

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2019-0132949
(43) 공개일자 2019년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/40 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)

A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/40 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0059562

(22) 출원일자 2019년05월21일

심사청구일자 2019년05월21일

(30) 우선권주장

1020180057630 2018년05월21일 대한민국(KR)

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

(72) 발명자

김문교

인천광역시 미추홀구 매소홀로541번길 9-12, 201호 (문학동, 학산빌리지)

윤민상

충청북도 진천군 광혜원면 화랑6길 15, 가동 506호 (원림아파트)

김기연

경기도 남양주시 다산순환로 111, 3201동 1204호 (다산동, 다산 한양수자인리버파크)

(74) 대리인

특허법인태백

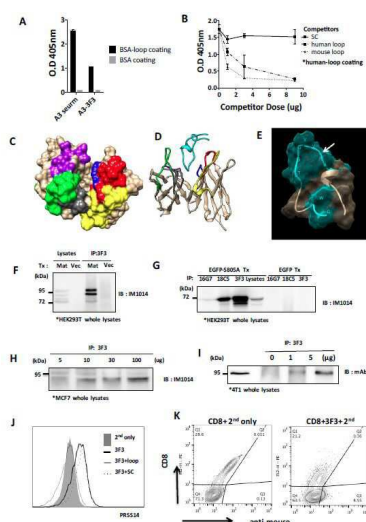
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분을 특이적으로 인식하는 단일클론항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분(autocatalytic loop portion)을 특이적으로 인식하는 단일클론항체 및 이의 용도에 관한 것으로서, PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 mAb3F3, 이의 인간화 항체 및 이들의 암 전이 진단 또는 암 전이 억제 용도에 대한 것이다. 마우스 모델에서 Prss14/ST14가 유방암의 폐 전이에 결정적으로 관여하고, Prss14/ST14 단백질의 자가분해 고리부분을 포함하는 에피토프는 전이 예방 백신으로 기능 할 수 있다는 것을 확인하였고, MMTV-PyMT 마우스 모델에서, 자가분해 고리에 대해 특이적인 새로운 단일클론항체가 상기 에피토프 서열을 인지하고, 구조 특이적 방식으로 전이를 억제할 수 있다는 것을 확인하였다. 이에, 본 발명의 PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적인 항체는 암 전이 진단 및 암 전이 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

G01N 33/574 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

G01N 2333/96433 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2009892

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원

연구과제명 PRSS14/Epithin 단백질 자가분해루프 구조특이 항체를 이용하는 암전이 기전과 면역 반응 연구

기 여 율 50/100

주관기관 인하대학교

연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI11C1879000013

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 생쥐모델을 이용한 암전이 예방백신 탐구 및 면역기전 연구

기 여 율 50/100

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2014.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 2

서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 또는 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 항체는 인간화 항체인 것을 특징으로 하는 PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분은 서열번호 10 또는 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산 분자.

청구항 6

제5항의 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 7

제6항의 재조합 발현벡터로 형질전환된 세포.

청구항 8

제7항의 형질전환된 세포를 배양하는 단계를 포함하는 PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 생산하는 하이브리도마 세포주.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 암은 유방암, 위암, 전립선암, 식도암, 대장암, 간암, 췌장암, 폐암, 난소암, 혈액암, 골암, 피부암, 뇌암, 자궁암, 비인두암, 후두암, 갑상선암, 기관지암, 방광암, 신장암, 담낭암, 자궁경부암, 악성흑색종, 림프종 또는 골수암인 것을 특징으로 하는 암 진단용 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 진단용 키트.

청구항 13

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 전이 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 암은 유방암, 위암, 전립선암, 식도암, 대장암, 간암, 췌장암, 폐암, 난소암, 혈액암, 골암, 피부암, 뇌암, 자궁암, 비인두암, 후두암, 갑상선암, 기관지암, 방광암, 신장암, 담낭암, 자궁경부암, 악성흑색종, 림프종 또는 골수암인 것을 특징으로 하는 암 전이 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 15

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 전이 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 PRSS14/ST14 단백질 검출용 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 PRSS14/ST14 단백질은 미변성(native) 형태인 것을 특징으로 하는 PRSS14/ST14 단백질 검출용 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 사용하여 시료 내의 PRSS14/ST14 단백질을 검출하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분(autocatalytic loop portion)을 특이적으로 인식하는 단일클론항체 및 이의 용도에 관한 것으로서, PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 mAb3F3, 이의 인간화 항체 및 이들의 암 전이 진단 또는 암 전이 억제 용도에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 에피틴(epithin), 매트립테아제(matriptase), 막 세린 단백질분해효소 1(membrane types serine protease 1; MT-SP1) 및 세린 단백질분해효소 종양 연관 차등 발현 유전자 15(serine protease tumor associated differentially expressed gene 15; TADG-15)로도 알려진, Prss14 (serine protease 14)/ST14 (suppression of tumorigenicity 14)는 타입 II 막 세린 단백질분해효소의 대표적인 멤버이다.

[0003] 암 환자 샘플을 이용한 여러 병리학적 분석 결과, 상피 타입의 진행성 암에서 Prss14/ST14가 일정하게 과발현되는 것을 확인할 수 있었다. 식도편평세포암 환자의 수술 후 경과 확인 결과, Prss14/ST14가 발현되면 무질병 생존 예후는 극히 나쁜 것으로 나타났다. 여러 인간 유방암 세포주 및 유방암 조직에서도 Prss14/ST14는 높은 수준의 발현이 검출되었다. 현재, 유방암 진행, 전이 및 환자의 생존율에 있어 Prss14/ST14의 역할은 매우 중요하다. 최근, 본 발명자들은 유전자 발현 공공 데이터베이스를 이용하여, 유방암 타입에 따른 특정 유전자(ER, PR, HER2) 및 EMT 유전자에 대한 체계적인 분석 결과, Prss14/ST14가 ER⁻ 또는 삼중 음성 유방암(triple negative; TN) 타입에 있어 훌륭한 예후진단 마커임을 보고하였다.

[0004] 암 진행 및 전이에 대한 Prss14/ST14의 세포 내 기능은 고발현 세포 및 마우스 모델을 통해 널리 연구되고

있다. 1) 세포에서 배양 배지로 분비되는 엑토도메인(Ectodomain)은 내피세포 이동, 침습 및 튜브 형성과 같은 혈관신생을 유도하였다. 상기 혈관신생 과정은 다클론 특이 항체에 의해 차단될 수 있다. 2) Prss14/ST14는 EMT에 필수적이다. 흉선종양(thymoma) 세포주 427.1.86에서 TGF β 유도된 EMT는 Prss14/ST14 message가 녹다운(knocked down) 될 때 차단되었다. 또한, 유도된 Prss14/ST14 유전자 발현은 MDCK 세포에서 EMT를 이끌었다. 3) Prss14/ST14는 내피에서 Tie2 신호전달을 상향조절함으로써 암세포의 내피세포 투과 이동(transendothelial cell migration)에 결정적으로 관여하고, IFN γ 활성화를 통해 대식세포의 내피세포 투과 이동에 결정적으로 관여한다. 4) 꼬리 혈관 정맥 주사 모델에서 Prss14/ST14는 4T1 유방암 세포의 전이성 폐 결절 형성에 중요한 역할을 한다.

[0005] 유전학적으로 다양하게 개량된 마우스 모델이 존재하는데, 이들은 Prss14/ST14 관련 암의 표현형을 명확하게 보여준다. K5 프로모터가 Prss14/ST14의 트랜스제닉(transgenic) 발현에 사용되면, 마우스에서는 종양 촉진 화합물에 의해 가속화될 수 있는 피부 선종이 자발적으로 발생한다. 이러한 연구는 Prss14/ST14의 종양 생성 기능을 명확하게 보여준다. MMTV-PyMT 마우스 모델이 매트립테아제(matriptase) 기능 결손(hypomorphic) 마우스와 교배시, Prss14/ST14 정상 수준 발현 동물보다 유방암 종양 부하(tumor burden)가 적었고, 더 오래 사는 것으로 나타났다. 이러한 연구 또한, 종양 미세환경에서 섬유아세포로부터 분비된 HGF에 대응하는 cMet 신호전달에 있어 Prss14/ST14가 중요한 역할을 수행한다는 것을 나타낸다.

[0006] Prss14/ST14 단백질분해효소에 대한 여러 특이적인 기질들은 종양 진행 및 전이에 있어 그 역할이 잘 알려져 있고, 여러 개의 패밀리로 분류될 수 있다. 콜라겐 및 피브로넥틴을 포함하는 세포의 기질 단백질들이 Prss14/ST14 단백질분해효소 활성화에 의해 분해되는데, 전이 과정에서 기저막이 세포 침습으로 쉽게 분해된다. 또한, EGFR 및 PDGF-D와 같이 종양 성장 및 증식에 관여하는 단백질들도 기질로 알려져 있다. MSP-1 및 Laminin 322와 같은 단백질은 세포 생존에 관여한다. 또한, Prss14/ST14 단백질분해효소는 PAR-2, uPA 및 MMP3을 절단하여 여러 단백질분해효소를 순차적으로 활성화시킬 수 있다. Prss14/ST14 단백질분해효소 활성화는 세포 수용체 또는 리간드를 절단하고 활성화하여 신호전달을 유도할 수 있다. 상기 단백질분해효소의 자가활성화 능력은 종양 진행 및 전이를 차단하기 위한 조절 표적의 중요 부분으로 주요 특성이 될 수 있다.

[0007] Prss14/ST14 단백질은 단백질분해효소 기능을 발현하기 전에 여러 가공 과정을 거치게 되는데, 활성화가 필요하고, 동족 억제제인 HAI1 및 HAI2로부터 분리되어야 한다. Prss14/ST14 단백질의 첫번째 가공 과정은 소포체 내에서 생물발생(biogenesis) 동안 aa149에 발생한다. 단백질이 세포막에 위치하면, 2번 이상의 단백질 분해성 절단이 일어난다. Prss14/ST14 단백질이 분비(shedding)되면, aa189 및 aa204 부근에서 절단이 일어난다고 알려져 있다. TGF β 또는 PMA 유도 과정에 관련된 효소는 TNF 전환 효소(TACE)이다. 하지만, 세린 단백질분해효소도 분비(shedding) 과정에 기여할 수 있다. PMA 유도 분비(shedding)의 경우, 필라민(filamin)은 분비 효소 및 액틴 재배열을 통해 근접한 Prss14/ST14 단백질을 운반하는데 중요하다는 것을 확인하였다. 다른 세린 단백질분해효소와 같이, Prss14/ST14 단백질 또한 aa604에 위치한 활성화 고리의 절단을 통한 활성화가 필요하다. 하지만, 이와 관련된 자세한 가공 기작에 대해서는 여전히 명확하게 밝혀진 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1500670호(2015.03.03 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현벡터, 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 세포 및 상기 세포를 배양하는 단계를 포함하는 PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공하는 데에 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물 또는 암 진단용 키트를 제공하는 데에 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 전이 예방 또는 치료용 약학조성물과, 암 전이 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 PRSS14/ST14 단백질 검출용 조성물과, 시료 내의 PRSS14/ST14 단백질을 검출하는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 또는 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 형질전환된 세포를 배양하는 단계를 포함하는 PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원

