

명세서

발명의 명칭: 항-NRP1 항체 스크리닝 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 NRP1 과발현 환자 유래 세포 및 이를 포함하는 동물모델을 이용하여 항-NRP1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 스크리닝하는 방법에 관한 것으로 보다 구체적으로는, NRP1을 함유하는 환자 유래 세포 및 이를 이식한 동물모델을 각각 이용한 *in vitro* 및 *in vivo* 패닝을 통해 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 뉴로필린(NRP)은 NRP1과 NRP2를 포함하며, 이는 신경세포에서 최초로 발견되었다. NRP1은 약 923개의 아미노산으로 구성되고, NRP2는 약 926개의 아미노산으로 구성되며, 이들은 공통적으로 유사한 도메인 구조를 가지면서, 전체적으로 44%의 아미노산 상동성을 가진다고 알려져 있다.
- [4] NRP1은 축삭 유도를 조절하기 위해 플렉신 보조-수용체와 작용하는, 세마포린 3A 리간드에 결합하는 수용체로 알려져 있다. 이후, NRP1은 혈관 내피 성장인자(VEGF) 리간드 패밀리의 구성원에 결합하여 혈관 발생을 매개하는 것으로 밝혀졌다.
- [5] 혈관계의 발생을 통해 수많은 생리적 과정과 병리적 과정이 진행된다. 종양과 같이 활동적으로 성장하는 조직에는 적절하게 혈액이 공급되어야 한다. 이들 조직은 일반적으로 새로운 혈관 형성과 유지를 증진시켜 주는 전-혈관신생 인자를 생성시킴으로써 혈관신생을 통해 혈액을 공급한다. 혈관 형성은 단순한 과정은 아니나, 다음 단계들을 통해 이루어진다: a) 내피세포 (EC)가 기존의 내피세포로부터 증식되거나 분화되는 단계; b) 내피세포가 이동하고 유착하여 코드 (cord)-유사 구조를 형성시키는 단계; c) 혈관 코드가 세관형성을 진행하여 중앙에 내강이 있는 혈관을 형성시키는 단계; d) 기존의 코드나 혈관에 싹이 나기 시작하여 이차 혈관을 형성시키는 단계; e) 원시 혈관총이 추가의 재형성과 재생을 진행하는 단계; 및 f) 내피 주변 세포를 동원하여 내피 관에 넣어, 혈관에 대한 유지 및 조정 기능을 제공하는 단계 (이러한 세포에는, 작은 모세혈관의 경우에는 혈관주위세포, 큰 혈관의 경우에는 평활근 세포, 및 심장 내의 심근 세포가 포함된다).
- [6] NRP1은 다양한 종류의 인간 종양 세포주 및 인간 종양(교모세포종, 성상세포종, 신경교종, 신경아세포종, 고환암, 대장암, 흑색종, 췌장암, 폐암, 유방암, 식도암 및 전립선암 등)에서 발현되는 것으로 알려져 있으며, VEGF 및 세마포린의 암세포의 증식, 생존 및 이동에 미치는 영향에 관련된다고도 알려져 있다. 또한, NRP1의 발현 정도에 따라 암 진행 정도가 증가하거나, 암환자의

예후가 좋지 않은 것으로 알려져 있다.

- [7] 종양 성장의 경우, 혈관신생은 과형성물에서 신생물로 전이되는데 있어 결정적이고, 종양의 성장과 전이에 대한 영양을 제공하는데 있어서도 결정적인 역할을 할 수 있다. 신생혈관형성으로 인해 종양 세포는 정상 세포와 비교해서 성장 이점과 증식 자율성을 획득할 수 있게 된다. 종양은 통상적으로, 이용 가능한 모세혈관 층으로부터의 거리 때문에 수 입방 밀리미터 크기로만 증식할 수 있는 단일 비정상 세포로서 시작하고, 추가의 성장과 전염없이 장기간 동안 '잠복' 상태로 정체될 수 있다. 이어서, 몇몇 종양 세포는 혈관신생 표현형으로 전환되어 내피 세포를 활성화시켜, 새로운 모세혈관으로 증식 및 성숙된다. 이와 같이 새로이 형성된 혈관은 원발성 종양을 지속적으로 성장시킬 수 있게 해줄 뿐만 아니라 전이성 종양 세포를 전파하고 재집락화시킬 수 있다.
- [8] 이와 관련하여, NRP1을 과발현하는 암을 치료하기 위하여, NRP1에 높은 친화력으로 결합하여 암세포의 성장을 저해할 수 있는 항-NRP1 항체가 요구된다.
- [9] 항체의약품은 높은 치료 효과 및 표적 치료성 등으로 인해 바이오 의약품 분야에서도 가장 급속도로 성장 중이다. 항체의약품 시장은 200여개의 바이오의약품 중에서 가장 빠르게 성장하는 분야로, 전체 바이오의약품 시장의 37%를 차지할 정도로 비중이 높으며, 세계 시장 규모는 2012년 515억 달러에서 연평균 11.8%로 성장하여 2017년에 899억 달러에 이를 것으로 예상된다(2013 바이오의약품 동향분석 보고서, 산업통상자원부, 2013).
- [10] 항체의약품의 주요 표적이 되는 질환은 대부분이 난치성 암(49%) 및 면역질환(35%)과 같이 특정 질환 적응증에 집중되어 있어, 유사 적응증 제품 간의 판매경쟁이 치열한 상황이다. 그럼에도 불구하고, 질환들 내 세분화되는 치료 표적들이 존재하기 때문에 향후에도 항암용 항체치료제 개발 분야는 성장세를 지속할 것으로 판단된다.
- [11] 이러한 항체의약품의 주요 활성의약품질인 항체 후보물질의 동정 및 확보에 이용되는 기술은 하이브리도마 세포주를 이용한 키메라(chimeric) 또는 인간화(Humanized) 항체의 개발, 형질전환 마우스(Transgenic mouse)를 이용하는 방법 및 항체 디스플레이 기술을 이용하는 방법으로 크게 구분할 수 있다.
- [12] 1975년에 암세포와 정상세포를 융합하여 만든 잡종세포로 monoclonal antibody를 생산하는 하이브리도마 기술이 개발되면서, 활발한 항체의약품 개발이 시작되었으며, 마우스 단일클론항체(mouse monoclonal antibody)가 인간에 적용될 때 나타나는 HAMA(Human-anti-mouse antibody)반응을 해결하기 위해, 인간화 항체 나아가 인간 항체를 동정하는 기술이 개발되었다.
- [13] 인간항체를 제작하기 위한 기술 분야는 크게 형질전환 마우스 및 항체 디스플레이(파지 디스플레이, 이스트 디스플레이, 리보솜 디스플레이 등)를 예시할 수 있다. 최근 많이 시도되고 있는 형질전환 마우스를 이용한 항체의 개발은 인간항체 유전자를 이식한 형질전환 마우스에 기존의 하이브리도마

기술을 적용시켜 인간 단일클론항체를 제조하는 기술이다. 이 기술은 생체 내 친화도 성숙(in-vivo maturation)이 가능하기 때문에 친화력이 높은 항체를 제조할 수 있으며, 인간항체를 효과적으로 만들 수 있다는 큰 장점이 있으나, 형질전환 마우스의 사용 조건이 비싸고, 제작 노하우(knowhow) 등 기술적 진입이 어려운 측면이 있다.

- [14] 항체 디스플레이 기술 중, 파지 디스플레이 기술은 박테리오파지의 표면에 항체단편을 발현시켜 스크리닝하는 기술로, M13 PIII 파지에 기반한 디스플레이 기술이 가장 널리 이용되고 있다. 하지만 이러한 파지 디스플레이 기술은 유전자 재조합으로 발현된 항체단편을 박테리오파지의 표면에 발현시키기 때문에 G-단백질 리셉터와 같은 세포 표면에 존재하는 단백질 또는 재조합 발현이 어려운 항체를 스크리닝하는데는 어려움이 있다.
- [15] 이러한 문제점을 해결하기 위하여 스크리닝 단계에서 재조합 단백질을 사용하지 않는 전략이 개발되었는데, 이는 세포 표면에 존재하는 단백질 그 자체를 스크리닝에 이용하는 전략이다.
- [16] 기존의 인용문헌들을 통하여, 항체 후보물질과 세포를 같이 배양함으로써 세포 표면에 발현되는 항원과 직접적으로 결합하는 항체 또는 펩타이드를 스크리닝할 수 있다는 것이 알려졌다(Andersen PS, et al., Proc Natl Acad Sci USA 93:1820-1824, 1999; Barry MA, et al., Nat Med 2:299-305, 1995; Cai X, Garen A. Proc Natl Acad Sci USA 92:6537-6541, 1995).
- [17] 하지만 상기의 세포를 이용한 디스플레이 방법은 실험실에서 배양된 세포를 이용하여 스크리닝하기 때문에, 실제로 환자에게 적용하였을 때, 그 효과를 제대로 발휘하지 못한다는 단점이 있었다.
- [18] 항체-약물 결합체 (Antibody-drug conjugate, ADC)는 링커를 통해 항체에 세포 독성 약물을 결합시킨 것으로, 단클론항체가 타겟 특이적 특성을 나타내므로, 항체-약물 결합체 중 약물은 선택적 표적능을 가지는 단클론항체에 의해 인지되는 항원/표적을 발현하는 종양에 전달될 수 있다. 이상적으로는 투여 후 혈액 중 프로드럭 상태의 항체-약물 결합체는 독성이 없어야 하고, 항체가 표적 종양 항원에 결합한 다음 암 세포 내로 내재화되면, 약물이 활성 형태로 방출되어 종양 세포를 살해하게 된다.
- [19] 이와 같이 항체가 결합하는 표적/항원을 결정하는 것이 항체-약물 결합체 제작에 중요 시작점이 된다. 특히, 항체가 결합하는 표적/항원은 종양 세포에서 우세하게 발현 (과발현)하는 세포 표면 단백질이 되어 왔다.
- [20] 인간 암의 세포 표면에서 발현되는 항원의 정의는 정상 조직에 비해 과다 발현되거나 돌연변이 및 선택적으로 발현되는 광범위한 목표물들을 의미한다. 핵심적인 문제는 항체를 기반으로 한 치료법들에 적절한 항원을 동정하는 것이다. 이러한 치료제들은 항원이나 수용체 기능 (즉 자극제로서나 길항제로서의 기능)의 변화를 매개하고 Fc 과 T 세포 활성화를 통해 면역 시스템을 조절하며 특정한 항원을 목표로 하는 항체에 결합되는 특정한 약물의

