

명세서

발명의 명칭: PAUF 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 PAUF(Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 현재 임상적으로 사용하고 있는 항암제는 화학요법제와 생물요법제로 분류할 수 있다. 과거 활발히 개발되었던 화학요법제는 암세포에 독성을 나타내는 약제들로서, 암세포뿐만 아니라 정상 세포에도 독성을 나타내며, 또한 내성을 나타낸다는 문제가 있어 개발 및 사용에 한계를 보이고 있다. 이에, 최근에는 인체의 면역 기능을 회복시키거나 증가시켜 암세포의 활동력을 약화시키는 생물요법제가 그 대안으로 활발히 개발되고 있다. 현재 사용되거나 개발되고 있는 생물요법제로는 사이토카인류, 단클론 항체(monoclonal antibody) 등의 재조합 항체, 핵산분자 치료제 및 신생혈관형성 억제제 등이 있다.

[4]

- [5] 상술한 생물요법제 중에서도, 치료용 단클론 항체는 표적에 대한 반응 특이성이 높아 부작용이 낮은 것이 특징이다. 항체는 여러 가지 기작으로 치료효과를 나타내는데, 해당 항원과 특이적으로 결합하여 신호전달을 저해하거나 교차 결합(cross-linking)에 의한 세포 사멸을 유도할 수 있으며, 또한 생체 내 면역 시스템을 활성화하여 그 효과를 나타낼 수도 있다. 따라서, 항암제로서의 단클론 항체는 암세포를 특이적으로 추적하여 그 활성을 억제함은 물론 면역반응을 일으켜 암세포를 효과적으로 제거할 수 있으므로, 암 치료의 주류로 자리매김해 가고 있다. 이와 관련하여, 라무시루맵(ramucirumab), 리툭시맵(rituximab), 트라스트주맵(trastuzumab) 등의 단클론 항체가 개발되어 위암, 유방암, 간암 등의 치료에 사용되고 있다.

[6]

- [7] 한편, PAUF(Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor) 단백질은 췌장암, 난소암, 대장암, 자궁경부암 등의 암세포에서 과발현되어 종양의 발달 및 전이에 관여하는 단백질로서, 새로운 패턴의 인산화를 통해 β -카테닌을 상향 조절하고 안정화시켜 췌장암 세포의 급속 증식에 기여한다고 알려져 있다(Experimental & Molecular Medicine, 2011, 43, 82-90). 또한, PAUF 단백질을 표적으로 하는 작은-간섭 RNA(small-interfering RNA)는 췌장암 세포의 이동, 침입 및 종양 형성 능력을 감소시킬 수 있음이 보고됨에 따라 암의 진단, 치료 등의 표적으로서 PAUF 단백질에 대한 관심이 높아지고 있으며(Cancer Sci. 2009 May,

100(5):828-36.; Biochem Biophys Res Commun. 2014 Nov, 454(1):144-50.), 이와 관련하여 항-PAUF 단백질 인간 항체를 포함하는 췌장암의 진단 및 치료용 조성물이 개발된바 있다(한국 등록특허공보 제10-1098186호). 그러나, PAUF 단백질에 대한 결합력 및 친화력을 향상시킴과 동시에, 다양한 종류의 암 진단 및 치료에 우수한 효과를 갖는 항체의 개발이 여전히 필요한 실정이었다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명자들은 PAUF 단백질에 특이적으로 결합하며, 다양한 암에 대해 우수한 치료 및 진단 효과를 나타낼 수 있는 항체를 개발하고자 예의 노력연구한 결과, 항-PAUF 마우스 항체를 기반으로 한 키메라 및 인간화 항체를 개발하였고, 이들은 기존의 항-PAUF 인간 항체에 비하여 PAUF 단백질에 더 높은 친화도 및 특이도를 가지며, 췌장암 또는 난소암 등에 대해 더 우수한 항암 효과를 나타냄을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[10]

과제 해결 수단

- [11] 본 발명의 하나의 목적은 PAUF(Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor) 단백질에 결합하는 항체를 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 항체를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 항체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 항체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암세포의 증식, 이동 또는 침투를 억제하는 방법을 제공하는 것이다.
- [18] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 항체에 약물이 결합된, 항체-약물 결합체를 제공하는 것이다.
- [19] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 항체를 포함하는, 암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [20] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는, 암 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [21] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 항체를 이용하여, 암이 의심되는

개체에서 분리된 생물학적 시료에서 PAUF 단백질을 항원-항체 반응을 통하여 검출하는 단계를 포함하는, 암의 진단 방법을 제공하는 것이다.

- [22] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (a) 암세포에 암의 예방 또는 치료 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 후보물질이 처리된 암세포에서 상기 항체를 이용하여, PAUF 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)의 PAUF 단백질 수준이 후보물질을 처리하지 않은 암세포의 것보다 감소하는 경우, 상기 (a)단계에서 처리한 후보물질을 암의 예방 또는 치료 물질로 판단하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[23]

발명의 효과

- [24] 본 발명의 항체는 PAUF 단백질에 높은 특이도 및 친화도를 가지고 결합하며, 암세포의 증식, 이동, 침투 및 생체 내 성장을 억제하므로, PAUF 단백질이 과발현되어 있는 암과 같은 질환의 진단 및 치료 분야에 있어 유용하게 사용될 수 있다.

[25]

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1은 항-PAUF 단백질 마우스 항체인 2H2 또는 20C5의 PAUF 단백질에 대한 친화도(A) 및 특이도(B)를 보여주는 그래프이다.
- [27] 도 2는 2H2 또는 20C5가 기존 항-PAUF 단백질 인간 항체인 PMAb83과 다른 에피토프를 가지고 있음을 보여주는 그래프로서, 비오틴-표지 2H2 경쟁 ELISA(Biotin-labeled 2H2 Competitive ELISA) 결과에 관한 것이다.
- [28] 도 3은 항-PAUF 단백질 키메라 항체인 cPMAb22 또는 cPMAb205의 PAUF 단백질에 대한 특이도를 보여주는 그래프이다. 인간 항체인 PMAb83은 비교군으로 사용하였다.
- [29] 도 4는 상기 cPMAb22 또는 cPMAb205의 PAUF 단백질에 대한 친화도를 보여주는 그래프로서, ELISA로 분석한 결과에 관한 것이다. 인간 항체인 PMAb83은 비교군으로 사용하였다.
- [30] 도 5는 상기 cPMAb22의 암세포 증식 억제 효과를 보여주는 그래프로서, WST-1 증식 어세이(proliferation assay) 결과에 관한 것이다. 췌장암 세포주 BxPC-3에 대한 효과를 확인하였다. IgG는 대조군, PMAb83은 비교군으로 사용하였다.
- [31] 도 6은 상기 cPMAb22의 암세포 이동(migration) 억제 효과를 보여주는 그래프로서, 이동 어세이(migration assay) 결과에 관한 것이다. 췌장암 세포주 CFPAC-1 및 췌장암 환자로부터 유래한 췌장암 세포 AMCPAC04에 대한 효과를 확인하였다. PMAb83은 비교군으로 사용하였다.
- [32] 도 7은 상기 cPMAb22의 암세포 침투(invasion) 억제 효과를 보여주는 그래프로서, 침투 어세이(invasion assay) 결과에 관한 것이다. 췌장암 세포주