[0023] 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 전이 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 전이 예방 또는 개선용 건강 기능식품 조성물을 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 PRSS14/ST14 단백질 검출용 조성물을 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 사용하여 시료 내의 PRSS14/ST14 단백질을 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분(autocatalytic loop portion)을 특이적으로 인식하는 단일클론항체 및 이의 용도에 관한 것으로서, PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 mAb3F3, 이의 인간화 항체 및 이들의 암 전이 진단 또는 암 전이 억제 용도에 대한 것이다. 마우스 모델에서 Prss14/ST14가 유방암의 폐 전이에 결정적으로 관여하고, Prss14/ST14 단백질의 자가분해 고리부분을 포함하는 에피토프는 전이 예방 백신으로 기능 할 수 있다는 것을 확인하였고, MMTV-PyMT 마우스 모델에서, 자가분해 고리에 대해 특이적인 새로운 단일클론항체가 상기 에피토프 서열을 인지하고, 구조 특이적 방식으로 전이를 억제 할 수 있다는 것을 확인하였다. 이에, 본 발명의 PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적인 항체는 암 전이

진단 및 암 전이 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0029]

도 1은 Balb/c 마우스에 동소 주입된 4T1 및 C57BL/6 마우스에 동소 주입된 E0771 유방암 세포의 전이에 PRSS14/ST14가 중요한 역할을 한다는 결과를 나타낸다. (A) 4T1 및 4T1EpiKD 세포를 가진 숙주 마우스의 생존 곡선을 나타낸다. 4T1 대조군의 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 또는 1×10^6 세포 (Con; 실선) 또는 4T1EpiKD 세포(EpiKD; 점선)는 Balb/c 마우스의 7차 유방 지방 패드 내로 이식되었다. 주입된 전체 세포수는 그래프에 나타났다. (B) 4T1 1차 종양의 성장 곡선을 나타낸다. 종양 크기는 다음의 식에 따라 계산되었다. (길이 $\times$ 너비²)/2. 상단에서 하단의 순서로, 1×10^4 , 1×10^5 및 1×10^6 세포수가 주입되었다. 실선: 4T1con, 점선: 4T1EpiKD. (C) 사망시 4T1 1차 종양 무게 및 4T1 폐 전이 수를 나타낸다. 상단 패널: 1차 종양 무게, 하단 패널: 계수된 결절 수. 검은색 원: 4T1con, 흰색 원: 4T1EpiKD. 평균 및 표준오차를 나타냈다. (D) 7차 유방 지방 패드 상 (n=10), E0771-EpiKD-C3 세포(점선) 또는 E0771-Control-D11 세포(실선) 이식된 C57BL/6 마우스의 생존율을 나타낸다(1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 cells/mouse, 진한 선일수록 고밀도임). (E) E0771-EpiKD-C3(점선) 또는 E0771-Control-D11(실선). 1차 종양의 성장 곡선을 나타낸다(종양 부피 (mm³) = (너비 $\times$ 길이²)/2). (F) 사망한 마우스의 E0771 1차 종양 무게 및 E0771 폐 무게를 비교한 결과이다(E0771-EpiKD-C3 종양(흰색 원) 또는 E0771-Control-D11(검은색 원)). P 수치는 Prism 6 소프트웨어의 unpaired t test를 통해 측정하였다.

도 2는 암 전이 예방 백신 기능성을 가진 항원 제작 및 시험 결과를 나타낸다. (A) 아미노산 서열 위치 및 시험 대상으로 선별된 항원의 위치를 나타낸다. (B) 마우스 및 인간 서열을 나타낸다. (C) 선별된 항원의 위치 및 구조를 나타낸다. (D) 4T1 세포를 가진 Balb/c에서 암 예방 백신으로 자가분해고리 Epi-SP 항원을 시험하였다. CFA 존재하에서, Epi-SP 항원으로 면역화 후, 4T1 세포를 주입하였다. (E, F) 마우스의 생존 및 폐 전이 결절의 수를 관측하였다. Adj: 어쥬번트, SP: Epi-SP. 각 그룹의 전이에 대한 평균 값을 나타냈다. (G) Epi-SP 면역화로 4T1 전이 감소 수준은 Prss14/ST14KD 수준과 비슷하였다. 4T1C: 4T1 대조군 세포, 4T1KD: 4T1EpiKD. (H) Epi-SP 및 Epi-Sc의 항원 항체 특이성을 나타낸다. 항원은 예방 백신 실험을 통해 3번 면역화되었고, 특정 항원에 대한 항체 반응은 ELISA로 시험하였다. SP: Epi-SP, Sc: Epi-Sc. (I) 면역화된 마우스 유래 항혈청이 내피세포 투과 이동(transendothelial migration)을 차단한다는 것을 나타낸다. 실험의 전체적인 모식도를 왼쪽에 나타냈고, MS1 내피세포의 세포 이동 결과를 오른쪽에 나타냈다. 평균 및 표준 오차로 나타냈다.

도 3은 안정적인 자가활성화 루프 구조의 항원 제작 및 C57BL/6 마우스에서 전이 예방 백신으로서의 시험 결과를 나타낸다. (A) 자가활성화 절단 사이트를 포함하는 인간 PRSS14의 604:627 아미노산 서열은 잘 보존되어 있다. (B) 인간 및 마우스 Prss14/ST14에서의 자연적인 604:627 서열 구조(왼쪽 두 패널) 및 합성된 604:627 서열 펩타이드 구조(오른쪽 두 패널)의 비교 결과를 나타낸다. 604:627의 구조는 인간 및 마우스 모두에서 고리 구조로 보존되어 있다. 합성된 604:627 펩타이드의 예상 구조는 원래의 고리 구조를 유지하지 않았다(Linear). 원래의 고리 구조와 유사한 고리 구조를 만들기 위해서 627번째 아미노산에 시스테인을 추가하였다(Loop). 활성화 절단 사이트는 흰색 화살표 또는 파란색 화살표로 표시하였다. 펩타이드의 단일 아미노산들은 흰색 글자로 나타났다. (C) 알룸 어쥬번트(Imject Alum)와 함께 SP, Loop 및 Linear 펩타이드로 면역화한 후, 1×10^6 E0771 세포를 C57BL/6 마우스의 꼬리 정맥을 통하여 주입하였다. 면역화된 C57BL/6 마우스 유래 폐에서의 전이 영역 백분율을 나타냈다. 전이 영역은 Image J program을 통해 측정하였다(전이 영역/전체 영역 *100). (D) MF59 어쥬번트와 함께 SP, Loop 및 Linear 펩타이드로 면역화한 후, 1×10^6 E0771 세포를 C57BL/6 마우스의 꼬리 정맥을 통하여 주입하였다. 결절 수 및 전이 영역은 ImageJ program으로 측정하였다. 폐 무게는 희생일에 측정하였다. P 수치는 Prism 6 소프트웨어의 unpaired t test로 측정하였다. (E) 전이성 폐의 대표적인 이미지를 나타낸다. (F) SP 및 Loop 펩타이드에 대한 항체 생산 결과를 나타냈고, 이의 이소타입(isotypes)은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)로 시험하였다.

도 4는 PRSS14의 자가활성화 고리에 서열과 구조 특이적인 mAb의 생산 및 특성 분석 결과를 나타낸다. (A) BSA 접합 Mat-Loop 및 BSA만 코팅된 항원에 대해 결합하는 mAb의 ELISA 결과를 나타낸다. (B) mAb3F3에 결합하는 인간 고리(Mat-Loop) 및 마우스 고리(Epi-Loop) 펩타이드의 경쟁적 ELISA 결과를 나타낸다. Sc, 임의의 서열(scrambled sequence). (C) PIGS를 통한 아미노산 서열 기반의 3F3 Fab 모델링 결과를 나타낸다. 빨강색; H-CDR1, 노랑색; H-CDR2, 파랑색; H-CDR3, 초록색; L-CDR1, 보라색; L-CDR2, 회색; L-CDR3. (D) Mat-loop 펩타이드에 대한 mAb3F3의 도킹 모델링 결과를 나타낸다(최저 에너지, -238). 청록색; 고리 펩타이드. (E) Mat-loop

펩타이드에서 mAb3F3와 상호작용하는 아미노산을 청록색으로 나타냈다. 흰색 화살표는 활성화 절단 사이트를 나타낸다. (F) 내지 (I) 세포 내에서 발현되는 미변형 Prss14/ST14에 대한 mAb3F3의 특이적인 상호작용을 확인하기 위한 면역침전분석 및 웨스턴 블랏팅 결과를 나타낸다. (F) 전장길이 인간 Prss14/ST14(Mat) 및 벡터(Vec)로 형질감염된 HEK293T 세포의 전체 용해물을 각각 mAb3F3과 반응시켰다. (G) EGFP-S805A 및 EGFP로 형질감염된 HEK293T 세포의 전체 용해물을 각각 mAb3F3과 반응시켰다. (H) 인간 유방암 세포 MCF7를 mAb3F3과 반응시켰다. (I) 마우스 유선 종양 세포 4T1의 결과를 나타낸다. (J) HEK293T 세포에서 발현되는 인간 Prss14/ST14의 유세포 분석 결과를 나타낸다. Mat-Loop 및 Epi-Sc는 경쟁자로서 사용되었다. (K) CD8 또는 전장길이 Prss14/ST14가 일시적으로 형질감염된 CHO-s 세포의 2차원 유세포 분석을 통한 특이성 시험 결과를 나타낸다.

도 5는 여러 인간 및 마우스 암세포에서의 Prss14/ST14 발현에 대한 면역형광 검출 결과를 나타낸다. (A) DAPI, actin 및 mAb3F3로 염색된 MCF7 유방암 세포 결과를 나타낸다. (B) mAb3F3 및 DAPI로 염색된 T47D 유방암세포 결과를 나타낸다. (C) mAb3F3로 염색된 여러 암세포를 나타낸다. MDA-MB-453: 인간 삼중 음성 유방암 세포주, SNU216: 인간 위 선암종 세포주, MKN45: 인간 위암 세포주, PC3: 인간 전립선암 세포주, OE19: 식도 선암종 세포주, HCT116: 인간 대장암, 427.1.86: 마우스 흉선종 세포주, 4T1: 마우스 유방암 세포주.

도 6은 mAb3F3이 암세포 이동성을 감소시키는 결과와 MMTV-PyMT 트랜스제닉 마우스 모델에서 유방암 전이를 감소시킬 수 있다는 결과를 나타낸다. (A) mAb3F3 처리 후 4T1 세포에서 wound healing migration assay 결과를 나타낸다. (B) MCF7 세포에 mAb3F3와 마우스 단일클론항체인 mAb5를 5, 10, 20 µg 넣었을 때 transwell migration를 나타낸다. 실선: mAb5, 점선: mAb3F3. (C) 12시간 배양한 MCF7 세포에 mAb3F3을 넣은 후 세포분열을 나타낸다. (D) mAb3F3을 넣어준 후 MCF7 세포의 세포주기를 나타낸다. (E) PBS, Taxol 및 mAb3F3 주입된 MMTV-PyMT 마우스의 종양 크기 성장 곡선을 나타낸다. Day 0에 첫번째 주입을 수행하였다. 화살표는 mAb3F3의 주입일을 나타낸다. (F) Day 11에서 각 그룹의 종양 부피에 대한 그래프이다. (G) 희생일에 측정된 전이 결절의 수를 나타낸다. (H) 각 그룹의 폐 대표 이미지를 나타낸다.

