(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0058137
(43) 공개일자 2025년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6851 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-0140949
(22) 출원일자 2023년10월20일
심사청구일자 2023년10월20일

(71) 출원인
주식회사이온셀
강원도 춘천시 한림대학길 1, 창업보육센터 1210 8호(옥천동, 한림대학교)
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
김형수
서울특별시 강남구 선릉로69길 20 역삼e-편한세상 109동 602호
박성택
서울특별시 서초구 신반포로16길 15-20 반포힐스테이트 102동 1103호
(74) 대리인
이보근

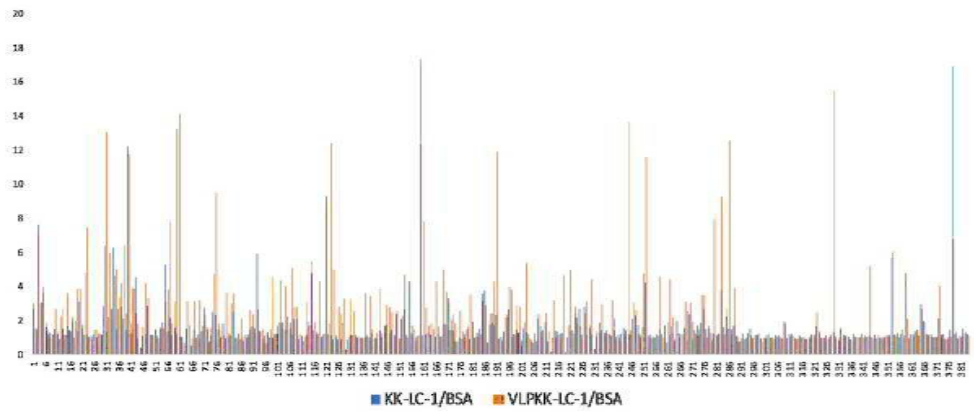
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **CT83에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 약물이 접합된 항체-약물 컨쥬게이트 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명의 목적은 CT83 항원에 대한 인간 단클론 항체 및 이의 용도를 제공하는 것으로서, CT-83 항원의 정보를 바이오 패닝을 통해 파악한 후, 항CT83(KK-LC-1) 항체를 제작하고 재조합 KK-LC-1 (CT83) 유전자 서열 확인하였다. 또한, 선정된 3가지 재조합 항체 SKAI-5, SKAI-33 또는 SKAI-48를 HeLa 세포 또는 HT-29세포와의 결합 능력을 확인하여, 암 관련 치료와 관련된 사업에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C07K 16/3023 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 7의 중쇄 CDR1, 서열번호 8의 중쇄 CDR2 및 서열번호 9의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 10의 경쇄 CDR1, 서열번호 11의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 12의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역;을 포함하는, CT83에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 약물이 접합된 항체-약물 컨쥬게이트(antibody-drug conjugate).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 약물은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편;에 링커 또는 2차 항체로 접합된 것을 특징으로 하는, 항체-약물 컨쥬게이트(antibody-drug conjugate).

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 링커는 라이신 접합, 시스테인 접합, 및 위치특이적 결합으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 항체-약물 컨쥬게이트(antibody-drug conjugate).

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 17의 에피토프와 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 항체-약물 컨쥬게이트(antibody-drug conjugate).

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 scFv인 것을 특징으로 하는, 항체-약물 컨쥬게이트(antibody-drug conjugate).

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 약물은 독소, 화학치료제(chemotherapeutic agent), 세포독성항암제, 표적항암제, 면역항암제, 면역관문억제제, 항생제, ADP-리보실 트랜스퍼라제(ADP-ribosyl transferase), 방사성동위원소 및 핵산분해효소(nucleolytic enzyme)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항체-약물 컨쥬게이트(antibody-drug conjugate).

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 암은 자궁경부암(cervical cancer), 대장암 (Colorectal cancer), 유방암 (Breast cancer), 폐암 (Lung cancer), 전립선암 (Prostate cancer), 식도암 (Esophageal cancer), 췌장암 (Pancreatic cancer), 담도암 (Biliary tract cancer), 간암 (Liver cancer), 위암 (Stomach cancer) 직장암(rectal cancer), 구강암(oral cancer), 인두암(pharynx cancer), 후두암(larynx cancer), 결장암(colon cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 난소암(ovarian cancer), 고환암(testis cancer), 방광암(bladder cancer), 신장암(renal cancer), 뼈암(bonecancer), 결합조직암(connective tissue cancer), 피부암(skin cancer), 뇌종양(brain cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 백혈병(leukemia), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 림프종(lymphoma) 및 다발성 골수혈액암(multiple myeloid blood cancer) 및 고형암으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 항체-약물 컨쥬게이트(antibody-drug conjugate).

청구항 8

제1항의 항체-약물 컨쥬게이트(antibody-drug conjugate)를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 9

제1항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 약물을 접합시키는 항체-약물 컨쥬게이트(antibody-drug conjugate) 제조 방법.

청구항 10

암 관련 시료에 청구항 1항의 항체-약물 컨쥬게이트(antibody-drug conjugate) 처리하여 CT83 항원-항체 복합체를 형성하는 단계; 및 상기 CT83 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, 종양 또는 암 진단 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

환자에게 청구항 제1항의 항체-약물 컨쥬게이트(antibody-drug conjugate)를 투여하여 CT83 항원-항체 복합체를 형성하는 단계; 및 상기 CT83 항원-항체 복합체를 통해 CT83 항원에 약물을 전달하는 단계를 포함하는, 종양 또는 암 치료방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CT83에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 약물이 접합된 항체-약물 컨쥬게이트 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 항체의 CDR(Complementarity Determining Region)은 항체 분자의 일부로서 항원 결합 부위를 형성하며, 항체가 특정 항원과 상호작용하여 인식하고 결합하는 역할을 한다.