- CFPAC-1 및 췌장암 환자 유래 췌장암 세포 AMCPAC04에 대한 효과를 확인하였다. PMAb83은 비교군으로 사용하였다.
- [33] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한, 항-PAUF 단백질 인간화 항체인 2H2-V_H1-V_L1, 2H2-V_H1-V_L2 및 2H2-V_H1-V_L3의 PAUF 단백질에 대한 친화도를 보여주는 그래프로서, ELISA로 분석한 결과에 관한 것이다. 키메라 항체인 cPMAb22 및 인간 항체인 PMAb83은 비교군으로 사용하였다.
- [34] 도 9는 상기 2H2-V_H1-V_L1, 2H2-V_H1-V_L2 및 2H2-V_H1-V_L3의 생산 수율을 보여주는 이미지로서, 웨스턴블롯(western blot)으로 분석한 결과에 관한 것이다. 1은 2H2-V_H1-V_L1, 2는 2H2-V_H1-V_L2, 3은 2H2-V_H1-V_L3, 4는 2H2-V_H2-V_L1, 5는 2H2-V_H2-V_L2, 6은 2H2-V_H2-V_L3, 7은 2H2-V_H3-V_L1, 8는 2H2-V_H3-V_L2, 9는 2H2-V_H3-V_L3, 및 10은 2H2-V_H4-V_L4를 의미하고, A는 단백질이 포함된 배지를 원심분리를 하지 않은 상태, B는 원심분리를 통해 파쇄물(debris)을 제거하고 0.22 μ m 필터를 이용하여 여과한 상태, 및 C는 Fc 단백질을 의미한다. Fc 단백질은 대조군으로 사용하였다.
- [35] 도 10은 상기 인간화 항체 2H2-V_H1-V_L1, 즉 hPMAb22의 PAUF 단백질에 대한 특이도를 보여주는 그래프이다. 인간 항체인 PMAb83은 비교군으로 사용하였다.
- [36] 도 11은 상기 hPMAb22의 PAUF 단백질에 대한 친화도를 보여주는 그래프로서, SPR(surface plasmon resonance)로 분석한 결과에 관한 것이다. 인간 항체인 PMAb83은 비교군으로 사용하였다.
- [37] 도 12는 상기 hPMAb22의 항-PAUF 단백질 인간 항체인 PMAb83과 다른 에피토프를 가지고 있음을 보여주는 그래프로서, 비오틴-표지 PMAb83 경쟁 ELISA 결과에 관한 것이다.
- [38] 도 13은 상기 hPMAb22의 암세포 증식 억제 효과를 보여주는 그래프로서, WST-1 증식 어세이 결과에 관한 것이다. 췌장암 세포주 CFPAC-1에 대한 효과를 확인하였다. IgG는 대조군, PMAb83은 비교군으로 사용하였다.
- [39] 도 14는 상기 hPMAb22의 암세포 이동 억제 효과를 보여주는 그래프로서, 이동 어세이 결과에 관한 것이다. 췌장암 환자 유래의 췌장암 세포 AMCPAC06 및 난소암 세포주 OVCAR-5에 대한 효과를 확인하였다. PMAb83은 비교군으로 사용하였다.
- [40] 도 15는 상기 hPMAb22의 암세포 침투 억제 효과를 보여주는 그래프로서, 침투 어세이 결과에 관한 것이다. 췌장암 환자 유래의 췌장암 세포 AMCPAC04 또는 AMCPAC06, 및 난소암 세포주 OVCAR-5에 대한 효과를 확인하였다. PMAb83은 비교군으로 사용하였다.
- [41] 도 16은 상기 hPMAb22의 생체 내(in vivo) 항암 효과를 보여주는 그래프로서, 항체의 투여에 의해 감소된 종양의 부피 및 무게를 보여준다. 젬자(Gemzar; Gemcitabine)는 비교군으로 사용하였다.
- [42]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [43] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 하나의 양태는 PAUF(Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor) 단백질에 결합하는 항체를 제공한다.
- [44]
- [45] 본 발명에서는, PAUF 단백질에 특이적으로 결합하는 서열번호 1의 중쇄 CDR1; 서열번호 2의 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3, 4 또는 30의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 5의 경쇄 CDR1; 서열번호 6의 경쇄 CDR2; 및 서열번호 7 또는 31의 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체를 개발하였으며, 이들은 기존 PAUF 항체보다 PAUF 단백질에 매우 높은 친화도 및 특이도를 나타내고, 췌장암, 난소암 등 다양한 암세포의 증식, 이동 및 침투를 억제하며, 나아가 생체 내 존재하는 암의 성장을 억제할 수 있음을 확인하였다.
- [46]
- [47] 본 발명의 용어, "PAUF(Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor) 단백질"은 종양의 발달 및 전이에 관여하는 단백질을 의미한다. 상기 PAUF 단백질은 췌장암, 난소암, 대장암, 자궁경부암 등의 암세포에서 과발현되는 것이 특징이며, 이에 따라 암의 진단, 치료 등의 표적이 될 수 있음이 보고되고 있다(Cancer Sci. 2009 May, 100(5):828-36.; Biochem Biophys Res Commun. 2014 Nov, 454(1):144-50.).
- [48]
- [49] 본 발명의 용어, "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론항체, 단일클론항체, 전체(whole) 항체 및 항체 단편을 모두 포함하고, 또한 키메라 항체 및 이가(bivalent) 또는 이중특이성 분자(예를 들어, 이중특이성 항체), 디아바디(diabody), 트리아바디(triobody) 및 테트라바디(tetrabody)를 포함한다. 아울러, FcRn(neonatal Fc receptor)에 대한 결합 기능을 보유한 단쇄 항체, 스캐프, 항체 불변영역의 유도체 및 단백질 스캐폴드에 기초한 인공 항체를 포함한다.
- [50] 상기 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 구조로서, 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합(disulfide bond)으로 연결되어 있다. 상기 전체 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM 및 IgG를 포함하며, IgG는 아형(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다.
- [51] 상기 항체 단편은 항원결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fc, Fd, Fab, Fab', Fv 및 F(ab')₂ 등을 포함한다. 상기 Fc는 Fc 수용체라 불리는 세포 표면 수용체와 상호작용 하는 항체의 꼬리 부분을 의미한다. 상기 Fd는 Fab 단편에 포함되어 있는 중쇄 부분을 의미하며, F(ab')₂는 Fd, Fab, Fab' 및 Fv를 포함하는 단편을 의미한다. 상기 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및

중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1 도메인)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'은 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 이황화 결합을 이루면서 생성된다. Fv(variable fragment)는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각을 의미한다. 이황화 Fv(dsFv; disulfide-stabilized Fv antibody fragment)는 이황화 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되어 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), 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

- [52] 일반적으로, 면역글로불린은 중쇄(heavy chain) 및 경쇄(light chain)를 가지며 각각의 중쇄 및 경쇄는 불변 영역(constant region) 및 가변 영역(variable region)을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은, 상보성 결정 영역으로 불리는 3개의 다변가능한 영역(complementarity-determining region, 이하 "CDR"로 명명) 및 4개의 구조 영역(framework region, 이하 "FR"로 명명)을 포함한다. 각 사슬의 CDR은 주로 항원의 에피토프(epitope)에 결합하는 역할을 하며, 전형적으로 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3로 명명된다. 또한, 각 사슬의 FR은 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 FR1, FR2, FR3, FR4로 명명될 수 있다.
- [53] 본 발명에서, 중쇄의 가변영역은 'V_H', 경쇄의 가변영역은 'V_L'로 명명될 수 있으며, 중쇄의 CDR은 각각 'V_H-CDR1', 'V_H-CDR2', 'V_H-CDR3'으로, 경쇄의 CDR은 각각 'V_L-CDR1', 'V_L-CDR2', 'V_L-CDR3'으로, 중쇄의 FR은 각각 'V_H-FR1', 'V_H-FR2', 'V_H-FR3', 'V_H-FR4'로, 경쇄의 FR은 'V_L-FR1', 'V_L-FR2', 'V_L-FR3', 'V_L-FR4'로 명명될 수 있다.
- [54]
- [55] 또한, 상기와 같은 본 발명의 항체가 불변 영역을 포함하는 경우, IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 불변 영역을 포함할 수 있다.
- [56] 본 발명의 용어, "조합(combination)"은 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 불변 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 그 예로, IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 불변 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 불변 영역으로부터 이량체 또는 다량체를 형성할 수 있다.
- [57] 본 발명의 용어, "하이브리드(hybrid)"는 단쇄 면역 글로불린 중쇄 불변 영역 내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 해당하는 서열이 존재함을 의미하며, 그 예로 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 CH1, CH2, CH3

및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하다.

- [58] 또한, 본 발명에서 항체는 가변영역 및 불변영역의 유래가 동일하거나 상이할 수 있으며, CDR, 이를 제외한 가변영역 및 불변영역의 유래가 동일 또는 상이할 수 있다.

[59]

- [60] 본 발명의 용어, "PAUF(Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체"는 PAUF 단백질에 결합하여 PAUF 단백질의 활성을 저해할 수 있는 항체를 의미한다.

- [61] 구체적으로, 상기 PAUF 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 마우스 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체일 수 있다.