도 7은 인간화 mAb3F3가 transwell migration를 감소시키고 유세포분석에서 활성화가 억제된 미변형 단백질과 결합하는 것을 나타낸다. (A) 인간 유방암세포 MCF7에 마우스 mAb3F3과 인간화 mAb3F3을 처리하였을 때 transwell migration가 감소함을 나타낸다. mAb5 마우스 항체가 음성대조군으로 사용되었다. 검정색: mAb5, 붉은색: 마우스 mAb3F3, 주황색: 인간화 mAb3F3-35, 초록색: 인간화 mAb3F3-37. (B) 유세포분석을 통하여 인간화 mAb3F3 클론들이 GFP와 활성화가 억제된 미변형 단백질 (S805A)를 동시 형질전환 시킨 HEK293TF 세포와 tdTomato를 형질감염 시킨 HEK293TF 세포에서 S805A 단백질과 결합한 것을 나타낸다. 파란색: tdTomato+, 붉은색: GFP+

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 이에 본 발명자들은 마우스 모델에서 Prss14/ST14가 유방암의 폐 전이에 결정적으로 관여하고, Prss14/ST14 단백질의 자가분해 고리부분을 포함하는 에피토프는 전이 예방 백신으로 기능 할 수 있다는 것을 확인하였다. MMTV-PyMT 마우스 모델에서, 자가분해 고리에 대해 특이적인 새로운 단일클론항체가 상기 에피토프 서열을 인지하고, 구조 특이적 방식으로 전이를 억제할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0031] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0032] 또한, 본 발명은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 또는 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다. 상세하게는 상기 항체는 인간화 항체일 수 있다.
- [0033] 바람직하게는, 상기 PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분은 서열번호 10 또는 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 한편, 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 표시되는 아미노산으로 이루어진 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3와, 서열번호 4 내지 서열번호 6으로 표시되는 아미노산으로 이루어진 중쇄 CDR4, CDR5 및 CDR6은 표 1에 기재하였고, 서열번호

호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 또는 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역은 표 3에 기재하였다.

[0035] 또한, 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열은 인간 PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분(Mat-Loop)이고, 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열은 마우스 PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분(Epi-Loop)이다.

[0036] 본 발명에서 용어, “항체”는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 의미하며, 그 예로, 단일 클론 항체, 다클론 항체, 전장항체(full-length antibody) 및 항체 단편을 모두 포함할 수 있다. 또한 상기 용어, “항체”는 이가(bivalent) 또는 이중 특이성 분자(예컨대, 이중특이성 항체), 디아바디, 트리아바디 또는 테트라바디를 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명에서 용어, “단일 클론 항체”는 실질적으로 동일한 항체 집단에서 수득한 단일 분자 조성의 항체 분자를 지칭하고, 이러한 단일 클론 항체는 다클론 항체가 여러 개의 에피토프에 결합할 수 있는 것과 달리, 특정 에피토프에 대해 단일 결합성 및 친화도를 나타낸다. 본 발명에서 용어, “전장항체”는 2 개의 전체 길이의 경쇄 및 2 개의 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. Ig는 서브타입(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다.

[0038] 본 발명에서 용어, “인간화 항체(humanized antibody)”란, 인간에게 비-면역원성(nonimmunogenic)이거나 또는 면역원성이 감소된 항체를 총칭한다. 인간화 항체는 아미노산 서열이 변형된 항체(altered antibody)이고 항체의 아미노산 서열은 원하는 목적에 맞게 재구성할 수 있다. 이러한 가능한 변화는 수없이 많고 하나 또는 몇 가지 아미노산을 변화시키는 것부터 항체의 가변 및/또는 불변 영역의 완전한 재구성까지 가능하다. 일반적으로 가변영역의 변형이 항원의 결합능과 친화도를 증대시키기 위하여 행하여지는데 비하여 불변영역에서의 변형은 보체(complement)의 고정, 막과의 상호작용 및 기타 효과제의 기능과 같은 세포내 작용을 증대시키기 위하여 행하여진다.

[0039] 본 발명에서 용어, “중쇄”는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VH 및 3 개의 불변 영역 CH1, CH2 및 CH3를 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에서 용어, “경쇄”는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VL 및 불변 영역 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 용어, “단편”, “항체 단편” 및 “항원 결합 단편”은 항체의 항원결합 기능을 보유하는 본 발명의 항체의 임의의 단편을 지칭하는 것으로 호환적으로 사용된다. 예시적인 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0041] 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적으로 결합하는 능력을 나타낼 수 있는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 항체의 서열뿐만 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, 리신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글리신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 티로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이점에 기초하여, 아르기닌, 리신과 히스티딘; 알라닌, 글리신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 티로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

[0043] 본 명세서에서 사용되는 용어, “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다. 본 발명의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산 분자의 서열은 변형될 수 있으며, 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.

- [0044] 또한, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.
- [0045] 본 발명에 있어서, "벡터"는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA 분자를 의미한다.
- [0046] 본 발명에서 있어서, "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 암피실린(Ampicillin), 카나마이신(Kanamycin), 제네티신(Geneticin; G418), 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(Hygromycin), 클로람페니콜(Chloramphenicol) 과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.
- [0047] 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열 중 어느 것이라도 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절서열의 예에는, 예를 들어, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, CMV의 프로모터와 인핸서, 레트로바이러스의 LTR, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 램다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스파타제의 프로모터들, 예를 들어 Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 구성과 유도의 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 항체를 발현하는 벡터는, 경쇄와 중쇄가 하나의 벡터에서 동시에 발현되는 벡터 시스템이거나 또는 경쇄와 중쇄를 각각 별도의 벡터에서 발현시키는 시스템 모두 가능하다. 후자의 경우, 두 벡터는 동시 형질전환(co-transformation) 및 표적 형질전환(targeted transformation)을 통하여 숙주세포로 도입된다. 동시 형질전환은 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 각각의 벡터 DNA를 동시에 숙주세포로 도입한 뒤 경쇄와 중쇄를 모두 발현하는 세포를 선별하는 방법이다. 표적 형질전환은 경쇄(또는 중쇄)를 포함하는 벡터로 형질전환 된 세포를 선별하고 경쇄를 발현하는 선별된 세포를 중쇄(또는 경쇄)를 포함하는 벡터로 다시 형질전환 하여 경쇄 및 중쇄 모두를 발현하는 세포를 최종적으로 선별하는 방법이다.
- [0049] 또한, 본 발명은 재조합 발현벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.
- [0050] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 세포는 관련 기술 분야에 공지된 임의의 숙주 세포일 수 있으며, 예컨대, 에스케리치아 콜라이(Escherichia coli), 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(Streptomyces), 슈도모나스(Pseudomonas)(예를 들면, 슈도모나스 푸티다(Pseudomonas putida)), 프로테우스 미라빌리스(Proteus mirabilis) 또는 스타필로코쿠스(Staphylococcus)(예를 들면, 스타필로코쿠스 카르노수스(Staphylococcus carnosus))와 같은 원핵 숙주 세포를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 또한, 본 발명은 상기 형질전환된 세포를 배양하는 단계를 포함하는 PRSS14/ST14의 자가분해 고리부분에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공한다.
- [0052] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조 방법에서 형질전환 세포의 배양은 관련 기술 분야에 공지된 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양과정은 통상의 기술자라면 선택되는 균주에 따라 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 세포 배양은, 세포의 성장 방식에 따라 현탁배양과 부착배양, 배양방법에 따라 회분식, 유가식 및 연속배양식의 방법으로 구분된다. 배양에 사용되는 배지는 특정한 균주의 요구조건을 적절하게 만족시켜야 한다.
- [0053] 또한, 본 발명은 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공한다.
- [0054] 본 발명의 용어 "하이브리도마 세포주"란, 2개의 다른 종류의 세포를 인공적으로 융합시켜 만든 세포로, 폴리에틸렌글리콜 등 세포융합을 일으키게 하는 물질이나 어떤 종의 바이러스를 사용하여 둘 이상의 동종 세포나 이종 세포가 융합되어, 각기 다른 세포가 갖는 다른 기능을 하나의 세포 속에 통합시킨 세포 또는 세포주를 의미한다. 특히, 골수종 세포(myeloma cell)와 비장이나 림프절에 들어 있는 림프구 가운데 항체 생성세포의 선구세포인 B세포를 융합시킨 잡종세포는 단일 클론항체를 만들어내므로 연구와 임상에 널리 응용된다. 그 밖에 림포카인(생리활성물질)을 만들어내는 T세포와 그 종양세포인 하이브리드마 등도 실용화되고 있다.
- [0055] 또한, 본 발명은 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.

- [0056] 상제하계는, 상기 암은 유방암, 위암, 전립선암, 식도암, 대장암, 간암, 췌장암, 폐암, 난소암, 혈액암, 골암, 피부암, 뇌암, 자궁암, 비인두암, 후두암, 갑상선암, 기관지암, 방광암, 신장암, 담낭암, 자궁경부암, 악성흑색종, 림프종 또는 골수암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 또한, 본 발명은 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.
- [0058] 상기 암 진단용 키트는 방사선면역측정법(RIA) 키트, 효소 면역측정법(ELISA) 키트, 면역형광법 키트, 화학발광 물질결합법 키트, 단백질칩 키트, 크로마토그래피 키트, 자기활성세포분리(Magnetic activated cell sorting, MACS) 키트 등이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 또한, 본 발명은 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 전이 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0060] 상제하계는, 상기 암은 유방암, 위암, 전립선암, 식도암, 대장암, 간암, 췌장암, 폐암, 난소암, 혈액암, 골암, 피부암, 뇌암, 자궁암, 비인두암, 후두암, 갑상선암, 기관지암, 방광암, 신장암, 담낭암, 자궁경부암, 악성흑색종, 림프종 또는 골수암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 암 전이 예방 또는 치료용 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유효제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0062] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장 내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 될 수 있으며, 본 발명의 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0063] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 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.
- [0064] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화하여 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 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.
- [0065] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [0066] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 전이 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0067] 상기 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽, 음료 또는 환의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품조성물은 유효성분인 본 발명에 따른 조성물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0068] 상기 건강기능식품 조성물에 함유된 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [0069] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및

비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0070] 또한, 본 발명은 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 PRSS14/ST14 단백질 검출용 조성물을 제공한다.

[0071] 상세하게는, 상기 PRSS14/ST14 단백질은 미변성(native) 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0072] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 사용하여 시료 내의 PRSS14/ST14 단백질을 검출하는 방법을 제공한다.

[0073] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0074] <실험예>

[0075] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0076] 1. 세포 배양

[0077] 모든 세포는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Welgene or Gibco), 페니실린 및 스트렙토마이신(Welgene)과, 4mM L-glutamine (Welgene)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM; Welgene)에서 유지시켰다. 부착된 모든 세포는 trypsin-EDTA (Welgene)로 2~3일 마다 계대배양하였다.

