(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년06월13일
(11) 등록번호 10-2408161
(24) 등록일자 2022년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57438 (2019.01)
A61K 39/3955 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7014527(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년03월15일
심사청구일자 2021년06월01일
(85) 번역문제출일자 2021년05월13일
(65) 공개번호 10-2021-0059020
(43) 공개일자 2021년05월24일
(62) 원출원 특허 10-2018-7027907
원출원일자(국제) 2017년03월15일
심사청구일자 2020년02월25일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/056150
(87) 국제공개번호 WO 2017/158043
국제공개일자 2017년09월21일
(30) 우선권주장
16305276.4 2016년03월15일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
WO2006092729 A2
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 10 항

(73) 특허권자
엥스띠뛰 나씨오날 드 라 쌍떼 에 드 라 흐쉐르슈 메디깔 (인쎄름)
프랑스공화국, 에프-75013 빠리, 뤼 드 똘비악 101
쌩뜨레 나티오날 데 라 르세르쉬 생띠끄
프랑스 75794 파리 세덱스 16 뤼 미셸 엔지 3-5
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
김인산
서울특별시 성북구 화랑로14길 5
베르또리노, 삘립
프랑스공화국, 69373 리용 세덱스, 밧 쉬네 데 - 뤼 레넥 28 위1052 - 쌍트르 레옹 베라르
엥니노, 안나
프랑스공화국, 69373 리용, 밧 쉬네 데 - 뤼 레넥 28 위1052 - 쌍트르 레옹 베라르
(74) 대리인
특허법인오리진

심사관 : 이수진

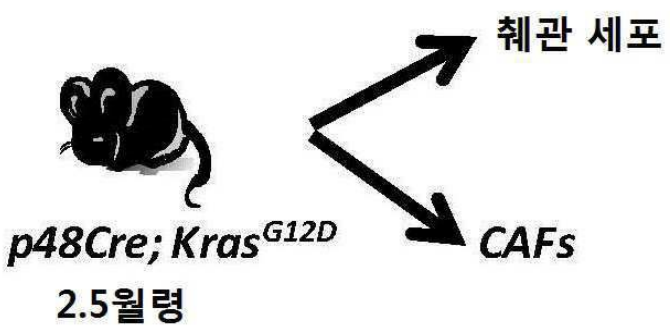
(54) 발명의 명칭 **대상체가 췌관 선암을 앓을 위험을 평가하기 위한 초기 및 비 침습적 방법 및 이러한 질환의 치료 방법**

(57) 요 약

본 발명은 혈액 샘플 중의 βig-h3 단백질의 수준을 측정하는 단계를 포함하고 여기에서 βig-h3의 혈청 수준이 PDAC를 앓을 위험에 양의 상관관계를 갖는, 대상체에서의 췌관 선암(PDAC)의 비침습적인 진단 방법에 관한 것이다. PDAC 환자 20개체 및 104개체의 2개의 구분된 군(cohorts)에 대한 그리고 PDAC 마우스 모델에 대한 연구를

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1a



통해, 본 발명자들은 βig-h3이 혈액 샘플 중에서 직접 검출될 수 있고 βig-h3이 췌장 종양 병소에서의 종양발생의 극히 초기에 발현된다는 것을 보이고 있다. 본 발명은 또한 PDAC의 치료에의 사용을 위한 βig-h3 단백질의 길항제에 관한 것이다. 본 발명자들은 βig-h3가 $CD8^+$ T 세포의 활성화 및 세포독성 특성을 감소시키는 것에 의하여 이들에 직접적으로 결합한다는 것을 발견하였다. 더욱이, PDAC 마우스 모델에서의 중화 βig-h3 항체의 사용이 $CD8^+$ T 세포 항-종양 반응을 향상시키는 것에 의하여 종양 성장을 감소시켰다. 따라서, 중화 βig-h3은 신규한 면역학적 체크-포인트 표적(target)으로 작용하고 따라서 PDAC에서 이로운 항-종양 면역력을 회복하도록 한다.

(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
G01N 33/57488 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)

(73) 특허권자
위니베르시테 끌로드 베르나르 리옹 I
프랑스 빌뢰르반 에프-69100, 불바르 뒤 11 노바브르 1918 43
상뜨로 레옹 베라르
프랑스 에프-69008 리옹 뤼 래넥 28
한국과학기술연구원
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

(56) 선행기술조사문헌
WO2012079977 A1*
WO2014113406 A1
Andrei Turtoi et al, Journal of Proteome Research (2011), vol 10, no 9, pp 4302-4313.
Ya Ting Chang et al, PLOS ONE (2011), vol 6, no 5, pp e20029, XP055036528, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0020029.
Maeva Patry et al, Diabetes (2015), vol 64, pp 4212-4219.
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명 세 서

청구범위

청구항 1

환자의 췌관 선암을 예방 또는 치료하는데 사용하기 위한, βig-h3 길항제로, 상기 길항제가 항-βig-h3 중화 항체 또는 압타머인, βig-h3 길항제.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 길항제가 βig-h3에 직접적으로 결합하고 CD8+ T 세포 활성화의 억제를 억제하는 βig-h3 길항제.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 항-βig-h3 중화 항체가 인간화된 항체인 βig-h3 길항제.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 환자가 대조 참조 값(reference control value)과 비교하여 높은 수준의 혈액 내 βig-h3 수준을 갖는 βig-h3 길항제.

청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 βig-h3 길항제 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 췌관 선암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 6

암에 걸린 환자의 항-종양 CD8+T 세포 반응을 활성하기 위한 방법에서 사용하기 위한 βig-h3 길항제로, 상기 길항제가 항-βig-h3 중화 항체 또는 압타머인, βig-h3 길항제.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 길항제가 인간화된 항-βig-h3 중화 항체인 βig-h3 길항제.

청구항 8

제 6 항 또는 제 7 항에 있어서,

암이 췌장암 식도편평세포암종, 위 및 간암종, 결장암, 흑색종, 결장암, 및 난소암으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 고형암인 βig-h3 길항제.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

고형암이 췌장암인 βig-h3 길항제.

청구항 10

제 8 항에 있어서,

췌장암이 췌관 선암인 βig-h3 길항제.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 췌관 선암(PDAC: pancreatic ductal adenocarcinoma)을 예방 또는 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 췌관 선암(PDAC)의 진단 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 대상체로부터 수득되는 혈액 샘플 중의 βig-h3 단백질의 수준을 측정하는 단계를 포함하고 여기에서 βig-h3의 수준이 췌관 선암을 앓는 상기 대상체의 위험에 양의 상관관계를 갖는, 대상체가 췌장암을 앓을 위험을 평가하기 위한 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 췌관 선암(PDAC)은 가장 치명적인 인간 악성종양 및 주요 건강 문제의 하나이다. PDAC는 프랑스에서 연간 약 10,000 명 그리고 세계적으로 연간 약 230,000 명의 사망자를 야기한다(Jemal et al, 2003). 발병/사망의 비율은 거의 1이며 사실상 PDAC를 나타내는 모든 환자가 그의 질환으로 사망할 것임을 나타낸다. 치료가 불충분하였기 때문에 그리고 질환이 진전된 상태에서 진단되었기 때문에, 이는 모든 종양 중 가장 짧은 약 6개월인 평균 단기 생존으로 인한 것이다. 과거 수 십년 동안의 상당한 연구 노력에도 불구하고, 수술, 방사선 요법, 화학요법 또는 이들의 조합을 포함하여 통상적인 치료 접근법은 매우 제한된 영향을 가졌다. 단지 환자의 20%가 진단 후 1년 동안 생존하는 것으로 예후는 암울하다(Jemal et al, 2003). 이러한 시나리오를 고려해 볼 때, PDAC 진전에 대응하고 그에 의하여 환자 생존 기대 및 삶의 질을 증가시킬 수 있는 신규한 치료를 위한 연구가 높은 우선순위를 받고 있다.

[0003] 전신 요법에 대한 저-효율 또는 고-내성에 대한 설명은 PDAC 종양이 과소혈관이고 종양 질량의 15 내지 90%를 나타내어 기질 중에서 매우 풍부하고, 이는 변형된 세포에의 약물 전달에 대하여 장벽을 형성할 수 있다는 것이다.

[0004] PDAC의 특징들은 다음과 같다: (i) 모든 환자들이 종국적으로는 재발하여 현재 치료 옵션에 대한 질환의 저항을 강조하기 때문에 불치성이다. (ii) 여전히 최상은 아니나 현존하는 치료들에 대한 반응의 관점에서 극히 이질적인 질환이다. (iii) 질환의 장기적인 자연 경과 및 반복되는 치료로 인하여 약물 내성이 PDAC에서 치료 실패 및 그의 필연적인 운명의 주요 원인으로 잔류하여 연관 사회 및 건강 문제를 생성한다. (iv) 위험-적응화되고, 개인화된 치료를 실행하고 임상적 유용성을 최대화하는 한편으로 비용을 최소화하기 위하여는 긴급하게 요구됨에도 불구하고, 치료에 대한 반응을 예측하는 강하고 특이적인 마커는 여전히 결여되어 있다.

[0005] 전체 PDAC 종양의 유전자 분석(gene profiling)이 선행 기술에서 대량으로 보고되었다(Abdollahi et al, 2007; Abiatari et al, 2009; Buchholz et al, 2005a; Buchholz et al, 2005b; Cavard et al, 2009; Crnogorac-Jurcevic et al, 2002; Gress et al, 1997; Ishikawa et al, 2005; Marcotte et al, 2012; Verma et al, 2012; Wang et al, 2013 참조). 그러나, 이러한 검사의 낮은 재현성은 발명자가 이러한 방향으로 탐색을 지속하는 것을 좌절시켰다.

[0006] 이러한 접근법의 실패에 대한 이유는 부적절한 도구, 불충분한 품질의 도구, 샘플의 열등한 품질로 인한 것일

수 있거나, 또한 PDAC 종양이 염증 및 괴사의 가변 영역과 연관되는 기질 조직의 15 내지 90%를 포함할 수 있기 때문에 병리 자체에 고유한 것일 수 있다.

[0007] 따라서, 그리고 발명자의 지식에 따르면, 개개 대상체가 췌관 선암(PDAC)을 앓거나 이로 발전할 위험을 예측하기 위한 획득가능한 진단 바이오 마커(biomarkder)가 존재하지 않는다. 특히, PDAC를 앓는 개인의 종양 발병의 초기 단계를 진단하기 위한 시험관 내 또는 생체 외 방법에 대한 요구가 남아 있다.

[0008] 초기에 침습적인 종양-내 생검 없이 PDAC를 앓는 개인의 진단을 결정하기에 적절한 방법 및/또는 킷트 및/또는 고체 지지체에 대한 요구가 또한 남아 있다.