전달을 통해 그 효능을 발휘한다. 항체 약동학 (pharmacokinetics), 작용 기능, 사이즈와 면역 자극성을 변화시킬 수 있는 분자 기술들은 새로운 항체를 기반으로 한 치료법들의 개발에서 핵심적인 요소로 등장하고 있다. 암 환자들을 대상으로 한 치료 항체들의 임상 시도에서 얻은 증거들은 목표 항원과 항체들의 친화성 및 결합성, 항체 구조의 선택, 치료적 접근법 (신호전달 차단이나 면역 작용 기능)을 포함하는 최적화된 항체들의 선택을 위한 접근법들의 중요성을 강조하고 있는 실정이다.

- [21] 이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 다양한 암에서 발현되는 것으로 알려진 NRP1에 결합하여 세포 내로 내재화(internalizing)되는 항암 치료용 항체를 개발하기 위하여 노력하였다. 그 결과, 파지 디스플레이 기술을 이용하여 NRP1에 높은 친화력으로 결합하고 세포 내로 내재화되는 항-NRP1 항체를 개발하고, 이러한 항-NRP1 항체가 암세포의 이동을 현저히 억제시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [22]
- [23] **발명의 요약**
- [24] 본 발명의 목적은 NRP1을 과발현하는 환자 유래 세포를 이용한 항체 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [25] 본 발명의 다른 목적은 NRP1을 과발현하는 환자 유래 세포 및 이를 포함하는 동물모델을 이용한 항체 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [26] 본 발명의 다른 목적은 상기 스크리닝 방법에 의해 선별된 항체 또는 그의 항원 단편을 제공하는 것이다.
- [27] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 스크리닝 방법에 의해 선별된 항체 또는 그의 항원 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [28] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (i) NRP1을 발현하는 환자 유래 세포에 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 라이브러리를 처리하여, NRP1에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 스크리닝하는 단계; (ii) 상기 스크리닝된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 NRP1이 발현되지 않는 환자 유래 세포에 처리하는 단계; 및 (iii) 상기 (i)에서 선별된 항체 또는 그의 항원 결합 단편 중에서 (ii)의 환자 유래 세포에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 분리·제거하는 단계를 포함하는, NRP1에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 스크리닝 하는 방법을 제공한다.
- [29] 본 발명은 또한, (i) NRP1을 발현하는 환자 유래 세포에 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 라이브러리를 처리하여, NRP1에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 1차 스크리닝하는 단계; (ii) 상기 1차 스크리닝된 항체 또는 그의 항원 결합 단편 라이브러리를 NRP1이 발현되지 않는 환자 유래 세포에 처리하는 단계; (iii) 상기 NRP1을 과발현하는 환자 유래 세포가 이식되어 있는 동물모델에 상기 (i)에서 선별된 항체 또는 그의 항원 결합 단편 중에서 (ii)의

환자 유래 세포에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 분리·제거한 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여하여, 항원 단백질에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 2차 스크리닝하는 단계; 및 (iv) 상기 2차 스크리닝된 항체 또는 그의 항원 결합 단편 중에서 NRP1 이외의 항원에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 분리·제거하는 단계를 포함하는, NRP1에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[30] 본 발명은 또한, 상기 스크리닝 방법으로 선별된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[31] 본 발명은 더욱이, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[32]

도면의 간단한 설명

[33] 도 1은 본 발명의 방법을 나타낸 개념도이다.

[34] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, Neurophilin 1(NRP1) 항원과 결합하는 항체를 스크리닝 하는 방법을 도식화한 것이다.

[35] 도 3은 NRP1 항원과 결합하는 항체를 *in vivo*에서 스크리닝 하는 방법을 도식화한 것이다.

[36] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 항-NRP1 항체 단편의 생산을 위한 파지미드 벡터의 구성도이다.

[37] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 정제된 각 항-NRP1 항체 단편의 쿠마시 염색 결과를 나타낸 것이다.

[38] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 선별한 3종의 항-NRP1 항체 단편들의 NRP1에 대한 결합력을 보여주는 ELISA 결과를 나타낸 것이다.

[39] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 선별한 3종의 항-NRP1 항체 단편들의 농도에 따른 NRP1에 대한 결합력을 보여주는 ELISA 결과를 나타낸 것이다.

[40] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 선별한 3종의 항-NRP1 항체 단편들의 KD 값을 SPR을 이용해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[41] 도 9는 NRP1 과발현 환자 유래 세포에 대하여, 본 발명의 일 실시예에 따라 선별한 항-NRP1 항체 단편의 결합능을 보여주는 FACS 분석결과이다.

[42] 도 10a 내지 10c는 본 발명의 일 실시예에 따라 선별한 3종의 항-NRP1 항체 단편들의 내재화 기능을 보여주는 공초점 레이저 주사현미경 사진이다.

[43] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라, 선별한 항-NRP1 항체 단편결합 에피토프를 확인한 결과이다

[44] 도 12는 NRP1을 과발현하는 세포주를 선별하기 위해 수행한 RNA-seq 분석 결과를 나타낸 것이다.

[45] 도 13은 3종의 항-NRP1 IgG항체에 대한 생산 순도를 나타낸 결과이다.

[46] 도 14는 3종의 항-NRP1 IgG항체에 대한 endotoxin test 결과를 나타낸 것이다.

- [47] 도 15는 ELISA를 이용한 항-NRP1 IgG항체의 KD 값을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [48] 도 16는 3종의 항-NRP1 IgG항체의 인간 NRP1에 대한 특이적인 결합능을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [49] 도 17은 본 발명의 방법에 따라 선별된 3종의 항-NRP1 IgG항체가 환자 유래 암세포에 내재화됨을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [50] 도 18은 본 발명의 방법에 따라 선별된 3종의 항-NRP1 IgG항체가 암세포 특이적 내재화를 보임을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [51] 도 19는 본 발명의 방법에 따라 선별된 3종의 항-NRP1 IgG항체가 공지의 NRP1 항체에 비해 우수한 정상세포와 암세포에 대한 결합력 차이를 보임을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [52] 도 20은 본 발명의 방법에 따라 선별된 3종의 항-NRP1 IgG항체가 우수한 암세포 이동 억제 효과를 보임을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [53] 도 21은 본 발명의 방법에 따라 선별된 항-NRP1 IgG항체가 우수한 암세포 이동 억제 효과를 보임을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [54] 도 22는 본 발명의 방법에 따라 선별된 항-NRP1 IgG항체에 의한 신호전달 물질의 변화를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [55] 도 23은 TUNEL assay를 통해 본 발명의 방법에 따라 선별된 항-NRP1 IgG항체에 의한 세포사멸 (apoptosis)이 증가함을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [56] 도 24는 본 발명의 방법에 따라 선별된 항-NRP1 IgG항체의 교모세포암에 대한 효능 평가 결과를 나타낸 것이다.
- [57] 도 25는 본 발명의 방법에 따라 선별된 항-NRP1 IgG항체의 폐암에 대한 효능 평가 결과를 나타낸 것이다.
- [58] 도 26은 본 발명의 방법에 따라 선별된 항-NRP1 IgG항체의 교모세포암 특이적 결합을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [59] 도 27은 본 발명의 방법에 따라 선별된 항-NRP1 IgG항체의 정상조직에 대한 분포 평가 결과를 나타낸 것이다.
- [60]
- [61] **발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예**
- [62] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [63] 본 발명자들은 향후 임상에서 성공 가능성이 높고, 내재화(internalization)되어 세포 내부에서 효과적으로 작용할 수 있는 항체를 선별하기 위하여, NRP1을 함유하고 있는 환자 유래 세포를 이용하여, 항암 치료용 항체를 개발하기 위해 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 파지 디스플레이 기술을 응용하여, NRP1에 높은 친화력으로 결합하고, 세포 내로 내재화하는 항체를 선별하고, 이러한

항체가 세포 내로 내재화하는 것을 확인하고자 하였다.