[0078] 2. 마우스 모델

[0079] Balb/c 및 C57BL/6 마우스는 대한 바이오텍로부터 구입하였다. 마우스는 실험 동물의 사용에 있어 적절한 LNCI 프로토콜에 따라, 인하대학교 분자세포면역학 실험실의 동물 시설에서 사육하였다. 유방암 동소 이식 마우스 모델에 있어서, 4T1 세포를 이식한 Balb/c 암컷 마우스 또는 E0771 세포를 이식한 C57BL/6 암컷 마우스는 2-메틸부탄올-2(2-Methylbutanol-2; Sigma)에 녹인 Avertin(2,2,2-Tribromoethanol; Sigma)으로 마취시켰다. 절개 부위는 상처 클립으로 봉합하였고, 1차 종양 성장은 일주일에 2번씩 종양 길이(a) 및 너비(b)를 측정하여 관측하였다. 종양 부피(V)는 Carlsson: $V=(ab^2)/2$ 식에 따라 측정하였는데, 'a' 및 'b'는 각각 종양의 최장 및 최소 지름을 나타낸다. 사후, 1차 종양의 무게를 측정하였고, 폐 결절의 수를 확인하였다. 종양 모델에서 항체의 효과를 확인하기 위하여, 9주령의 암컷 MMTV-PyMT 마우스에 PBS, 탁솔(Taxol) 또는 mAb3F3 항체를 50 µg/마우스의 양으로 복막 내 주사하였다. 그룹 당 5 마리의 9주령 마우스에 처치를 시작하였고, 일주일에 2번씩 14주령이 될 때까지 주입하였다. 일주일 2번씩 캘리퍼(caliper)를 통해 종양 크기를 측정하였다. 마우스는 15주령에 안락사시켰다. 폐 결절의 수 및 범위는 imageJ를 사용하여 사진촬영하고 가공하였다.

[0080] 3. 항원성 펩타이드 합성

[0081] 펩타이드들은 Thermo 또는 Abclon에서 합성하였다. 양 말단 사이의 이황화결합 형성은 질량분석기(Abclon)를 통해 확인하였다. 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin; KLH) 또는 소혈청알부민(bovine serum albumin; BSA)의 접합은 영인프론티어에서 수행하였다. Epi-SP 펩타이드(KQARVVGGTNADEGEWPWQ)와 동일한 아미노산 조성물인 Epi-Sc (EQGKGARDWPEWAVQGVNT)는 웹사이트(<http://users.umassmed.edu/ian.york/Scramble.shtml>)에서 선택되었고, 영인프론티어에서 합성하였다.

[0082] 4. 단백질 구조 모델링

[0083] 단백질 및 펩타이드의 3차 모델 구조는 I-TASSER server (<http://zhanglab.ccmb.med.unich.edu/I-TASSER/>)로부터 얻어냈다. 예측 모델들은 chimera software (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>)를 통해 분석하였다. 단일클론항체의 항원 결합 단편(fragment antigen-binding; Fab)의 구조 모델링은 PIGS web server (<http://www.biocomputing.it/pigs>)를 통해 수행하였다. 항원-항체 도킹 모델링은 ClusPro 2.0 web server (<http://cluspro.bu.edu>)를 통해 얻어냈다.

[0084] 5. 내피세포 투과 이동(Transendothelial migration) 분석

[0085] Boyden Chamber (8 µm pore insert, Falcon) 상에서, MS1 cells (5×10^4)은 10% FBS가 포함된 DMEM에서 컨플루언트(confluent)하게 될 때까지 배양하였다. 4T1 cells은 CFSE (Molecular Probes TM)로 염색하였고, 5% FBS 및 anti-SP sera가 포함된 DMEM에서 재현탁되었다. CFSE-염색된 1×10^5 4T1 cells을 MS1 cells 상에 첨

가하였고, 4시간 동안 배양하였다. 세포는 3.7% 포름알데히드로 고정시켰고, 잔여 세포들은 긁어냈고, 씻어냈다. 반대편으로 이동한 CFSE-양성 세포의 이미지들은 AxioCam MRm (Zeiss) 장착된 IX-51 microscope (Olympus)를 통해 얻어냈고, 이동한 세포들의 수는 ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>)로 분석하였다.

6. 트랜스웰 이동 (Transwell migration) 분석

Boyden Chamber (8 μ m pore insert, Corning) 상부에 5×10^4 MCF7 cell을 인간화 mAb3F3과 혈청 미포함 배양액과 함께 배양하였다. 각각 샘플은 3배 분량으로 실험하였다. 4시간 후 하부 챔버에 10% 혈청포함 배양액을 넣고 배양하였다. 24시간 후, 상부 챔버 막 표면에 있는 세포는 면봉으로 제거하고 하부 챔버 막 표면에 이동한 세포들은 100% 메탄올로 10분간 고정하였다. 0.2% 크리스탈 바이올렛으로 5분간 염색 후 현미경으로 확인하여 10 개의 지역을 촬영 하였다. 이동한 세포들의 수는 ImageJ로 분석하였다.

7. 단일클론항체 생산

암컷 Balb/c 마우스는 Imject^R Alum (Thermo)에 혼합한 KLH 접합된 펩타이드 항원으로, 3주 간격으로 4번에 걸쳐 복막 내로 면역화시켰다. 융합 3일 전, 프라임된(primed) 마우스는 최종 면역화로 부스트(boost) 되었다. 융합 시, 비장에서 수집된 단일세포 부유물을 50% 폴리에틸렌 글리콜(Polyethylene glycol; PEG) 용액 (Sigma)을 사용하여 SP2/0-Ag14 myeloma와 융합시켰고, 20% 혈청이 첨가된 DMEM을 포함하는 96 웰 플레이트에서 배양하였다. 하이브리도마 세포는 하이포잔틴(Hypoxanthine), 아미노프테린(Aminopterin), 티미딘(Thymidine) (HAT 첨가) (Gibco) 에서 선별되었고, 하이포잔틴(Hypoxanthine), 티미딘(Thymidine) (HAT 첨가)에서 유지되었다. 하이브리도마 클론들은 2번의 한계 희석을 통해 선별되었다.

8. 효소 결합 면역침강분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA)

통상적인 ELISA 분석을 위해, 96 웰 플레이트(SPL)의 웰 상에서, 50ng의 펩타이드들은 코팅 완충액(32mM Na₂CO₃, 68mM NaHCO₃, 0.1% NaN₃, pH 9.6)으로 코팅되었고, PBS에 녹인 1% 무지방 건조우유로 차단시켰다. 0.1% Tween20 함유된 0.4 M Tris-Buffered Saline (pH7.4)으로 씻어낸 후, 1차 항체들을 첨가하였고, 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후, 항-마우스 겨자무 퍼옥시다아제(anti-mouse horseradish peroxidase; HRP) 접합된 항체를 첨가하였고, 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. ELISA Reader (TECAN, SunriseTM)를 사용하여 405nm에서 광학 밀도를 측정하기 위해서, Super AquaBlue ELISA substrate (eBioscience)가 사용되었다. C-말단 코팅 ELISA는 TaKaRa에서 제공되는 프로토콜에 따라 펩타이드 코팅 키트를 이용하여 수행하였다. 96-웰 반응 플레이트에서, 225ng의 펩타이드는 웰 당 50 μ l 반응 완충액 및 10 μ l 커플링 시약으로 37°C에서 2시간 동안 코팅되었다. 코팅된 웰들은 차단 용액으로 1시간 동안 차단되었다. 증류수로 씻어내는 과정을 제외하고, 나머지 과정은 일반적인 ELISA와 동일하였다.

9. 유세포 분석

미변성 단백질의 결합을 시험하기 위해서, 구조체(전장길이의 인간 Prss14/ST14, S805A mutant 및 EGFP-S805A)로 형질감염시킨 HEK293T 세포를 PBS로 2번 씻어냈고, 단일세포로 부유시키기 위해 Enzyme-Free PBS-based cell dissociation buffer (Gibco)로 처리하였다. CHO-s 세포 및 HEK293TF 세포의 경우, 세포들을 해리 없이 수확하였다. 5×10^5 세포를 FACS 완충액(0.1mg/ml BSA in PBS)이 포함된 둥근 바닥 96-웰 플레이트에 접종하였다. 세포들을 1500 rpm으로 2분 동안 4°C에서 원심분리하였다. 살아있는 세포를 검출하기 위해서, Fixable Viability dye eFluor 455UV (affymetrix)를 암소에서 4°C, 30분 동안 처리하였다. 세척 후, 세포들을 Fix & Perm kit (CALTAG)로 고정시켰고, 투과시켰다. Fc 수용체들을 차단하기 위해서, Human Fc receptor binding inhibitor (14-9161, affymetrix)를 사용하였다. 1차 항체로 사용된 mAbs에 대해, 3 μ g/ml PE conjugated anti-mouse Kappa (PharMingen)가 2차 항체로 사용되었다. 인간화시킨 mAb3F3의 미변성 단백질과의 결합을 확인하기 위해서, HEK293TF 세포를 사용하였다. 70%의 pcDNA3.1/EGFP 와 pcDNA3.1/matriptase(S805A)-TST를 동시 형질전환 시킨 HEK293TF 세포와 30%의 pcDNA3.1 과 pCMV/tetTomato를 동시 형질전환 시킨 HEK293TF 세포를 섞어 둥근 바닥 96-웰 플레이트에 접종하였다. 세척과 희석에는 HEK293TF 세포의 배양액인 FreeStyleTM 293 Expression Medium을 사용하였다. 세포들을 1500 rpm으로 2분 동안 4°C에서 원심분리하여 세척 한 후 10% 노말 랫트 혈청, 10% 노말 햄스터 혈청, 70% 10X 2.4G2를 5분간 처리하였다. 세포는 Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer를 사용하여 고정 및 투과화 시켰다. 세척 후 30 μ g/ml의 인간화 mAb3F3을 암소에서 20분간 반응 시켰다. 세척 후 이차 항체로 Alexa Fluor[®] 647 anti-human IgG Fc antibody를 암소에서 15분간 반응 시켰

다. BD Accuri^(TM) Flow Cytometer를 이용하여 데이터를 수집하였고 Flowjo 10 프로그램에서 분석하였다.

10. 면역침전법 및 웨스턴 블랏팅

단백질분해효소 억제제 카테일이 첨가된 non-denaturing lysis buffer (IP buffer; 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1mM EDTA, 50mM HEPES, pH7.4)에서 세포들을 용해시켰고, 교반기에서 4℃, 20분 동안 반응시켰다. 용해된 세포는 스크래퍼(scraper)로 수집하였다. 26G 바늘이 달린 1ml 실린지를 통하여, 게노믹 DNAs를 절단한 후, 세포 파쇄물은 4℃에서 15분 동안 15000rpm으로 원심분리하여 펠렛화시켰다. 세포 용해물은 단일클론항체와 4℃에서 밤새도록 회전시키면서 반응시켰고, protein A/G agarose bead (Pierce)의 50% 현탁액(slurry)에 상온에서 2시간 동안 회전시키면서 반응시켰다. protein A/G beads 포획 항체-항원 복합체는 4℃, 1분 동안 1500 rpm으로 원심분리하여 PBS로 3번 씻어냈고, 상등액을 제거하였다. 항체-항원 복합체를 용출하기 위해서, 복합체를 SDS 샘플 완충액과 혼합하였고, 99℃에서 5분 동안 반응시켰다. 용출된 상등액은 PVDF membrane (Pall, FluoroTrans)을 사용하여 웨스턴 블랏으로 분석하였다. 멤브레인을 0.1% TritonX-100 in PBS (PBS-T)에 녹인 5% 스킵밀크로 반응시켰고, 인간 단백질에 대응하는 polyclonal rabbit antibody IM1014 (Calbiochem) 또는 마우스 단백질에 대응하는 polyclonal rabbit anti-epithin serum으로 반응시켰다. HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:5000 희석)는 Luminol/Enhancer solution and Stable Peroxide solution (SuperSignal^R West Pico, Thermo)과 함께 사용되었다. 화학발광도는 LAS-4000mini (GE healthcare Life Sciences)를 통해 관측하였고, 각 밴드의 신호는 ImageJ를 통해 디지털화되었다.