[0009] 따라서, PDAC의 신규한 생물학적 마커에 대한 요구가 존재하고 있다. 특히, 신뢰할 수 있는 진단 및 질환의 초기 단계의 모니터링을 허용하는 바이오 마커가 대단히 바람직하다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은: i) 대상체가 PDAC에 감염되었는 지의 여부를 질환 발병 초기 단계에서 예측하기 위한 신규하고 신뢰가능한 방법 및 ii) PDAC를 치료하기 위한 신규한 치료 표적을 제공하는 것에 의하여 이러한 요구를 처리하는 것이다.

[0011] 발명자들은 최근 세포외 기질(extracellular matrix)과 세포 모두에 결합할 수 있는 기질의 분비된 단백질인 βig-h3 단백질(전환성장인자 베타-유도 단백질(transforming growth factor beta-induced protein) 또는 TGFBIp)이 1형 당뇨병에서의 소도 발작 T 세포 세포독성 공격(islet insult T cell cytotoxic attack)에 대한 소도 내성(islet tolerance) 및 보전(integrity)을 유지하는 데 중요한 역할을 한다는 것을 보여주었다 (Patry et al., 2015).

[0012] TGFBIp는 인테그린 αvβ5와의 상호작용을 통하여 패혈증을 유발하는 인간 내피 세포 및 혈소판에 의하여 발현되는 세포외 기질 단백질이다. Bae와 그의 동료들은 항-TGFBIp 항체를 중화시키는 것이 TGFBIp와 TGFBIp 동종 수용체 중의 하나인 인테그린 αvβ5 간의 특이적인 상호작용을 억제하였다는 것을 보여주었다(Bae et al., 2014). 이들은 TGFBIp-중화 항체의 사용에 기반하는 치료가 패혈증의 유해한 영향을 개선할 수 있다는 것을 입증하였다. 더욱이, TGFBIp의 상승된 발현은 앞서 결장암 세포주 및 고등급 진전 결장암 등과 같은 여러 암세포주 및 종양 생검(Ma et al., 2008) 뿐만 아니라 췌장 조직(Turtoi et al., 2011)에서 개시되었다. 이러한 발현은 종양 조직(혈청 수준에서가 아닌)에서 검출되었고 이는 상당히 진전된 종양(Ma et al 2008에서의 고등급 진전 결정암)에서 열등한 예후와 연관되었다. 반대로, 다른 연구(Han et al. 2015)에서는 TGFBIp의 혈청 농도가 여러 암으로 고통받는 환자들에서 평가된 반면, 췌장암으로 고통받는 환자에서는 유의미한 연관이 관찰되지 않았다. 마지막으로, 이러한 연구들 중 어느 것도 PDAC에서의 TGFBIp의 잠재적인 치료적 표적화 및 특히 인간에서의 면역학적 표적을 탐구하지 못하였다.

발명의 내용

[0013] 본 발명의 제1 목적은 대상체로부터 수득된 혈액 샘플 중의 βig-h3 단백질의 수준을 측정하는 단계를 포함하고 여기에서 βig-h3의 수준이 췌관 선암을 앓는 상기 대상체의 위험에 양의 상관관계(positively correlated)를 갖는, 대상체가 췌관 선암을 앓거나 이로 발전할 위험을 평가하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0014] βig-h3의 높은 수준은 췌관 선암을 앓거나 이로 발전할 높은 위험을 예측한다.

[0015] βig-h3의 낮은 수준은 췌관 선암을 앓거나 이로 발전할 낮은 위험을 예측한다.

[0016] 본 발명의 제2 목적은 대상체에서 췌관 선암을 치료하기 위한 요법의 효과를 모니터링하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0017] 본 발명의 제3 목적은 또한 췌관 선암으로 감염된 환자의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 βig-h3 길항근(antagonist)에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0018] **도 1. 종양 병소(neoplasic lesions) 중의 βig-h3의 주요 원천은 CAFs이다.**

A. 췌관 세포 및 CAFs의 단리 프로토콜. **B.** 췌관 및 CAFs 단리 구획에서의 βig-h3의 상대 발현(자가 보관 대조 유전자로서 TBP를 사용하는 실시간 정량 중합효소연쇄반응법(RT-qPCR)). **C.** TGF-β1으로 24 시간 동안 자극된 대조 생체 외 조건에서 CAF에 의한 βig-h3 생산. ** $P < 0.01$.

도 2. 종양의 미세 환경 중에서의 가용성 βig-h3 생산이 특이적인 $CD8^+$ T 세포 반응을 조절할 수 있다.

βig-h3는 직접적으로 $CD8^+$ T 세포 활성화를 조절한다. OT1 T 세포는 rβig-h3로 24시간 동안 전처리된 후 계속해서 2개의 서로 다른 농도(10 및 1 ng/㎖)로 OVA 펩티드를 첨가하는 것에 의하여 Ag-특이적 활성화되었다. 전처리 조건은 적색으로 표현하였다. 미처리 조건은 회색으로 표현하였다. A) 시험관 내 세포 배양의 98 시간 후 분할된 $CFSE^{low}$ OT1 세포의 정량 B) 시험관 내 세포 배양의 98 시간 후 OT1 세포의 총 수의 정량, B) 시험관 내 세포 배양 98 시간 후 활성화된 $CD69^+$OT1 세포의 정량 C) 시험관 내 세포 배양 98 시간 후 활성화된 $CD44^+$ OT1 세포의 정량. D) 시험관 내 세포 배양 98 시간 후 $CD69^+$OT1 세포의 총 수의 정량, E) 시험관 내 세포 배양 98 시간 후 CAF 세포 및 항-βig-h3 중화 Ab 또는 대조 Ab 세포의 존재/부재 중에서의 OT1의 수의 정량 F) 시험관 내 세포 배양의 98 시간 후 CAF 상청액의 존재/부재 중에서 그리고 항-βig-h3 중화 Ab 또는 대조 Ab 세포와의 OT1 세포의 수의 정량. G) 종양 세포주(KC)로의 배양 5 일 후 p48;Kras 마우스의 배수 림프절로부터의 항-종양 $CD8^+$ T 세포의 정량. 3개의 독립 실험들의 대표. * P < 0.05. ** $P < 0.01$

도 3. βig-h3 결핍이 생체 중(in vivo)에서의 T 세포 반응을 향상시킨다.

췌관-내 $CD8^+$ T 세포 (A), EPCAM(유관 종양 구획) (B) 및 αSMA(CAF 구획) (C). 3개의 독립 실험들의 대표 * P < 0.05. ** $P < 0.01$

도 4. βig-h3은 초기 종양 발달의 마커로서 사용될 수 있다.

A. 2월령에서의 WT 및 KC 마우스에서의 βig-h3의 양의 ELISA 결정. B) 20개체의 건강한 지원자 및 20개체의 PDAC 환자의 혈청 중의 βig-h3의 양의 ELISA 결정. * P < 0.05, *** < 0.001.

도 5. βig-h3은 T 세포의 표면 상의 CD61을 통하여 신호를 보낸다. (A) 비장 내 및 종양 내에서 $CD8^+$ T 세포에 대한 CD61 발현의 평균 형광 세기(MFI: Mean fluorescence intensity). (B) 24 시간 동안 βig-h3-처리 또는 미처리된 $CD8^+$ T 세포 중에서의 CD61 발현의 MFI. (C) pLck Y505로의 CD61의 공초점 콜로컬화(confocal colocalisation)를 Manders법에 따른 Zen 소프트웨어를 사용하여 산출하였다. 각 분자에 대하여 적어도 20개의 영상이 분석되었다. 결과는 3개의 독립 실험들의 대표이다. **** P < 0.0001.

도 6. CD8+ T 세포는 종양 성장에 대한 βig-h3 중화 효과를 위한 도구이다. (A) 실험 설정. (B) CD45의 백분율의 FACS 분석, (C) CD45+ 세포 중의 CD8+ T 세포의 백분율 (D) CD45- 세포 중의 EPCAM-의 백분율. (E) 실험 설정. (F) CD45- 세포 중의 EPCAM-의 백분율의 FACS 분석. 결과는 2개의 독립 실험들의 대표이다. * P < 0.05.

도 7. 잠재적 진단 마커로서의 가용성 βig-h3의 존재에 대한 혈액 은행으로부터의 49개체의 건강한 지원자 및 PDAC를 앓는 104개체의 환자의 혈청의 추가 집단. 혈청 중의 βig-h3의 양의 ELISA 결정 *** P < 0.001.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명자들은 PDAC 환자로부터의 βig-h3 혈청 수준 및 생물학적 발견점들 간의 상관관계를 조사하였다. 본 발명자들은 놀랍게도 다음과 같은 사실들을 발견하였다: 1) βig-h3 단백질이 마우스와 인간 모두에서 췌장 종양의 종양 기질 중의 암 연관 섬유아세포(CAF: cancer associated fibroblast)에 의해 고도로 생산된다; 2) βig-h3은 PDAC 환자뿐만 아니라 PDAC 소인의 마우스 모델에서의 췌장 종양 병소(PanIN1, PanIN2 및 PanIN3 단계)의 종양발생에서 극히 초기에 발현된다; 3) βig-h3은 췌장 종양 병소가 발달된 마우스의 혈청 중에서 분비되고 검출될 수 있다; 4) βig-h3은 이들의 활성화 및 세포독성 특성을 감소시킴에 의하여 $CD8^+$ T 세포에 대하여 직접적으로 작용한다; 5) βig-h3이 CD8+ T 세포의 표면에서 CD61과 상호작용한다; 6) PDAC 마우스 모델에서의 중화 βig-h3 항체의 사용이 $CD8^+$ T 세포 항-종양 반응을 향상시키는 것에 의하여 종양 성장을 감소시켰다; 7) CD8+ T 세포가 생체 중에서의 βig-h3 중화 효과에 필수적이다. 이러한 결과는 βig-h3이 항-종양 $CD8^+$T 세포 반응 차단에 기여한다는 것을 나타내고 있다. 중화 βig-h3은 새로운 면역학적 체크-포인트 표적으로 작용하고 따라서 췌장암에서 이로운 항-종양 면역력을 회복하도록 한다.

[0020] **본 발명에 따른 진단 방법:**

[0021] 본 발명의 제1 양태는 대상체로부터 수득되는 혈액 샘플 중의 βig-h3 단백질의 수준을 측정하는 단계를 포함하

고 여기에서 βig-h3의 수준이 췌관 선암을 앓는 상기 대상체의 위험에 양의 상관관계를 갖는, 대상체가 췌관 선암(PDAC)을 앓거나 이로 발전할 위험을 평가하는 방법으로 이루어진다.