[0003] CDR은 항체의 다양성을 결정하는 중요한 요소이고, CDR은 항체 엔지니어링과 항체 기반 치료제 개발에 있어서 중요한 요소이다.

[0004] HeLa 세포는 말라리아 치료를 위해 1951년에 헨리엣터 라크스 (Henrietta Lacks)라는 여성에서 채취된 자궁경부암 세포주이다. 이 세포주는 매우 강력한 성장 능력을 갖고 있으며, 장기간에 걸쳐 인공적으로 번식할 수 있어

세포 생물학 및 암 연구에서 널리 사용되며, 또한, 종양 세포의 특성을 연구하고 항암 치료의 효과를 평가하는 등의 목적으로 널리 활용된다.

[0005] 자궁경부암은 여성 자궁(태반을 배출하는 기관)의 경부 부위에서 발 생하는 암이다. 이 종류의 암은 주로 인간 유두종 바이러스(Human Papillomavirus, HPV) 감염과 관련되어 있다. HPV는 성행위를 통해 전파되며, 일부 HPV 감염은 자궁 경부 세포의 이상을 유발하여 암으로 진행할 수 있다.

[0006] HT-29 세포는 대장암 세포주 중 하나로 널리 사용되는 인공적인 세포 주이다. 이 세포주는 인간 대장암 조직에서 유래했으며, 대장암 연구와 약물 시험에 널리 활용되고 있다.

[0007] 대장암은 대장 또는 직장에서 발생하는 암으로, 소화계 암 중 하나이다. 주로 결장의 내막에서 암이 발생하며, 종양이 성장하면서 주변 조직에 침범하고 확산할 수 있다. 대장암은 주로 장 내 선종(polyps)이 암으로 진화하는 과정을 거치며, 다양한 증상과 징후를 나타낼 수 있으며, 이는 종양의 위치와 크기, 진 행 정도에 따라 달라질 수 있다. 일반적인 대장암의 증상은 변비 또는 설사, 변의 형태나 색상의 변화, 복통, 체중 감소, 피로 등이 존재할 수 있다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 CT83 항원의 과발현은 불량한 예후와 강한 연관성이 있으며, CT83 항원의 발현은 암세포의 증식, 전이, EMT를 촉진하는 것을 확인하였고, 파지디스플레이와 바이오 패닝을 통해 CT83 항원에 대해 특이적으로 결합하는 재조합 항체를 개발하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 CDR 1, CDR 2 및 CDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0010] CDR 1, CDR 2 및 CDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 CT83 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 또다른 목적은 상기 CT83 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명의 목적은 상기 유전자를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.

[0013] 또한, 본 발명의 목적은 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공하는 것이다.

[0014] 또한, 본 발명의 목적은 상기 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계;를 포함하는 CT83 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 또한, 본 발명의 목적은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 또한, 본 발명의 목적은 상기 암의 예방 또는 치료용 조성물을 이용해 상기 암을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[0017] 또한, 본 발명의 목적은 상기 CT83에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 결합된 항체-약물 결합체를 제공하는 것이다.

[0018] 또한, 본 발명의 목적은 상기 CT83에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 종양 또는 암 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[0019] 또한, 본 발명의 목적은 암 관련 시료에 상기 CT83에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 처리하여 CT83 항원-항체 복합체를 형성하는 단계; 및 상기 CT83 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, 종양 또는 암 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0020] 아울러, 본 발명의 목적은 암 관련 시료에 상기 CT83에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 처리하여 CT83 항원-항체 복합체를 형성하는 단계; 및 상기 CT83 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, 종양 또는 암 진단 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0021] 본 발명은 CDR 1, CDR 2 및 CDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0022] CDR 1, CDR 2 및 CDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, CT83에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 CT83에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계;를 포함하는 CT83 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법을 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 암의 예방 또는 치료용 조성물을 이용해 상기 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 CT83에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 결합된 항체-약물 결합체를 제공한다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 CT83에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 종양 또는 암 검출용 키트를 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명은 암 관련 시료에 상기 CT83에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 처리하여 CT83 항원-항체 복합체를 형성하는 단계; 및 상기 CT83 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, 종양 또는 암 검출 방법을 제공한다.

[0032] 아울러, 본 발명은 암 관련 시료에 상기 CT83에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 처리하여 CT83 항원-항체 복합체를 형성하는 단계; 및 상기 CT83 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, 종양 또는 암 진단 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0033] 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 CT83 항원과 특이적으로 결합할 수 있고, 이러한 항체 또는 항원 결합 단편을 이용하여 CT83 항원과 관련된 종양 또는 암의 진단, 및 치료와 관련된 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1는 400개의 항CT83 단일항체 후보군의 ELISA 결과를 나타낸 것이다.

도 2은 본 발명의 항체 후보군으로 선정된 SKAI-33의 ELISA 결과를 나타낸 것이다.

도 3는 에피토프 매핑을 위해 항원과의 결합을 확인한 마이크로어레이 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 HeLa 세포 또는 HT-29 세포에서의 KK-LC-1 단백질의 발현 양을 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 항체 후보군으로 선정된 SKAI-33의 HeLa 세포 또는 HT-29 세포에 특이적으로 결합하는지 여부를 확인한 것이다.