[62]

- [63] 구체적으로, 본 발명의 항체는 서열번호 1의 중쇄 CDR1; 서열번호 2의 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3, 4 또는 30의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 5의 경쇄 CDR1; 서열번호 6의 경쇄 CDR2; 및 서열번호 7 또는 31의 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [64] 또한, 본 발명의 항체는 서열번호 17, 28 또는 37의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역; 및 서열번호 18, 29 또는 38의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [65] 또한, 본 발명의 항체는 서열번호 8, 19 또는 32의 중쇄 FR(Framework region)1; 서열번호 9 또는 20의 중쇄 FR2; 서열번호 10, 21 또는 33의 중쇄 FR3; 및 서열번호 11, 12, 22, 23 또는 34의 중쇄 FR4를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 13, 24 또는 35의 경쇄 FR1; 서열번호 14 또는 25의 경쇄 FR2; 서열번호 15 또는 26의 경쇄 FR3; 및 서열번호 16, 27 또는 36의 경쇄 FR4를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[66]

- [67] 본 발명의 일 예로, 기존 PAUF 항체에 비하여 PAUF 단백질에 대한 친화도 및 특이도가 향상된 본 발명의 항체는,

- [68] 구체적으로 서열번호 1의 중쇄 CDR1; 서열번호 2의 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 5의 경쇄 CDR1; 서열번호 6의 경쇄 CDR2; 및 서열번호 7의 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하거나,

- [69] 서열번호 1의 중쇄 CDR1; 서열번호 2의 중쇄 CDR2; 및 서열번호 4의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 5의 경쇄 CDR1; 서열번호 6의 경쇄 CDR2; 및 서열번호 7의 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하거나, 또는

- [70] 서열번호 8의 중쇄 FR1; 서열번호 9의 중쇄 FR2; 서열번호 10의 중쇄 FR3; 및

서열번호 11의 중쇄 FR4를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 13의 경쇄 FR1; 서열번호 14의 경쇄 FR2; 서열번호 15의 경쇄 FR3; 및 서열번호 16의 경쇄 FR4를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하거나,

- [71] 서열번호 8의 중쇄 FR1; 서열번호 9의 중쇄 FR2; 서열번호 10의 중쇄 FR3; 및 서열번호 12의 중쇄 FR4를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 13의 경쇄 FR1; 서열번호 14의 경쇄 FR2; 서열번호 15의 경쇄 FR3; 및 서열번호 16의 경쇄 FR4를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있으며,
- [72] 더욱 구체적으로 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [73] 본 발명의 일 실시예에서는, 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 항체를 "2H2" 또는 "cPMAb22"로 명명하였다.
- [74]
- [75] 또한, 본 발명의 항체는,
- [76] 구체적으로 서열번호 1의 중쇄 CDR1; 서열번호 2의 중쇄 CDR2; 및 서열번호 3의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 5의 경쇄 CDR1; 서열번호 6의 경쇄 CDR2; 및 서열번호 7의 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하거나,
- [77] 서열번호 1의 중쇄 CDR1; 서열번호 2의 중쇄 CDR2; 및 서열번호 4의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 5의 경쇄 CDR1; 서열번호 6의 경쇄 CDR2; 및 서열번호 7의 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하거나, 또는
- [78] 서열번호 19의 중쇄 FR1; 서열번호 20의 중쇄 FR2; 서열번호 21의 중쇄 FR3; 및 서열번호 22의 중쇄 FR4를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 24의 경쇄 FR1; 서열번호 25의 경쇄 FR2; 서열번호 26의 경쇄 FR3; 및 서열번호 27의 경쇄 FR4를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하거나,
- [79] 서열번호 19의 중쇄 FR1; 서열번호 20의 중쇄 FR2; 서열번호 21의 중쇄 FR3; 및 서열번호 23의 중쇄 FR4를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 24의 경쇄 FR1; 서열번호 25의 경쇄 FR2; 서열번호 26의 경쇄 FR3; 및 서열번호 27의 경쇄 FR4를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있으며,
- [80] 더욱 구체적으로 서열번호 28의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [81] 본 발명의 일 실시예에서는, 서열번호 28의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 항체를 "hPMAb22"로 명명하였다.
- [82]

- [83] 또한, 본 발명의 항체는,
- [84] 구체적으로 서열번호 1의 중쇄 CDR1; 서열번호 2의 중쇄 CDR2; 및 서열번호 30의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 5의 경쇄 CDR1; 서열번호 6의 경쇄 CDR2; 및 서열번호 31의 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하거나, 또는
- [85] 서열번호 32의 중쇄 FR1; 서열번호 9의 중쇄 FR2; 서열번호 33의 중쇄 FR3; 및 서열번호 34의 중쇄 FR4를 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 35의 경쇄 FR1; 서열번호 14의 경쇄 FR2; 서열번호 15의 경쇄 FR3; 및 서열번호 36의 경쇄 FR4를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있으며,
- [86] 더욱 구체적으로 서열번호 37의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 38의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [87] 본 발명의 일 실시예에서는, 서열번호 37의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 38의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 항체를 "20C5" 또는 "cPMAb205"로 명명하였다.
- [88]
- [89] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, PAUF 단백질에 결합하는 마우스 항체 2H2 또는 20C5, 이의 키메라 항체 cPMAb22 또는 cPMAb205, 및 이의 인간화 항체 hPMAb22를 개발하였고, 상기 항체들은 기존의 PAUF 항체보다 PAUF 단백질에 높은 특이도 및 친화도로 결합하는 것을 확인하였다(도 1, 3, 4, 8 내지 11). 또한, 상기 항체들은 췌장암 세포주와 췌장암 환자로부터 유래한 췌장암 세포뿐만 아니라, 난소암 세포주에 대해서도 암세포의 증식, 이동 및 침투를 억제하며, 생체 내 존재하는 췌장암의 성장 또한 억제할 수 있음을 확인하였다. 나아가, 상기 항체들의 암 치료 효과는 기존의 PAUF 단백질 특이적 인간 항체인 PMAb83과 유사하거나 더 우수함을 확인하였다(도 5 내지 7, 및 13 내지 16).
- [90] 이는, 본 발명의 PAUF 단백질에 결합하는 항체는 PAUF 단백질의 인지가 필요한 분야, 예를 들어 PAUF 단백질이 과발현된 질환의 진단 또는 치료 등에 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [91]
- [92] 다른 하나의 양태는 본 발명의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.
- [93] 이때, 상기 항체의 설명에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [94]
- [95] 본 발명에서, 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터는 특별히 이에 제한되지 않으나, 포유류 세포(예를 들어, 사람, 원숭이, 토끼, 래트, 햄스터, 마우스 세포 등), 식물 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 박테리아 세포(예를 들어, 대장균 등)를 포함하는 진핵 또는 원핵세포에서 상기

폴리뉴클레오티드를 복제 및/또는 발현할 수 있는 벡터가 될 수 있고, 바람직하게는 숙주세포에서 상기 뉴클레오티드가 발현될 수 있도록 적절한 프로모터에 작동가능하도록 연결되며, 적어도 하나의 선별마커를 포함하는 벡터가 될 수 있다. 그 예로 파아지, 플라스미드, 코스미드, 미니-염색체, 바이러스 또는 레트로바이러스벡터 등에 상기 폴리뉴클레오티드가 도입된 형태가 될 수 있다.

[96] 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터는, 상기 항체의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 각각 포함하는 발현벡터 또는 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 모두 포함하는 발현벡터일 수 있다.

[97]

[98] 본 발명에서, 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현벡터가 도입되어 형질전환된 대장균, 스트렙토미세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO(중국 햄스터 난소 세포, chinese hamster ovary cells), SP2/0(마우스 골수종), 인간 림프아구(human lymphoblastoid), COS, NSO(마우스 골수종), 293T, 보우멜라노마 세포, HT-1080, BHK(베이비 햄스터 신장세포, baby hamster kidney cells), HEK(인간 배아신장 세포, human embryonic kidney cells), PERC.6(인간망막세포) 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다.

[99]

[100] 본 발명의 용어, "도입"은 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포에 전달하는 방법을 의미한다. 이와 같은 도입은 칼슘 포스페이트-DNA 공침전법, DEAE-덱스트란-매개 트랜스펙션법, 폴리브렌-매개 형질감염법, 전기충격법, 미세주사법, 리포솜 융합법, 리포펙타민 및 원형질체 융합법 등의 당 분야에 공지된 여러 방법에 의해 수행될 수 있다. 또한, 형질도입은 감염(infection)을 수단으로 하여 바이러스 입자를 사용하여 목적물을 세포 내로 전달시키는 것을 의미한다. 아울러, 유전자 밤바드먼트(bombardment) 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 도입할 수 있다. 본 발명에서 도입은 형질전환과 혼용되어 사용될 수 있다.