[0022] βig-h3의 높은 수준은 췌관 선암을 앓거나 이로 발전할 높은 위험을 예측한다.

[0023] βig-h3의 낮은 수준은 췌관 선암을 앓거나 이로 발전할 낮은 위험을 예측한다.

[0024] 실제로, 본 발명자들은 놀랍게도 지금까지는 인간 내피 세포 또는 여러 종양 세포에 의해 발현되는 세포외 기질 단백질인 것으로 알려진 βig-h3가 혈액 중에 존재하는 순환 단백질(circulating protein)이라는 것을 입증하였다.

[0025] 하나의 구체예에 있어서, 본 발명에 따른 방법에서 사용되는 혈액 샘플은 전혈 샘플, 혈청 샘플 또는 혈장 샘플이다. 바람직한 구체예에 있어서, 혈액 샘플은 혈청 샘플(serum sample)이다.

[0026] 특정한 구체예에 있어서, 본 발명의 방법은, 초기 단계, 예를 들어 췌장 종양 병소(pancreatic neoplastic lesions)(IPMN (췌관-내 점액 종양), MCN(점액 낭포성 종양), PanIN1, PanIN2 및 PanIN3 단계)가 발생하는 경우,에서 대상체가 췌장 암종(PDAC)을 앓거나 이로 발전할 위험을 평가하는 데 적합하다. 여기에서 정의된 바와 같이 또한 "전환성장인자 β-유도 단백질" 또는 "TGFBIp" 또는 "TGFBi"로도 알려진 용어 "βig-h3" 또는 (βig-h3)은 인간에서 *TGFBI* 유전자에 의해 인코딩되는 인간 내피 세포 및 혈소판에 의해 발현되는 세포외 기질 단백질이다. 이 유전자는 I, II 및 IV형 콜라겐을 결합하는 RGD-함유 단백질을 인코딩한다. RGD 모티브는 세포 부착을 조절하는 많은 세포외 기질 단백질 중에서 발견되고 여러 인테그린에 대하여 리간드 인식 시퀀스로서 역할을 한다. 이 단백질은 세포-콜라겐 상호작용에서 역할을 하고 연골 중에서 연골 내 골형성에 연관될 수 있다. 단백질은 전환성장인자-β에 의해 유도되고 세포 부착을 억제하는 데 작용한다. 유전자의 돌연변이는 여러 형태의 각막 이상증을 야기한다(Munier et al 1997). 야생-형 βig-h3 인간 아미노산 시퀀스의 하나의 예가 서열 번호: 1(NCBI Reference Sequence: NP_000349)로 제공된다. 서열 번호:1의 야생-형 βig-h3 아미노산 시퀀스를 인코딩하는 뉴클레오티드 시퀀스의 하나의 예가 서열 번호: 2(NCBI Reference Sequence: NM_000358)로 제공된다.

[0027] 상기 정의된 방법의 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 생물학적 마커가 βig-h3와 함께 정량된다.

[0028] 여기에서 사용된 바와 같이, "생물학적 마커(biological marker)"는 특정한 유전자의 발현에 의하여 합성되고 따라서 유전자-특이적 mRNA, cDNA 및 단백질을 포함하는 임의의 검출가능한 생성물을 포함한다.

[0029] 여기에서 특정되는 다양한 생물학적 마커 이름은 이들의 상보성 DNA(cDNA) 및 게놈 DNA 시퀀스를 포함하여 이들의 완전 아미노산 및 핵산 시퀀스에 액세스하는 데 사용할 수 있는 국제적으로 인식된 두문자에 대응한다. 예시적으로, 본원에서 특정되는 생물학적 마커들 각각의 대응하는 아미노산 및 핵산 시퀀스들은 또한 여기에서 "유전자 기호(gene symbol)"인 이들의 두문자 명칭을 근거로 GenBank 또는 EMBL 시퀀스 데이터베이스에서 검색될 수 있다. 본 명세서 중에서 나열된 모든 유전자 기호는 GenBank 명명법에 대응한다. 이들의 DNA(cDNA 및 gDNA)와 마찬가지로 이들의 아미노산 시퀀스는 따라서 당해 기술분야에서 숙련된 자가 GenBank 데이터베이스로부터, 특히 하기 웹사이트 주소 "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/"에서 충분히 이용가능하다.

[0030] 물론 이러한 시퀀스의 기능적 호모로그(homologue), 파라로그(paralogue) 또는 오르토로그(orthologue)를 포함하나 이로 제한되지 않는 생물학적 마커의 변종 시퀀스가 본 발명의 문맥에서 채용될 수 있다.

[0031] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대상체"는 설치류, 고양이, 개, 영장류 등과 같은 포유동물을 의미한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 대상체는 인간이다.

[0032] 용어 "췌관 선암(pancreatic ductal adenocarcinoma)"은 전형적으로 미조절된 췌장 세포 성장으로 특징지어지는 포유동물에서의 병리학적 상태를 나타내거나 이를 개시한다. 특히, 췌관 선암(PDAC)은 외분비 구획에 영향을 주는 급속 진전으로 특징지어지는 악성 종양이다. PDAC는 풍부한 기질 반응과 연관되고, 이는 종양 용적의 90%까지 차지한다. 몇년전부터, 이러한 괴상 기질의 기여가 췌장 종양 개시 및 진전의 신규한 작용자(actor) 및 원인 제공자(contributor)로서 출현하였다.

[0033] βig-h3의 수준은 면역이력화학 또는 샌드위치형 분석 등과 같은 경쟁, 직접 반응 등과 같은 면역분석법을 포함하여 표준 전기영동 및 면역진단 기술을 사용하는 것에 의하여 결정될 수 있다. 이러한 분석은 웨스턴 블럿(Western blot); 응집반응 검사(agglutination test); ELISA 등과 같은 효소-표지 및 매개 면역 분석(enzyme-labelled and mediated immunoassay); 비오틴/아비딘 형 분석(biotin/avidin type assay); 방사면역분석(radioimmunoassay); 면역전기영동(immunoelectrophoresi); 면역침강(immunoprecipitation) 등을 포함하나, 이로 제한되지 않는다. 반응은 일반적으로 형광, 화학 발광, 방사성, 효소 표지 또는 염료 분자 등과 같은 표지를

드러내는 것 또는 항원과 항체 또는 이들과 반응하는 항체들 간의 착체의 형성을 검출하기 위한 다른 방법을 포함한다.

[0034] 예를 들어, βig-h3 수준의 결정은 당해 기술분야에서 잘 알려진 다양한 기술 및 방법: RIA kits(DiaSorin; IDS, Diasource) Elisa kits(Thermo Fisher, EHTGFBI, R&D DY2935, IDS(사용설명서) IDS(공개 분석기에 적용된) 면역화학발광 자동화 법(Immunochemiluminescent automated methods ; DiaSorin Liaison, Roche Elecsys family, IDS iSYS)(Janssen et al., 2012)에 의해 수행될 수 있다.

[0035] 특정한 구체예에 있어서, 본 발명의 방법은 혈액 샘플을 결합 파트너(binding partner)와 접촉시키는 것을 포함한다.

[0036] 그에 사용된 바와 같이, 결합 파트너는 βig-h3와 선택적으로 상호작용할 수 있는 분자를 의미한다.

[0037] 결합 파트너는 일반적으로 다클론(polyclonal) 또는 단클론(monoclonal), 바람직하게는 단클론일 수 있는 항체일 수 있다. βig-h3에 대하여 지시되는 다클론 항체는 적절한 항원 또는 에피토프를 예를 들어 다른 무엇들보다도 돼지, 소, 말, 토끼, 염소, 양 및 마우스로부터 선택되는 숙주 동물에 투여하는 것에 의하여 공지된 방법에 따라 얻어질 수 있다. 당해 기술분야에서 공지된 여러 보조제가 항체 생산을 향상시키는 데 사용될 수 있다. 비록 본 발명을 실행하는 데 유용한 항체가 다클론일 수 있으나, 단클론 항체가 바람직하다. βig-h3에 대한 단클론 항체는 연속적인 세포주 배양에 의하여 항체의 생산을 위하여 제공되는 임의의 기술을 사용하여 생산되고 단리될 수 있다. 생산 및 단리를 위한 기술은 본래 Kohler et al. Nature. 1975; 256(5517):495-7에 의해 개시된 하이브리도마 기술; 인간 B-세포 하이브리도마 기술(Cote et al Proc Natl Acad Sci U S A. 1983;80(7):2026-30); 및 EBV-하이브리도마 기술(Cole et al., 1985, in "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy," Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96)을 포함하나 이로 제한되지 않는다. 대신에, 단쇄 항체의 생산에 대하여 개시한 기술(예를 들어 U.S. Pat. No. 4,946,778를 참조)이 적용되어 항-βig-h3 단쇄 항체를 생산할 수 있다. 본 발명을 실시하는 데 유용한 항체는 또한 무손상 항체 분자의 펩신 소화에 의해 생성될 수 있는 F(ab')2 및 F(ab')2 단편의 이황화물 다리(disulfide bridge)를 환원하는 것에 의하여 생성될 수 있는 Fab 단편을 포함하나 이로 제한되지 않는 항-βig-h3을 포함한다. 달리, Fab 및/또는 scFv 발현 라이브러리를 구축하여 βig-h3에 대하여 소정의 특이성을 갖는 단편의 신속한 동정이 가능하도록 할 수 있다. 예를 들어, 항체의 파지 디스플레이가 사용될 수 있다. 이러한 방법에 있어서, 단쇄 Fv(scFv) 또는 Fab 단편은 적절한 박테리오파지, 예를 들어, M13의 표면에서 발현된다. 요약하면, 단백질로 면역화된 적절한 숙주, 예를 들어, 마우스의 비장 세포가 제거된다. 단백질에 대한 소정의 항체를 생산하는 세포로부터 수득되는 VL 및 VH쇄의 코딩 영역이 수득된다. 이러한 코딩 영역은 계속해서 파지 시퀀스의 말단에 융합된다. 일단 파지가 적절한 캐리어, 예를 들어, 박테리아 내로 삽입되면, 파지가 항체 단편을 전시(display)한다. 항체의 파지 디스플레이는 또한 당해 기술분야에서 숙련된 자에게 공지된 조합 방법(combinatorial method)에 의하여 제공될 수 있다. 파지에 의해 전시된 항체 단편은 계속해서 면역분석의 일부로서 사용될 수 있다.