도 6a는 본 발명의 항체가 가지는 에피토프 중 어느 하나의 주요 정보를 나타낸 것이다. 도 6a의 상단은 에피토프의 서열, 길이, 질량, 등전점, 전하, 소수성 수치(hydrophobicity), 및 흡광계수 정보를 나타낸 것이고, 도 6a의 중단은 상기 에피토프의 구조를 나타낸 것이고, 도 6a의 하단은 상기 에피토프 서열을 이루는 아미노산에 대한 서열(sequence), 서열번호, 길이, 소수성 지표(hydropathy_index)를 나타낸 것이다.

도 6b는 본 발명의 항체가 가지는 또다른 에피토프의 주요 정보를 나타낸 것이다. 도 6b의 상단은 에피토프의 서열, 길이, 질량, 등전점, 전하, 소수성 수치(hydrophobicity), 및 흡광계수 정보를 나타낸 것이고, 도 6b의 중단은 상기 에피토프의 구조를 나타낸 것이고, 도 6b의 하단은 상기 에피토프 서열을 이루는 아미노산에 대한 서열(sequence), 서열번호, 길이, 소수성 지표(hydropathy_index)를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 항체가 결합하는 에피토프 중 반복 서열의 위치를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0036] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로써, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0037] 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

[0038] “파지 디스플레이(phage display)”는 단백질간 상호 작용 또는 단백질과 다른 표적 물질과의 상호 작용을 검출하는 실험 방법이다. 박테리오파지(bacteriophage)에 유전자를 클로닝(clonning)해서 발현된 단백질을 파지 표면에 디스플레이 되도록 한 다음, 다른 단백질 또는 다른 표적 물질과의 결합력으로 상호 작용의 여부 및 상호 작용의 정도를 측정할 수 있다.

[0039] 패닝(panning)은 특정 항원에 대해 특이적인 결합을 하는 항체 또는 항원에 결합하는 단편을 선별하는 방법이다. 파지라이브러리를 이용해 다양한 항체 단편을 파지에 발현시킨 후 항원과의 특이적 결합을 확인하고, 특이적 결합이 있는 파지가 암호화한 유전정보를 확인하여 항체를 제작할 수 있다.

[0040] 본 발명의 "바이오 패닝"은 친화도에 따라 특정 목표 물질에 결합하는 펩티드를 골라내는 기술이고, 이를 통해 특정 목표에 대해 결합하는 펩티드의 서열을 동정하여 항체개발, 의약품 개발에 활용 가능함이 알려져 있다.

[0041] 본 발명의 항체의 아미노산 서열은 표 2에 표시되어 있다.

[0042] CT83 항원은 CT83 유전자에 의해 발현되는 단백질이고 CXorf61, KKLC1, Kita-kyushu lung cancer antigen 1, KK-LC-1, 또는 Cancer/testis antigen 83 로도 불리고, 약 26.8 kDa의 분자량을 가지고 있고 인체에서 암 유발 원인인자 중의 하나로 알려져 있다.

[0043] 상기 기술적 과제를 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 CDR 1, CDR 2 및 CDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 CDR 1, CDR 2 및 CDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, CT83에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0044] 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 17의 에피토프와 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0045] 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CT83에 특이적으로 결합하는 scFv일 수 있다. 상기 scFv는 단일사슬단편 항체를 의미할 수 있고 면역글로블린의 경쇄와 중쇄의 가변영역을 연결한 것을 의미할 수 있다.

[0046] 상기 기술적 과제를 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 CT83에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0047] 상기 유전자가 세포 내에서 발현되는 경우, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생성할 수 있다.

[0048] 상기 기술적 과제를 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0049] 상기 벡터는 플라스미드, 코스미드(cosmid), 세균인공염색체(BAC), 효모인공염색체(YAC), 레트로바이러스벡터, 아데노바이러스벡터, 리포좀, 또는 엑소좀을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0050] 상기 기술적 과제를 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

이 때 상기 벡터를 숙주세포 내로 주입하는 방법은 전기천공법(electroporation)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 상기 기술적 과제를 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는, CT83 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법을 제공한다.

[0052] 상기 기술적 과제를 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0053] 상기 기술적 과제를 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 암의 예방 또는 치료용 조성물을 이용해 암을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명에 있어서, 상기 암을 치료하는 방법은 인간을 대상으로 하는 치료를 제외할 수 있고 포유류를 대상으로 할 수 있다. 상기 포유류는 개, 고양이, 기린, 호랑이, 고래, 양, 염소, 원숭이, 낙타, 소, 돼지, 코끼리, 및 말 등을 포함해 암이 발병한 동물을 의미할 수 있다.

[0054] 상기 기술적 과제를 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 CT83에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 결합된 항체-약물 결합체를 제공한다.

[0055] 상기 암 예방 또는 치료용 항체-약물 결합체(Antibody-drug conjugate)는 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 링커 또는 2차 항체로 접합된 것을 의미할 수 있다. 이 때 상기 링커는 라이신 접합, 시스테인 접합, 및 위치특이적 결합으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0056] 상기 기술적 과제를 달성하기 위한 하나의 양태로서, 또한, 본 발명의 목적은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 T세포가 결합된 CAR T 치료제를 제공한다.

[0057] 상기 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 독소, 화학치료제(chemotherapeutic agent), 세포독성항암제, 표적항암제, 면역항암제, 면역관문억제제, 항생제, ADP-리보실 트랜스퍼라제(ADP-ribosyl transferase), 방사성동위원소 및 핵산분해효소(nucleolytic enzyme)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상을 의미할 수 있다.