11. 면역형광분석

세포들은 0.1% 젤라틴 코팅된 커버슬립에 접종되었고, 4% 파라포름알데히드로 상온에서 10분 동안 고정시켰다. 그 후, 세포들은 0.5% PBS-T로 투과시켰고, 비특이적 결합은 0.1% PBS-T에 녹인 10% goat serum/1% gelatin으로 30분 동안 차단시켰다. mAb3F3은 1차 항체로 사용되었다. FITC-conjugated anti-mouse IgG는 2차 항체로 사용되었다. 액틴은 phalloidin-iFluor647 (Abcam)를 사용하여 가시화되었고, 핵은 Mowiol mounting media (Sigma)에 희석된 0.3μM DAPI (Molecular Probes)로 염색되었다. 상기 염색된 세포들은 LSM510 meta (Zeiss)를 사용하는 공초점 현미경으로 가시화되었고, Photoshop으로 가공하였다.

<실시예 1> 4T1 및 E0771 유방암 세포의 전이에서 Prss14/ST14의 역할

유방암 진행 및 전이에서 PRSS14/ST14의 역할을 확인하기 위해서, 2종의 마우스 유방암 세포주인 4T1 및 E0771을 사용하였고, 동종이식(syngeneic) 마우스 숙주로 Balb/C 및 C57BL/6을 각각 사용하였다(도 1). PRSS14/ST14 녹다운 세포 (EpiKD) 및 이의 대조군 세포(con)를 유방 지방 패드 내로 동소(orthotopically) 주입하였고, 생존, 종양 개시, 1차 종양 성장 및 폐 전이를 추적하였다. 4T1 EpiKD는 용량 의존적 방식으로 생존이 증가하였고(도 1A), 1차 종양 성장은 약간 감소한 반면(도 1B 및 도 1C), 폐에서의 전이 결절의 수는 상당히 감소하였다(도 1C). E0771 EpiKD 세포주도 준비하였고, 동일한 방법으로 실험하였다(도 1D 내지 도 1F). PRSS14/ST14의 녹다운은 생존율을 상당히 증가시켰고(도 1D), 종양 성장을 감소시켰으며(도 1E 및 도 1F), 폐 전이를 감소시켰다(도 1F). E0771 보다 더 전이성이 강한 4T1 유방암 모델의 경우, 녹다운에 의해 폐 전이가 분명히 억제되었다. 상기 결과들은 Prss14/ST14가 4T1 종양 증식 및 전이에 필수적이라는 것을 나타냈다.

<실시예 2> 항체 반응을 일으킬 수 있는 특이 구조 항원 펩타이드의 제작

Prss14/ST14는 여러 다운스트림 기질들을 활성화하여 중요한 역할을 수행하므로, 본 발명자들은 항체를 통해 상기 기능을 억제하면, 종양 전이를 차단하고, 종양 환자의 생존율을 증가시킬 수 있다고 가정하였다. 이에, 본 발명자들은 높은 항원성, 친수성, 표면 노출 가능성(surface probability), 진화적 보존성(evolutionary conservation)을 나타내고, 당화와 같은 단백질 변형 부위를 피하여 항원 에피토프를 제작하기로 결정하였다. 선별된 항원 에피토프는 활성화 절단과 관련된 영역으로, 단백질 분해효소 내 활성화 루프 (19mer)인 Epi-SP이다(도 2A 내지 도 2C). Epi-SP 에피토프는 모델 내 항원으로써 적당한 부위에 위치하고 있어, 본 발명자들은 항-전이 예방 백신으로서의 가능성을 시험해 보기로 결정하였다. KLH 접합된 마우스 에피토프 펩타이드인 Epi-SP의 면역화를 통해, Balb/c 마우스에서 쉽게 검출가능한 항체를 생산하였다.

<실시예 3> 4T1 유방암 전이를 억제하는데 효과적인 항원 펩타이드의 면역화

에피토프 자체 면역화를 통한 암 전이의 감소 가능성을 시험하기 위해서, Complete Freund's adjuvant로 3번의 면역화 후, 꼬리 정맥 주사를 통한 전이 분석을 수행하였다(도 2D). 세포주입 19일 후, 폐의 전이 결절을 계수하였다. Epi-SP는 통계적으로 유의성 있게 폐의 전이 결절의 수를 감소시켰는데, 이는 Prss14/ST14 항원의 자체

적인 암 면역화가 암 전이를 억제할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0104] 항체에 의한 전이 차단에 있어 서열 비특이적인 효과를 검증하기 위해서, Epi-SP 임의 서열을 가진 펩타이드 (Epi-SP sequence-scrambled peptide)인 Epi-Sc가 선별되었다. 꼬리 정맥 변이 분석을 위해, 2개의 항원들을 면역화한 마우스에 4T1 및 4T1EpiKD 세포를 주입하여 동일한 조건으로 실험하였는데, Epi-SP 펩타이드로 면역화된 5 마리의 마우스 중 4 마리에서 전이가 억제되는 것으로 명확히 나타난 반면, Epi-Sc는 전이를 차단하는데 실패하였다(도 2G). 전이 감소 수준은 4T1EpiKD 세포의 수준과 비슷하였다. 상기 결과는 PRSS14/Epithin 펩타이드가 서열 특이적인 방식으로 4T1 암 전이를 감소시킨다는 것을 나타낸다. 각각의 항형질은 높은 특이성을 가진 항원 서열에만 결합하는데, 두 항체 간의 교차 반응성은 없는 것으로 나타났다(도 2H).

[0105] Epi-SP 펩타이드 면역화가 어떻게 4T1 암 전이를 감소시킬 수 있는지에 대해 확인하기 위해서, 마우스 혈청 존재하에서 내피세포 투과 이동 능력을 시험하였다. MS1 내피세포의 컨플루언트한 단일층 상에 접종된 4T1 암세포는 anti-Epi-SP 혈청 존재하에서 덜 이동하였다(도 2I). 상기 결과는 Epi-SP 펩타이드로 유도된 항체가 암세포의 내피세포 투과 이동을 차단하여 전이를 억제한다는 것을 나타낸다.

[0106] <실시예 4> E0771 전이를 억제할 수 있는 자가분해 고리(Autocatalytic loop) 펩타이드

[0107] 본 발명자들은 Epi-SP 서열에 대한 특이적인 단일클론항체를 얻으려고 시도하였으나, 성공하지 못하였다. 상기와 같은 성공하지 못한 시도를 통해, 상기 에프토프 펩타이드는 좋은 항체들을 스크리닝하는데 충분히 안정적이지 않을 수도 있다는 생각을 하게 되었다. 이에 본 발명자들은 안정화 고리를 만들 수 있는 아미노산들의 거리를 측정함으로써 구조 모델을 다시 확인하였다. aa604 내지 aa627의 펩타이드 범위는 자가활성화 고리 영역을 커버하는 가장 가까운 말단으로 나타났다. 상기 영역은 3개의 종에서 높게 보존되어 있다(도 3A). 인간 및 2 종의 쥐 서열 사이에 단지 하나의 아미노산만이 차이를 나타냈다. 본 발명자들은 환원반응에 의한 이황화 결합을 만들기 위해서, C 말단에 시스테인을 추가하였다. 인간 및 마우스 단백질 전체의 결정 구조 분석에 기초한 자가활성화 고리의 구조 모델링은 펩타이드 서열의 모델링과 비교하여 매우 유사한 구조를 나타냈다(도 3B).

[0108] 3개의 KLH-접합된 펩타이드인, Epi-SP(KQARVVGGTNADEGEWPWQ), 인간 유래 선형(human derived linear; Mat-Linear; CGLRSFTRQARVVGGTDADEGEWP) 및 시스테인 결합된 고리(cysteine bonded loop; Mat-Loop; CGLRSFTRQARVVGGTDADEGEWPC)를 알룸 어쥬번트(Alum adjuvant)와 함께 면역화시킨 결과, C57BL/6 유래 E0771 전이 분석에서 모두 상당한 감소를 나타낸 반면, 임의서열을 가진 Epi-Sc 항원은 그렇지 않았다(도 3C). KLH 접합된 항원은 2개의 어쥬번트인 알룸(Alum) 및 MF59로 실험하였는데, Mat-Loop는 전이 결절의 수와 범위 및 폐의 무게를 상당히 효과적으로 감소시킬 수 있는 것으로 나타났으며, 이는 어쥬번트의 영향을 넘어서는 것으로 통계학적 유의성을 나타냈다(도 3D 및 도 3E). 한편, 상기 조건에서 생성된 항체들이 모두 IgG1 이소타입이라는 것을 확인하였다(도 3F).

[0109] <실시예 5> 인간 단백질에 특이성을 나타내며, 마우스 PRSS14/ST14 고리에 교차 반응성을 나타내는 mAb3F3 하이브리도마

[0110] 전이 예방 백신 실험에서의 성공적인 전이 차단 결과를 토대로, 본 발명자들은 자가활성화 고리 구조를 인식할 수 있는 단일클론항체(mAb)를 개발하였다. PRSS14/ST14의 자가분해 고리에 직접 대응하는 구조 특이적인 mAb를 제작하기 위해서, 본 발명자들은 Mat-Loop 펩타이드로 하이브리도마 실험을 수행하였다. 광범위한 스크리닝 후, 본 발명자는 mAb3F3 클론을 분리하였고, 이의 결합 특이성을 분석하였다(도 4). BSA 접합 Mat-Loop로 코팅된 ELISA에서, mAb3F3은 Mat-Loop 펩타이드 서열에 특이적으로 결합하였으나, BSA 단독으로 실험한 경우에는 결합하지 않았다(도 4A). ELISA plate 상에서, BSA 접합 Mat-Loop에 결합하는 mAb3F3은 Mat-Loop 뿐만 아니라 Epi-Loop와도 경쟁하였는데(도 4B), 이는 인간 및 마우스 단백질 서열에 대해 교차 반응성을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0111] 하이브리도마 유래 mRNA를 서열분석한 결과, 중쇄 및 경쇄 모두에서 항원 결합 포켓을 형성하는 CDR1, 2, 3 영역을 확인하였다(표 1). 이후, mAb3F3 Fab 영역의 구조를 아미노산 서열을 기초로 하여 예측하였고(도 4C), 도킹 모델링에 적용하였다(도 4D). 모델링 결과에서 나타난 바와 같이, 전체 단백질 모델로부터 도출된 항원 고리는 항체 결합 포켓과 잘 맞는 것으로 나타났다. mAb3F3의 CDRs는 활성화 절단 사이트를 포함하였다(도 4E). SPR sensorgrams을 통해 BSA 접합 펩타이드 항원에 대한 mAb3F3의 친화도를 측정하였다. 인간 고리(Mat-Loop) 및 마우스 고리(Epi-Loop) 펩타이드 모두에 대한 mAb3F3 친화도는 나노몰 수준으로 나타났다(인간: $K_D=5.333 \times 10^{-9}$, 마우스: $K_D=7.814 \times 10^{-9}$)(표 2). 선형 형태는 2 logs 낮은 친화도를 나타냈고, 임의의 서열과는 전혀 결합하지

않았다.

