160  
 Leu Glu His Ser Leu Ser Thr Asn Lys Leu Glu Lys Gln Ile Leu Asp  
 165 170 175  
 Gln Thr Ser Glu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Lys Asn Ser Phe Leu Glu  
 180 185 190  
 Lys Lys Val Leu Ala Met Glu Asp Lys His Ile Ile Gln Leu Gln Ser  
 195 200 205  
 Ile Lys Glu Glu Lys Asp Gln Leu Gln Val Leu Val Ser Lys Gln Asn  
 210 215 220  
 Ser Ile Ile Glu Glu Leu Glu Lys Lys Ile Val Thr Ala Thr Val Asn  
 225 230 235 240  
 Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln His Asp Leu Met Glu Thr Val Asn  
 245 250 255  
 Asn Leu Leu Thr Met Met Ser Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asp Pro Thr  
 260 265 270  
 Val Ala Lys Glu Glu Gln Ile Ser Phe Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe  
 275 280 285  
 Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn  
 290 295 300  
 Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln  
 325 330 335  
 Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu  
 340 345 350

Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg  
 355 360 365

Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr  
 370 375 380

Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg  
 385 390 395 400

Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile  
 405 410 415

Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys  
 420 425 430

Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp  
 435 440 445

Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln  
 450 455 460

Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser  
 465 470 475 480

Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala Asp Phe  
 485 490 495

<210> 28

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> heavy chain variable region (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m1A10)

<400> 28

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Asp Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Trp Leu Glu Trp Leu Ile Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe



<211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> heavy chain variable region (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m1B6)  
 <400> 30

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp His Asp Gly Tyr Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 31  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> heavy chain variable region (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m3E2)  
 <400> 31

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Pro  
 20 25 30  
 Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile



tcttgcaagg ctcttgata caccttcaact gactactaca tgaagtgggt gaggcagagc 120  
 catggaaga gccttcagtg gggttgagaa attaatccta agaatggtga tactttctac 180  
 aaccagatat tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 atgcaactca ccagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtac acgtgagaat 300  
 gattacgacg tgggattctt tgactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 34  
 <211> 354  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> gene encoding heavy chain variable region (e.g., for

SAIT-ANG-2-AB-m1B6)

<400> 34  
 cagatccagt tggatgagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60  
 tcttgcaagg ctcttgata taccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct 120  
 ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct aactggaga gccaacatat 180  
 gctgatgact tcaagggacg ttttgccttc tttttgaaa cctctgccag cactgcctat 240  
 ttgcagatca acaacctcaa aatgaggac acggctacat atttctgtgc aagagatcat 300  
 gatggttacc ttatggacta ctggggctcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354

<210> 35  
 <211> 354  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> gene encoding heavy chain variable region (e.g., for

SAIT-ANG-2-AB-m3E2)

<400> 35  
 gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60  
 tcttgcacag ctcttggett caacattaaa gaccctata tacactgggt gaaacagagg 120  
 cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat 180  
 gaccgaagt tccagggcaa ggccactata acggcagaca catcctcaa cacagcctac 240  
 ctccagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgt tagaaggtgg 300

gacggggggg gctttgacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354

<210> 36

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable region (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m1A10)

<400> 36

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr

20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Asp Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable region (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m8D3)

<400> 37

Thr Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile





<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable region (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m3E2)

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 40

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gene encoding light chain variable region (e.g., for SAIT-ANG-2-AB-m1A10)

<400> 40

gacattgtgc tgaccaaac tccagcttct ctggctgtgt ctctaggtca gagggccacc 60

atcctctgca gagccagtga aagtgttgat agttatggca atagttttat gactggtac 120

cagcagaaac caggacagcc acccaaac tcatctatc gtgcatcaa cctagattct 180

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240

cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatcctctc 300

acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa 333

<210> 41

<211> 321

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> gene encoding light chain variable region (e.g., for

SAIT-ANG-2-AB-m8D3)

<400> 41  
 actattgtga tgaccagac tcccaaattc ctgcttgat cagcaggaga caggattacc 60  
 ataacctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtag cctggtatca acagaagcca 120  
 gggcagtctc ctaaactgct gatatactat gcatccaatc gctaccctgg agtcctgat 180  
 cgcttcactg gcagtggata tgggacggat ttcactttca ccatcagcac tgtgcaggct 240  
 gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcag gattatacct ctccgtggac gttcgggtgga 300  
 ggcaccgagc tggaaatcaa a 321

<210> 42  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> gene encoding light chain variable region (e.g., for  
 SAIT-ANG-2-AB-m1B6)

<400> 42  
 gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60  
 atcagttgta gtacaagtca gggcattagc aattatttga actggtatca gcagaaacca 120  
 gatggaactg taaactcct gatcttttac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggactgat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct 240  
 gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccgtacac gttcgggggg 300  
 gggaccaagc tggaaataaa a 321

<210> 43  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> gene encoding light chain variable region (e.g., for  
 SAIT-ANG-2-AB-m3E2)

<400> 43  
 gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca gggcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca	120
gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca	180
aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattaccaa cctggagcaa	240
gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtggac gttcggtgga	300
ggcaccaagc tggaatcaa a	321