- [64] 이에, 본 발명의 일 실시예에서는 다양한 암에서 발현되는 것으로 알려진 NRP1(neurophilin 1)에 결합하여 세포내로 내재화되는 항체를 선별하기 위하여, 교모세포종 환자로부터 유래한 세포에 기반한 파지 디스플레이를 수행하였다. 그 결과, 선별된 항-NRP1 항체가 암세포 표면에 발현된 NRP1에 결합된 후, 세포내로 내재화됨을 확인하였으며(도 9a 내지 9c), 항체의 결합 에피토프가 기존의 항체와 상이한 것을 확인하였다(도 10).
- [65] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (i) NRP1을 발현하는 환자 유래 세포에 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 라이브러리를 처리하여, NRP1에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 스크리닝하는 단계; (ii) 상기 스크리닝된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 NRP1이 발현되지 않는 환자 유래 세포에 처리하는 단계; 및 (iii) 상기 (i)에서 선별된 항체 또는 그의 항원 결합 단편 중에서 (ii)의 환자 유래 세포에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 분리·제거하는 단계를 포함하는, NRP1에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.
- [66] 본 발명에서 사용되는 용어 “발현”은 NRP1이 구조적 유전자로부터 생산되는 과정을 의미하며, 유전자가 mRNA로 전사 및 mRNA가 NRP1 단백질로 번역되는 과정을 포함한다. 일반적으로 NRP1이 질병 예를 들어 암의 생성에 기여할 수 있고, NRP1이 과발현되어 예를 들어 암세포의 세포사멸을 억제하거나, NRP1의 과발현은 예를 들어 암세포의 침윤(invasiveness) 또는 이동을 증가시킬 수 있으므로, 본 발명에 따른 NRP1에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 스크리닝하는 방법에서 NRP1의 발현은 NRP1의 과발현 또는 비정상적 활성을 포함하는 의미일 수 있다.
- [67] 본 발명에서 사용되는 용어 “항체”는 IgA, IgE, IgM, IgD, IgY 및 IgG로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역글로불린으로, 목표 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 경쇄(light chain)와 중쇄(heavy chain) 각각 2개씩 모여 이루어지며, 각각의 사슬은 아미노산 서열이 가변적인 가변영역(variable domain)과 일정한 서열을 가지는 고정영역(constant domain)으로 이루어져 있다. 가변영역의 3차원구조 말단에 항원이 결합하는 부위가 위치하며, 이 부위는 경쇄와 중쇄에 각각 3개씩 존재하는 상보성결정부위(complementarity determining region)들이 모여서 형성된다. 상보성결정부위는 가변영역 중에서도 아미노산 서열의 가변성이 특히 높은 부분이며, 이러한 높은 가변성에 의해 다양한 항원에 대해 특이적 항체가 찾아질 수 있다. 본 발명의 범위에는 완전한 항체 형태뿐 아니라, 상기 항체 분자의 항원 결합 단편도 포함된다.
- [68] 본 발명에서 사용되는 용어 “ScFv (single-chain Fv, 단일사슬단편항체 또는 항체 단편)”는 경쇄 및 중쇄의 가변영역을 연결한 항체이다. 경우에 따라서, 15개 내외의 아미노산이 연결된 펩타이드 사슬로 이루어진 링커(linker, 연결부위)를 포함할 수 있으며, 이 때, ScFv는 경쇄 가변영역-연결부위-중쇄 가변영역, 또는

중쇄 가변영역-연결부위-경쇄 가변영역의 구조를 가질 수 있으며, 원 항체와 동일 혹은 유사한 항원특이성을 가진다.

- [69] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.
- [70] 항체의 항원 결합 단편 또는 항체 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 다이설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 제조합 기술은 PCT 국제 공개특허출원 WO88/10649, WO88/106630, WO88/07085, WO88/07086 및 WO88/09344에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv, scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 경쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 제조합 기술을 통하여 제작할 수도 있다.
- [71] 본 발명에서 사용되는 용어 "항체(또는 ScFv) 라이브러리"는 서로 다른 서열을 가지는 다양한 항체 유전자들의 집합이다. 항체 라이브러리로부터 임의의 항원에 대해 특이적 항체를 분리하기 위해서는 매우 높은 다양성이 요구되며, 서로 다른 항체 클론들로 이루어진 라이브러리가 구축되어 사용된다. 이러한 항체라이브러리를 이루는 항체 유전자는 예를 들어, 파지미드(phagemid) 벡터에 클로닝되어 형질전환체(대장균)에 형질전환될 수 있다.
- [72] 본 발명에서 사용되는 용어 상기 "핵산"은 유전자 또는 뉴클레오티드와 혼용될 수 있으며, 예를 들어 천연/합성 DNA, 게놈 DNA, 천연/합성 RNA, cDNA 및 cRNA로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [73] 본 발명에서 사용되는 용어 "파지미드" 벡터는 파지 디스플레이에 사용되고, 파지복제시작점(phage origin of replication)을 가지는 플라스미드 DNA이며, 통상적으로 항생제내성유전자를 선택 마커(selection marker)로 가지고 있다. 파지 디스플레이에 사용되는 파지미드 벡터의 경우 M13 파지의 gIII 유전자 또는 그 일부가 포함되어 있으며, ScFv 유전자는 gIII 유전자의 5' 말단에

라이게이션(ligation)되어 형질전환체를 통해 발현된다.

- [74] 본 발명에서 사용되는 용어 "헬퍼 파지(helper phage)"는 파지미드가 파지 입자로 조립되도록 필요한 유전정보를 제공하는 파지이다. 파지미드에는 파지 유전자 중 gIII 혹은 그 일부만이 존재하므로 파지미드로 형질전환된 숙주세포(형질전환체)를 헬퍼 파지로 감염시켜 나머지 파지 유전자를 공급하게 된다. M13K07 혹은 VCSM13 등의 종류가 있으며 대부분 카나마이신(kanamycin) 등 항생제 내성 유전자를 포함하여 헬퍼 파지에 감염된 형질전환체를 선택할 수 있도록 하고 있다. 또한 조립신호(packaging signal)에 결합이 있으므로 헬퍼 파지 유전자보다 파지미드 유전자가 선별적으로 파지입자 속으로 조립된다.
- [75] 본 발명에서 사용되는 용어 "신호서열"은 유전자의 5' 말단부분에 위치하여, 유전자로부터 코딩된 단백질이 외부로 분비될 때 필요한 신호로 기능하는 염기서열 혹은 그에 상응하는 아미노산 서열이다.
- [76] 본 발명에서 사용되는 용어 "파지 디스플레이"는 변이체 폴리펩티드를 파지, 예를 들어 섬유상 파지 입자의 표면 상에 외피 단백질의 적어도 일부와의 융합 단백질로서 디스플레이하는 기술이다. 파지 디스플레이의 유용성은 무작위화 단백질 변이체의 큰 라이브러리를 대상으로 하여, 표적 항원과 고 친화도로 결합하는 서열을 신속하고도 효율적으로 분류할 수 있다는 사실에 있다. 펩티드 및 단백질 라이브러리를 파지 상에 디스플레이하는 것은 특이적 결합 특성을 지닌 폴리펩티드를 알아보기 위해 수 백만개의 폴리펩티드를 스크리닝하는데 사용되어 왔다.
- [77] 파지 디스플레이 기술은 특정 리간드 (예: 항원)와 결합하는 신규 단백질을 생성 및 선별하기 위한 강력한 도구를 제공하였다. 파지 디스플레이 기술을 사용하여, 단백질 변이체의 큰 라이브러리를 생성시키고, 표적 항원과 고 친화성으로 결합하는 서열을 신속하게 분류할 수 있다. 변이체 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 바이러스성 외피 단백질, 예를 들어 유전자 III 단백질 또는 유전자 VIII 단백질을 암호화하는 핵산 서열과 융합시킨다. 단백질 또는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 유전자 III 단백질의 일부를 암호화하는 핵산 서열과 융합시킨 1가 파지 디스플레이 시스템이 개발되었다. 1가 파지 디스플레이 시스템에서는, 유전자 융합물이 저 수준으로 발현되고 야생형 유전자 III 단백질이 또한 발현되어 입자 감염성이 유지된다.
- [78] 섬유상 파지 표면 상에서의 펩티드의 발현과 숙주세포의 주변세포질에서의 기능성 항체 단편의 발현을 입증하는 것이 항체 파지 디스플레이 라이브러리를 개발하는 데에 있어 중요하다. 항체 또는 항원 결합성 폴리펩티드의 라이브러리는 수 많은 방식, 예를 들어 무작위 DNA 서열을 삽입함으로써 단일 유전자를 변경시키는 방법 또는 관련 유전자 계열을 클로닝하는 방법으로 제조하였다. 라이브러리를 대상으로 하여, 목적하는 특징을 수반한 항체 또는 항원 결합성 단백질의 발현에 관하여 스크리닝할 수 있다.
- [79] 파지 디스플레이 기술은 목적하는 특징을 지닌 항체를 제조하기 위한 통상적인

하이브리도마 및 재조합 방법에 비해 몇 가지 이점을 지니고 있다. 이러한 기술은 동물을 사용하지 않고서도 짧은 시간에 다양한 서열을 지닌 큰 항체 라이브러리를 생성시킬 수 있도록 한다. 하이브리도마의 제조나 인간화 항체의 제조는 수 개월의 제조기간을 필요로 할 수 있다. 또한, 면역이 전혀 요구되지 않기 때문에, 파지 항체 라이브러리는 독성이거나 항원성이 낮은 항원에 대해서도 항체를 생성시킬 수 있다. 파지 항체 라이브러리를 또한 사용하여 신규한 치료적 항체를 생성 및 확인할 수 있다.

[80] 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 면역시킨, 비-면역시킨 인간, 생식세포계 서열, 또는 미감작 B 세포 Ig 레퍼토리 (repertory)로부터 인간 항체를 생성시키는 기술을 사용할 수 있다. 각종 림프계 조직을 사용하여, 미감작 또는 비면역 항원 결합성 라이브러리를 제조할 수 있다.