[0058] 상기 암은 자궁경부암(cervical cancer), 대장암 (Colorectal cancer), 유방 암 (Breast cancer), 폐암 (Lung cancer), 전립선암 (Prostate cancer), 식도암 (Esophageal cancer), 췌장암 (Pancreatic cancer), 담도암 (Biliary tract cancer), 간암 (Liver cancer), 위암 (Stomach cancer) 직장암(rectal cancer), 구강암(oral cancer), 인두암(pharynx cancer), 후두암(larynx cancer), 결장암(colon cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 난소암(ovarian cancer), 고환암(testis cancer), 방광암(bladder cancer), 신장암(renal cancer), 뼈암(bonecancer), 결합조직암(connective tissue cancer), 피부암(skin cancer), 뇌종양(brain cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 백혈병(leukemia), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 림프종(lymphoma), 다발성 골수혈액암(multiple myeloid blood cancer), 및/또는 고형암인 것을 의미할 수 있다

[0059] 상기 기술적 과제를 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 CT83에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 종양 또는 암 검출용 키트를 제공한다.

[0060] 상기 CT83 항원은 상기 종양 또는 암 검출용 키트에 있어서 바이오마커(biomarker)로 작용할 수 있고, 상기 CT83 항원에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 반응물질로 할 수 있다.

[0061] 상기 기술적 과제를 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 암 관련 시료에 상기 CT83에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 처리하여 CT83 항원-항체 복합체를 형성하는 단계; 및 상기 CT83 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, 종양 또는 암 검출 방법을 제공한다.

[0062] 아울러 상기 기술적 과제를 달성하기 위한 또다른 양태로서, 본 발명은 암 관련 시료에 상기 CT83에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 처리하여 CT83 항원-항체 복합체를 형성하는 단계; 및 상기 CT83 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, 종양 또는 암 진단 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0064] 실시예를 통해 SKAI-33 단백질이 CT83 항원과 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편임을 확인하였고, SKAI-33 단백질과 암 예방 또는 치료용 약물을 결합하여 ADC로 활용하거나 키메릭항원수용체 T-세포(chimeric antigen receptor T-cell; CAR-T)를 제작해 항암치료에 활용할 수 있음을 확인하였다.

[0065] 이하 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다.

또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0067] **실시예 1. 라이브러리 구축 및 발현**

[0068] CT83 단백질에 특이적으로 결합 가능한 펩타이드 서열을 동정하기 위해 항체 라이브러리를 구축하고 하기와 같은 방법으로 발현하였다.

[0069] 항체 후보서열을 발굴하기 위한 바이오패닝은, 7.6X109 개의 scFv를 암호화하는 뉴클레오타이드에 HA 태그(HA tag)가 결합된 형태인 OPAL 라이브러리(OPAL library, oriented peptide array library, Construction of a Large synthetic human scFv library with six diversified CDRs and high functional diversity., Yang Hym at. al., Molecules and cells, 2009. DOI/10.1007/s10059-009-0028-9)를 사용하였다.

[0070] 상기 OPAL 라이브러리에 의해 발현되는 항체는 V3-23에 위치하는 유전자 Vh3-23이 암호화하는 인간 가변 중사슬 및 Ig에 위치하는 유전자 Vλ이 암호화하는 인간 가변 경사슬을 포함하고 있고, CDR-H1, H2, L1, L2, 및 L3은 일부 CDR 루프 및 CDR 시퀀스를 인간에서 파생된 CDR 시퀀스와 결합하거나 조합한 것을 포함하도록 하였다.

[0071] CDR-H3은 네 개의 서브라이브러리로 구성되어 있으며 AE, BE, CF, 및 DF를 포함하고 있고(표 1), DF 서브라이브러리의 시스테인 사이에(C-(Xaa)4-C) 인트라루프 이황화 결합을 형성하고 있다.

표 1

[0072]

CDR-H3	AE	(N-ter)-(RK)-(X)4-F-D-Y-(C-ter)	서열번호 1
	BE	(N-ter)-(RK)-(DG)-(LPRVAG)-(X)7-F-D-Y-(C-ter)	서열번호 2
	CF	(N-ter)-(RK)-(FSYCLPHRVADG)-(LPRITSVAG)-(X)7-(YS)-(YS)-(ADSY)-(YND)-(GA)-M-D-V-(C-ter)	서열번호 3
	DF	(N-ter)-(RK)-(VADG)-(LPRITSVAG)-(LRISVG)-X-C-(X)4-C-(YS)-(YS)(ADSY)-(YND)-(GA)-M-D-V-(C-ter)	서열번호 4

[0073] X는 임의의 아미노산을 의미함(X)n에서 n은 해당 아미노산이 n개가 반복된 것을 의미함

[0075] ER2738(*E.Coli*, AMID BIOSCIENCES, cat. No. ER-201) 에 상기 OPAL 라이브러리를 형질전환시키고, 50 ug/ml 카르베니실린 및 70 ug/ml 카나마이신을 함유하는 2xYT 배지(BD DifcoTM, 2xYT powder)에 20MOI의 헬퍼파지(VCSM13)를 첨가하고 30℃에서 14시간 동안 배양하였다. 이후 4% Polyethylene glycol 8000 (PEG8000)을 이용해 박테리오파지를 활성화(rescue)시켰다.

[0077] **실시예 2. CT83 단백질과 특이적으로 결합하는 후보군 선별**

[0078] CT83 단백질과 특이적으로 결합하는 후보군을 선별하기 위해 바이오 패닝을 하기와 같이 수행하였다.