표 1

	Light Chain Variable Region (V _L)	Heavy Chain Variable Region (V _H)
Total Length	112	113
Sequences of CDR1	RSSQSIVHSNGNTFLE	GYTFSIYWLE
Sequences of CDR2	KVSNRFS	EILPGSGNANYNEKFKG
Sequences of CDR3	FQGSHPVFT	SGTD

[0112]

표 2

	ka(1/Ms)	kd(1/s)	K _D (M)
Mat-loop-BSA	6.414x10 ⁵	0.003420	5.333x10 ⁻⁹
Epi-loop-BSA	4.131x10 ⁵	0.003228	7.814x10 ⁻⁹
Mat-Linear	2.593x10 ⁴	0.01052	4.057x10 ⁻⁷
Scrambled	No binding		

[0113]

<실시예 6> 인간 및 마우스 유방암 세포에서 PRSS14/ST14 단백질의 미변성 형태에 특이성을 나타내는 mAb3F3

[0114]

단일클론항체를 생산하기 위해 펩타이드 항원을 사용한 경우, mAb3F3이 미변성 단백질 구조를 인식할 수 있는 것은 중요한 이슈가 된다. 따라서, 본 발명자들은 mAb3F3이 세포 내에서 발현되는 PRSS14/ST14에 결합하는지 확인하였다. HEK293T 세포는 전장길이 인간 Prss14/ST14 (Mat)으로 형질감염되었고, 면역침전분석을 수행하였다(도 4F 내지 도 4H). 도 4에서 나타난 바와 같이, HEK293T 세포에 전장길이 구조체를 형질감염시키면, 4개의 서로 다른 가공 형태의 주요 밴드가 웨스턴 블랏팅 결과에서 나타났는데, mAb3F3은 2개 이상의 밴드에서 강하게 면역침전되었다(도 4F). S805 돌연변이를 가진 재조합 EGFP 융합 Prss14/ST14 단백질의 구조체인 EGFP-S805A을 형질감염시키면, mAb3F3와의 면역복합체를 확인할 수 있었다(도 4G). EGFP로 형질감염시킨 대조군에서는 어떠한 검출가능한 밴드도 확인할 수 없었다. 다음으로, 본 발명자들은 인간 MCF7에서 발현되는 내재성 Prss14/ST14에 mAb3F3가 결합하는 것을 확인하였다(도 4H). mAb3F3는 4T1 유방암 세포의 마우스 단백질을 쉽게 검출할 수 있었다(도 4I). 상기 결과는 mAb3F3이 마우스 및 인간 미변성 단백질에 특이적으로 결합한다는 것을 나타냈다. mAb3F3이 미변성 Prss14/ST14에 결합할 수 있는지 다른 분석방법으로 좀 더 확인하기 위해서, 본 발명자들은 유세포 분석을 수행하였다(도 4J 및 도 4K). mAb3F3은 세포 내에서 발현되는 Prss14/ST14 단백질을 검출할 수 있었다. 서열 특이적 경쟁 방식에서 단지 자체 펩타이드만이 경쟁적으로 결합할 수 있고, 임의의 서열을 가진 펩타이드는 결합하지 않았으므로, 서열 특이성은 명백하게 확인되었다. 또한, 결합 특이성도 음성 개체군으로서 CD8 단백질을 발현하는 세포와 함께, 2 색상 분석을 통해 검증하였다.

[0116]

<실시예 7> 여러 암세포에서 발현되는 PRSS14/ST14를 검출할 수 있는 mAb3F3

[0117]

본 발명자들은 진단 도구로서 mAb3F3의 가능성도 확인하였다. 여러 암세포주의 면역세포화학 염색에 mAb3F3이 적용되었다(도 5). 세포질, 세포 부착물 및 멤브레인에서 특이적인 Prss14/ST14 염색이 인간 유방암 세포인 MCF7 및 T47D에서 검출되었다(도 5A 및 도 5B). 핵 염색은 분명하게 나타나지 않았다. 흥미롭게도, Prss14/ST14 염색은 오직 서브개체군(subpopulation)에서만 확인되었고, MCF7 세포 모두에서 확인되지는 않았다(도 5A). Prss14/ST14를 발현하는 인간 및 마우스 암세포주에서의 확대 적용을 통해, MDA-MB-453 삼중 음성 유방암 세포주, SNU216 및 MKN45 인간 위 선암종 세포주, PC3 인간 전립선암 세포주, OE19 인간 식도 선암종 세포주,

HCT116 인간 대장암, 427.1.86 마우스 흉선종 및 4T1 마우스 유방암 세포주의 멤브레인 영역 또는 세포 부착물 영역을 mAb3F3이 염색시킬 수 있다는 것을 확인하였다(도 5C). 본 발명에서 사용된 모든 세포주는 Prss14/ST14를 발현하는 것으로 확인되었다. 따라서, mAb3F3는 미손상된 비절단 활성화 고리 구조를 가진 Prss14/ST14 단백질의 비활성화된 형태를 검출하기 위한 새롭고 독특한 진단 시약으로 활용될 수 있다.

[0118] <실시예 8> MMTV-PyMT 유방암의 전이를 감소시키는 mAb3F3

[0119] 본 발명자들은 우선 mAb3F3가 (자가)활성화를 차단할 수 있는지, 즉, 고리를 절단하여 변성 SDS-PAGE에서 30 kD 밴드를 나타내는지에 대한 mAb3F3의 생물학적 효과를 확인하였다. 활성화를 유도하기 위해서, pH 6 완충액을 MCF7 세포에 처리한 결과, 배지 내에 절단된 활성화 단백질 분해효소 도메인 (aMat-S) 뿐만 아니라 Press 14/ST14 long shed form (Mat-S')의 양도 증가되었다. 흥미롭게도, 세린 단백질 분해효소 억제제인 류펩틴 (leupeptin) 또한 분비(shed) 및 활성화 형태 모두 증가되었다. 본 발명자들은 상기 시스템에서 분비(shedding) 또한 영향을 미치는 것으로 결론 내리고, 활성화 실험을 수행하기 위한 명확한 시스템이 필요하다고 판단하였다. 마우스 427.1.86 세포 및 인간 MCF7 세포를 사용한 시험관 내(*in vitro*) 이동 및 침습 분석 결과, 두 세포 모두 mAb3F3를 추가한 경우 트랜스웰을 통한 침습 또는 이동이 통계학적 유의성 있게 증가하는 것을 확인하였다.

[0120] 예상하지 못했던 시험관 내(*in vitro*) 실험 결과에도 불구하고, 본 발명자들은 MMTV-PyMT 모델에서 정제된 항체로 세포 내(*in vivo*) 실험을 진행하였다(도 6). MMTV-PyMT 마우스는 6주령(day0)에 mAb3F3 항체로 3번 처리되거나, 대조군으로서 타솔로 처리되었다. day11에 mAb3F3 처리한 마우스에서 확인된 약간의 크기 감소를 제외하고는, 3 그룹 사이에 1차 종양 부피의 증가에 유의성 있는 차이는 확인할 수 없었다(도 6E 및 도 6F). 진행성 1차 종양은 Prss14/ST14 발현을 유지시켰다. 다만, day 14에 종양 절절의 수는 줄어들어, 폐 전이가 상당히 감소되었다(도 6G 및 도 6H). 상기 결과는 mAb3F3이 MMTV-PyMT 마우스 모델에서 암 전이를 억제할 수 있다는 것을 나타낸다. 이러한 결과들로부터, mAb3F3는 전이를 표적으로 하는 예방/치료 항체의 후보군으로 사용될 수 있다는 것을 확인하였다.

[0121] <실시예 9> 세포이동성을 억제하고 불활성화 PRSS14/ST14 단백질에 특이성을 나타내는 인간화 mAb3F3 항체클론

[0122] 인간화 항체의 세포이동성에 미치는 영향을 검증하기 위하여 트랜스웰의 반대편으로 이동하는 기능을 확인하였다(도 7A). 변성된 에피틴 단백질에 결합하는 mAb5는 배양액에 넣어 주었을 때 30 µg/ml까지 세포의 이동을 억제하지 않았고, 생쥐 하이브리도마 항체 mAb3F3는 3 µg/ml까지 70%로 이동성 억제를 보였다. 이 때 인간화 항체 h3F3-37은 50% 정도의 이동성 억제를 나타냈다. h3F3-35는 mAb3F3와 비슷한 정도를 나타냈다. 인간화 항체의 특이성을 확인하기 위하여 단백질 분해효소기능 돌연변이체 MatriptaseS805A를 EGFP와 함께 넣어준 세포와 TdTomato만 넣어준 세포를 같이 염색하여 항원 특이성을 유세포분석법으로 확인하였다(도 7B). 원편의 그림 이차항체만 있을 경우에 비하여 GFP+ 범위 안에서 h3F3-35에서는 적게 h3G3-37는 확실하게 특이적으로 세포를 염색할 수 있음을 확인하였다. 인간화 과정을 통해 획득한 h3F3-35와 h3F3-37의 아미노산 서열은 표3과 같다.

표 3

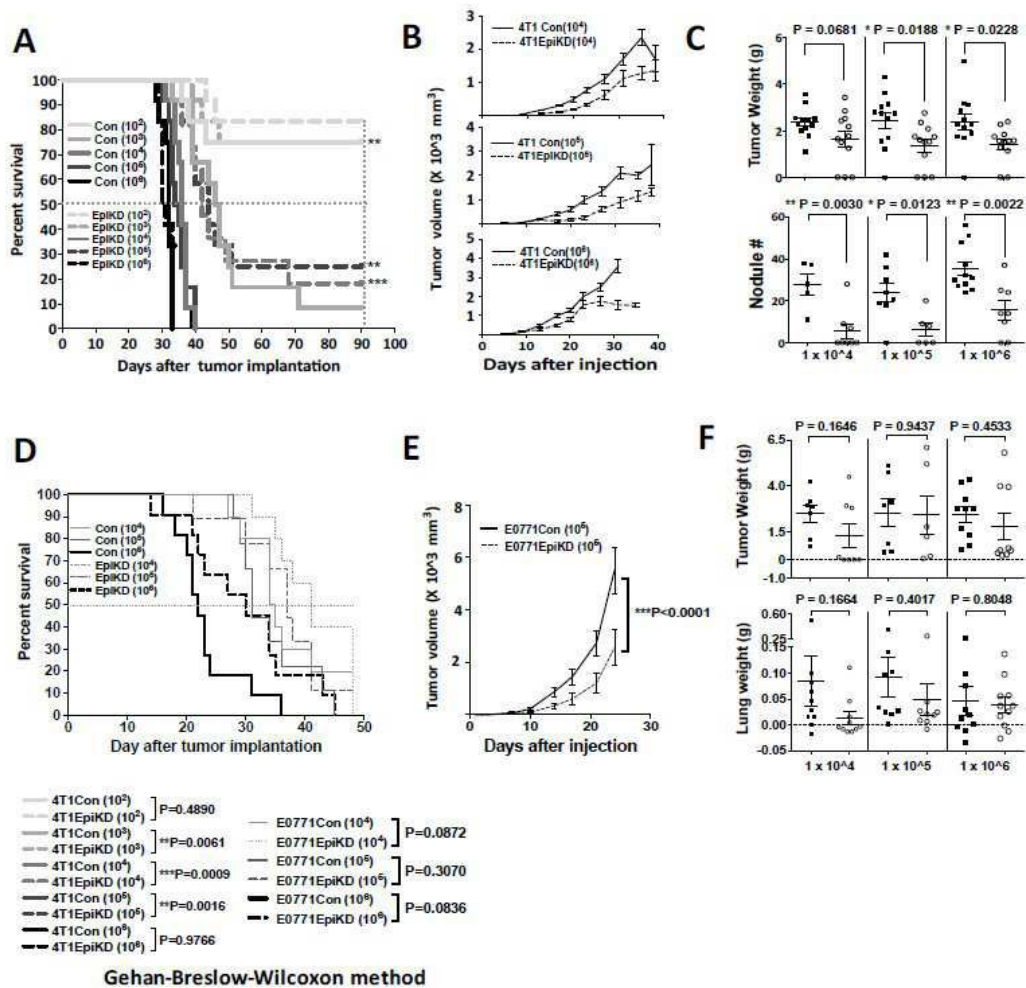
[0123]