[81] 파지 디스플레이 라이브러리로부터 고친화성 항체를 확인 및 분리할 수 있는 기술은 치료용 신규 항체 분리에 중요하다. 라이브러리로부터 고친화성 항체를 분리하는 것은 라이브러리의 크기, 세균성 세포 중에서의 생산 효율 및 라이브러리의 다양성에 좌우될 수 있다. 라이브러리의 크기는 항체 또는 항원 결합성 단백질의 부적절한 폴딩과 정지 코돈의 존재로 인한 비효율적 생산에 의해 감소된다. 세균성 세포에서의 발현은 항체 또는 항원 결합성 도메인이 적절하게 폴딩되지 않는 경우에는 억제될 수 있다. 발현은 가변/불변 계면의 표면이나 선별된 CDR 잔기에서의 잔기를 교대로 돌연변이시킴으로써 개선시킬 수 있다. 골격 영역의 서열은 세균성 세포에서 항체 파지 라이브러리를 생성시키는 경우에 적절한 폴딩을 제공하기 위한 하나의 요소이다.

[82] 고 친화성 항체 분리에서 항체 또는 항원 결합성 단백질의 다양한 라이브러리를 생성시키는 것이 중요하다. CDR3 영역은 이들이 종종 항원 결합에 참여하는 것으로 밝혀졌다. 중쇄 상의 CDR3 영역은 크기, 서열 및 구조적 입체 형태 면에서 상당히 다양하므로, 이를 이용하여 다양한 라이브러리를 제조할 수 있다.

[83] 또한, 각 위치에서 20개 아미노산 모두를 사용하여 가변 중쇄 및 경쇄의 CDR 영역을 무작위화함으로써 다양성을 발생시킬 수 있다. 20개의 모든 아미노산을 사용하면 다양성이 큰 변이체 항체 서열이 생성되고 신규한 항체를 확인할 기회가 증가할 수 있다.

[84] 본 발명에서 사용되는 용어 "뉴로필린" 또는 NRP는 집합적으로 뉴로필린-1 (NRP1, neurophilin 1), 뉴로필린-2 (NRP2) 및 그들의 이소형 및 변이체를 포함한다. 뉴로필린은 120 내지 130 kDa 비-티로신 키나제 수용체이다. 다수의 NRP-1 및 NRP-2 스플라이스 변이체 및 가용성 이소형이 있다. 뉴로필린의 기본 구조는 5개 도메인을 포함한다: 3개의 세포외 도메인 (a1a2, b1b2 및 c), 막관통 도메인 및 세포질성 도메인. a1a2 도메인은 2개의 디설파이드 브릿지를 형성하는 4개의 시스테인 잔기를 일반적으로 함유하는 보체 성분 C1r 및 C1s (CUB)와 상동성이다. b1b2 도메인은 응고 인자 V 및 VIII와 상동성이다. c 도메인의

중양부는 메프린 (meprin), A5 및 수용체 티로신 포스파타제 μ 단백질과의 상동성 때문에 MAM으로서 명명된다. a1a2 및 b1b2 도메인은 리간드 결합에 책임이 있는 반면, c 도메인은 동중-이량체화 또는 이중-이량체화에 있어 결정적이다.

- [85] "뉴로필린-1 매개 생물학적 활성"은 뉴로필린-1이 실질적 역할을 하는 생리적 또는 병리학적 상태를 의미한다. 예를 들어, 배아 신경계 발생 또는 신경 세포 재생 동안의 액손 안내, 혈관형성 (혈관 재형성 포함), 종양 생성 및 종양 전이일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [86] 본 발명의 항체는 단일클론 항체, 다특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 항체는 항체의 항원 결합 단편 또는 항체 단편을 포함하며, 상기 단편은 단쇄 Fvs(scFV), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 다이설파이드-결합 Fvs(sdFV) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체를 포함할 수 있다.
- [87] 상기 단일클론 항체는 실질적으로 동질적 항체 집단으로부터 수득한 항체, 즉 집단을 차지하고 있는 개개의 항체가 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생적 돌연변이를 제외하고는 동일한 것을 지칭한다. 단일클론 항체는 고도로 특이적이어서, 단일 항원 부위에 대항하여 유도된다.
- [88] 상기 "인간화" 형태의 비-인간 (예: 무린) 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는, 수용자의 초가변 영역으로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 중 (공여자 항체), 예를 들어 마우스, 랫트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 초가변 영역으로부터의 잔기로 대체시킨 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다.
- [89] 상기 "인간 항체"는 인간 면역글로불린으로부터 유래하는 분자로서 상보성 결정영역, 구조 영역을 포함한 항체를 구성하는 모든 아미노산 서열 전체가 인간의 면역글로불린으로 구성되어 있는 것을 의미한다.
- [90] 중쇄 및/또는 경쇄 일부가 특별한 종으로부터 유래되거나 특별한 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 나머지 쇄(들)는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 "키메라" 항체 (면역글로불린)뿐 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 상기 항체의 단편이 포함된다.
- [91] 본원에 사용된 바와 같은 "항체 가변 도메인"은 상보성 결정 영역 (CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3), 및 골격 영역 (FR)의 아미노산 서열을 포함하는 항체 분자의 경쇄 및 중쇄 부분을 지칭한다. VH는 중쇄의 가변 도메인을 지칭한다. VL은 경쇄의 가변 도메인을 지칭한다.
- [92] "상보성 결정 영역" (CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3)은 항원 결합을 위해 필요한 존재인, 항체 가변 도메인의 아미노산 잔기를 지칭한다. 각 가변

도메인은 전형적으로, CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 확인된 3개의 CDR 영역을 갖는다.

- [93] "골격 영역" (FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각 가변 도메인은 전형적으로, FR1, FR2, FR3 및 FR4로서 확인된 4개의 FR을 가진다.
- [94] 본 발명은 (i) NRP1을 과발현하는 환자 유래 세포에 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 라이브러리를 처리하여, NRP1에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 스크리닝하는 단계를 포함한다.
- [95] 상기 환자 유래 세포는 예를 들어, 암 환자 유래의 세포일 수 있으며, 암 환자 유래의 암세포는 정상세포와 상이한 생리학적 특징을 나타내고, 이러한 생리학적 특징은 정상세포와 비교하여 암세포 특이적으로 NRP1의 발현이 증가하거나 감소하는 유전자의 발현양상에 의해 결정되며, 이러한 유전자의 발현 양상은 환자 특이적이거나 또는 환자의 조직 특이적인 차이를 나타낼 수 있다.
- [96] 상기 환자 유래 세포 및 정상 세포의 NRP1 함유량을 측정하는 방법은 NRP1을 코딩하는 유전자 또는 단백질의 발현량을 측정하여 비교하는 것을 특징으로 할 수 있고, 바람직하게는 FACS, ELISA, Whole exome sequencing 및 RNA sequencing으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 방법으로 수행되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [97] 본 발명에서 라이브러리는 항체 및/또는 그의 항원 결합 단편의 집합으로, 스크리닝을 위해 디스플레이될 수 있으며, 전장 항체로 제작될 수 있다. 상기 라이브러리에서 항체 및/또는 그의 항원 결합 단편은 예를 들어 리보솜, 파지, 또는 세포 상에 디스플레이될 수 있다.
- [98] 본 발명에 있어서, 상기 환자 유래 세포는 고형암 환자에서 유래한 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 고형암은 간암, 교모세포종, 난소암, 대장암, 두경부암, 방광암, 신장세포암, 위암, 유방암, 전이암, 전립선암, 췌장암 및 폐암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [99] 상기 환자 유래 세포의 수득방법은 제한되지 않으나, 예를 들어 (a) 분리된 암 환자유래 암 조직을 분쇄한 다음, 상기 분쇄물에서 세포분획을 수득하는 단계; 및 (b) 상기 수득된 세포분획을 단백질 분해효소로 처리한 다음, 여과 및 원심분리하고 현탁하여 단세포화 하는 단계를 포함할 수 있다.
- [100] 본 발명에서 상기 단백질 분해효소는 단백질 가수분해 (proteolysis)를 수행할 수 있는 효소를 의미할 수 있으며, 단백질 내 아미노산을 연결하는 펩타이드 결합을 가수분해하는 단백질 이화작용을 통해 단백질을 분해하는 엔도펩타다아제 (endopeptidase) 및 단백질의 N-말단 또는 C-말단에서부터 펩타이드 결합을 가수분해하는 엑소펩타다아제 (exopeptidase)를 포함할 수 있다.
- [101] 본 발명은 또한, 상기 스크리닝된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 NRP1이

발현되지 않는 환자 유래 세포에 처리하는 단계를 포함한다.

- [102] 상기 단계 (ii)는 단계 (i)에서 선택된 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 대한 음성 선별 (negative selection) 하기 위한 단계로, (iii) 상기 (i)에서 선별된 항체 또는 그의 항원 결합 단편 중에서 (ii)의 환자 유래 세포에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 분리·제거하는 단계를 포함함으로써, 이를 통해 항원에 대해 높은 선택성을 갖는 항체를 스크리닝할 수 있다.
- [103] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (ii)의 NRP1이 발현되지 않도록 제거된 환자 유래 세포는 자연적으로 NRP1을 발현하지 않는 세포일 수 있고, NRP1이 발현되지 않도록 인위적으로 조작한 환자 유래 세포일 수 있으며, 인위적으로 조작하는 방법은 NRP1이 발현되지 않도록 만드는 방법이면 어떤 방법이든 사용할 수 있으나, 바람직하게는 NRP1에 결합하는 압타머, siRNA, single-stranded siRNA, microRNA, 및 shRNA로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 처리하여 수득되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [104] 본 발명에서, 상기 NRP1이 발현되지 않는 환자 유래 세포를 이용하여 NRP1에 결합하는 항체만을 선별하는 단계는 음성 선별과정으로서, 바로 앞의 양성 선별단계 다음에 수행되어 선별된 항체의 NRP1에 대한 정확도를 향상시키는 효과가 있다.
- [105] 경우에 따라서, 상기 단계 (ii) 중 또는 상기 단계 (ii) 이후 4°C에서 파지 디스플레이를 수행한 다음, 온도를 37°C로 상승시켜, 세포 내로 내재화되는 항체를 선별하는 과정을 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이를 통해 세포 내로 내재화되는 항체를 스크리닝할 수 있다.
- [106] 상기 분리·제거는 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 이용 가능하지만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [107] 상기 분리·제거는 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 불순물을 제거하고, 그 결과물을 예를 들어 친화 크로마토그래피 등을 이용하여 정제할 수 있다. 추가의 기타 정제 기술 예를 들어 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피 등이 사용될 수 있다.
- [108] 본 발명은 다른 관점에서, (i) NRP1을 발현하는 환자 유래 세포에 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 라이브러리를 처리하여, NRP1에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 1차 스크리닝하는 단계; (ii) 상기 1차 스크리닝된 항체 또는 그의 항원 결합 단편 라이브러리를 NRP1이 발현되지 않는 환자 유래 세포에 처리하는 단계; (iii) 상기 NRP1을 과발현하는 환자 유래 세포가 이식되어 있는 동물모델에 상기 (i)에서 선별된 항체 또는 그의 항원 결합 단편 중에서 (ii)의 환자 유래 세포에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 분리·제거한 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여하여, 항원 단백질에 결합하는 항체 또는