[0079] 구체적으로, 재조합 인간 폐암항원 1(CT83)-VLPs (KK-LC-1 VLP, CSB-MP711093HU, CUSABIO)(표 2)을 이용하여 (CT83)-VLPs 항원과 특이적으로 결합하는 물질을 탐색하기 위해 바이오 패닝을 수행하였다.

표 2

[0080]

단백질	서열번호	CAT#	아미노산 서열	발현세포	태그
KK-LC-1(CT83) (NM_001017978)	5	TP309391	(N-ter)-MNFYLLLASSILCALIVFWKYRRFQRNTGEMSSNSTALALVRPSSSGLINSNTDNNLAVYDLSRDILNNFPHSIARQKRILVNLSMVENKLVELEHTLLSKGFRGASPHRKST-(C-ter)	HEK293T	(C-ter)-Myc/DDK

재조합 인간폐암 항원 1 (CT83)-VLPs (활성)	6	CSB-MP711093HU	(N-ter)-MNFYLLLASSILCALIVFWKYRRFQRNTGEMSSNSTALALVRPSSSGLINSNTDNNLAVYDLSRDILNNFPHSIARQKRILVNLSMVENKLVELEHTLLSKGFRGASPHRKST-(C-ter)	포유세포	(N-ter)-6xHis-tag

[0082] CT83 항원을 에폭시 자석 비드와(M-270 Epoxy) 4℃, 오버나이트(overnight)로 결합시킨 후 scFv가 발현된 파지와 37℃, 2시간 배양하였다. 이후 CT83이 결합된 파지를 100 mM Triethylamine(TEA)를 이용하여 용리(elution)후 새로운 ER2738 세포로 감염시켰다. 상기 scFv가 발현된 박테리오 파지를 CT83 항원과 특이적으로 결합시킨 후 상기 TEA를 이용해 용리시키는 바이오 패닝 과정을 3회 반복하였다. 바이오 패닝 과정을 반복하여 항원과 비특이적으로 결합하는 물질을 제거할 수 있었다.

[0083] 이후 VLP 자체와 비특이적으로 결합하는 물질들을 걸러내기 위해 KK-LC-1(CT83)(NM_001017978) 인간 재조합 단백질(Human Recombinant Protein)(CAT#: TP309391, Origene)(표 2)을 이용한 바이오 패닝을 추가적으로 1회 더 진행하여 항체 후보군을 발굴하였다.

[0084] 단일 항체(monoclonal) 후보군 400개는, 상기 4회 패닝 이후 배양한 콜로니 중 독립적으로 형성된 콜로니에서 무작위로 선정하였다(도 1). 각각의 후보군을 scFv 형태로 발현시킨 것에 대해 ELISA분석을 진행하여, BSA 대비 KK-LC-1 (CT-83) 및 BSA 대비 KK-LC-1 VLPs에 특이적으로 결합하는 항체후보군 50개를 선별하였다.

[0086] **실시예 3. 선별된 후보군의 NGS 분석 및 최종 후보군 선별**

[0087] KK-LC-1(CT83) 및 KK-LC-1 VLPs에 결합하고, BSA 및 VLP-(음성)에는 결합하지 않는 선별된 후보군 50개에 대하여 NGS(Next Generation Sequencing) 유전자 분석을 통해 그 50개 후보군 각각에 대한 유전자 서열을 분석하였다.

[0088] 상기 50개 선별된 항체 후보군에 대해 NGS 분석을 진행하여 중복되는 항체 및 서열이동(frame shift)이 발생한 항체를 제외하고 46개의 항체 후보군을 선별하였고, 유전자 서열을 이용해 상기 46개의 항체 후보군의 scFv를 재생산하고, CT83 단백질에 특이적이게 결합할 수 있는 최종 항체 후보군을 선별하기 위해서 상기 재조합 KK-LC-1/BSA 및 KK-LC-1 VLPs/BSA을 ELISA로 분석하였다.

[0089] 그 결과, 흡광도 비율이 10을 초과하고 음성대조군의 흡광도가 기준치 이하인 최종 항체 후보군 3개를 선정하였다. 최종 항체 후보군은 SKAI-5, SKAI-33, 및 SKAI-48으로 명명하였고, 해당 항체 후보군의 중사슬과 경사슬 CDR 아미노산 서열은 표 3에 기재하였다.

[0090] SKAI-33의 ELISA 결과는 도 2와 같다. TMB(3,3',5,5' - 테트라메틸벤지딘)를 넣고 20분 후 흡광도 450nm로 플레이트 리더(plate reader)기로 측정하였다.

표 3

[0091]

SKAI-33	VH	CDR1	CDR2	CDR3
		서열번호 7	서열번호 8	서열번호 9
		(N-ter)-SYSMS-(C-ter)	(N-ter)-AISSSGGNK-(C-ter)	(N-ter)-ARRKKLFDY-(C-ter)
	VL	CDR1	CDR2	CDR3
		서열번호 10	서열번호 11	서열번호 12
		(N-ter)-SGSSSNIGTNDVT-(C-ter)	(N-ter)-ANNQ-(C-ter)	(N-ter)-GAWDASLNG-(C-ter)

[0093] **실시예 4. CT83에 결합하는 에피토프 서열 동정**

[0094] 실시예 3에서 확인한 최종 항체 후보군을 IgG 항체로 제조하고, 해당 항체가 CT83 단백질에 결합하는 부위의 아미노산 서열을 명확히 동정하기 위해서 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0095] **4-1. IgG 항체 제조**

[0096] CT83에 결합하는 SKAI-33의 scFv 서열을 하기와 같은 방법으로 인간 IgG 투벡터(TGEX-HC, Antibody design labs, MX001, 및 TGEX-LC, Antibody design labs, MX002)시스템에 삽입하였다.