[0038] 다른 구체예에 있어서, 결합 파트너는 압타머(aptamer)일 수 있다. 압타머는 분자 인식의 면에서 항체에 대한 대안을 대표하는 분자의 한 류이다. 압타머는 사실상 높은 친화성 및 특이성으로 임의의 류의 표적 분자를 인식할 능력을 갖는 올리고뉴클레오티드 또는 올리고펩티드 시퀀스이다. 이러한 리간드는 Tuerk et al. (1990) Science, 249, 505-510에서 개시된 바와 같이 랜덤 시퀀스 라이브러리의 Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment(SELEX)를 통하여 단리될 수 있다. 랜덤 시퀀스 라이브러리는 DNA의 조합 화학 합성에 의하여 수득가능하다. 이러한 라이브러리에 있어서, 각 구성원은 종국적으로 화학적으로 변성된 독특한 시퀀스의 선형 올리고머이다. 이러한 류의 분자의 가능한 변성, 용도 및 이점들이 Jayasena 1999에서 검토되었다. 펩티드 압타머는 2개의 하이브리드 법에 의하여 조합 라이브러리로부터 선택되는 대장균 티오레독신 A(*E. coli* Thioredoxin A) 등과 같은 플랫폼 단백질(platform protein)에 의하여 전시되는 형태적으로 속박된 항체 가변 영역으로 이루어진다(Colas et al. (1996) Nature, 380, 548-50).

[0039] 항체 또는 압타머 등과 같은 본 발명의 결합 파트너는 형광 분자, 방사성 분자 또는 당해 기술분야에서 공지된 임의의 다른 표지 등과 같은 검출가능한 분자 또는 물질로 표지될 수 있다. 일반적으로 신호를 제공(직접적으로 또는 간접적으로)하는 표지가 당해 기술분야에서 공지되어 있다.

[0040] 여기에서 사용된 바와 같이, 결합 파트너와 관련하여 용어 "표지된(labeled)"은 방사성 시약 또는 형광단(예를 들어 플루오레세인이소티오시안산염(FITC: fluorescein isothiocyanate) 또는 피코에리트린(PE: phycoerythrin) 또는 인도시아닌(Cy5: Indocyanine)) 등과 같은 검출가능한 물질의 항체 또는 압타머에의 결합(즉, 물리적으로 연결)에 의한 항체 또는 압타머의 직접적인 표지와 마찬가지로 검출가능한 물질에 대한 반응성

에 의한 프로브 또는 항체의 간접적인 표지를 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 항체 또는 압타머는 당해 기술분야에서 공지된 임의의 방법에 의하여 방사성 분자로 표지될 수 있다. 예를 들어 방사성 분자는 I123, I124, In111, Re186, Re188 등과 같은 섬광조영술 검사를 위한 방사성 원소를 포함하나 이로 제한되지 않는다.

[0041] 앞서 언급된 분석은 일반적으로 고체 지지체 중에서의 결합 파트너(즉, 항체 또는 압타머)의 결합을 포함한다. 본 발명의 실시에서 사용될 수 있는 고체 지지체는 니트로셀룰로오스(예를 들어, 막 중의 또는 미량적정웰(microtiter well) 형태); 폴리비닐클로라이드(예를 들어, 시트 또는 미량적정웰); 폴리스티렌 라텍스(예를 들어, 비드 또는 미량적정판(microtiter plate)); 폴리비닐리덴플루오라이드; 디아조화 종이(diazotized paper); 나일론 막; 활성화 비드, 자기 반응성 비드 등과 같은 서브스트레이트를 포함한다. 특히, ELISA법이 사용될 수 있으며, 여기에서 미량적정판의 웰이 βig-h3에 대한 한 세트의 항체로 코팅된다. 계속해서 βig-h3를 포함하거나 이로 의심되는 체액 샘플이 코팅된 웰에 첨가된다. 결합 파트너-βig-h3 착체가 형성되기에 충분한 기간의 배양 후, 판(들)이 세척되어 미결합된 물질이 제거되고 표지된 2차 결합 분자가 첨가된다. 2차 결합 분자는 임의의 포획된 샘플 마커 단백질과 반응되고, 판이 세척되고 2차 결합 분자의 존재가 당해 기술분야에서 충분히 공지된 방법을 사용하여 검출된다.

[0042] 결합 파트너로서, 2차 결합 분자가 표지될 수 있다.

[0043] 방사성면역분석법 또는 ELISA 등과 같은 서로 다른 면역분석법이 당해 기술분야에서 개시되었다.

[0044] 면역분석-기반 방법을 수반하거나 수반함이 없이 βig-h3의 수준을 측정하는 것은 또한 단백질의 분리: 단백질의 분자량에 기반하는 원심분리; 질량 및 하전에 기반하는 전기영동; 소수성에 기반하는 HPLC; 크기에 기반하는 크기배제 크로마토그래피; 및 사용되는 특정한 고상에 대한 단백질의 친화도에 기반하는 고상 친화도(solid-phase affinity)를 포함할 수 있다. 일단 분리되면, βig-h3은 공지된 "분리 프로파일(separation profile)" 예를 들어 단백질에 대한 체류 시간에 기반하여 동정되고 표준 기술을 사용하여 측정될 수 있다. 달리, 분리된 단백질은 예를 들어 질량 분광분석기로 검출되고 측정될 수 있다.

[0045] 바람직한 구체예에 있어서, βig-h3의 수준을 측정하기 위한 방법은 βig-h3와 선택적으로 상호작용하여 결합 파트너-βig-h3 착체를 형성할 수 있는 결합 파트너와 혈액 샘플을 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0046] 보다 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명에 따른 방법은 혈액 샘플의 임의의 미결합된 물질을 결합 파트너-βig-h3 착체로부터 분리하는 단계, 결합 파트너-βig-h3 착체를 표지된 2차 결합 분자와 접촉시키는 단계, 2차 결합 분자-βig-h3 착체로부터 임의의 미결합된 2차 결합 분자를 분리하는 단계 및 2차 결합 분자-βig-h3 착체의 2차 결합 분자의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0047] 전형적으로, βig-h3의 높거나 낮은 수준은 대조 참조값과의 비교로 의도된다.

[0048] 상기 대조 참조값(reference control values)은 하나 이상의 건강한 대상체로부터 취하여진 혈액 샘플 중에 존재하는 βig-h3의 수준에 대하여 또는 대조 개체군 중의 βig-h3 분포에 대하여 결정될 수 있다.

[0049] 하나의 구체예에 있어서, 본 발명에 따른 방법은 상기 βig-h3의 수준을 대조 참조값과 비교하는 단계를 포함하며 여기에서 상기 대조 참조값에 비하여 높은 수준의 βig-h3는 췌관 선암을 앓거나 이로 발전할 높은 위험을 예측하고 상기 대조 참조값에 비하여 낮은 수준의 βig-h3는 췌관 선암을 앓거나 이로 발전할 낮은 위험을 예측한다.

[0050] 대조 참조값은 βig-h3의 수준을 측정하는 데 사용된 방법 또는 대상체의 성별 등과 같은 여러 매개변수들에 의존적일 수 있다.

[0051] 전형적으로, 인간 βig-h3에 대하여 얻어진 다클론 항체에 대한 경쟁적 면역분석을 사용하여 측정된 혈청 샘플 중의 βig-h3의 수준에 대하여는, 5 ㎍/㎖ 초과의 βig-h3의 수준은 췌관 선암을 앓을 높은 위험을 예측하고 5 ㎍/㎖ 미만의 βig-h3의 수준은 췌관 선암을 앓을 낮은 위험을 예측한다.

[0052] 대조 참조값은 당해 기술분야에서 숙련된 자에 의하여 앞서의 시험 하의 환자로부터 수집된 혈액 샘플 중의 βig-h3의 수준을 결정하기 위한 것과 동일한 기술을 사용하는 것에 의하여 용이하게 결정가능하다.

[0053] "대조 참조값(control reference value)"은 "문턱값(threshold value)" 또는 "차단값(cut- off value)"일 수 있다. 전형적으로, "문턱값" 또는 "차단값"은 실험적으로, 경험적으로 또는 이론적으로 결정될 수 있다. 문턱값은 또한 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 인식될 수 있는 바와 같은 현존하는 실험 및/또는 임상적인 조건들에 기반하여 임의로 선택될 수 있다. 문턱값은 시험의 기능에 따른 최적의 민감도 및 특이성 그리

고 유익성/위해성 균형(위양성과 위음성의 임상적 결과)을 수득하기 위하여 결정되어야 한다. 전형적으로, 최적의 민감도 및 특이성(및 그에 따른 문턱값)은 실험 데이터에 기반하는 Receiver Operating Characteristic (ROC) 곡선을 사용하여 결정될 수 있다. 바람직하게는, 당해 기술분야에서 숙련된 자는 βig-h3 수준(본 발명에 따라 수득된)을 정의된 문턱값과 비교할 수 있다. 본 발명의 하나의 구체예에 있어서, 문턱값은 췌관 선암 치료에 대한 응답하는 하나 이상의 대상체로부터 파생되는 혈액 샘플 중에서 결정된 βig-h3 수준(또는 비율 또는 점수)으로부터 파생된다. 본 발명의 하나의 구체예에 있어서, 문턱값은 또한 췌관 선암으로 영향을 받지 않은 하나 이상의 대상체로부터 파생되는 혈액 샘플 중에서 결정된 βig-h3 수준(또는 비율 또는 점수)으로부터 파생될 수 있다. 더욱이, 적절히 배열된 역사적 대상체 샘플 중의 βig-h3 수준(또는 비율 또는 점수)의 소급법이 이러한 문턱값을 수립하는 데 사용될 수 있다.

[0054] 본 발명의 문맥에서 "위험(Risk)"은 췌관 선암(PDAC)로의 전환에서와 같이 어떤 사건이 특정한 기간에 걸쳐 발생할 수 있는 가능성과 연관되며, 대상체의 "절대적" 위험 또는 "상대적" 위험을 의미할 수 있다. 절대적 위험은 연관 시간 집단에 대한 실제 관측 후-측정에 관하여 또는 연관 기간에 후속되는 통계학적으로 유효한 역사적 집단으로서 발달된 지표값(index value)에 관하여 측정될 수 있다. 상대적 위험은 낮은 위험 집단의 절대적 위험 또는 평균 개체군 위험에 대한 대상체의 절대적 위험의 비율을 의미하며, 이는 어떻게 임상적인 위험 인자가 평가되는 지에 의하여 변할 수 있다. 주어진 시험 결과에 대한 부정적인 사건(negative event)에 대한 긍정적인 사건(positive event)의 비율인 오즈비(odds ratios)가 무전환(no conversion)에 통상적으로 사용된다(오즈(odds)는 식 p/(1-p)에 따르며 여기에서 p는 사건의 가능성이고 (1-p)는 무사건의 가능성이다). 본 발명의 문맥에서 평가될 수 있는 대안의 연속적인 측정은 AMC에 대한 시간 및/또는 선천성 말초신경병 전환 및 치료학적 AMC 및/또는 선천성 말초신경병 전환 위험 감소 비율을 포함한다.