그의 항원 결합 단편을 2차 스크리닝하는 단계; 및 (iv) 상기 2차 스크리닝된 항체 또는 그의 항원 결합 단편 중에서 NRP1 이외의 항원에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 분리·제거하는 단계를 포함하는, NRP1에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

- [109] 앞서 설명한 스크리닝 방법에서 설명된 구성과 동일한 구성에 대한 설명이 동일하게 적용될 수 있다.
- [110] 본 발명의 다른 실시예에서는 다양한 암에서 발현되는 것으로 알려진 NRP1(neurophilin 1)에 결합하여 세포내로 내재화되는 항체를 선별하기 위하여, 교모세포종 환자로부터 유래한 세포에 기반한 과지 디스플레이를 수행한 다음, 1차 선별한 항체 후보군을 환자 유래 세포를 포함하는 면역결핍마우스에 주입하여, 생체 내에서 2차 스크리닝을 수행하였다. 그 결과, 선별된 항-NRP1 항체가 암세포 표면에 발현된 NRP1에 결합된 후, 세포 내로 내재화됨을 확인하였으며(도 9a 내지 9c), 항체의 결합 에피토프가 기존의 항체와 상이한 것을 확인하였다(도 10).
- [111] 본 발명은 특히, (iii) 상기 NRP1을 과발현하는 환자 유래 세포가 이식되어 있는 동물모델에 상기 (i)에서 선별된 항체 또는 그의 항원 결합 단편 중에서 (ii)의 환자 유래 세포에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 분리·제거한 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여하여, NRP1에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 2차 스크리닝하는 단계를 추가로 포함한다.
- [112] 상기 단계를 포함하는 본 발명에 따른 스크리닝 방법을 통해, NRP1을 과발현하는 환자 유래 세포를 이식한 동물모델을 통해 환자의 특성을 충분히 반영할 수 있게 됨으로써, 환자 맞춤형 치료제의 선별 및 치료 방법의 선택 등에 유용하게 사용할 수 있을 뿐 아니라, 환자 특성에 특히 적합한 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 높은 선택도로 선별할 수 있게 된다.
- [113] 본 발명에 있어서, NRP1을 과발현하는 환자 유래 세포가 이식되어 있는 동물모델은 환자 유래 세포를 포함하는 동물이면 모두 가능하나, 바람직하게는 면역결핍 마우스인 것을 특징으로 할 수 있고, "면역 결핍된 마우스"는 교모세포종이 발병될 수 있도록 면역시스템을 구성하는 일부 구성요소를 유전자 수준에서 인위적으로 손상시켜서 정상적인 면역시스템이 구현되지 않도록 조작하여 제조된 마우스를 의미한다. 가장 바람직하게는 누드 마우스, NOD(non-obese diabetic) 마우스, SCID(Severe combined immunodeficiency) 마우스, NOD-SCID 마우스 또는 NOG(NOD/SCID Il2rg-/-) 마우스인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [114] 본 발명에 따른 방법을 통해 예를 들어 환자 유래 세포에서 과발현되는 NRP1에 결합하는 항체를 스크리닝할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 항체는 예를 들어, NRP1의 VEGF165 도메인에 결합하는 항체일 수 있으나, 이는 NRP1의 VEGF165 도메인에 결합하는 항체로 알려진 종래의 항체(예를 들어, Genetech社의 MNRP1685A 항체)와 결합하는 에피토프가 상이할 수 있다.

- [115] 본 발명에 의해 선별된 항체 또는 이의 결합 단편은 예를 들어 IgG 형태, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fab 단편, Fv 단편, 또는 단일 사슬 Fv 단편(scFv)일 수 있으나, 바람직하게 IgG 형태로 제작될 수 있다.
- [116] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 방법으로 스크리닝된 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 관한 것이다.
- [117] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 NRP1을 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 본 발명의 항-NRP1 항체뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물도 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [118] 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스(hydrophobic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신(+4.5); 발린(+4.2); 루이신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스테인(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글라이신(-0.4); 쓰레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 타이로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).
- [119] 단백질의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유 할 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [120] 한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌(+3.0); 라이신(+3.0); 아스파르테이트(+3.0 $\pm$ 1); 글루타메이트(+3.0 $\pm$ 1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글라이신(0); 쓰레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5 $\pm$ 1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 루이신(-1.8); 아이소루이신(-1.8);

타이로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4).

- [121] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu 및 Asp/Gly 간의 교환이다.
- [122] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 항체 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열번호에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 61%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)은 NCBI 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [123] 본 발명에 있어서, NRP1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 스크리닝하는 방법인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [124] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [125] 본 발명은 예를 들어, (a) 본 발명에 따른 NRP1에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물일 수 있다. 본 발명은 또한, 환자에게 필요한 유효량으로 본 발명에 따른 NRP1에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.
- [126] 상기 조성물은 상술한 본 발명의 항-NRP1 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 반복 기재에 따른 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [127] 하기의 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명에 따른 항-NRP1 항체는 NRP1을 발현하는 암세포의 이동을 억제할 수 있다. 이와 같이 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 NRP1에 높은 친화도로 결합하여 NRP1을 과 발현하는 암세포의 이동을 억제할 수 있으므로, 암의 예방 및 치료에 사용 가능하다.
- [128] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 방법에 의해 선별된 항-NRP1 항체는 암세포 특이적인 내재화(실시예 9)를 나타낼 수 있고, 세포사멸 효과 증가

및 고평암 예를 들어 교모세포암 및 폐암에서 목적하는 중앙 성장 억제 효과를 나타낼 수 있음(실시예 11)을 확인하였다. 특히, 본 발명에 따른 방법에 의해 선별된 항-NRP1 항체는 정상조직에 결합력이 낮거나 거의 없음을 확인함으로써, 부작용을 최소화할 수 있음을 예상할 수 있다(실시예 12).

- [129] "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 암을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 암의 발전의 억제, 암의 경감 또는 암의 제거를 의미한다.
- [130] 상기 조성물에 적용되는 질환인 암은 NRP1을 과발현하는 암이고, 예를 들어 교모세포종, 성상세포종, 신경교종, 신경아세포종, 고환암, 대장암, 흑색종, 췌장암, 폐암, 유방암, 식도암 및 전립선암 등일 수 있다.
- [131] "NRP1을 과발현하는 암"은 동일한 조직 유형의 비-암성 세포와 비교하여 유의적으로 더 높은 수준으로 NRP1을 암 세포표면에 갖고 있는 암을 의미한다.
- [132] 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [133] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장 내 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [134] 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 약제학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [135] 본 발명에 따른 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-100 mg/kg이다. 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 암을 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [136] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이 때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제,

과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [137] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [138]
- [139] 실시예 1. 환자 유래 세포를 이용한 내재화(internalizing) 항체 1차 동정
- [140] 항-NRP1 항체 단편 동정 위한 세포 패닝(cell panning)에 필요한 세포를 선별하기 위해 사업단(삼성서울병원 난치암연구사업단)에서 보유하고 있는 환자 유래 세포들의 NRP1 발현 수준을 RNA-Seq 이후, RPKM(Reads Per Killobase Million) 방법으로 분석하였고(도 12), culture 유무와 FACS(Fluorocence Activated Cell Sorting) 방법으로 선별하여 환자 유래 세포를 세포 패닝에 이용하였다.
- [141] 기존에 제작된 합성 scFv 항체 단편 파지 라이브러리(Yang et al., Mol. Cells. 27:225-235, 2009)를 이용하여 인간 NRP1에 결합하는 scFv 항체 단편을 파지 디스플레이 스크리닝을 통해 동정하였다. 대장균 숙주 ER2537 내에 도입되어 있는 파지미드(phagemid) 벡터를 파지(phage) 형태로 회수하기 위해 4개의 하위 라이브러리 샘플을 각 400 ml의 배양배지(SB/암피실린/2% 글루코오스)에서 2시간 동안 배양하였다. O.D₆₀₀에서 흡광도가 0.5-0.7 정도되면 5000 g에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 제거한 후 400 ml의 2차 배양배지(SB/암피실린) 내내부유시킨 다음, 1012 pfu(plaque forming unit)의 헬퍼 파지(VCSM13)를 첨가하여 1시간 동안 배양하였다. 그 다음 카나마이신 항생제(헬퍼 파지 내 도입된 항생제 유전자)를 70 µg/ml 첨가한 후 30°C에서 밤샘 배양을 하여 파지 라이브러리가 숙주세포 외로 분비될 수 있도록 하였다. 이어 원심분리를 통해 얻은 배양물을 PEG(polyethylene glycol) 용액을 이용해 파지 형태만 침전시켜 파지 라이브러리를 얻었다.
- [142] 이렇게 얻어진 파지 라이브러리와 NRP1 발현이 높은 환자 유래 세포(4 X 10⁶)를 섞어 총 5 ml NBA(neurobasal medium)에 넣고, 4°C의 회전기에 고정시킨 후 1-2시간 동안 360도로 회전시켰다. 그 다음 환자 유래 세포에 결합하지 않은 파지입자들을 제거하기 위해 300 g에서 5분간 원심분리하여 세포를 분리시킨 후 다시 5 ml NBA를 넣는 세척 과정을 진행하였다. 이 과정을 4차례 반복하였고, 마지막 과정에서는 미리 37°C의 인큐베이터에 둔 NBA 5 ml를 사용하여 환자 유래 세포와 파지들을 T 플라스크에 넣어 37°C에서 30분간 배양시켜 세포 표면에 붙은 파지입자들이 내재화(internalization)을 통해 세포 내로 들어가게 유도하였다.
- [143] 그 다음 15 ml 튜브(conical tube)에 옮긴 후 300 g에서 5분간 원심분리시켜 세포를 분리시킨 후, 차가운 PBS(Phosphate buffered saline) 5 ml을 넣는 세척 과정을 6번 반복하여 수행하고, 세포 패닝 회차가 거듭될수록 이 과정의 횟수를 증가시켰다. 이후, 0.1 M 글리신(pH 2.2) 5 ml를 넣고, 상온에서 5분간 두어 세포 표면에 있는 파지입자들을 세포 표면으로부터 분리시켰다. 이후, 300 g에서