[101]

[102] 또 다른 하나의 양태는 상기 항체를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[103]

[104] 상기 항체는 암에서 과발현된 PAUF 단백질에 매우 높은 친화도 및 특이도를 나타내며, 췌장암, 난소암 등 다양한 암세포의 증식, 이동 및 침투를 억제하며, 나아가 생체 내 존재하는 암의 성장을 억제할 수 있으므로, PAUF 단백질이 과발현된 질환, 예를 들어 암의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다. 이때,

상기 항체의 설명에 대해서는 전술한 바와 같다.

[105]

[106] 본 발명의 용어, "암"은 신체 조직의 자율적인 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자라난 덩어리로서, 본 발명의 항체에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 암이라면 그 종류에 제한 없이 포함하나, 구체적인 예로 췌장암, 위암, 대장암, 담도암, 식도암, 직장암, 구강암, 인두암, 후두암, 폐암, 결장암, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암, 전립선암, 고환암, 방광암, 신장암, 간암, 골암, 결합 조직암, 피부암, 뇌암, 갑상선암, 백혈병, 호지킨(Hodgkin) 질환, 림프종 및 다발성 골수종 혈액암일 수 있다.

[107]

[108] 본 발명의 용어, "예방"은 상기 조성물의 투여에 의해 암의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[109] 본 발명의 용어, "치료"는 상기 조성물의 투여에 의해 암의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[110]

[111] 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있고, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다.

[112] 본 발명의 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"는 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 허용되는 약학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 하나 이상의 성분을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[113] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있고, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제,

감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[114]

[115] 또한, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.

[116] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 암의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[117]

[118] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, PAUF 단백질에 높은 특이도 및 친화도로 결합하는 항체들은 췌장암 세포주와 췌장암 환자로부터 유래한 췌장암 세포뿐만 아니라, 난소암 세포주에 대해서도 암세포의 증식, 이동 및 침투를 억제하며, 생체 내 존재하는 췌장암의 성장 또한 억제할 수 있음을 확인하였다. 나아가, 상기 항체들의 암 치료 효과는 기존의 PAUF 단백질 특이적 인간 항체인 PMAb83과 유사하거나 더 우수함을 확인하였다(도 5 내지 7, 및 13 내지 16).

[119] 이는, 본 발명의 PAUF 단백질에 결합하는 항체는 암의 예방 또는 치료 용도로서 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[120]

[121] 또 다른 하나의 양태는 상기 항체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[122] 이때, 상기 항체, 암, 예방 및 치료의 설명에 대해서는 전술한 바와 같다.

[123]

[124] 본 발명의 용어, "개체"는 암이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 쥐, 소, 돼지, 양, 닭, 개, 인간 등을 포함하는 포유동물, 조류 등을 포함하며, 본 발명의 약학 조성물의 투여에 의해 암이 치료되는 개체는 제한 없이 포함한다.

[125]

[126] 본 발명의 암의 예방 또는 치료 방법에서, 상기 조성물을 투여하는 투여 경로 및

투여 방식은 특별히 제한되지 않으며, 목적하는 해당 부위에 상기 조성물이 도달할 수 있는 한, 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다.

[127] 구체적으로, 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 그 투여 경로의 비제한적인 예로는, 구강, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내 또는 흡입 등을 통하여 투여되는 것을 들 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[128]

[129] 또 다른 하나의 양태는 본 발명의 항체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암세포의 증식, 이동 또는 침투를 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

[130] 이때, 상기 항체, 개체 및 암의 설명에 대해서는 전술한 바와 같다.

[131]

[132] 상기 항체는 암에서 과발현된 PAUF 단백질에 매우 높은 친화도 및 특이도를 나타내고, 췌장암, 난소암 등 다양한 암세포의 증식, 이동 및 침투를 억제하며, 나아가 생체 내 존재하는 암의 성장을 억제할 수 있으므로, 암세포의 증식, 이동 또는 침투를 억제하는 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

[133]

[134] 또 다른 하나의 양태는 본 발명의 항체에 약물이 결합된, 항체-약물 결합체를 제공한다.

[135] 이때, 상기 항체의 설명에 대해서는 전술한 바와 같다.

[136]

[137] 본 발명의 용어, "항체-약물 결합체"는 항체가 가지는 표적 특이성, 혈액 순환 동안 독성 없음, 및 약동학적 장점을 이용하여 항체에 약물을 결합시킨 형태의 물질을 의미한다. 이러한 항체-약물 결합체는 통상 단일클론항체-링커-약물, 3가지의 구성 요소를 포함하며 항체가 표적으로 하는 세포, 특히 암 세포에 약물을 전달하여 항체에 의한 치료 효과를 상승시킬 수 있다.

[138] 본 발명의 용어, "약물"은 항체에 직접 또는 간접적으로 결합되어 효과적으로 상기 항체가 표적으로 하는 질환의 치료를 가져올 수 있는 물질을 의미한다. 항체와 결합될 수 있는 약물에는 방사성핵종, 약제, 림포카인, 독소, 이중특이적 항체 등을 포함한다. 또한, 상기한 방사성핵종에는 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re 등이 있으며, 이로 제한되지 않는다. 또한 상기 약제 또는 독소의 예로서, 에토포시드, 테니포시드, 아드리아마이신, 다우노마이신, 카르미노마이신, 아미노프테린, 닥티노마이신, 미토마이신류, 시스-백금 및 시스-백금 동족체, 블레오마이신류, 에스페라미신류, 5-플루오로우라실, 멜팔란 및 기타 질소 머스타드 등을 들 수 있으나, 상기 예에 의해 본원발명의 항체에 결합될 수 있는 약제 또는 독소가 제한되는 것은 아니다.

[139] 이러한 항체-약물 결합체는 당업계에 공지된 다양한 항체-약물 결합체의 제조 방법을 통하여 제조될 수 있다.

[140]

[141] 또 다른 하나의 양태는 본 발명의 항체를 포함하는, 암 진단용 조성물을 제공한다.

[142] 이때, 상기 항체 및 암의 설명에 대해서는 전술한 바와 같다.

[143] 본 발명의 암 진단용 조성물은 다양한 종류의 암세포에서 과발현되는 PAUF 단백질에 특이적으로 결합하는 항체들을 포함하므로, PAUF 단백질의 발현 여부나 발현 정도와 관련된 질환, 예컨대 암의 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

[144]

[145] 또 다른 하나의 양태는 상기 조성물을 포함하는, 암 진단용 키트를 제공한다.

[146] 이때, 상기 조성물 및 암의 설명에 대해서는 전술한 바와 같다.

[147] 본 발명의 암 진단용 키트는 분석방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분을 가진 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다.

[148]

[149] 또 다른 하나의 양태는 본 발명의 항체를 이용하여, 암이 의심되는 개체에서 분리된 생물학적 시료에서 PAUF 단백질을 항원-항체 반응을 통하여 검출하는 단계를 포함하는, 암의 진단 방법을 제공한다.

[150] 이때, 상기 항체, 개체, PAUF 단백질 및 암의 설명에 대해서는 전술한 바와 같다.

[151]

[152] PAUF 단백질은 다양한 종류의 암세포에서 과발현된다고 알려져 있으므로, PAUF 단백질에 높은 특이도 및 친화도로 결합하는 본 발명의 항체는 PAUF 단백질의 발현 여부나 발현 정도와 관련된 질환, 예컨대 암의 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

[153]

[154] 상기 암의 진단 방법은, 본 발명의 PAUF에 특이적인 항체를 암이 의심되는 개체의 분리된 생물학적 시료와 반응시키고 항원-항체 복합체 형성을 검출함으로써 PAUF 단백질을 검출할 수 있으며, 이를 통해 암을 진단할 수 있다.