[0055] 본 발명의 문맥에서 "위험 평가(Risk evaluation)" 또는 "위험의 평가(evaluation of risk)"는 사건 또는 질환 상태가 발생할 가능성(probability), 오즈(odds) 또는 공산(likelihood), 사건의 발생 또는 하나의 질환 상태에서 다른 질환 상태 즉, 정상 상태로부터 PDAC 상태로 또는 PDAC로 발전할 위험에 있는 상태로의 전환의 예측을 이루는 것을 포함한다. 위험 평가는 또한 앞서 측정된 개체군을 참조하여 절대적이거나 상대적인 개념으로의 말초 조직, 혈청 또는 다른 유체 중의 새포 개체군 결정 등과 같은 장래의 임상적 매개변수, 전통적인 실험실 위험 인자 값 또는 PDAC의 다른 지수의 예측을 포함할 수 있다. 본 발명의 방법은 PDAC로의 전환의 위험의 연속적이거나 분류적인 측정을 하고, 따라서 PDAC에 대한 위험에 있는 것으로 정의된 대상체의 카테고리의 위험 스펙트럼을 진단하고 정의할 수 있다. 분류적인 시나리오에 있어서는, 본 발명은 정상 및 PADC에 대하여 보다 높은 위험에 있는 다른 대상체 집단 간을 식별하는 데 사용될 수 있다. 다른 구체예에 있어서, 본 발명은 정상으로부터 PDAC를 앓는 것들을 식별하는 데 도움을 주도록 사용될 수 있다.

[0056] 본 발명은 또한 특히 초기 단계에서 PDAC의 혈액 바이오 마커로서의 βig-h3의 용도와 관련된다. 본 발명에 따르면, PDAC의 초기 단계는 예를 들어 췌장 종양 병소가 발생하는 때(PanIN1, PanIN2 및 PanIN3 단계)를 의미한다.

[0057] *항-췌장암 치료의 모니터링*

[0058] 본 발명의 하나 이상의 조직-특이적 생물학적 마커의 발현의 수준에 대한 시약(예를 들어, 약물 성분)의 영향을 모니터링하는 것은, 시간에 대한 환자의 치료된 췌관 선암의 악성 강도(malignant potency)를 모니터링하기 위하여 적용될 수 있다. 예를 들어, βig-h3 발현에 영향을 주는 시약의 효능은 항암제를 수령하는 대상체의 치료, 특히 화학요법 치료 동안 모니터링될 수 있다.

[0059] 따라서, 본 발명의 제2 목적은, 또한, 대상체에서 췌관 선암을 치료하기 위한 요법의 효과를 모니터링하기 위한 방법으로, 상기 방법에 t1에서 대상체로부터 수득되는 제1 혈액 샘플 중의 βig-h3의 수준을 측정하고 t2에서 상기 대상체로부터 수득되는 제2 혈액 샘플 중의 βig-h3의 수준을 측정하는 단계를 포함하고, 이 때, t1이 요법(therapy) 이전인 경우, t2는 요법 동안 또는 그 이후이고, t1이 요법 동안인 경우, t2는 이후 요법 동안 또는 요법 이후이며, 제1 샘플 중의 βig-h3의 수준에 비한 제2 샘플 중의 βig-h3의 수준의 감소는 치료된 대상체에서의 췌관 선암에 대한 요법의 긍정적인 효과를 의미하는 것인(indicative)방법에 관한 것이다.

[0060] 다른 구체예에 있어서, 본 발명은 (i) 시약의 투여 이전에 대상체로부터 투여-전 혈액 샘플을 수득하는 단계; (ii) βig-h3 혈액 수준을 검출하는 단계; (iii) 대상체로부터 하나 이상의 투여-후 샘플을 수득하는 단계; (iv) 투여-후 샘플 중의 βig-h3 혈액 수준을 검출하는 단계; (v) 투여-전 샘플 중의 βig-h3 수준과 투여-후 샘플 또는 샘플들 중의 발현의 수준을 비교하는 단계; 및 (vi) 따라서 대상체에의 시약의 투여를 교체하는 단계를 포함하는, 시약(예를 들어, 작용제, 길항제, 펩티드 모방체(peptidomimetic), 단백질, 펩티드, 핵산, 소분자

또는 다른 약물 후보)으로의 대상체의 치료의 유효성을 모니터링하기 위한 방법을 제공한다. 예를 들어, 치료의 과정 동안의 증가된 βig-h3 혈액 수준은, 효과적이지 못한 투여량 및 투여량의 증가가 바람직함을 나타내거나 치료를 변화시킬 필요성을 나타낼 수 있다. 역으로, 감소된 βig-h3 혈액 수준은 유효한 치료임을, 및 투여량을 변화시킬 필요가 없음을 의미하는 것일 수 있다.

[0061] 특정한 구체예에 있어서, 췌관 선암을 치료하기 위한 요법은 화학요법 치료 및/또는 βig-h3 길항제로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0062] 상기 개시된 모니터링 방법을 실행하기 위해 암-보유 환자로부터의 생물학적 샘플의 반복되는 수집이 필요하기 때문에, 바람직한 생물학적 샘플은 (i) 환자의 췌관 선암 조직으로부터 유래하는 세포, 또는 (ii) 핵산 및 단백질을 포함하여 환자 췌관 선암 조직으로부터 유래하는 세포로 합성되는 특이적인 마커 발현 생성물을 포함하기 쉬운(susceptible) 혈액 샘플이다.

[0063] *치료 방법 및 용도:*

[0064] 본 발명은 췌관 선암을 예방하거나 치료하기 위한 방법 및 조성물(약제학적 조성물 등과 같은)을 제공한다. 본 발명은 또한 췌관 선암을 억제하거나 예방하는 방법 및 조성물을 제공한다.

[0065] 본 발명의 문맥에 있어서, 용어 "치료(treatment) 또는 예방(prevention)"은 이러한 용어가 적용되는 장애 또는 상태 또는 이러한 장애 또는 상태의 하나 이상의 증후군의 진전을 역전하거나 완화하거나 억제하거나 또는 이를 방지하는 것을 의미한다. 특히, 장애의 치료는 악성 세포의 수를 감소시키는 것으로 이루어질 수 있다. 보다 바람직하게는, 이러한 치료는 악성 세포의 완전한 결핍을 야기한다.

[0066] 바람직하게는, 치료되어야 하는 개체는 암으로 영향을 받거나 영향을 받을 것 같은 인간 또는 비-인간 포유동물(설치류(마우스, 랫트), 고양이, 개 또는 영장류 등과 같은)이다. 바람직하게는, 개체는 인간이다.

[0067] 제1 양태에 따르면, 본 발명은 췌관 선암으로 영향을 받은 환자의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 βig-h3 길항제(antagonist)에 관한 것이다.

[0068] "βig-h3 길항제"는 예를 들어 βig-h3와 αvβ3 인테그린 간의 상호작용을 감소 또는 차단하는 것을 포함하여 βig-h3의 활성을 중화하거나, 차단하거나, 억제하거나, 폐지하거나, 감소시키거나 이에 간섭할 수 있는 분자(천연 또는 합성)를 의미한다. βig-h3 길항제는 항체 및 그의 항원-결합 단편, 단백질, 펩티드, 당단백질, 당펩티드, 당지질, 다당류, 올리고당류, 핵산, 생유기 분자(bioorganic molecule), 펩티드 모방체, 약리학적 시약 및 이들의 대사 산물, 전사 및 번역 조절 시퀀스 등을 포함한다. 길항제는 또한 단백질의 길항제 변이형, 단백질로 지시되는 siRNA 분자, 단백질로 지시되는 안티센스 분자, 압타머 및 단백질에 대한 리보자임을 포함한다. 예를 들어, βig-h3 길항제는 βig-h3에 결합하고 βig-h3의 생물학적 활성(종양 세포 성장을 유도하는 것과 같은)을 중화하거나, 차단하거나, 억제하거나, 폐지하거나, 감소시키거나 이에 간섭하는 분자일 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 βig-h3 길항제는 항-βig-h3 항체이다.

[0069] βig-h3의 "생물학적 활성(biological activity)"에 대해서는, 종양 세포 성장을 유도하고 $CD8^+$ T 세포 활성화(항-종양 반응을 차단)를 억제하는 것을 의미한다.

[0070] βig-h3 길항제가 될 화합물의 능력을 결정하기 위한 시험은 당해 기술분야에서 숙련된 자에게는 충분히 공지되어 있다. 바람직한 구체예에 있어서, 길항제는 βig-h3의 생물학적 활성을 억제하기에 충분한 방법으로 βig-h3에 특이적으로 결합한다. βig-h3에의 결합 및 βig-h3의 생물학적 활성의 억제는 당해 기술분야에서 충분히 공지된 임의의 경쟁적 분석에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 분석은 βig-h3 길항제로서 시험되어야 할 시약의 βig-h3에의 결합의 능력을 결정하는 것으로 이루어질 수 있다. 결합 능력은 Kd 측정으로 반영된다. 여기에서 사용되는 바와 같은 용어 "KD"는 해리 상수를 의미하는 것으로 의도되며, 이는 Ka에 대한 Kd의 비율(즉 Kd/Ka)로부터 수득되고 몰 농도(M)로 표현된다. 결합 생체분자에 대한 KD값은 당해 기술분야에서 잘 구축된 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 특정한 구체예에 있어서, "βig-h3에 특이적으로 결합하는" 길항제는 1 μM 또는 그 미만, 100 nM 또는 그 미만, 10 nM 또는 그 미만 또는 3 nM 또는 그 미만의 KD로 인간 βig-h3 폴리펩티드에 결합하는 억제제를 의미하는 것으로 의도된다. 따라서 경쟁적 분석은 βig-h3의 생물학적 활성을 억제하는 시약의 능력을 결정지을 수 있다. 기능적 분석은 a) 종양 세포 성장의 유도 및/또는 b) $CD8^+$ T 세포 활성화를 억제하는 능력을 평가하는 것과 같이 구현될 수 있다 (예를 들어 βig-h3 항체를 차단하는 것에 대한 실시예 및 도 2 및 도 3을 참조).