5분간 원심분리시켜 세포만 분리하여 0.5 ml 100 mM TEA를 넣고, 이를 e-튜브에 옮겨 상온에서 15분간 두었다. 다음으로, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리시켜 세포 찌꺼기를 분리하여 세포 안에 있는 파지 입자들이 있는 상층액을 따서 1 ml 2M Tris(pH 8)와 섞어 중화시킨 후, 미리 키워놓은 ER2537이 들어있는 8.5 ml의 배양배지(SB)에 넣고, 37°C에서 120 rpm으로 배양시켜 파지입자들을 대장균 숙주인 ER2537에 감염시켰다. 이후, 3,000 rpm으로 15분간 원심분리시켜 가라앉은 ER2537을 배양배지(SB) 500 μ l로 섞은 후, 15 cm 배양배지에 도말하여 배양 후 5ml의 SB 배양배지(50% 글리세롤)를 첨가하여 콜로니들을 회수 및 보관(-80°C)하였다. 이어 반복되는 세포 패닝 회차를 진행하기 위해 보관된 전 회차 파지 용액 중 1 ml를 취해 파지 입자 증폭 작업을 수행하였다. 숙주세포인 ER2537에 배양 후 헬퍼 파지를 넣어 회수된 파지입자들은 PEG 침전을 통해 분리하였고, 이를 다음 회차 패닝 때도 동일하게 사용하였다. 3회차 패닝을 수행하였고, 이러한 세포 패닝 과정은 도 2에 나타내었다. 회차가 거듭될수록 패닝 전 대비 후의 파지입자의 비율이 증가됨을 확인하였고, 이는 세포 패닝을 거쳐 내재화된 파지입자들이 증폭됨을 의미하며, 이의 결과를 표 1에 나타내었다.

[144]

[145] [표1]

환자 유래 세포를 이용한 세포 패닝

	Input	Wash	Output	Out/Input
1 round	1.1×10^{13}	2.2×10^4	2.7×10^3	$2.5/10^{10}$
2 round	2.5×10^{13}	5.0×10^3	1.32×10^5	$5.28/10^9$
3 round	1.5×10^{13}	3.1×10^4	1.49×10^6	$9.93/10^7$

[146]

[147] 실시예 2. 항-NRP1 항체 단편 후보 선별을 위한 ELISA 및 서열 분석

[148] 3회차 세포 패닝에서 회수된 파지 입자들을 숙주세포(ER2537) 감염을 통해 배양배지에서 콜로니로 확인하였다. 이 콜로니들을 취하여 200 μ l SB/암피실린 배양배지가 담긴 96-웰 플레이트에 접종 후 37°C 2-3시간 동안 배양하였다.

[149] 그 다음, scFv-pIII 단백질 발현 유도를 위해 각 웰에 최종농도 1 mM의 IPTG(Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)를 처리하고 30°C에서 밤샘 배양하였다. 배양한 플레이트는 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 배양세포 주변세포질(periplasm) 내에 있는 파지입자를 회수하기 위해 각 웰 당 40 μ l의 TES 용액(20% w/v 수크로오스, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 넣고, 4°C에서 30분 동안 정치함으로써 세포를 용해시켰다. 이후 60 μ l의 0.2X TES 용액을 처리하여 4°C에서 30분 동안 두어 삼투압으로 세포를 분해시킨 다음, 플레이트를 3,000 rpm 15분간 원심분리시켜 상층액의 scFv-pIII 단백질을

얻었다.

- [150] 미리 준비한 인간 NRP1 단백질이 코팅된 96-웰 플레이트에 얻은 상층액 중 25 μ l를 각 해당 웰에 첨가한 후 1시간 동안 실온에서 결합시킨 다음, TBST와 증류수를 이용해 6번 세척하였다. 이후, scFv-pIII의 HA tag에 결합할 수 있는 HRP가 결합된 항-HA 항체를 이용해 1시간 동안 실온에서 결합시킨 후, 다시 TBST(0.1% Tween20)와 증류수를 이용해 6번 세척하였다. TMB 용액을 이용한 발색반응을 유도한 후 H_2SO_4 용액으로 발색반응을 멈추고, O.D 450 nm에서 그 값을 측정하였다.
- [151] 총 분석된 클론 수는 384개였고, 이 중 41개의 클론(결합능배수 > 2)이 인간 NRP1에 대한 높은 결합능을 보였다. 대조군으로는 BSA 용액이 사용되었으며, 이 41개 클론 중 재확인 ELISA를 통해서 결합능이 높은 10개의 클론들을 선택하였다. 이후, 10개의 클론들로부터 파지미드를 회수한 다음 DNA 서열분석을 진행하였고, 총 6개의 다른 서열을 지닌 클론들을 선별하였다. 1C08과 동일한 서열인 3H10을 제외하고는 각 다른 서열을 지닌 클론들이 선별되었고, 최종적으로 3H10, 1A03 및 4F12 클론을 항-NRP1 항체 단편 후보로 선택하였다. 3H10, 1A03 및 4F12 클론의 아미노산 서열을 표 2 및 표 3에 나타내었다.
- [152]

[153] [표2]

항-NRP1 항체 단편 중쇄 FR/CDR 서열

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1A03	EVQLLE SGGGL VQFGGS LRLSQA AS	GFTFSS YY	MSWVR QAFGK GLEWV SA	ISFGSSN K	YYADS VQGRFT ISRDNS KNTLYL QMNEL RAEDT AVYYC	ARRKK SFDY	WGQGT LVTVSS
3H10	EVQLLE SGGGL VQFQQS LRLSQA AS	QFTFSS YY	MSWVR QAFGK GLEWV SA	ISPGSSN K	YYADS VKGRFT ISRDNS KNTLYL QMNEL RAEDT AVYYC	ARRKY MFDY	WGQGT LVTVSS
4F12	EVQLLE SGGGL VQFGGS LRLSQA AS	GFTFSG YA	MSWVR QAFGK GLEWV SG	ISPGSGS T	YYADS VKGRFT ISRDNE KNTLYL QMNEL RAEDT AVYYC	AKRKT RFDY	WGQGT LVTVSS

[154]

[155] [표3]

항-NRP1 항체 단편 경쇄 FR/CDR 서열

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1A03	QSVLTQ FFSASG TPGQRV TISCSGF	SSNIGN ND	VSWEYQ QLFGTA PKLLIY	SCN	NRPSGV PDRFSG SKSGTS ASLAIS GLRSSD EADYY C	GAWVA SLSAYV	FGGGT KLTVTTL
3H10	GSVLTQ PPSASG TPGQRV TISCTG E	SSNIGN ND	VYWEYQ QLPGTA FKLLIY	SQS	NRPSG MPDRFS GSKSGT SASLAI SGLRSE DEADY YC	ASWDS SLSGYV	FGGGT KLTVTTL
4F12	QSVLTQ FFSASG TFGRRV TISQSG S	SSNIGN NE	VYWEYQ QLPGTA PKLLIY	ANN	KRFSG MPDRFS GSKEGT SASLAI SGLRSE DEADY YC	AAWDS SLNGY V	FGGGT KLTVTTL

[156]

[157] 실시예 3. 환자 유래 세포를 이용한 내재화(internalizing) 항체 2차 동정

[158] 실시예 1에서 3회차 세포 패닝에서 회수한 후보 항체들을 실시예 1에서 사용한 환자 유래 세포가 피하 이식된 마우스에 intra-tumoral injection을 통해 주입시켰다.

[159] 20시간이 지난 다음, 마우스를 희생하여 암 조직을 단세포 단위로 분리한 다음, 세포 내에 내재화된 항체 단편을 얻어 실시예 2의 방법과 같이 ELISA를 통해 분석하였다.

[160] 이러한 생체 내 세포 패닝 과정을 도 3에 나타내었다. 회차가 거듭될수록 패닝 전 대비 후의 파지입자의 비율이 증가됨을 확인하였고, 이는 세포 패닝을 거쳐 내재화된 파지입자들이 증폭됨을 의미하며, 이의 결과를 표 4에 나타내었다(단위: cfu/ml).