[0097] 구체적으로, 제한효소 부위를 포함하는 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 항체유전자 결합부위를 증폭하여 scFv를 암호화하는 염기서열을 이용해 IgG를 제작할 수 있도록 유전자 클로닝 벡터를 제작하였다. 상기 프라이머의 염기서열은 표 4에 기재하였다.

표 4

[0098]

벡터 명	정방향 프라이머 (5'->3')	역방향 프라이머 (5'->3')
TGEX-VH	서열번호 13	서열번호 14
	(BSSHII) NNGCGCGCACTCCGAGGTGCAGCTGTTG	(BsmbI) NNCGTCTCNATGCTGAGCTCACGGTGAC
TGEX-VL	서열번호 15	서열번호 16
	(BspEI) NNNNNNTCCGGACAGTCTGTGCTGACT	(BsaI) NNGGTCTCNTTCGTAGGACCGTCAGCT

[0100] 상기 IgG를 포유세포에서 발현시킬 수 있도록 하기와 같은 방법으로 벡터를 제작하였다.

[0101] VH 프라이머는 5'말단에서 BspE1 및 3'말단에서 Bsa1에 대한 제한부위를 갖도록 설계되었고, VL 프라이머는 5'말단에서 BSSHII 및 3'말단에서 BsmBI에 대한 제한부위를 갖도록 설계되었다. 상기 VH 프라이머의 염기서열은 서열번호 13 및 14의 염기서열이고, VL 프라이머의 염기서열은 서열번호 15 및 16의 염기서열이다.

[0102] 증폭된 VH 단편은 TGEX-HC(Antibody design labs, MX001) 벡터에 삽입하고, VL 단편은 TGEX-LC (Antibody design labs, MX002) 벡터에 삽입하였다. Escherichia coli DH5α-competent cell을 사용해 플라스미드를 증폭하였고, DNA 시퀀싱을 통해 클로닝을 확인하였다.

[0103] 클로닝된 중쇄 및 경쇄 human IgG 플라스미드는 Expi-CHO-s 세포에 하기와 같은 방법으로 공동-형질감염(co-transfection) 시켰다.

[0104] 6 x 106 Expi-CHO-s 세포를 준비하고, 중쇄 및 경쇄 IgG 플라스미드를 각각 15ug씩 Opti-pro SFM 배지(ThermoFisher scientific, Cat no. 12309019)에 5분간 반응시켰다. 5분 후 ExpifectamineTM CHO와 혼합하여 복합체를 만들었다. 만들어진 복합체를 5분의 반응을 넘기지 않도록 하여 준비된 Expi-CHO-s 세포(ThermoFisher scientific, A29127)에 형질감염시켰다. 다음날 영양분 공급과 단백질 생산 효율을 높여주는 ExpiCHOTM Feed 와 ExpiFectamineTM CHO Enhancer(ExpiFectamineTM CHO Transfection kit, ThermoFisher scientific, cat no. A29129)를 추가하였다. 세포 생존율이 약 75%(형질감염 후 약 7일째)일 때 세포를 수확하였다.

[0105] 생성된 항체를 정제하기 위해 단백질 A 레진(Protein A Resin, Amicogen)을 사용하여 단일클론항체를 정제하였다. 생성된 항체(volume 50ml)와 단백질 A 레진 1ml (≥ 40mg human IgG/ml resin)을 혼합하여 4℃6시간동안 배양하고 이 혼합물을 친화성 크로마토그래피 컬럼에 넣은 뒤 0.1 M 글리신 HCl 완충액(pH 2.7)을 이용해 용출시켰다. 마지막으로 50 kDa 컷오프 아미콘(cut off amicon, merckmilipore)을 이용하여 정제된 항체를 농축한 후, 단백질 분석 키트(PierceTM, BCA Protein Assay kit, Thermo Scientific)를 이용해 항체의 농도를 측정하였다.

[0107] **4-2. 에피토프 매핑**

[0108] 표적항원(CT83)에 대한 선별된 항체의 항원 결합 부위(epitope)를 확인하기 위하여 마이크로어레이(microarray)를 통한 에피토프 매핑을 실행하였다.

[0109] 마이크로어레이를 실행하기 전 실시예 4-1에 의해 제조된 SKAI-33 항체를 비오티닐화 한다. 이후 상기 비오티닐화 한 항체 샘플을 18,000여개의 CT83 항원 펩타이드 위치에 대하여 마이크로어레이 칩 분석을 진행하여 CT83 항원과의 결합을 확인하였다(도 3).

[0110] 항원-항체의 결합은 중복된 비오틴화 신호를 측정하여 확인하였다. SKAI-33과 결합하는 주요 에피토프의 서열(sequence), 서열번호, 길이, 질량, 등전점, 전하, 소수성 수치(hydrophobicity), 및 흡광계수 정보는 도 6a, 및 6b에 나타냈고, 반복 서열의 위치를 확인하였다(도 7). 확인된 에피토프 서열은 (표 5)에 기재하였다.

표 5

[0111]

SKAI-33	서열번호	에피토프
	17	(N-ter)-NNLAVYDLLSRDILNNFPHSIARQKR-(C-ter)

[0113] **실시예 5. 암세포 특이적 결합 여부 확인**

[0114] SKAI-33 단백질이 암세포에서 발현된 CT83(KK-LC-1) 항원에도 특이적으로 결합하는지 여부를 확인하기 위하여 하기와 같은 방법으로 FACS 실험을 진행하였다.