[0071] 당해 기술분야에서 숙련된 자는 βig-h3 길항제가 βig-h3의 생물학적 활성을 중화하거나, 차단하거나, 억제하거나, 폐지하거나, 감소시키거나 이에 간섭하는 지의 여부를 용이하게 결정할 수 있다. 초기에 특정된 βig-h3 항체를 차단하고/하거나 결합 분석 및/또는 세포 증식 분석 및/또는 CD8+ T 세포 활성화를 억제하는 분석에 비하여 βig-h3 길항제가 βig-h3에 결합하고/하거나 종양 세포 성장을 억제할 수 있고/있거나 동일한 방법으로 $CD8^+$ T 세포를 억제할 수 있는 지의 여부를 체크하는 것이 각 길항제에 대하여 수행될 수 있다. 예를 들어 $CD8^+$ T 세포 활성화를 억제하는 것은 실시예 영역(도 2)에서 개시된 바와 같이 항체 항-CD69 및 항-CD44($CD8^+$ T 세포)로 활성화 마커를 발현하는 세포를 검출하는 것에 의하여 평가될 수 있고 세포 증식 분석은 CFSE-증식 분석으로 측정될 수 있다.

[0072] 따라서, βig-h3 길항제는 항체, 압타머, 및 폴리펩티드로 이루어지는 군으로부터 선택되는 βig-h3에 결합하는 분자일 수 있다.

[0073] 당해 기술분야에서 숙련된 자는 βig-h3 길항제가 βig-h3의 생물학적 활성: (i) βig-h3에 결합하고/하거나 (ii) 종양 세포 성장을 유도하고/하거나 (iii) CD8+ T 세포 활성화를 억제하는 것을 중화하거나, 차단하거나, 억제하거나, 폐지하거나, 감소시키거나 이에 간섭하는 지의 여부를 용이하게 측정할 수 있다.

[0074] 따라서, 특정한 구체예에 있어서, βig-h3 길항제는, 직접적으로 βig-h3에 결합하고 CD8+ T 세포 활성화의 억제(또는 CD8+ T 세포 활성화를 회복)를 억제한다.

[0075] 본 발명은 또한 암에 영향을 받은 환자의 항-종양 CD8+T 세포 반응을 활성화시키기기 위한 방법에서의 사용을 위한 βig-h3 길항제에 관한 것이다.

[0076] 용어 "암(cancer)" 및 "종양(tumors)"은 전형적으로 미조절된 세포 성장으로 특징지어지는 포유동물에서의 병리학적 상태를 의미하거나 이를 개시한다. 보다 엄밀히는, 본 발명의 사용에 있어서, βig-h3을 발현/분비하는 질환, 즉 종양이 CD8+ T 세포 활성화의 회복 이후 βig-h3 길항제에 대하여 가장 반응할 개연성이 있다. 특히, 암은 고형암 또는 림프종/백혈병(조혈 세포로부터의)과 연관될 수 있다. 고형암 형성과 연관되는 암의 예는 유방암, 자궁경부암, 식도암, 췌장암, 결장암, 대장암, 신장암, 난소암, 전립선암, 두경부암, 비소세포폐암 위암, 간엽 유래의 종양(즉; 섬유육종 및 횡문근종육종) 중추 및 말초신경계의 종양(즉; 성상세포종, 신경모세포종, 신경교종, 아교모세포종을 포함하여) 갑상선암을 포함한다.

[0077] 바람직하게는 고형암은 췌장암 식도편평세포암종(Ozawa et al, 2014), 위 및 간암종(Han et al, 2015), 결장암(Ma et al, 2008), 흑색종(Lauden et al, 2014)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0078] 보다 바람직하게는 췌장암은 췌관 선암이다.

[0079] 용어 "항-종양 CD8+T 세포 반응"은 암세포를 용해하는 CD8+T 세포의 자연적인 능력을 의미한다(Robbins and Kawakami, 1996, Romero, 1996)

[0080] · **항체**

[0081] 다른 구체예에 있어서, βig-h3 길항제는 βig-h3와 αVβ3 인테그린과의 상호작용을 차단할 수 있는 항체(용어는 항체 단편 또는 단백질을 포함)이다.

[0082] 바람직한 구체예에 있어서, βig-h3 길항제는 상기 항체가 αVβ3 인테그린에 대한 βig-h3의 결합을 손상("항체를 중화")시키는 것과 같은 방법으로 βig-h3에 대하여 지시되는 항체로 이루어질 수 있다.

[0083] 따라서, 본 발명에 대하여, βig-h3의 중화 항체는 (i) βig-h3에 결합하고/하거나 (ii) 종양 세포 성장을 억제하고/하거나 (iii) CD8+ T 세포 활성화를 억제하는 이들의 능력에 대하여 상기 개시된 바와 같이 선택된다.

[0084] 여기에서 개시된 항체 또는 그의 부분의 하나의 구체예에 있어서, 항체는 단클론 항체이다. 여기에서 개시된 항체 또는 그의 부분의 하나의 구체예에 있어서, 항체는 다클론 항체이다. 여기에서 개시된 항체 또는 그의 부분의 하나의 구체예에 있어서, 항체는 인간화된 항체이다. 여기에서 개시된 항체 또는 그의 부분의 하나의 구체예에 있어서, 항체는 키메라 항체이다. 여기에서 개시된 항체 또는 그의 부분의 하나의 구체예에 있어서, 항체의 부분은 항체의 경쇄를 포함한다. 여기에서 개시된 항체 또는 그의 부분의 하나의 구체예에 있어서, 항체의 부분은 항체의 중쇄를 포함한다. 여기에서 개시된 항체 또는 그의 부분의 하나의 구체예에 있어서, 항체의 부분은 항체의 Fab 부분을 포함한다. 여기에서 개시된 항체 또는 그의 부분의 하나의 구체예에 있어서, 항체의 부분은 항체의 F(ab')2 부분을 포함한다. 여기에서 개시된 항체 또는 그의 부분의 하나의 구체예에 있어서, 항체의 부

분은 항체의 Fc 부분을 포함한다. 여기에서 개시된 항체 또는 그의 부분의 하나의 구체예에 있어서, 항체의 부분은 항체의 Fv 부분을 포함한다. 여기에서 개시된 항체 또는 그의 부분의 하나의 구체예에 있어서, 항체의 부분은 항체의 가변 영역을 포함한다. 여기에서 개시된 항체 또는 그의 부분의 하나의 구체예에 있어서, 항체의 부분은 항체의 하나 이상의 CDR 영역을 포함한다.

[0085] 여기에서 사용되는 바와 같이, "항체"는 자연적으로 발생하는 그리고 비-자연적으로 발생하는 항체 둘 다를 포함한다. 특히, "항체"는 다클론 및 단클론 항체들 및 그의 1가 및 2가 단편들을 포함한다. 더욱이, "항체"는 키메라 항체, 전합성 항체(wholly synthetic antibody), 단쇄 항체 및 이들의 단편들을 포함한다. 항체는 인간 또는 비인간 항체일 수 있다. 비인간 항체는 재조합법에 의해 인간화되어 사람에서의 그의 면역원성을 감소시킬 수 있다.

[0086] 항체는 통상적인 방법론에 따라 제조된다. 단클론 항체는 Kohler and Milstein의 방법을 사용하여 생성될 수 있다(Nature, 256:495, 1975). 본 발명에서 유용한 단클론 항체를 제조하기 위하여, 마우스 또는 다른 숙주 동물이 적절한 간격(예를 들어, 2주마다, 주마다, 2개월마다 또는 1개월마다) 항원 형태의 βig-h3으로 면역화된다. 희생 1주 이내에 항원의 최종 "부스트(boost)"가 동물에 투여될 수 있다. 면역화 동안 항원보강제(immunologic adjuvant)를 사용하는 것이 종종 바람직하다. 적절한 항원보강제는 프로인드 완전 보조제(Freund's complete adjuvant), 프로인드 불완전 보조제(Freund's incomplete adjuvant), 명반, 리비 보조제(Ribi adjuvant), Hunter's Titermax, QS21 또는 Quil A 등과 같은 사포닌 보조제 또는 CpG-함유 면역자극 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 다른 적절한 보조제가 이 기술분야에서 충분히 공지되어 있다. 동물은 피하, 복강내, 근육내, 정맥내, 비강내 또는 다른 경로로 면역화될 수 있다. 주어진 동물은 다중의 경로로 복수 형태의 항원으로 면역화될 수 있다.

[0087] 요약하면, 재조합 βig-h3이 재조합 세포주로의 발현에 의하여 제공될 수 있다. 재조합 형태의 βig-h3이 임의의 앞서 개시된 방법을 사용하여 제공될 수 있다. 면역화 요법에 후속하여, 림프구가 동물의 비장, 림프절 또는 다른 기관으로부터 단리되고 폴리에틸렌글리콜 등과 같은 시약을 사용하여 적절한 골수종 세포주와 융합되어 하이브리도마를 형성한다. 융합에 후속하여, 개시된 바와 같은 표준 방법을 사용하여 융합 파트너가 아닌 하이브리도마의 성장을 허용하는 매질 중에 위치된다(Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 3rd edition, Academic Press, New York, 1996). 하이브리도마의 배양에 후속하여, 소정의 특이성 즉, 항원을 선택적으로 결합하는 항체의 존재에 대하여 세포 상청액이 분석된다. 적절한 분석 기술은 ELISA, 유세포 분석, 면역침강 및 웨스턴 블럿을 포함한다. 다른 스크리닝 기술이 이 기술분야에서 충분히 공지되어 있다. 미-변성 효소결합면역흡착측정법(non-denaturing ELISA), 유세포 분석 및 면역침강 등과 같이 형태적으로 무손상이고, 자연적으로 중첩된 항원에의 결합을 확증하는 기술이 바람직한 기술이다.

[0088] 유의미하게, 당해 기술분야에서 충분히 공지된 바와 같이, 단지 항체 분자의 작은 부분인 파라토프(paratope)가 항체의 바인딩(binding) 내에서 그의 에피토프(epitope)에 참여한다(일반적으로, Clark, W. R. (1986) *The Experimental Foundations of Modern Immunology* Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) *Essential Immunology,* 7th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford을 참조). 예를 들어, Fc' 및 Fc는 보체 연쇄반응(complement cascade)의 효과기이나 항원 결합에는 참여하지 않는다. 그로부터 pFc' 영역이 효소적으로 개열되거나 pFc' 영역을 수반하지 않고 생성된, F(ab')2 단편으로 지칭되는 항체가 무손상 항체의 두 항원 결합 자리 모두를 유지한다. 유사하게, 그로부터 Fc 영역이 효소적으로 개열되거나 Fc 영역을 수반하지 않고 생성된, Fab 단편으로 지칭되는 항체가 무손상 항체 분자의 항원 결합 자리들 중의 하나를 유지한다. 더욱 진행하면, Fab 단편은 공유적으로 결합된 항체 경쇄 및 Fd로 지칭되는 항체 중쇄의 부분으로 이루어진다. Fd 단편은 항체 특이성의 주요 결정이고(단일 Fd 단편은 항체 특이성을 변경함이 없이 10개 이하의 서로 다른 경쇄와 연관될 수 있음) Fd 단편은 에피토프-결합능을 별개로 보유한다.