[161]

[162] [표4]

	Input	Binding & no-internalization	Output	Output/Input
1 round	2.4×10^{13}	3×10^6	8×10^4	$3.3/10^9$
2 round	3.5×10^{15}	1.8×10^7	1.2×10^5	$3.4/10^{11}$
3 round	2.5×10^{15}	2.0×10^8	2.4×10^5	$9.6/10^9$

[163]

[164] 실시예 4. 항-NRP1 항체 단편 생산 및 NRP1 결합능 확인

[165] 파지미드의 기본 구성은 도 4에서 확인할 수 있으며, 위의 실시예에서 사용된 숙주세포 ER2537의 경우 phage pIII 앞에 위치한 전사억제 코돈(amber codon(UAG))을 억제하기 때문에 scFv 단독 발현이 불가능하다. 따라서 비억제 숙주(non-suppressor strain)인 발현균주(TOP10F')를 이용하여 파지미드를 발현균주내로 형질도입 하였다. 이후, DNA 서열분석을 통해 각 파지미드가 돌연변이 없이 도입된 발현균주임을 확인하였고, 이 발현균주를 콜로니로 취한 다음 LB/암피실린 배양배지 3 ml에 접종 후 37°C에서 밤샘 배양하였다. 이후, 밤샘 배양시킨 배양액 3 ml은 400 ml 배양배지(SB/암피실린)로 옮겨 O.D₆₀₀에서 0.5-0.7이 될 때까지 배양하였고, 최종 농도 1 mM IPTG를 첨가하여 30°C에서 밤샘 배양하였다. 배양액은 원심분리 후 TES 용액 40 ml을 이용하여 발현숙주를 용해시킨 후, 0.2X TES 60 ml을 투입해 세포주변질 내 파지입자를 회수하였고, 회수한 상층액은 0.45 μ m 필터를 통해 여과하였다. 여과된 용액 내에 존재하는 scFv 단백질은 His-tag 정제를 위해 Ni-NTA bead(Qiagen) 1 ml이 첨가되어 상온에서 1시간 결합되었고, 이후 중력 컬럼(gravity column, Bio-rad)에 패킹되어 200 mM 이미다졸 용액을 통해 회수하였다. 각 클론의 발현 및 정제 후 SDS-PAGE 및 쿠마시 염색(coomassie blue staining)을 통해 scFv 해당 크기인 약 28 kDa을 확인하였다(도 5).

[166] 정제된 scFv를 이용해 ELISA를 진행하여 표적 NRP1에 대한 결합능이 존재하는지 확인하였다. ELISA(3번 반복)로 200 ng NRP1 단백질을 코팅한 96웰과 대조군인 BSA 200 ng을 코팅한 96웰에 각 클론 당 5 μ g/ml 수준으로 상온에서 1시간 동안 결합시켰다. 이후, 0.1% TBST를 이용해 3회 세척한 다음 HRP가 결합된 HA 항체를 1시간 동안 처리하고, 다시 한 번 세척한 후 TMB 용액으로 5분간 정치시켰다. 그리고, 2M 황산용액으로 발색반응을 정지시킨 후 OD 값을 측정하였다.

[167] 측정 결과, NRP1에 결합하지 않는 12B scFv에 비해 1A03, 3H10 및 4F12 scFv는 NRP1에 대한 특이적인 결합능을 보였다(도 6).

- [168] 다음으로, 인간 NRP1에 대한 각 항체 단편의 농도에 따른 결합능을 측정하기 위하여, 각각 200 ng의 NRP1 또는 BSA가 코팅된 96웰에 각 scFv를 2,000ng/ml, 1,000 ng/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62.5 ng/ml, 31.25 ng/ml 또는 15.62 ng/ml 농도로 처리하여 OD 값 변화를 분석하였다. NRP1에 대한 결합능에 있어, 12B scFv의 경우에는 농도 변화에 따른 OD 값의 변화가 없는 반면, 1A03, 3H10 및 4F12 scFv의 경우에는 고농도로 갈수록 BSA 대비 NRP1에 결합한 scFv가 증가함을 OD 값 변화를 통해 확인할 수 있었다(도 7).
- [169] 3종의 scFv 항체 단편의 NRP1 단백질에 대한 결합능의 세기를 수치화를 통해 정확하게 알아보고자 표면 플라즈몬 공명(SPR, surface Plasmon resonance) 장비인 biacore T100을 이용해 k_a 와 k_d 값을 통한 최종적인 KD 값을 얻었다. KD 값은 k_d 값을 k_a 값으로 나눈 값으로 낮을수록 해당 물질에 대한 결합능이 크다. 분석 결과, 4F12 scFv의 경우 KD(M) 값이 73.60×10^{-9} 로 가장 낮았고, 이어 1A03 scFv는 89.40×10^{-9} 의 KD(M) 값을 나타냈으며, 3H10 scFv는 295.4×10^{-9} 의 KD(M) 값을 나타내었다(도 8).
- [170]
- [171] 실시예 5. NRP1 과발현 세포주를 이용한 항-NRP1 항체 단편 결합능 확인
- [172] 인간 NRP1 단백질에 대한 결합능을 ELISA로 확인한 뒤 실제 세포막에 존재하는 NRP1에 결합하는지 알아보기 위하여, NRP1 발현이 높은 환자 유래 세포를 이용하여 FACS 분석을 하였다. 각 scFv 당 5×10^5 개의 환자 유래 세포와 4°C에서 대략 1시간 결합시킨 후 FACS 용액 1ml로 3번 세척하였다. 이후 붉은색 형광(PE; phycoerythrin)이 결합된 HA 항체를 1 μ g 처리하고 4°C에서 30분간 결합시켰다. 이어 FACS 용액 1 ml로 3번 세척한 뒤 FACS Calibur™ 시스템을 통해 분석하였다.
- [173] 분석 결과, PE가 결합된 HA 항체와 12B를 처리한 세포에 비해 1A03, 3H10 및 4F12 등 3종의 항체 단편은 모두 NRP1이 과발현된 세포주에 특이적으로 결합하였다(도 9).
- [174]
- [175] 실시예 6. 항-NRP1 항체 단편의 NRP1 과발현 암세포 내 투과능 확인
- [176] 3종의 항-NRP1 항체 단편의 경우 세포 내 투과성을 세포면역형광염색법으로 확인하였다. 챔버 슬라이드에 PD-라이신 용액을 넣어 상온에서 1-2시간 동안 코팅시켰다. 이후, 용액을 제거한 후 슬라이드를 건조시켰다. 다음으로, 5×10^4 개의 환자 유래 세포가 들어있는 NBA 용액 200 μ l를 슬라이드에 처리한 후, 37°C에서 4-5시간 동안 배양하여 슬라이드에 고정시켰다. 다음으로 NBA 용액을 제거하고, 4% 파라포름알데하이드를 넣어 4°C에서 10분간 고정시켰다. 이후 PBS로 3번 세척과정을 거친 후, 0.1% Triton X-100을 처리한 세포투과도 증진 작업을 수행했다. 이후, NRP1 단백질의 염색을 위해 항-인간 NRP1 항체(R&D)와 동시에 항-NRP1 항체 단편을 처리하여 37°C에서 15/30/60분으로 나누어 결합시켰다. PBS로 3번 세척과정을 거친 후 비특이적인 결합을 막기 위해 1%

BSA 용액으로 실온에서 1시간 정도 블로킹하였다. 2차 항체로는 NRP1 단백질을 보기 위하여 녹색 형광(Alexa-Fluor 488)이 표지된 염소 항-생쥐 항체(Invitrogen)를 처리하였고, 항-NRP1 항체 단편을 보기 위한 항-HA 항체(Santacruz biotechnology)를 처리하고 상온에서 1시간 결합시켰다. 마지막으로 핵을 염색하기 위한 DAPI 염색을 수행한 후 최종 세척 후 유리 덮개를 슬라이드 위에 고정시킨 다음, 공초점 레이저 주사현미경을 이용하여 관찰하였다.

- [177] 그 결과, 3종의 항-NRP1 항체 단편 모두에서, 15분과 30분에서는 표면에 붙은 항-NRP1 항체 단편과 세포 내로 삽입된 항-NRP1 항체 단편들이 섞여 있었지만 60분 정도 경과하였을 때는 거의 대부분의 항-NRP1 항체 단편들이 세포 내로 투과하여 삽입된 것을 확인할 수 있었다(도 10a 내지 10c). 특히, 1A03과 3H10보다는 4F12 항체 단편이 상대적으로 세포 투과성이 시간 변화에 따라 두드러지게 나타났다(도 10a). 이러한 결과는, 본 발명의 항체를 특정 단백질 발현 억제를 위한 물질 또는 치료/진단용 화학약물 등을 암세포 내로 전달시킬 목적으로 이용할 수 있음을 보여준다.

[178]

- [179] 실시예 7. 항-NRP1 항체 단편에서 항-NRP1 IgG 로의 transform

- [180] 항-NRP1 항체 단편을 IgG 형태로 형태 전환을 위해 NRP1 항체 단편의 중쇄서열과 경쇄서열의 유전자를 Expi 293F 발현시스템(life technologies)을 이용해 형질주입 하였다. 배양액에 있는 항-NRP1 IgG항체를 얻기 위해 AKTA 단백질 정제 시스템과 Amicon 원심분리 필터를 이용해 정제를 하였고, 생산량은 IRCR-101(IgG 형태로 전환한 3H10)은 120mg/L, 1A03은 66mg/L, 4F12는 15mg/L이었다. 정제한 항-NRP1 항체의 순도를 확인하기 위해 고속액체 크로마토그래피를 도입하였다. IgG의 크기가 150kD이므로 마커 피크에서 16.388분에서 나오는 물질에 해당한다. 3종의 항-NRP1 IgG항체가 이 피크에서 검출되었고, 순도는 99.5, 99.4, 99.5%에 해당하였다(도 13). 생산된 3종의 항-NRP1 IgG항체의 endotoxin 수치를 알아보기 위해 Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL-1000™ kit을 이용하였다. 분석한 결과 3종의 항체는 0.5-3.1EU/mg 정도로 치료용 단백질의 endotoxin 정상수치에 해당되었다(도 14).