[155] 구체적으로, (a) 상기 항체를 암이 의심되는 개체의 분리된 생물학적 시료에 처리하여 PAUF 단백질을 항원-항체 반응을 통하여 검출하는 단계; (b) 상기 (a)에서 검출된 PAUF 단백질의 수준을 대조군과 비교하여, 대조군에 비하여 PAUF 단백질 수준이 높으면 암 환자로 판정하는 단계를 포함하는, 암 진단 방법일 수 있다.

[156]

[157] 본 발명의 용어, "생물학적 시료"는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 조직 부검 시료(뇌, 피부, 림프절, 척수 등), 세포 배양 상등액, 파열된 진핵세포 및 세균 발현계 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 생물학적 시료를 조작하거나 조작하지 않은 상태로 본 발명의 항체와 반응시켜 PAUF 단백질의 존재 또는 암의 유무를 확인할 수 있다.

[158]

[159] 본 발명의 용어, "항원-항체 복합체"는 시료 중의 PAUF 단백질 항원과 이를 인지하는 본 발명의 항체의 결합물을 의미하며, 이러한 항원-항체 복합체의 형성은 비색법(Colormetric method), 전기화학법(Electrochemical method), 형광법(Fluorimetric method), 발광법(Luminometric method), 입자계수법(Particle counting method), 육안측정법(Visual assessment) 또는 섬광계수법(Scintillation counting method) 등의 임의의 방법으로 검출할 수 있다. 그러나 반드시 이들로만 제한되지 않고 다양한 응용과 적용이 가능하다.

[160] 상기 항원-항체 복합체를 검출하기 위하여 여러 가지 표지체를 사용할 수 있다. 구체적인 예로, 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자 또는 방사성 동위원소 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, 검출 표지체로서 사용되는 효소로는 아세틸콜린에스테라제, 알칼라인 포스파타제, β -D-갈락토시다제, 호스래디쉬 퍼옥시다제, β -라타마제 등을 포함하며, 형광물로는 플루오레세인, Eu^{3+} , Eu^{3+} 킬레이트 또는 크립테이트 등을 포함하며, 리간드로는 바이오틴 유도체 등을 포함하며, 발광물로는 아크리디늄 에스테르, 이소루미놀 유도체 등을 포함하며, 미소입자로는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등을 포함하며, 방사성 동위원소로는 ^{57}Co , ^3H , ^{125}I , ^{125}I -볼톤(Bonton) 헌터(Hunter) 시약 등을 포함한다.

[161]

[162] 또 다른 하나의 양태는 (a) 암세포에 암의 예방 또는 치료 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 후보물질이 처리된 암세포에서 본 발명의 항체를 이용하여, PAUF 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)의 PAUF 단백질 수준이 후보물질을 처리하지 않은 암세포의 것보다 감소하는 경우, 상기 (a)단계에서 처리한 후보물질을 암의 예방 또는 치료 물질로 판단하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[163] 이때, 상기 항체, PAUF 단백질 및 암의 설명에 대해서는 전술한 바와 같다.

[164]

[165] 본 발명의 용어, "암의 예방 또는 치료 후보물질"은 암을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 물질로서, 직접 또는 간접적으로 암을 호전 또는 개선 시킬 수 있을 것으로 예상되는 물질이면 제한 없이 사용 가능하며, 화합물, 유전자 또는 단백질 등의 치료가능 예상물질을 모두 포함한다.

[166]

[167] 본 발명에서, 암세포에 암의 예방 또는 치료 후보물질을 처리하는 상기 (a) 단계는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 구체적인 예로, 암세포에 상기 후보물질을 처리하여 함께 배양하거나, 또는 암세포를 포함하는 생체 내에 투여함으로써 상기 후보물질을 처리할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 당업자라면 본 발명의 목적에 맞는 방법을 사용할 수 있을 것이다.

[168] 또한, PAUF 단백질의 수준을 측정하는 상기 (b) 단계는 당업자에게 알려진

어떠한 방법이든 사용 가능하다. 구체적인 예로, 웨스턴블롯(Western blot), 공동-면역침전 어세이(Co-Immunoprecipitation assay), ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay), 조직 면역염색(Immunostaining) 및 유세포분석법(Flowcytometry analysis) 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 당업자라면 본 발명의 목적에 맞는 방법을 사용할 수 있을 것이다.

[169] 마지막으로, 상기 (c) 단계는 상기 후보물질을 암의 예방 또는 치료 물질로서 사용할 수 있는지 판단하는 단계로서, PAUF 단백질은 암세포에서 과발현되며, 암세포의 증식, 이동, 침투, 성장 등을 촉진하므로, PAUF 단백질의 수준을 감소시키는 후보물질은 암의 예방 또는 치료 물질로서 사용될 수 있다.

[170]

발명의 실시를 위한 형태

[171] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[172]

[173] 실시예 1. 항-PAUF 단백질 마우스 항체의 발굴 및 특성 확인

[174] 실시예 1-1. 2H2 및 20C5의 발굴

[175] PAUF 단백질을 타겟으로 하는 항체를 개발하기 위하여, 먼저 PAUF 단백질에 결합하는 마우스 단클론 항체를 이용하였다.

[176] 구체적으로, 항-PAUF 단백질 마우스 항체는 다음과 같은 방법으로 발굴하였다. PAUF 단백질을 마우스에게 주사한 후 항원 PAUF 단백질에 대한 항체가 생성되면 마우스의 지라에서 B 림프구를 분리하였다. 분리한 B 림프구들을 높은 배율로 희석하여 PAUF 단백질이 코팅되어 있는 96웰 플레이트에 하나의 B 림프구만이 들어가도록 하였다. 그 후, HRP가 표지된 항-마우스 항체를 이용하여 PAUF 단백질과 결합하는 B 림프구를 스크리닝하였다.

[177] 그 결과, 2H2, 4E6, 11G6 및 20C5의 4종의 항-PAUF 단백질 마우스 단클론 항체를 발굴할 수 있었고, 이의 중쇄 및 경쇄 가변영역, CDR, 및 FR 서열은 하기 표 1 및 2에 기재하였다.

[178] [표1]

항-PAUF 단백질 마우스 항체, '2H2'의 아미노산 서열

항체명	구분	서열	서열 번호
2H2	중쇄가변영역(Heavy chain variable region; V _H)	QVQLKQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNI KDYYMHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENG NTIYDPKFQGKASITADTSSNTAYLQLSSL TSEDVAVYYCARRAITTATAWFAYWGQG TLVTVSA	17
	V _H -CDR1	GFNIKDYY	1
	V _H -CDR2	IDPENGNT	2
	V _H -CDR3	ARRAITTATAWFA	3
	V _H -CDR3	ARRAITTATAWFAY	4
	V _H -FR1	QVQLKQSGAELVRPGALVKLSCKAS	8
	V _H -FR2	MHWVKQRPEQGLEWIGW	9
	V _H -FR3	IYDPKFQGKASITADTSSNTAYLQLSSLTS EDTAVYYC	10
	V _H -FR4	YWQGGLVTVSA	11
	V _H -FR4	WGQGLVTVSA	12
	경쇄가변영역(Light chain variable region; V _L)	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVMTMSCKSSQSL LNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWA STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAE DLAVYYCKQSYNLYTFGAGTKLELK	18
	V _L -CDR1	QSLLSRTRKNY	5
	V _L -CDR2	WAS	6
	V _L -CDR3	KQSYNLY	7
	V _L -FR1	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVMTMSCKSS	13
	V _L -FR2	LAWYQQKPGQSPKLLIY	14
	V _L -FR3	TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAE LAVYYC	15
	V _L -FR4	TFGAGTKLELK	16

[179]

[180] [표2]

항-PAUF 단백질 마우스 항체, '20C5'의 아미노산 서열

항체명	구분	서열	서열 번호
20C5	중쇄가변영역(Heavy chain variable region; V _H)	QVQLKESGAELVRPGALVKLSCKASGFNIK DYMHVVKQRPEQGLEWIGWIDPEHGNTI YDPKFQGKASLTADTSSNTAYLQLSSLTSE DTAVYYCARRGWLPWFAYWGQGTLVTVSA	37
	V _H -CDR1	GFNIKDY	1
	V _H -CDR2	IDPEHGNT	2
	V _H -CDR3	ARRGWLPWFAY	30
	V _H -FR1	QVQLKESGAELVRPGALVKLSCKAS	32
	V _H -FR2	MHVVKQRPEQGLEWIGW	9
	V _H -FR3	IYDPKFQGKASLTADTSSNTAYLQLSSLTSE DTAVYYC	33
	V _H -FR4	WGQGTLVTVSA	34
	경쇄가변영역(Light chain variable region; V _L)	DIVMTQSPSSSLAVSAGEKVTLSCSSQSLL NSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAST RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLA VYYCKQSYNLYTFGGGTKLEIK	38
	V _L -CDR1	QSLLNSRTRKNY	5
	V _L -CDR2	WAS	6
	V _L -CDR3	KQSYNLYT	31
	V _L -FR1	DIVMTQSPSSSLAVSAGEKVTLSCSS	35
	V _L -FR2	LAWYQQKPGQSPKLLIY	14
	V _L -FR3	TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDL AVYYC	15
	V _L -FR4	FGGGTKLEIK	36

[181]

[182] 실시예 1-2. PUAF 단백질에 대한 특이도 확인

[183] 상기 실시예 1-1에서 발굴한 2H2, 4E6, 11G6 및 20C5의 4종의 항체 중에서, PUAF 단백질에 친화도가 가장 높은 항체를 발굴하기 위하여, 다음과 같은

방법을 수행하였다.