[0089] 항체의 항원-결합 부분 내에서, 당해 기술분야에서 충분히 공지된 바와 같이, 항원의 에피토프와 직접적으로 상호작용하는 상보성 결정 영역(CDR) 및 파라토프의 3차 구조를 유지하는 프레임워크 영역(FR)이 존재한다(일반적으로, Clark, 1986; Roitt, 1991을 참조). IgG 면역글로블린의 중쇄 Fd 단편 및 경쇄 둘 다에서, 3개의 상보성 결정 영역(CDR1 내지 CDR3)로 개별적으로 분리되는 4개의 프레임워크 영역(FR1 내지 FR4)이 존재한다. CDR들, 특히 CDR 영역들 그리고 더욱 특히 중쇄 CDR들이 항체 특이성에 크게 기여한다.

[0090] 포유류 항체의 비 CDR 영역들이 공특이적이거나 이종특이적인 항체들의 유사한 영역들로 치환되는 한편으로 원래 항체의 에피토프 특이성을 보유할 수 있다는 것이 이제 당해 기술분야에서 충분히 구축되어 있다. 이는 비-

인간 CDR이 인간 FR 및/또는 Fc/pFc' 영역에 공유적으로 결합되어 기능성 항체를 생성하는 "인간화된" 항체의 개발 및 사용에서 가장 명백하게 나타난다.

[0091] 본 발명은 특정한 구체예에서 인간화된 형태의 항체를 포함하는 조성물 및 방법을 제공한다. 여기에서 사용되는 바와 같이, "인간화된(humanized)"은 CDR 영역 외측의 아미노산의 일부, 대부분 또는 전부가 인간 면역글로블린 분자로부터 파생되는 대응하는 아미노산으로 대체되는 항체를 개시한다. 인간화의 방법은 여기에 참조로 포함되는 미국 특허 제4,816,567호, 제5,225,539호, 제5,585,089호, 제5,693,761호, 제5,693,762호 및 제5,859,205호에서 개시된 방법들을 포함하나 이로 제한되지 않는다. 상기 미국 특허 제5,585,089호 및 제5,693,761호 그리고 국제공개특허 제WO 90/07861호가 또한 인간화된 항체를 디자인하는 데 사용될 수 있는 4가지 가능한 표준을 제안한다. 제1 제안은 수용체에 대하여, 인간화되어야 할 공여체 면역글로블린에 비정상적으로 동종인 특정한 인간 면역글로블린을 사용하는 것 또는 다수의 인간 항체로부터의 합치 프레임워크(consensus framework)를 사용하는 것이다. 제2 제안은 인간 면역글로블린의 프레임워크 중의 아미노산이 비정상적이고 그 포지션에서의 공여체 아미노산이 인간 시퀀스들에 대하여 전형적인 것인 경우, 수용체 보다는 오히려 공여체 아미노산이 선택될 수 있다는 것이다. 제3 제안은 인간화된 면역글로블린쇄 중의 3개의 CDR들에 바로 인접한 포지션들에서 수용체 아미노산 보다는 오히려 공여체 아미노산이 선택될 수 있다는 것이다. 제4 제안은 아미노산이 항체의 3차원 모델 내의 CDR들의 3A 내에 측쇄 원자를 갖는 것으로 기대되고 CDR들과 상호작용할 수 있는 것으로 기대되는 프레임워크 포지션들에 존재하는 공여체 아미노산을 사용하는 것이다. 상기 방법들은 단지 당해 기술분야에서 숙련된 자가 인간화된 항체를 만들기 위하여 채용할 수 있는 방법들 중의 일부를 설명하는 것이다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 항체 인간화에 대한 다른 방법들에 친숙할 것이다.

[0092] 항체들의 인간화된 형태들의 하나의 구체예에 있어서, CDR 영역들의 외측의 아미노산의 일부, 대부분 또는 전부가 인간 면역글로블린 분자로부터의 아미노산으로 대체되나 여기에서 하나 이상의 CDR 영역들 내의 아미노산의 일부, 대부분 또는 전부는 바뀌지 않는다. 주어진 항원에 결합하는 항체의 능력을 폐지하지 않는 한 아미노산의 작은 첨가, 결실, 삽입, 치환 또는 변경이 허용된다. 적절한 인간 면역글로블린 분자는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgM 분자를 포함할 수 있다. "인간화된" 항체는 원래의 항체와 유사한 항원 특이성을 보유한다. 그러나, 특정한 인간화의 방법들을 사용하여, 그의 내용이 여기에 참조로 포함되는 Wu et al., /. *Mol. Biol.* 294:151, 1999에 의해 개시된 바와 같은 "유도 진화(directed evolution)"의 방법을 사용하여 항체의 결합의 친화도 및/또는 특이성이 증가될 수 있다.

[0093] 완전 인간 단클론 항체는 또한 인간 면역글로블린 중쇄 및 경쇄 장소들의 대부분에 대하여 형질전환 마우스를 면역화하는 것에 의하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 그의 내용이 여기에 참조로 포함되는 미국 특허 제5,591,669호, 제5,598,369호, 제5,545,806호, 제5,545,807호, 제6,150,584호 및 그 안에 언급된 참조문헌들을 참조하시오. 이들 동물들은 내인성(예를 들어, 쥣과(murine)) 항체의 생산에서의 기능적 결실이 존재하도록 유전자 변형되었다. 동물들은 추가로 이러한 동물들의 면역화가 대상의 항원에 대한 완전 인간 항체의 제조의 결과를 가져오도록 인간 생식-계열 면역글로블린 유전자 장소의 전부 또는 일부를 포함하도록 변성된다. 이들 마우스들(예를 들어, XenoMouse(Abgenix), HuMAb 마우스(Medarex/GenPharm))의 면역화에 후속하여, 단클론 항체가 표준 하이브리도마 기술에 따라 제조될 수 있다. 이들 단클론 항체들은 인간 면역글로블린 아미노산 시퀀스를 가질 수 있고 따라서 인간에 투여될 때 인간 항-마우스 항체(KAMA) 반응을 유발하지 않을 수 있다.

[0094] 인간 항체를 제조하기 위한 시험관 내 방법들이 또한 존재한다. 이들은 파지 디스플레이 기술(미국 특허 제5,565,332호 및 제5,573,905호) 및 인간 B 세포의 시험관 내 자극(미국 특허 제5,229,275호 및 제5,567,610호)을 포함한다. 이들 특허들의 내용들이 여기에 참조로 포함된다.

[0095] 따라서, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 수 있는 바와 같이, 본 발명은 또한 F(ab')2 Fab, Fv 및 Fd 단편들; Fc 및/또는 FR 및/또는 CDR1 및/또는 CDR2 및/또는 경쇄 CDR3 영역들이 상동 인간 또는 비-인간 시퀀스들로 대체된 키메라 항체들; FR 및/또는 CDR1 및/또는 CDR2 및/또는 경쇄 CDR3 영역들이 상동 인간 또는 비-인간 시퀀스들로 대체된 키메라 F(ab')2 단편 항체들; FR 및/또는 CDR1 및/또는 CDR2 및/또는 경쇄 CDR3 영역들이 상동 인간 또는 비-인간 시퀀스들로 대체된 키메라 Fab 단편 항체들; 및 FR 및/또는 CDR1 및/또는 CDR2 영역들이 상동 인간 또는 비-인간 시퀀스들로 대체된 키메라 Fd 단편 항체들을 공급한다. 본 발명은 또한 소위 단쇄 항체들을 포함한다.

[0096] 여러 항체 분자들 및 단편들이 IgA, 분비 IgA, IgE, IgG 및 IgM을 포함하나 이로 제한되지 않는 임의의 통상적으로 공지된 면역글로블린류들로부터 파생될 수 있다. IgG 서브클래스들이 또한 당해 기술분야에서 충분히 공지되어 있고 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하나 이들로 제한되지 않는다.

[0097] 다른 구체예에 있어서, 본 발명에 따른 항체는 단일 도메인 항체이다. 용어 "단일 도메인 항체(single domain antibody)"(sdAb) 또는 "VHH"는 자연적으로 경쇄들이 부재하는 낙타과 포유동물에서 발견될 수 있는 형태의 항체들의 단일 중쇄 가변 영역을 의미한다. 이러한 VHH는 또한 "nanobody®"라고도 불리운다. 본 발명에 따르면, sdAb는 특히 라마 sdAb일 수 있다.

[0098] 중화 항-βig-h3 항체의 예가 예를 들어 Bae JS et al Acta Physiol 2014, 212, 306-315에 개시되어 있다. 당업자는 관례적인 기술들을 사용하여 이러한 항체들(예를 들어, CDR들)의 항원-결합 시퀀스들을 사용하고 여기에서 개시된 바와 같은 PDAC의 치료를 위한 인간화된 항체들을 생성할 수 있다.

[0099] · **압타머**

[0100] 다른 구체예에 있어서, βig-h3 길항제는 βig-h3에 대하여 지시되는 압타머이다. 압타머는 분자 인식의 관점에서 항체들에 대한 대안을 나타내는 분자의 한 부류이다. 압타머는 실질적으로 임의의 부류의 표적 분자들을 높은 친화도 및 특이성으로 인식하는 능력을 갖는 올리고뉴클레오티드 또는 올리고펩티드 시퀀스이다. 이러한 리간드는 Tuerk C. and Gold L., 1990에서 개시된 바와 같이 랜덤 시퀀스 라이브러리의 Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment(SELEX)를 통하여 단리될 수 있다. 랜덤 시퀀스 라이브러리는 DNA의 조합 화학 합성으로 수득가능하다. 이 라이브러리에서, 각 구성원은 종국적으로 화학적으로 변성된 독특한 시퀀스의 선형 올리고머이다. 이러한 부류의 분자의 가능한 변성, 용도 및 이점은 Jayasena S.D., 1999에 검토되어 있다. 펩티드 압타머는 2개의 하이브리드 법에 의하여 조합 라이브러리로부터 선택되는 대장균 티오레독신 A(*E. coli* Thioredoxin A) 등과 같은 플랫폼 단백질(platform protein)에 의하여 전시되는 형태적으로 속박된 항체 가변 영역으로 이루어진다(Colas et al., 1996).

[0101] 계속해서, 본 발명을 위하여는, βig-h3의 중화 압타머가 상기 개시된 바와 같이 (i) βig-h3에 결합하고/하거나 (ii) 종양 세포 성장을 유도하고/하거나 (iii) CD8+ T 세포 활성화를 억제하는 것을 차단하는 것에 대한 이들의 능력에 대하여 선택된다.