	VH	VL
Hu3F3-35	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSIYWLEWVRQAPGKGLEWIGEILPGSGNANYNEKFKGRFTFSADTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTDWGQGTLLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSI VHSNGNTFLEWFQKPKGKAPKLLIYKVSNRFSVPSRFSGSGSGTDFTF TISSLPEDIATYYCFQGSHPVPTFGPGTKVDIK
Hu3F3-37	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSIYWLEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGNANYNEKFKGRVTMTADTSTSTVYMELSLRSEDTAVYYCARGTDWGQGTLLTVSS	상동

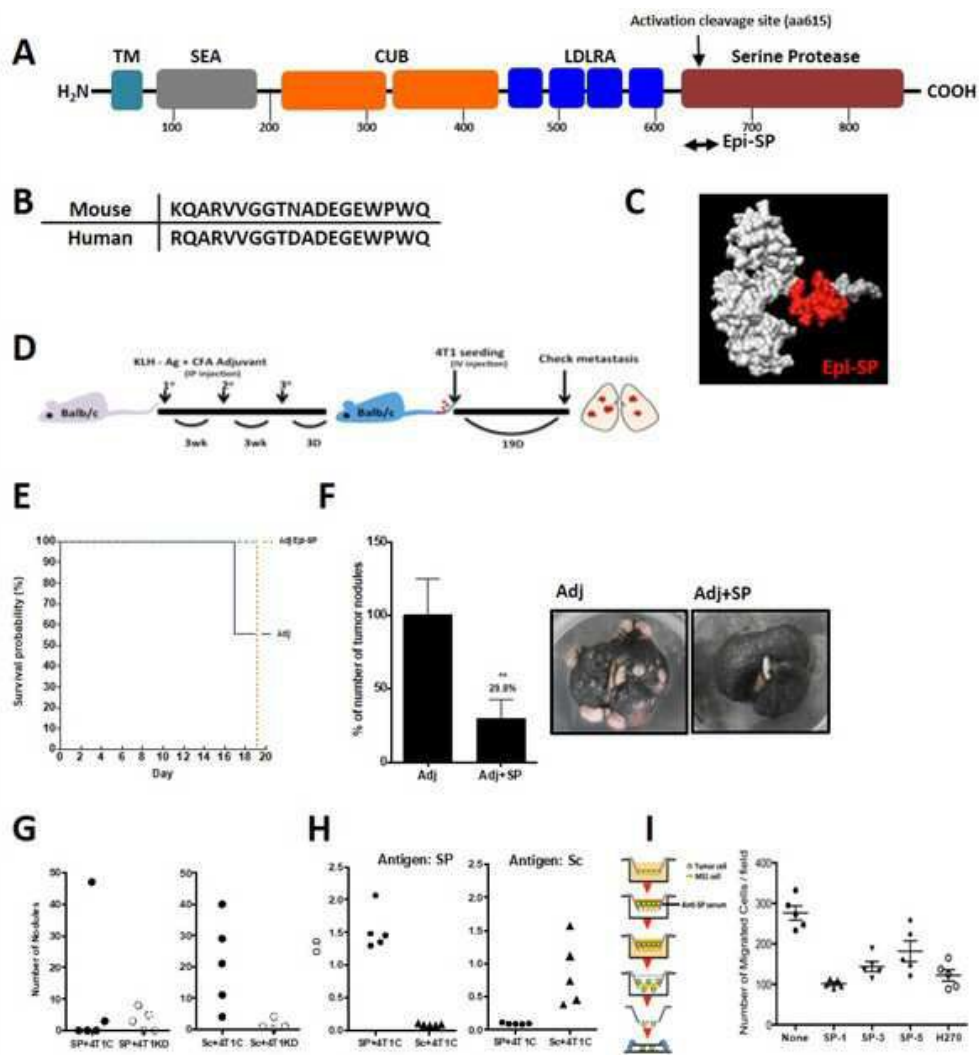
[0124] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