- [184] 구체적으로, 항원-항체의 친화도 테스트를 위해 간접 ELISA(Indirect ELISA)를 수행하였다. PAUF를 코팅한 면역-플레이트(Immuno-plate)에 2H2, 4E6, 11G6 및 20C5의 4종의 항체를 농도별로 처리한 뒤, HRP가 표지된 항-마우스 항체를 이용하여 O.D 값을 측정하였다. 이때, O.D 값이 높을수록 PAUF와 항체의 친화도가 높음을 의미한다. 또한, PAUF에 대한 결합친화성이 높은 항-PAUF 마우스 단일클론항체의 다른 항원 단백질과의 비특이적 결합을 측정하기 위해 면역-플레이트에 PAUF와 불특정 항원을 코팅하여 간접 ELISA를 수행하였다.
- [185] 그 결과, 도 1의 A 및 B에서 볼 수 있듯이, 다른 항체에 비하여, 2H2 또는 20C5의 두 종의 항체가 PAUF 단백질에 더 높은 친화도로 결합하며, 또한 PAUF 단백질에 대하여 매우 높은 특이도를 가지고 있음을 확인하였다.
- [186]
- [187] 실시예 1-3. 에피토프(epitope) 확인
- [188] 상기 실시예 1-1에서 발굴한 2H2 또는 20C5의 에피토프를 확인하기 위하여, 먼저 한국 등록특허공보 제10-1098186호에 공지된 PAUF 특이적인 인간 단일클론항체인 8F3, 즉 PMAb83과 동일한 에피토프를 갖는지 확인하였다.
- [189] 구체적으로, 비오틴-표지 2H2 경쟁 ELISA(Biotin-labeled 2H2 Competitive ELISA)를 수행하였다. 면역-플레이트에 PAUF를 코팅한 후 비오틴이 표지된 2H2와 비오틴이 표지되지 않은 비표지 항체를 1:0, 1:50, 1:100, 1:200 비율로 넣어주었다. 2차 항체로는 스트렙타비딘(streptavidin)-HRP를 사용하여 각각의 항체의 O.D값을 측정함으로써 에피토프를 분석하였다. 이때, 2가지 항체가 유사한 에피토프를 갖는 경우 비표지 항체의 농도가 증가함에 따라 O.D 값이 낮아지지만, 2가지 항체의 에피토프가 다른 경우 비표지 항체의 농도가 증가하여도 O.D 값은 변화가 없다.
- [190] 그 결과, 도 2에서 볼 수 있듯이, 2H2 또는 20C5는 유사한 에피토프를 인식하며, PMAb83과 다른 에피토프를 갖는 것을 확인하였다.
- [191]
- [192] 실시예 2. 항-PAUF 단백질 키메라 항체(chimeric antibodies)의 제조 및 특성 확인
- [193] 실시예 2-1. cPMAb22 또는 cPMAb205의 제조
- [194] 상기 실시예 1에서 발굴한 2H2 또는 20C5 마우스 항체의 거부반응을 최소화하기 위하여, 상기 항체의 가변영역은 유지하고, 불변영역만 인간 유래의 단백질로 바꾼 키메라 항체를 제조하였다.
- [195] 구체적으로, 2H2 또는 20C5 마우스 항체를 생산하는 하이브리도마(hybridoma) 세포에서 전체 mRNA를 분리하여 cDNA를 합성하였다. 그 후, PCR을 통해 각 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변영역(variable region)만을 증폭시켜 DNA를 얻었다. PCR을 통해 얻은 2H2 또는 20C5의 가변영역을 인간의 중쇄 및 경쇄의 불변영역을 가지는 벡터에 클로닝 하였다. 벡터에 클로닝한 2H2와 20C5를 DNA

전기영동을 통해 확인 한 후, 서열을 분석하여 그룹을 나누었다. 같은 서열을 가지는 클론을 제거한 뒤, 각 항체의 중쇄 및 경쇄를 선별하였다. 선별된 서열을 HEK293 세포에서 발현시켜 최종적으로 마우스의 가변영역과 인간의 불변영역을 가지는 키메라 항체 2종을 제작하였다.

- [196] 그 결과, 2H2의 키메라 항체인 cPMAb22, 또는 20C5의 키메라 항체인 cPMAb205를 제조할 수 있었다. 또한, 이의 중쇄 및 경쇄 가변영역, CDR, 및 FR 서열은 상기 표 1 및 2에 기재한 2H2 또는 20C5와 동일함을 확인하였다.
- [197]
- [198] 실시예 2-2. PUAF 단백질에 대한 특이도 확인
- [199] 상기 실시예 2-1에서 제조한 cPMAb22 또는 cPMAb205의 PUAF 단백질에 대한 특이도를 확인하기 위하여, 다음과 같은 방법을 수행하였다.
- [200] 구체적으로, 간접 ELISA를 수행하였다. PAUF-His 단백질과 다수의 불특정 항원 단백질을 코팅한 면역-플레이트에 키메라 항체 cPMAb22와 cPMAb205 및 인간 항체 PMAb83를 0, 1, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 넣은 뒤, 2차 항체인 항-인간 카파 경쇄-HRP(anti-human kappa light chain-HRP)를 사용하여 O.D 값을 측정하였다.
- [201] 그 결과, 도 3에서 볼 수 있듯이, cPMAb22 또는 cPMAb205는 PUAF 단백질에 대하여 매우 높은 특이도를 가지고 있으며, 특히 기존의 항-PAUF 인간 항체인 PMAb83보다 더 높음을 확인하였다.
- [202]
- [203] 실시예 2-3. PUAF 단백질에 대한 친화도 확인
- [204] 상기 실시예 2-1에서 제조한 cPMAb22 또는 cPMAb205의 PUAF 단백질에 대한 친화도를 확인하기 위하여, 다음과 같은 방법을 수행하였다.
- [205] 구체적으로, 간접 ELISA를 수행하였다. 면역-플레이트에 PAUF-His를 코팅시킨 후 각 항체를 농도별로 처리하였으며, 2차 항체로는 인간의 불변영역을 인식하는 항-인간 Fc-HRP를 사용하여 분석하였다. 이때, 각 항체의 농도가 증가함에 따라 O.D 값은 증가하게 된다.
- [206] 그 결과, 도 4에서 볼 수 있듯이, cPMAb22 또는 cPMAb205는 PUAF 단백질에 대하여 매우 높은 친화도를 가지고 있으며, 특히 기존의 항-PAUF 인간 항체인 PMAb83보다 더 높음을 확인하였다.
- [207]
- [208] 실시예 2-4. 암세포의 증식(proliferation) 억제 효과 확인
- [209] 상기 실시예 2-1에서 제조한 키메라 항체 cPMAb22의 암에 대한 치료효과를 확인하기 위하여, 췌장암 세포주 BxPC-3에 대한 증식 억제 효과를 확인하였다.
- [210] 구체적으로, WST-1 증식 어레이(proliferation assay)를 수행하였다. PAUF의 자체 발현량이 높은 BxPC-3 세포주를 96웰 플레이트에 3×10^3 씩 넣어준 후, IgG와 키메라 항체 cPMAb22와 인간항체 PMAb83를 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 2일에 한번씩 처리하였다. 이후, WST-1을 처리하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [211] 그 결과, 도 5에서 볼 수 있듯이, IgG 대조군 항체를 처리한 그룹에 비하여,

cPMAb22를 처리한 그룹이 BxPC-3 세포의 증식 억제능이 더 좋은 것을 확인하였다.