[0115] 본 실험에서 사용된 HeLa 세포는 CT83(KK-LC-1) 단백질이 발현된 암세포이고, HT-29는 CT83(KK-LC-1) 단백질이 발현되지 않은 암세포이다. 도 4를 통해 상기 HeLa 세포는 CT83(KK-LC-1) 항원을 발현하며, HT-29세포는 CT83(KK-LC-1)항원을 발현하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0116] FACS 실험을 위해 HeLa 및 HT-29 세포를 트립신을 처리하여 모은 뒤, PBS로 세척 후에 원심 분리하여 세포를 침천시키는 과정을 2회 반복하여 준비하고, CT83 항원에 대한 마우스 단클론항체(Invitrogen, Catalog # MA5-24711)를 1/100로 희석하여 상온에서 1시간 인큐베이션하였다. 1시간 후 2차 항체를 1/100로 희석하여 상온에서 1시간 인큐베이션 후 전방산란광(FSC)을 통해 분석하였다.

[0117] FACS를 통해, CT83(KK-LC-1) 단백질이 발현된 HeLa 세포 및 CT83(KK-LC-1)이 발현되지 않은 HT-29가 각각 SKAI-33과 결합하는 정도를 분석하여 SKAI-33이 CT83(KK-LC-1)항원에 특이적으로 결합한다는 것을 확인하였다. (도 5)

[0119] **실시예 6. SKAI-33과 약물을 접합한 항체-약물 컨쥬게이트**

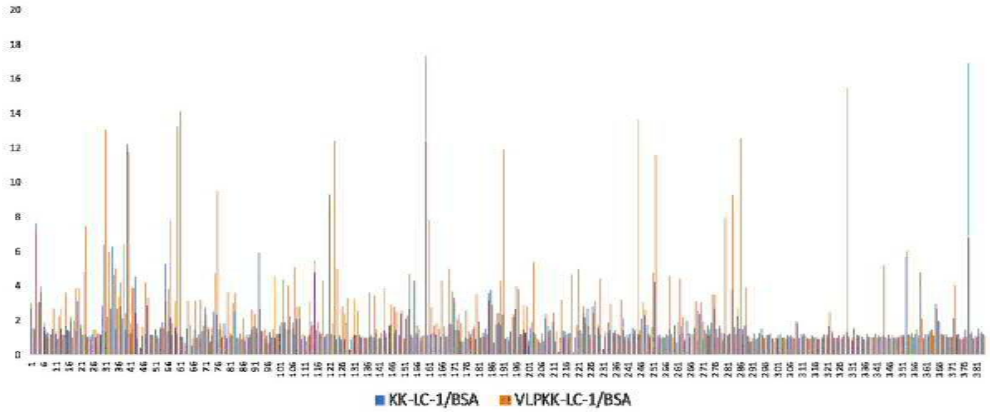
[0120] 항체-약물 컨쥬게이트(ADC, antibody-drug conjugate)는 항체에 약물을 접합시켜서 환자의 체내에 주입하는 방법이다. ADC를 주입하게 되면, 항체에 특이적으로 결합하는 항원 또는 상기 항원을 발현하는 세포와 항체가 결합하게 되고, 이로 인해 상기 항원을 발현하는 세포와 항체가 결합하는 경우에는 항체의 내부화(internalization)를 유도함으로써 상기 항원을 발현하는 세포 내부로 약물을 전달할 수 있다.

[0121] SKAI-33과 약물을 접합한 항체-약물 컨쥬게이트를 제작하고, 컨쥬게이트 형태로 주입했을 때와 약물을 단독으로 사용했을 때 항원 또는 항원을 발현하는 세포에 약물이 도달하는 농도를 비교하여 상기 약물이 상기 항원에 특이적으로 도달할 수 있는지 확인하였다.

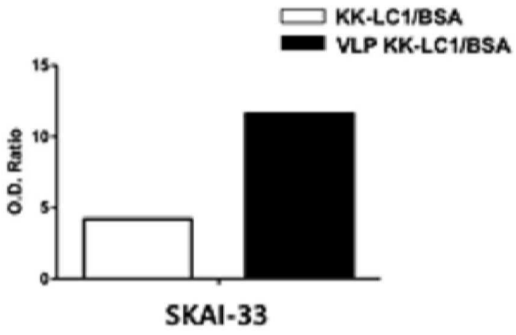
[0122] 이로 인해 상기 ADC 방식으로 SKAI-33을 주입하는 경우, 항원을 발현하지 않는 정상세포에는 항암제 치료를 배제하여, 항암 효과와 환자의 정상세포 손상을 최소화하면서 SKAI-33을 이용한 항암 치료할 수 있다는 점을 확인하였다.