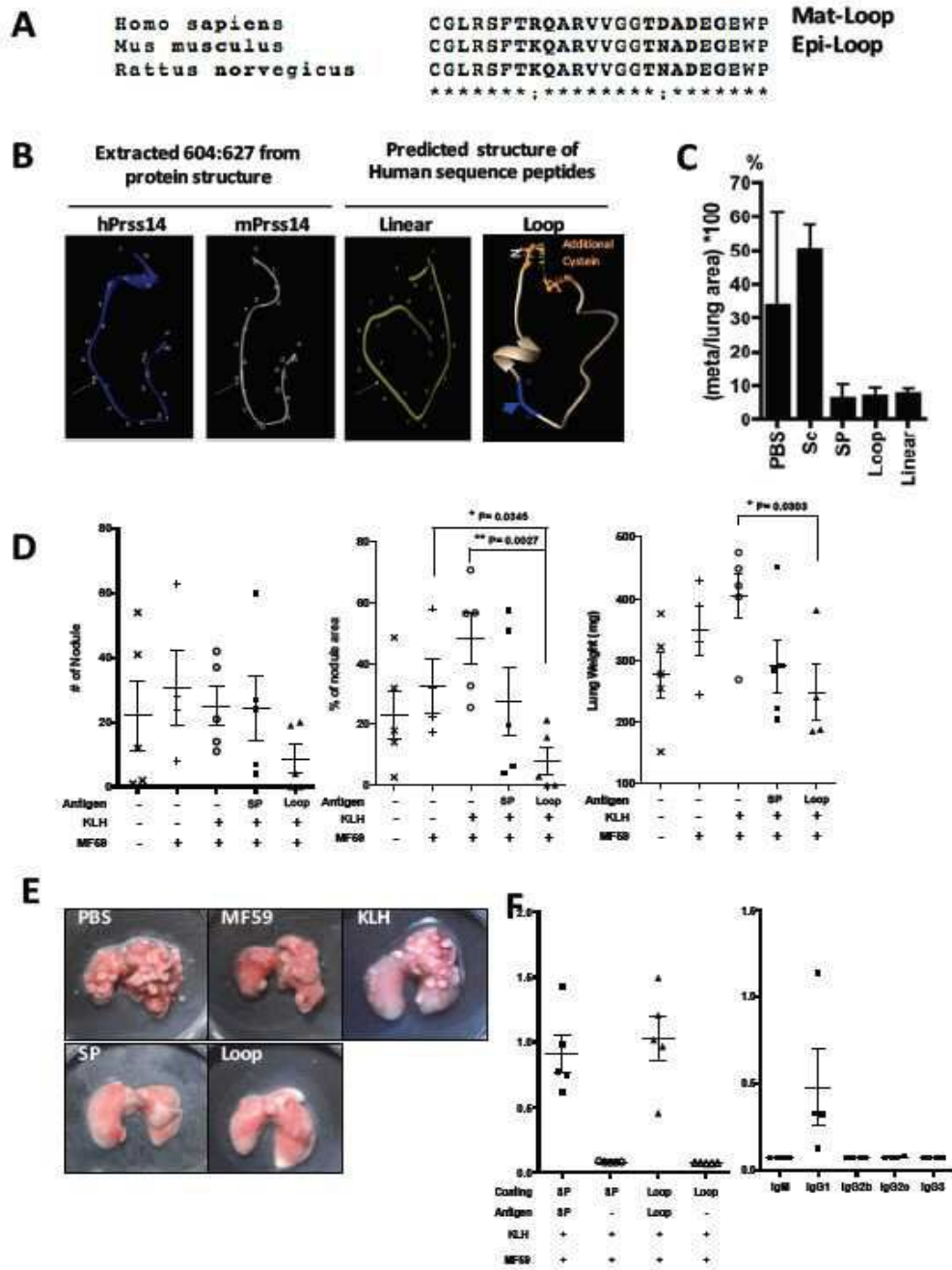
도면1



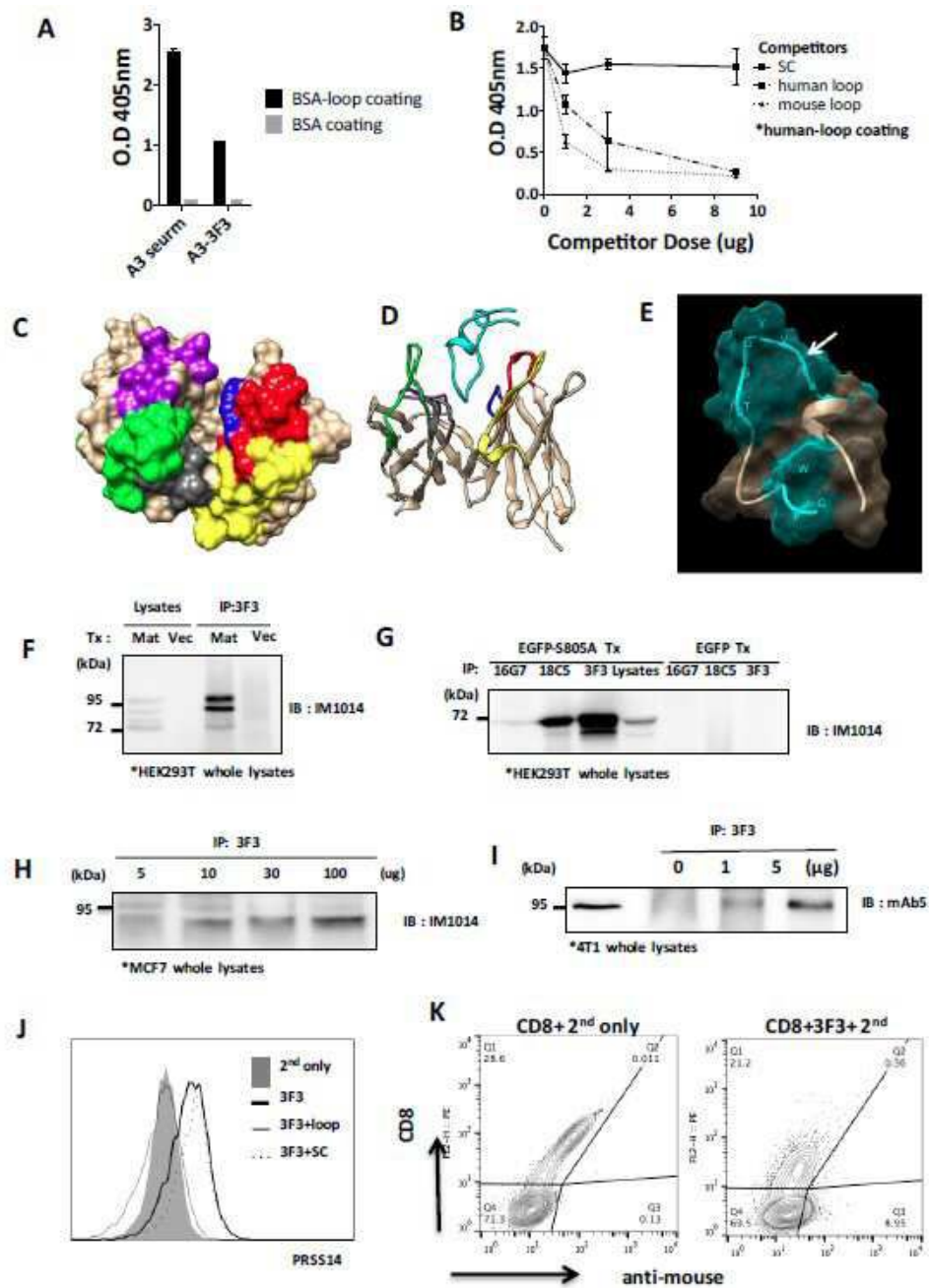
도면2



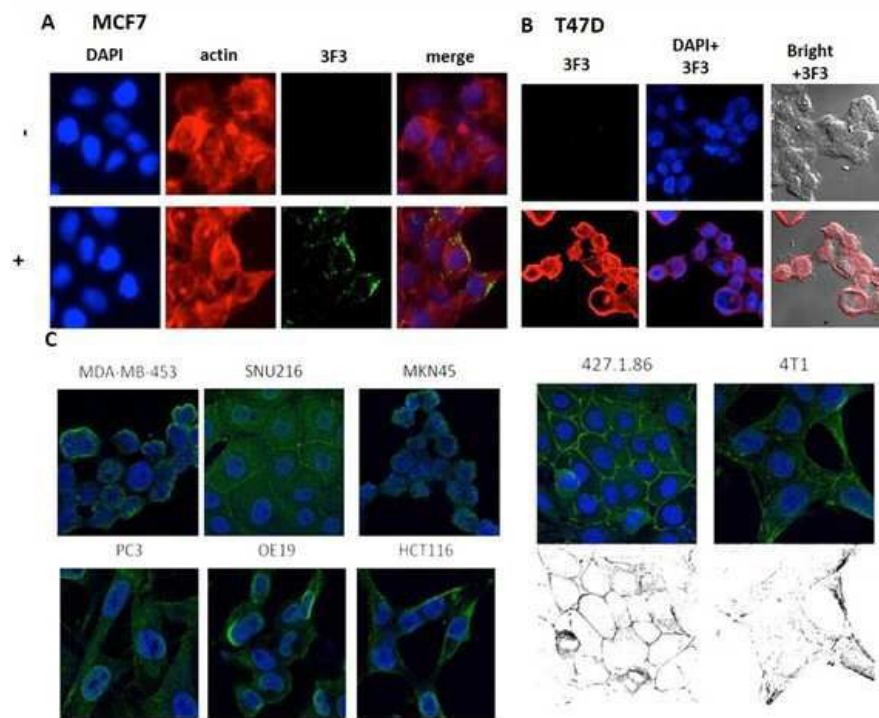
도면3



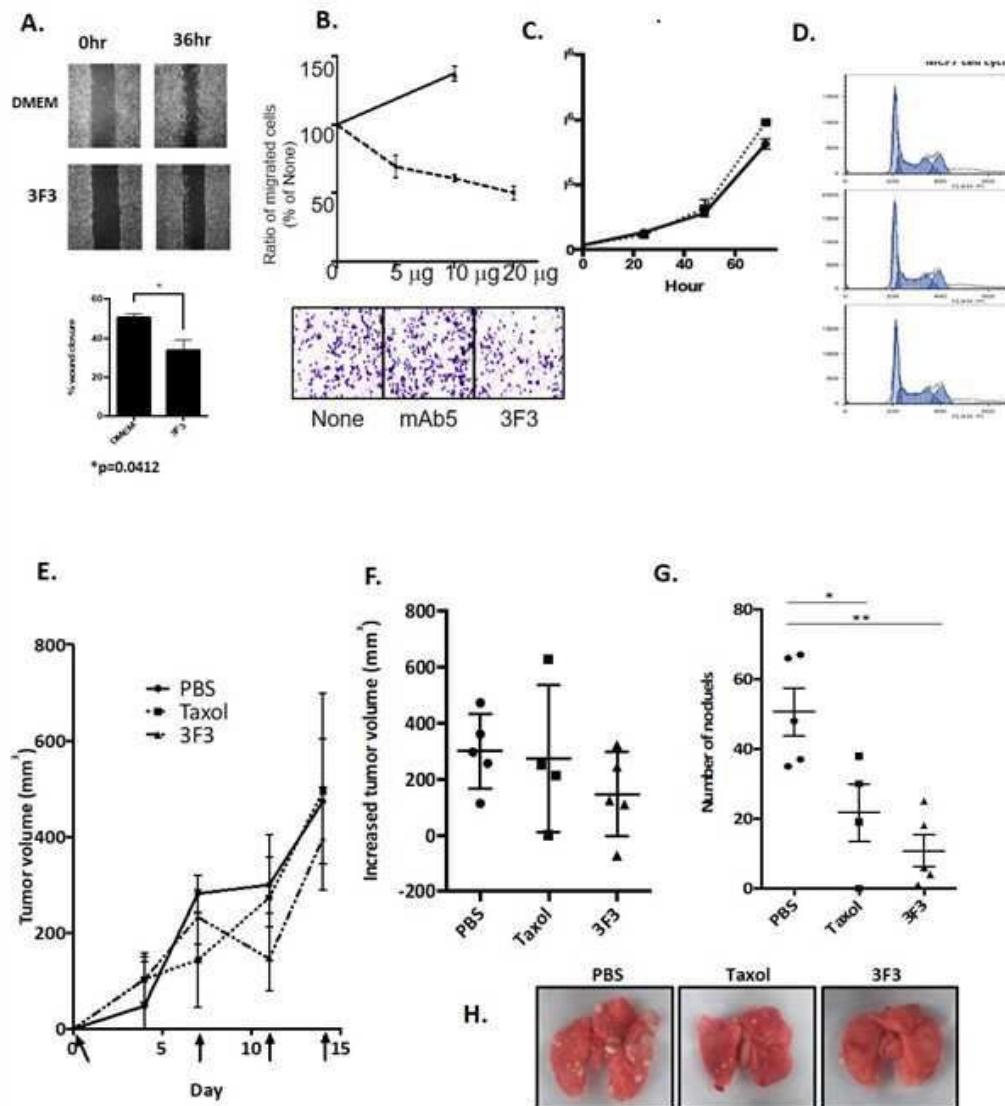
도면4



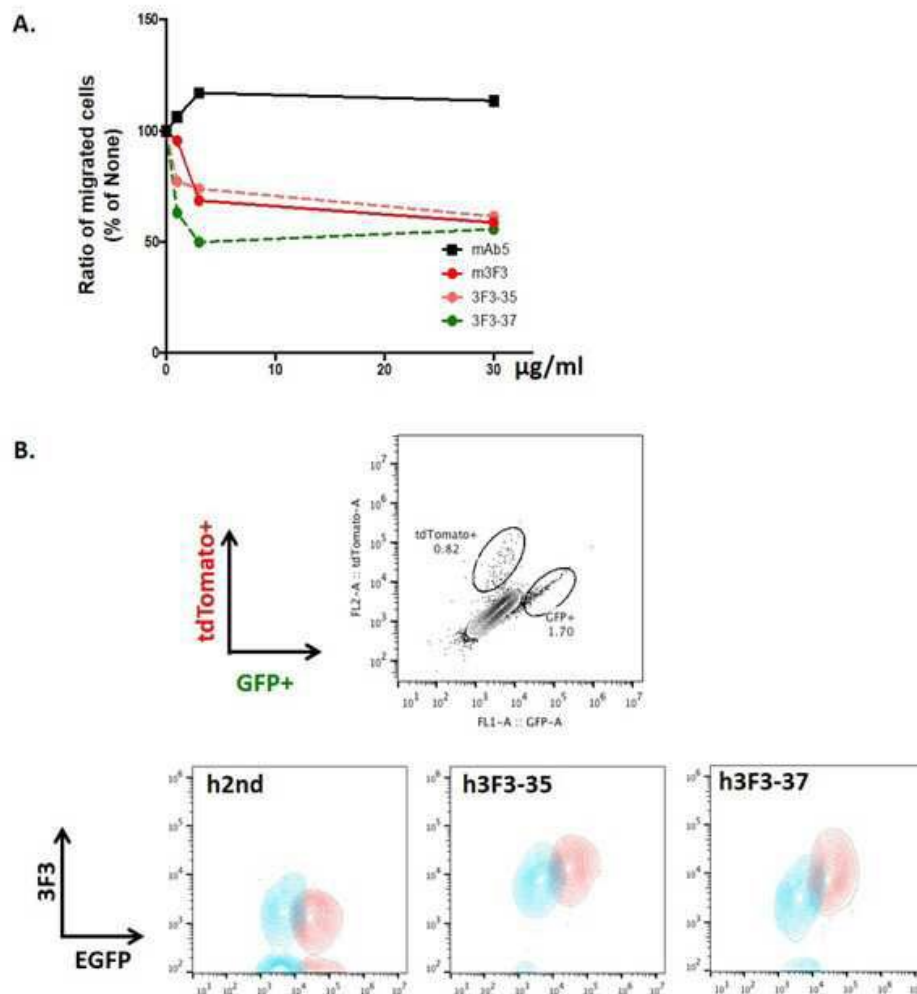
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> Specific monoclonal antibody against autocatalytic loop portion
of PRSS14/ST14 and use thereof
- <130> ADP-2019-0198
- <150> KR 10-2018-0057630
- <151> 2018-05-21
- <160> 11
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> mouse
- <400> 1

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu

1 5 10 15

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> mouse

<400> 2

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> mouse

<400> 3

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> mouse

<400> 4

Gly Tyr Thr Phe Ser Ile Tyr Trp Leu Glu

1 5 10

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> mouse

<400> 5

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

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 4
 <212> PRT
 <213> mouse
 <400> 6
 Ser Gly Thr Asp
 1
 <210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> humanized antibody VL
 <400> 7
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105 110
 <210> 8
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> humanized antibody VH
 <400> 8
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30
 Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<

210> 9
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> humanized antibody VH
 <400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30
 Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 10
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 10

Cys Gly Leu Arg Ser Phe Thr Arg Gln Ala Arg Val Val Gly Gly Thr
 1 5 10 15

Asp Ala Asp Glu Gly Glu Trp Pro
 20

<210> 11
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> mouse
 <400> 11

Cys Gly Leu Arg Ser Phe Thr Lys Gln Ala Arg Val Val Gly Gly Thr
 1 5 10 15

Asn Ala Asp Glu Gly Glu Trp Pro
 20