- [212] 상기 결과를 통해, cPMAb22는 우수한 암세포 증식 억제 효과를 나타내므로, 암의 예방 또는 치료 물질로 유용하게 사용될 것임을 알 수 있었다.
- [213]
- [214] 실시예 2-5. 암세포의 이동(migration) 억제 효과 확인
- [215] 상기 실시예 2-1에서 제조한 키메라 항체 cPMAb22의 암에 대한 치료효과를 확인하기 위하여, 췌장암 세포주 CFPAC-1 및 췌장암 환자로부터 유래한 췌장암 세포 AMCPAC04에 대한 이동 억제 효과를 확인하였다.
- [216] 구체적으로, 트랜스웰(Transwell)을 이용한 이동 어세이(migration assay)를 수행하였다. 췌장암 세포주 CFPAC-1의 경우 트랜스웰의 상단 구획(upper compartment)에는 혈청이 포함되지 않은 배지를 이용하여 각 세포를 5×10^4 씩 넣었고, IgG와 cPMAb22 및 PMAb83를 $15 \mu\text{g/ml}$ 을 처리하였다. 하단 구획(Lower compartment)에는 혈청을 포함한 배지를 넣었고, 24 시간 뒤 각 세포의 이동을 관찰하였다. 또한, 췌장암 환자로부터 유래한 췌장암 세포 AMCPAC04는 상단 구획에는 혈청이 포함되지 않은 배지를 이용하여 각 세포를 6×10^4 씩 넣었고, IgG와 cPMAb22 및 PMAb83를 $10 \mu\text{g/ml}$ 을 처리하였다. 하단 구획에는 혈청을 포함한 배지를 넣었고, 20 시간 뒤 세포의 이동을 관찰하였다.
- [217] 그 결과, 도 6에서 볼 수 있듯이, IgG 대조군 항체를 처리한 그룹에 비하여, cPMAb22를 처리한 그룹은 췌장암 세포주 또는 환자 유래 췌장암의 이동 정도가 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 이는 PMAb83를 처리한 그룹에 비해서도 더욱 낮은 것임을 확인하였다.
- [218] 상기 결과를 통해, cPMAb22는 기존의 항-PAUF 인간 항체인 PMAb83보다 더 우수한 암세포 이동 억제 효과를 나타내므로, 암의 예방 또는 치료 물질로 유용하게 사용될 것임을 알 수 있었다.
- [219]
- [220] 실시예 2-6. 암세포의 침투(invasion) 억제 효과 확인
- [221] 상기 실시예 2-1에서 제조한 키메라 항체 cPMAb22의 암에 대한 치료효과를 확인하기 위하여, 췌장암 세포주 CFPAC-1 및 췌장암 환자로부터 유래한 췌장암 세포인 AMCPAC04에 대한 침투 억제 효과를 확인하였다.
- [222] 구체적으로, 트랜스웰을 이용한 침투 어세이(invasion assay)를 수행하였다. 이때, 트랜스웰에 세포외기질을 인위적으로 모사할 수 있는 매트릭스(matrigel)를 코팅하여 각 항체에 의해 변화하는 췌장암 세포주의 침투능을 관찰하였다. 췌장암 세포주 CFPAC-1의 경우 트랜스웰의 상단 구획에는 혈청이 포함되지 않은 배지를 이용하여 각 세포를 7×10^4 씩 넣었고, IgG와 cPMAb22 및 PMAb83를 $15 \mu\text{g/ml}$ 을 처리하였다. 하단 구획에는 혈청이 포함된 배지를 넣고, 24시간 뒤 각 세포의 침투를 관찰하였다. 또한, 췌장암 환자로부터 유래한 췌장암 세포 AMCPAC04는 상단 구획에는 혈청이 포함되지

않은 배지를 이용하여 각 세포를 6×10^4 씩 넣었고, IgG와 cPMAb22 및 PMAb83를 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하였다. 하단 구획에는 혈청이 포함된 배지를 넣고, 20시간 뒤 세포의 침투를 관찰하였다.

- [223] 그 결과, 도 7에서 볼 수 있듯이, IgG 대조군 항체를 처리한 그룹에 비하여, cPMAb22를 처리한 그룹은 체장암 세포주 또는 환자 유래 체장암의 침투 정도가 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 이는 PMAb83를 처리한 그룹에 비해서도 더욱 낮은 것임을 확인하였다.
- [224] 상기 결과를 통해, cPMAb22는 기존의 항-PAUF 인간 항체인 PMAb83보다 더 우수한 암세포 침투 억제 효과를 나타내므로, 암의 예방 또는 치료 물질로 유용하게 사용될 것임을 알 수 있었다.
- [225]
- [226] 실시예 3. 항-PAUF 단백질 인간화 항체(humanized antibodies)의 제조 및 특성 확인
- [227] 실시예 3-1. hPMAb22의 제조
- [228] 상기 실시예 1에서 발굴한 2H2 마우스 항체 및 상기 실시예 2에서 제조한 cPMAb22 키메라 항체의 거부반응을 최소화하기 위하여, 2H2 및 cPMAb22의 CDR(마우스 유래)은 유지하고, CDR을 제외한 가변영역 및 불변영역은 인간 유래의 단백질로 바꾼 인간화 항체를 제조하였다.
- [229] 구체적으로, CDR grafting을 통해 2H2- V_H1/V_L1 , 2H2- V_H1/V_L2 , 2H2- V_H1/V_L3 의 3종의 인간화 항체를 제조하였고, 이들의 친화도 및 생산 수율을 확인하였다. 인간화 항체의 발현량을 측정하기 위해 각각 5 ml 수준에서 3개의 중쇄 V_H1 , V_H2 , V_H3 와 3개의 경쇄 V_L1 , V_L2 , V_L3 를 서로 교차 조립(cross assembling)하도록 하여 HEK293 세포에 형질주입하였다. 이후, 6일 후에 항체의 단백질이 포함된 배지를 수확하여 배양액을 얻어 웨스턴블롯을 통해 발현율을 측정하였다. 또한, 이들 항체의 친화도 분석을 위해 간접 ELISA를 수행하였다. 면역-플레이트에 PAUF-His를 코팅시킨 후 각 항체를 농도별로 처리하였고, 2차 항체로는 인간 항체의 불변영역을 인식하는 항-인간 Fc-HRP를 사용하여 O.D 값을 측정하였다.
- [230] 그 결과, 도 8에서 볼 수 있듯이, 다른 인간화 항체에 비하여, 2H2- V_H1/V_L1 항체가 PUAf 단백질에 대하여 가장 높은 친화도를 가지고 있으며, 이는 키메라 항체인 cPMAb22, 또는 기존의 항-PAUF 인간 항체인 PMAb83보다도 높음을 확인하였다.
- [231] 아울러, 도 9에서 볼 수 있듯이, 2H2- V_H1/V_L1 항체의 생산 수율은 165.5 mg/L로서, 28.25 mg/L 또는 42.0 mg/L의 수율을 갖는 2H2- V_H1/V_L2 또는 2H2- V_H1/V_L3 보다 매우 높음을 확인하였다.
- [232] 상기 결과를 통해, PUAf 단백질에 대하여 가장 높은 친화도를 가지고, 가장 높은 수율을 갖는 상기 2H2- V_H1/V_L1 항체를 본 발명에 따른 2H2 및 cPMAb22의 인간화 항체로 선별하여 'hPMAb22'로 명명하였고, 이의 서열은 하기 표 3에 기재하였다.