- [181] 3종의 항-NRP1 IgG항체를 이용하여 인간 NRP1에 대한 결합력을 ELISA와 SPR analysis를 통해 분석해본 결과 1A03, IRCR-101, 4F12 순서로 결합력이 강함을 확인하였다. 특히 4F12의 경우 현재 치료용 항체 수준의 결합력인 0.6nM의 KD값을 가졌다(도 15). 인간 NRP1과 비슷한 구조를 지닌 다른 단백질과 비교함으로써 인간 NRP1에 대한 특이적 결합력을 분석해본 결과 3개의 항-NRP1 IgG항체 모두 인간 NRP1에만 결합함을 확인하였다(도 16).

[182]

- [183] 실시예 8. 항-NRP1 IgG항체 결합 에피토프 확인

- [184] MNRP1685A의 결합 도메인이 VEGF 도메인이기 때문에 MNRP1685A를 양성

- 대조군으로 사용하였다. 96well plate에 각 well당 hNRP1 protein을 coating시킨 후 500nM의 IRCR-101과 MNRP1685A를 25°C에서 1시간 결합시키고, PBST로 washing한 다음, biotin을 결합시킨 VEGF, Sema3A를 상온에서 15분 결합시켰다.
- [185] 상기 plate를 PBST로 washing한 후, streptavidin-HRP 항체를 넣어 TMB 발색 반응을 ELISA로 확인한 결과, MNRP1685A 및 IRCR-101 모두 VEGF165 binding domain에 결합하는 것을 확인할 수 있었다(도 11 왼쪽 패널).
- [186] 양성 대조군과 IRCR-101의 결합 에피토프를 확인하기 위해, 96well plate에 각 well당 200ng hNRP1 protein을 coating시킨 후, 500nM의 IRCR-101과 MNRP1685A를 25°C에서 1시간 결합시킨 후, PBST로 washing하고, biotin을 결합시킨 다음 IRCR-101, MNRP1685A를 상온에서 15분 결합시켰다.
- [187] 상기 plate를 PBST로 washing한 다음, streptavidin-HRP 항체를 넣어 TMB 발색반응을 ELISA로 확인한 결과, 대조군과 IRCR-101의 결합 에피토프가 서로 상이한 것을 확인할 수 있었다(도 11 오른쪽 패널).
- [188]
- [189] 실시예 9: 암세포와 정상세포를 이용해 암 특이적인 내재화 (Internalization) 및 결합력 확인
- [190] pHrodo® Red Microscale Labeling Kit (Thermo #p35363)를 이용하여 3종의 항-NRP1 IgG항체가 암세포와 정상세포에서 내재화되는 양상을 비교하였다. 위 kit의 원리는 항체에 발색시료를 컨쥬게이트(conjugate)시켜 해당 항체가 세포 밖에 있으면 발색이 되지 않는 반면, 세포 내로 들어가 주위 환경이 산성화되면 발색하는 원리를 이용해 해당 항체의 세포 내재화를 확인할 수 있다. 3종의 항-NRP1 IgG항체에 컨쥬게이트시켜 환자 유래 암세포와 정상세포인 HUVEC세포를 이용해 내재화 양상을 비교한 결과, 환자 유래 암세포에서 20분 경과 때부터 내재화된 항체가 관찰되기 시작하였다 (도 17).
- [191] 반면, 정상세포인 HUVEC 세포에서 4F12은 2시간 경과 내재화된 항체가 관찰되기 시작하였고, IRCR-101, 1A03 항체는 내재화된 항체가 발견되지 않았다. 이에, IRCR-101, 1A03 항체는 암세포 특이적인 내재화를 보임을 확인하였다 (도 18).
- [192] 4°C의 결합조건에서 IRCR-101과 기존 NRP1항체(MNRP1685A 항체, 특허(WO2011143408)에 개시되어 있는 서열합성을 통해 자체 제작)를 이용하여 정상세포와 암세포에 대한 결합력 차이를 비교해보았다. 같은 농도 처리시 기존 NRP1항체는 암세포 대비 정상세포에 더 큰 결합력을 보이는 반면 IRCR-101은 암세포 특이적인 결합력을 보임을 확인하였다 (도 19).
- [193]
- [194] 실시예 10 : 암세포 이동과 신호하위인자 조절 확인
- [195] 교모세포암 세포주인 U87MG와 환자 유래 세포를 이용하여 3종의 항-NRP1 IgG항체가 암세포 이동을 억제하는지 확인하였다. 각 항체 처리 후 24시간 동안 37°C에서 배양시킨 뒤 확인해본 결과 IRCR-101, 1A03의 경우 두 세포 모두에서

- 50%이상 암세포 이동을 억제하였고, 4F12은 환자 유래 세포에서 40%정도 암세포 이동을 억제시켰다 (도 20).
- [196] 최종 항-NRP1 IgG항체인 IRCR-101를 가지고, 유방암 세포주인 MBAMB231과 폐암 세포주인 A549를 이용하여 이동 억제(migration inhibition)를 관찰한 결과, 농도별 암세포이동 억제능을 확인하였다. IRCR-101 (10ug/ml) 처리시 유방암 모델에서 60%, 폐암 모델에서 30% 암세포 이동을 억제함을 확인하였다 (도 21).
- [197] IRCR-101처리시 관련 신호전달 물질의 변화를 알아보기 위해 교모세포종 환자 유래 세포에서 15, 30, 120분에 NRP1, AKT, ERK변화를 면역블랏 (Immunoblotting)을 통해 살펴보았다. NRP1의 경우 30분째 완전히 분해(degradation)되어 보이지 않는 것을 확인하였고, AKT와 ERK는 인산화된 AKT와 ERK가 감소함으로써 이와 관련된 신호기작을 억제함을 확인하였다 (도 22).
- [198]
- [199] 실시예 11 : In vivo모델에서 IRCR-101 효능평가와 표적 확인
- [200] 교모세포암 환자 유래 세포를 이용해 피하투여 모델 (subcutaneous model) 2종을 제작하여 IRCR-101 5mg/kg을 주 3회 정맥주사로 주입 후 종양크기를 측정하였다. 대조군 대비 30-40% 종양크기 억제를 나타내었으며, 면역형광 (Immunofluorescence)을 통해 IRCR-101에 의한 세포사멸(apoptosis)이 증가함을 TUNEL assay로 확인하였다 (도 23).
- [201] 교모세포암 세포주인 U87MG를 이용한 피하투여 모델을 제작하여 경쟁항체인 MNRP1685A (MNRP1685A 항체, 특허(WO2011143408 A1)에 나와있는 서열합성을 통해 자체제작)와의 효능평가를 비교하였다. 5mg/kg 주 2회 주입한 군에서 MNRP1685A는 60% 억제, IRCR-101은 80% 종양 성장억제를 보였다 (도 24).
- [202] 폐암 세포주인 A549를 이용한 피하투여 모델을 제작하여 경쟁항체인 MNRP1685A와의 효능평가를 비교하였다. 25mg/kg 주 2회 주입한 군에서 MNRP1685A는 19% 억제, IRCR-101은 57% 종양 성장억제를 보였다 (도 25).
- [203] 교모세포암 정위 모델 (orthotopic model)에서 IRCR-101에 형광물질을 표지한 후 이를 정맥주사로 주입하여 시간경과에 따른 형광세기 변화를 관찰하였다. 15min, 1hr, 1day, 2day를 관찰한 결과 1day에서 종양 위치와 일치하는 부위에서 강하게 형광이 발색하였고 3day까지 동일 위치에서 형광이 발색함을 확인하였다 (도 26).
- [204]
- [205] 실시예 12: Monkey TMA를 이용한 정상조직에 대한 분포(distribution) 평가
- [206] IRCR-101의 부작용(side-effect)을 알아보고자 기존 NRP1 항체(MNRP1685A 항체, 특허(WO2011143408 A1)에 개시되어 있는 서열합성을 통해 자체제작)와 함께 수컷 및 암컷 Monkey TMA (Tissue microArray)를 실행하였다. 분석결과 대부분의 정상적인 장기조직에서 IRCR-101이 기존의 NRP1항체보다 결합이

낮거나 거의 없는 것을 확인하였다. 따라서, 정상조직에 결합력이 낮거나 거의 없는 것으로 보아 임상시험 시 IRCR-101의 부작용은 낮을 것으로 예측된다 (도 27).

[207]

산업상 이용가능성

[208] 본 발명에 따른 스크리닝 방법은 환자 유래 세포를 이용함으로써 환자 특이적 과발현 단백질을 타겟하는 항체를 스크리닝할 수 있을 뿐 아니라, 본 발명에 따라 스크리닝된 항체를 통해 환자 맞춤형 항체를 제작할 수 있게 됨으로써, 환자 맞춤형 치료제 개발에 유용하다. 또한, 본 발명의 방법을 통해 선별된 항체 또는 이의 항원 결합 단편들은 향후 임상에서의 성공 가능성이 높을 것으로 예측된다. 더욱이, 본 발명에 따른 스크리닝 방법을 통해 내재화되는 항체를 선별할 수 있게 됨으로써, 약물-항체 접합체(ADC) 제작에 적합한 항체의 선별이 가능하게 된다.

[209]

[210] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.