도면

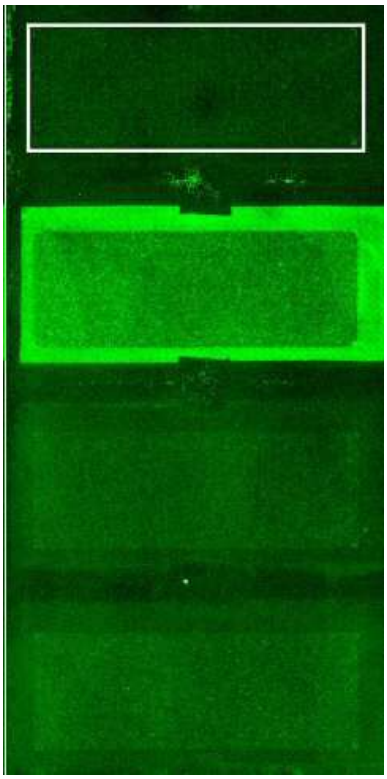
도면1


KK-LC-1/BSA
VLPKK-LC-1/BSA

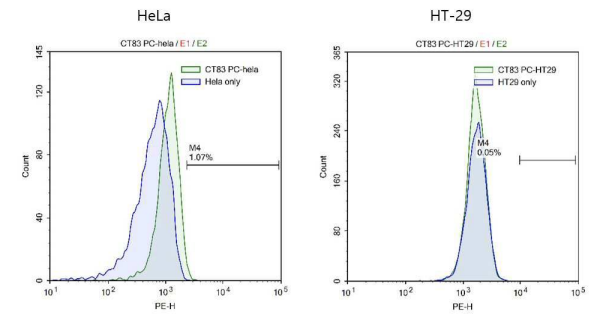
도면2


KK-LC1/BSA
VLP KK-LC1/BSA
O.D. Ratio
15
10
5
0
SKAI-33

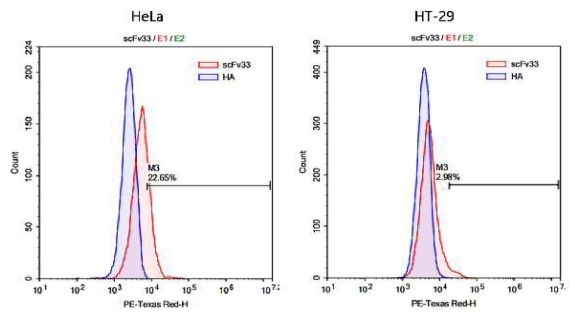
도면3



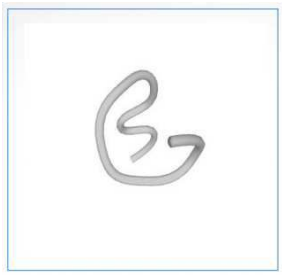
도면4


HeLa
HT-29
CT83 PC-hela / E1 / E2
CT83 PC-hela
Hela only
M4
1.07%
CT83 PC-HT29 / E1 / E2
CT83 PC-HT29
HT29 only
M4
0.05%
Count
PE-H

도면5

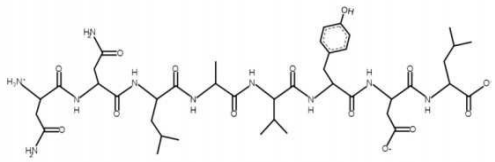

HeLa
HT-29
scFv33 / E1 / E2
scFv33
HA
M3
22.65%
M3
2.98%
Count
PE-Texas Red-H

도면6a



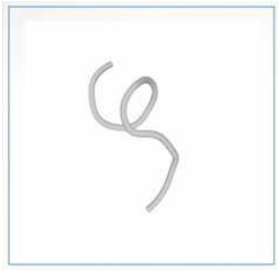
Peptide properties

Sequence	NNLAVYDL
Length	8
Mass	920.4588
Isoelectric point (pI)	3.02
Net charge	-1
Hydrophobicity	+10.07 Kcal * mol -1
Extinction coefficient	1490 M-1 * cm-1



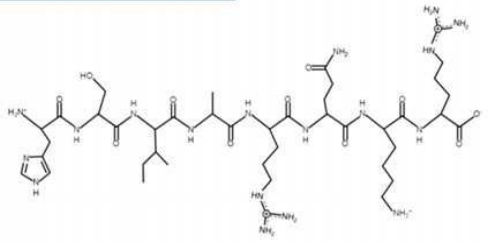
Sequence	Seq_No.	Length	Hydropathy_Index
N	1	1	-3.5
N	2	1	-3.5
L	3	1	3.8
A	4	1	1.8
V	5	1	4.2
Y	6	1	-1.3
D	7	1	-3.5
L	8	1	3.8
	9	0	3.8

도면6b



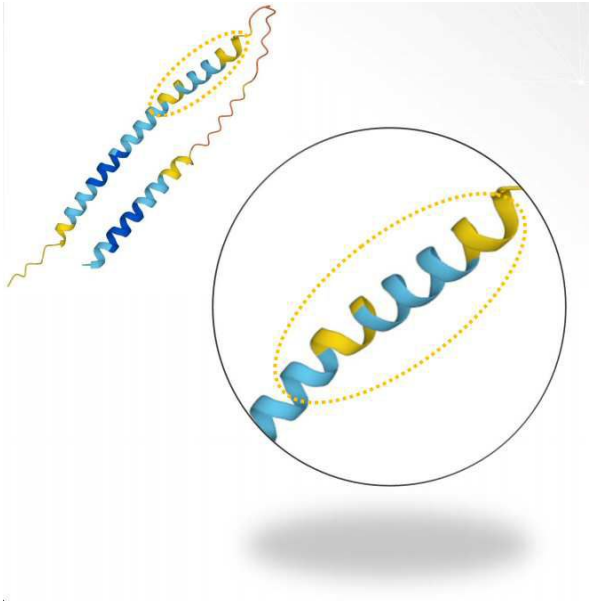
Peptide properties

Sequence	HSIARQKR
Length	8
Mass	994.5769
Isoelectric point (pI)	12.49
Net charge	+3
Hydrophobicity	+17.26 Kcal * mol -1
Extinction coefficient	0 M-1 * cm-1



Sequence	Seq_No.	Length	Hydropathy_Index
H	1	1	-3.2
S	2	1	-0.8
I	3	1	4.5
A	4	1	1.8
R	5	1	-4.5
Q	6	1	-3.5
K	7	1	-3.9
R	8	1	-4.5
	9	0	-4.5

도면7



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.