[233] [표3]

항-PAUF 단백질 인간화 항체, 'hPMAb22'의 아미노산 서열

항체명	구분	서열	서열 번호
hPMAb22	중쇄가변영역(Heavy chain variable region; V _H)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNI KDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENG NTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCARRAITTATAWFAYWGQ GTLVTVSS	28
	V _H -CDR1	GFNIKDY	1
	V _H -CDR2	IDPENGNT	2
	V _H -CDR3	ARRAITTATAWFA	3
	V _H -CDR3	ARRAITTATAWFAY	4
	V _H -FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	19
	V _H -FR2	MHWVRQAPGQGLEWMGW	20
	V _H -FR3	NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR SDDTAVYYC	21
	V _H -FR4	YWGQGTSLVTVSS	22
	V _H -FR4	WGQGTSLVTVSS	23
	경쇄가변영역(L ight chain variable region; V _L)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSL NSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDV AVYYCKQSYNLYTFGQGTKVEIK	29
	V _L -CDR1	QSLNSRTRKNY	5
	V _L -CDR2	WAS	6
	V _L -CDR3	KQSYNLY	7
	V _L -FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS	24
	V _L -FR2	LAWYQQKPGQPPKLLIY	25
	V _L -FR3	TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDV AVYYC	26
	V _L -FR4	TFGQGTKVEIK	27

[234]

[235] 실시예 3-2. PUAF 단백질에 대한 특이도 확인

- [236] 상기 실시예 3-1에서 제조한 인간화 항체 hPMAb22의 PUAF 단백질에 대한 특이도를 확인하기 위하여, 상기 실시예 2-2에 따른 방법을 수행하였다.
- [237] 그 결과, 도 10에서 볼 수 있듯이, hPMAb22는 PUAF 단백질에 대하여 매우 높은 특이도를 가지고 있으며, 특히 기존의 항-PAUF 인간 항체인 PMAb83보다 더 높음을 확인하였다.
- [238]
- [239] 실시예 3-3. PUAF 단백질에 대한 친화도 확인
- [240] 상기 실시예 3-1에서 제조한 인간화 항체 hPMAb22의 PUAF 단백질에 대한 친화도를 확인하기 위하여, 다음과 같은 방법을 수행하였다.
- [241] 구체적으로, SPR 방법을 이용하여 항원항체의 결합력을 측정하였다. 금속박막 표면에 항원 PAUF를 고정시킨 후, 항체를 농도별로 희석하여 금속표면을 지나가도록 하였다. 항원과 항체가 결합하는 시간과 해리되는 시간을 측정하여 각 항원항체의 결합친화성을 측정하였다.
- [242] 그 결과, 도 11에서 볼 수 있듯이, PMAb83의 경우 1.169×10^{-9} M, hPMAb22는 0.1938×10^{-9} M의 K_d 값을 보임을 확인하였다. 상기 결과를 통해, hPMAb22는 PUAF 단백질에 대하여 매우 높은 친화도를 가지고 있으며, 특히 기존의 항-PAUF 인간 항체인 PMAb83보다 더 높음을 알 수 있었다.
- [243]
- [244] 실시예 3-4. 에피토프 확인
- [245] 상기 실시예 3-1에서 제조한 hPMAb22의 에피토프를 확인하기 위하여, 먼저 기존의 항-PAUF 인간 항체인 PMAb83과 에피토프가 동일한지 상기 실시예 1-3에 따라 확인하였다.
- [246] 그 결과, 도 12에서 볼 수 있듯이, hPMAb22는 PMAb83과 다른 에피토프를 갖는 것을 확인하였다.
- [247]
- [248] 실시예 3-5. 암세포의 증식 억제 효과 확인
- [249] 상기 실시예 3-1에서 제조한 인간화 항체 hPMAb22의 암에 대한 치료효과를 확인하기 위하여, 췌장암 세포주 CFPAC-1에 대한 증식 억제 효과를 상기 실시예 2-4에 따른 방법으로 확인하였다.
- [250] 그 결과, 도 13에서 볼 수 있듯이, IgG 대조군 항체를 처리한 그룹에 비하여, hPMAb22를 처리한 그룹이 CFPAC-1 세포의 증식 억제능이 더 좋은 것을 확인하였다.
- [251] 상기 결과를 통해, hPMAb22는 우수한 암세포 증식 억제 효과를 나타내므로, 암의 예방 또는 치료 물질로 유용하게 사용될 것임을 알 수 있었다.
- [252]
- [253] 실시예 3-6. 암세포의 이동 억제 효과 확인
- [254] 상기 실시예 3-1에서 제조한 인간화 항체 hPMAb22의 암에 대한 치료효과를 확인하기 위하여, 췌장암 환자로부터 유래한 췌장암 세포 AMCPAC06 및 난소암

세포주 OVCAR-5에 대한 이동 억제 효과를 상기 실시예 2-5에 따른 방법으로 확인하였다.

- [255] 그 결과, 도 14에서 볼 수 있듯이, IgG 대조군 항체를 처리한 그룹에 비하여, hPMAb22를 처리한 그룹은 췌장암 세포주, 환자 유래 췌장암, 또는 난소암 세포주의 이동 정도가 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 이는 PMAb83를 처리한 그룹에 비해서도 더욱 낮은 것임을 확인하였다.
- [256] 상기 결과를 통해, hPMAb22는 기존의 항-PAUF 인간 항체인 PMAb83보다 더 우수한 암세포 이동 억제 효과를 나타내므로, 암의 예방 또는 치료 물질로 유용하게 사용될 것임을 알 수 있었다.
- [257]
- [258] 실시예 3-7. 암세포의 침투 억제 효과 확인
- [259] 상기 실시예 3-1에서 제조한 인간화 항체 hPMAb22의 암에 대한 치료효과를 확인하기 위하여, 췌장암 환자로부터 유래한 췌장암 세포 AMCPAC04 또는 AMCPAC06 및 난소암 세포주 OVCAR-5에 대한 침투 억제 효과를 상기 실시예 2-6에 따른 방법으로 확인하였다.
- [260] 그 결과, 도 15에서 볼 수 있듯이, IgG 대조군 항체를 처리한 그룹에 비하여, hPMAb22를 처리한 그룹은 췌장암 세포주, 환자 유래 췌장암, 또는 난소암 세포주의 침투 정도가 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 이는 PMAb83를 처리한 그룹에 비해서도 더욱 낮은 것임을 확인하였다.
- [261] 상기 결과를 통해, hPMAb22는 기존의 항-PAUF 인간 항체인 PMAb83보다 더 우수한 암세포 침투 억제 효과를 나타내므로, 이는 암의 예방 또는 치료 물질로 유용하게 사용될 것임을 알 수 있었다.
- [262]
- [263] 실시예 3-8. 생체 내(in vivo) 항암 효과 확인
- [264] 상기 실시예 3-5 내지 3-7을 통해 PAUF 단백질에 특이적인 인간화 항체 hPMAb22는 시험관 내(in vitro)에서 암세포의 증식, 이동 및 침투를 억제하는 것을 확인함에 따라, 생체 내(in vivo)에서도 동일한 항암 효과를 나타내는지 확인하였다.
- [265] 구체적으로, 췌관 선암종(pancreatic ductal adenocarcinoma) 환자의 암 조직을 NSG 마우스에 이식하여 PDX(patient-derived xenograft)-마우스 모델을 제작하였다. PDX-마우스 모델에서 적출한 암 조직을 누드 마우스 오른쪽 다리 피하에 이식하여 약 3주 후에 종양의 크기가 80-120 mm³로 형성된 마우스를 선별하여 그룹을 나누었다. 약물 투여는 꼬리정맥에 하였으며, IgG 및 hPMAb22는 10 mg/kg으로 일주일에 2번씩 총 4주간 투여하였고, 양성 대조군인 젬자(Gemzar; Gemcitabine)는 50 mg/kg으로 한 번 투여하였다. 이 때, 일주일에 두 번씩 캘리퍼를 사용하여 종양의 크기를 측정하였고, 마우스 체중도 측정하여 종양의 약물에 대한 반응성을 확인하였다. 31일 췌 실험을 종료하고 종양을 적출한 후, 각 종양의 무게를 측정 및 비교하였다.

- [266] 그 결과, 도 16에서 볼 수 있듯이, 대조군 항체를 투여한 그룹에 비하여, hPMAb22를 투여한 그룹은 암세포의 성장이 30% 이상 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 상기의 성장 억제 효과는 항암제로 사용되고 있는 쥘자를 투여한 그룹보다 더 우수함을 확인하였다.
- [267] 상기 결과를 통해, hPMAb22는 기존 항암제인 쥘자보다 더 우수한 생체 내 암 성장 억제 효과를 나타내므로, 이는 암의 예방 또는 치료 물질로 유용하게 사용될 것임을 알 수 있었다.
- [268]
- [269] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.
- [270]