[0102] · **βig-h3 유전자 발현의 억제제**

[0103] 여전히 다른 구체예에 있어서, βig-h3 길항제는 βig-h3 유전자 발현의 억제제이다. "발현의 억제제(inhibitor of expression)"는 유전자의 발현을 억제하는 생물학적 효과를 갖는 천연 또는 합성 화합물을 의미한다. 따라서, "βig-h3 유전자 발현의 억제제"는 βig-h3 유전자의 발현을 억제하는 생물학적 효과를 갖는 천연 또는 합성 화합물을 의미한다.

[0104] 본 발명의 바람직한 구체예에 있어서, 상기 βig-h3 유전자 발현의 억제제는 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 뉴클레아제 또는 리보자임이다.

[0105] 본 발명에서 사용하기 위한 βig-h3 유전자 발현의 억제제는 안티센스 올리고뉴클레오티드 구성물에 기반할 수 있다. 안티센스 RNA 분자 및 안티센스 DNA 분자를 포함하여 안티센스 올리고뉴클레오티드는 βig-h3 mRNA에 결합하는 것에 의하여 이의 번역을 직접적으로 차단하고 따라서 단백질 번역을 예방하거나 mRNA 감성(degradation)을 증가시키고, 따라서 βig-h3의 수준을 감소시키고, 따라서 세포 중에서의 활성을 증가시키도록 작용할 수 있다. 예를 들어, 적어도 15개의 염기들을 갖고 βig-h3을 인코딩하는 mRN 전사 시퀀스의 독특한 영역들에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드가, 예를 들어, 통상적인 포스포디에스테르 기술에 의해 합성되고, 예를 들어, 정맥내 주사 또는 투입에 의하여 투여될 수 있다. 그의 시퀀스가 알려진 유전자의 유전자 발현을 특이적으로 억제하기 위하여 안티센스 기술을 사용하기 위한 방법은 당해 기술분야에서 충분히 공지되어 있다(예를 들어 미국 특허 제6,566,135호; 제6,566,131호; 제6,365,354호; 제6,410,323호; 제6,107,091호; 제6,046,321호; 및 제5,981,732호를 참조).

[0106] 작은 억제 RNA(siRNA: small inhibitory RNA)는 또한 본 발명에서 사용하기 위한 βig-h3 유전자 발현의 억제제로서 기능할 수 있다. βig-h3 유전자 발현은 βig-h3 유전자 발현이 특이적으로 억제되도록(즉 RNA 간섭 또는 RNAi) 작은 이중가닥 RNA(dsRNA) 또는 작은 이중 가닥 RNA의 생산을 야기하는 벡터 또는 구성물을 사용하는 것에 의하여 감소될 수 있다. 적절한 dsRNA 또는 dsRNA-인코딩 벡터를 선택하기 위한 방법은 그 시퀀스가 공지된 유전자에 대하여 당해 기술분야에서 충분히 공지되어 있다(예를 들어 Tuschi, T. et al. (1999); Elbashir, S. M. et al. (2001); Hannon, GJ. (2002); McManus, MT. et al. (2002); Brummelkamp, TR. et al. (2002); 미국 특허 제6,573,099호 및 제6,506,559호; 및 국제공개특허 제WO 01/36646호, 제WO 99/32619호 및 제WO 01/68836호를 참조).

[0107] βig-h3에 대한 상기 siRNA의 예는 Chaoyu Ma (2008) Genes & Development 22:308-321에서 개시된 것들이 포함되나, 이로 제한되지 않는다.

[0108] 리보자임은 또한 본 발명에서 사용하기 위한 βig-h3 유전자 발현의 억제제로서 기능할 수 있다. 리보자임은 RNA의 특이적인 개열을 촉매할 수 있는 효소 RNA 분자이다. 리보자임 작용의 메카니즘은 상보성 표적 RNA에 대한 리보자임 분자의 시퀀스 특이적 하이브리드화에 후속하는 내인핵산분해 개열(endonucleolytic cleavage)을 포함한다. 그에 의하여 βig-h3 mRNA 시퀀스의 내인핵산분해 개열을 특이적으로 그리고 효과적으로 촉매하는 조작된 헤어핀 또는 해머헤드 모티브 리보자임 분자가 본 발명의 범주 내에서 유용하다. 리보자임 개열 자리에 대하여 표적 분자를 스캐닝하는 것에 의하여 임의의 잠재적 RNA 표적 내의 특이적인 리보자임 개열이 초기에 동정되며, 이는 전형적으로 하기 시퀀스들, GUA, GUU 및 GUC를 포함한다. 일단 동정되면, 개열 자리를 포함하는 표적 유전자의 영역에 대응하는 약 15 내지 20개의 리보뉴클레오티드의 짧은 RNA 시퀀스가 부적절한 올리고뉴클레오티드 시퀀스를 부여할 수 있는 2차 구조 등과 같은 예측되는 구조적 특징에 대하여 평가될 수 있다. 후보 표적의 적합성은 또한 예를 들어 리보뉴클레아제 보호 분석을 사용하여 상보성 올리고뉴클레오티드로의 하이브리드화에 대한 이들의 접근성을 시험하는 것에 의하여 평가될 수 있다.

[0109] βig-h3 유전자 발현의 억제제로서 유용한 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA 및 리보자임이 공지된 방법들로 제조될 수 있다. 이들은 예를 들어, 고상 포스포르아미다이트 화학 합성에 의한 것과 같은 화학 합성에 대한 기술을 포함한다. 달리, 안티센스 RNA 분자는 RNA 분자를 인코딩하는 DNA 시퀀스의 시험관 내 또는 생체 내 전사에 의해 생성될 수 있다. 이러한 DNA 시퀀스는 T7 또는 SP6 폴리머라아제 프로모터 등과 같은 적절한 RNA 폴리머라아제 프로모터를 합병하는 다양한 벡터들 내로 합병될 수 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드에 대한 여러 변성들이 세포내 안정성 및 반감기를 증가시키는 수단으로서 도입될 수 있다. 가능한 변성은 리보뉴클레오티드의 측면 시퀀스 또는 분자의 5' 및/또는 3' 말단에의 디옥시리보뉴클레오티드 또는 포스포로티오에이트의 사용 또는 올리고뉴클레오티드 백본 내에의 포스포디에스테라아제 연결 보다는 오히려 2'-O-메틸의 첨가를 포함하나 이로 제한되지 않는다.

[0110] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA 및 리보자임은 생체 내에서 단독으로 또는 벡터와 공동으로 파생될 수 있다. 그의 가장 광범위한 의미로, "벡터"는 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA 또는 리보자임 핵산의 세포, 바람직하게는 βig-h3을 발현하는 세포로의 전달을 용이하게 할 수 있는 임의의 비히클이다. 바람직하게는, 벡터는 벡터의 부재에서 야기될 수 있는 감성의 정도에 비하여 감소된 감성으로 핵산을 세포로 수송한다. 일반적으로, 본 발명에서 유용한 벡터는 플라스미드, 파지미드, 바이러스, 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA 또는 리보자임 핵산 시퀀스의 삽입 또는 합병에 의하여 조작된 바이러스 또는 박테리아원으로부터 파생되는 다른 비히클을 포함하나, 이로 제한되지 않는다. 바이러스 벡터는 바람직한 형태의 벡터이고 하기 바이러스로부터의 핵산 시퀀스를 포함하나, 이로 제한되지 않는다: 몰로니 설치류 백혈병 바이러스(moloney murine leukemia virus), 하비 설치류 육종 바이러스(harvey murine sarcoma virus), 설치류 유방 종양 바이러스(murine mammary tumor virus) 및 루즈 육종 바이러스(rouse sarcoma virus) 등과 같은 레트로바이러스; 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스; SV40-형 바이러스; 폴리오마 바이러스(polyoma virus); 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Bar virus); 유두종 바이러스; 헤르페스 바이러스; 백시니아 바이러스(vaccinia virus); 소아마비 바이러스; 및 레트로바이러스 등과 같은 RNA 바이러스. 호칭되지 않았으나 당해 기술분야에서 공지된 다른 벡터가 용이하게 채용될 수 있다.

[0111] 바람직한 바이러스 벡터는 비-필수 유전자가 대상의 유전자로 대체된 비-세포병변 진핵 바이러스에 기반한다. 비-세포병변 바이러스는 그의 라이프 사이클이 숙주 세포 DNA 내로의 후속하는 프로바이러스 통합을 수반하는 게놈 바이러스 RNA의 DNA 내로의 역전사를 포함하는 레트로바이러스(예를 들어, 렌티바이러스)를 포함한다. 레트로바이러스는 인간 유전자 요법 시도에 대하여 승인되었다. 복제-결핍인(즉, 소정의 단백질의 합성을 지향할 수 있으나, 감염성 입자를 제조할 수 없는) 이들 레트로바이러스가 가장 유용하다. 이러한 유전적으로 변형된 레트로바이러스 발현 벡터는 생체 내에서 유전자의 고효율 형질도입에 대한 종합적인 활용도를 갖는다. 복제-결핍 레트로바이러스를 제조하기 위한 표준 프로토콜(외인성 유전자 물질의 플라스미드 내로의 융합, 패키지 세포주의 플라스미드로의 형질감염, 패키징 세포주에 의한 재조합 레트로바이러스의 생산, 조직 배양 매질로부터의 바이러스 입자의 수집 및 표적 세포의 바이러스 입자로의 감염의 단계를 포함)이 KRIEGLER(A Laboratory Manual," W.H. Freeman C.O., New York, 1990)에서 그리고 MURRY("Methods in Molecular Biology," vol.7, Humana Press, Inc., Cliffton, N.J., 1991)에서 제공되었다.

[0112] 특정한 응용을 위한 바람직한 바이러스는 유전자 요법에서의 인간 사용을 위하여 이미 승인된 이중-가닥 DNA 바이러스인 아데노-바이러스 및 아데노-연관 바이러스이다. 아데노-연관 바이러스는 복제 결핍이 되도록 그리고

광범위한 세포 형태 및 종들을 감염시킬 수 있도록 가공될 수 있다. 이는 추가로 열 및 지질 용매 안정성; 조혈 세포를 포함하여 다양한 계통의 세포 중에서의 높은 형질도입 빈도; 및 중복감염 억제의 결여 및 따라서 다중 시리즈의 형질도입을 허여하는 것 등과 같은 이점을 갖는다. 전하는 바에 따르면, 아데노-연관 바이러스는 인간 세포 DNA 내로 자리-특이적인 방법으로 융합되고, 그에 의하여 삽입 돌연변이유발 및 레트로바이러스의 삽입된 유전자 발현 특성의 가변성을 최소화시킬 수 있다. 게다가, 야생-형 아데노-연관 바이러스 감염에 후속하여 아데노-연관 바이러스 게놈 융합이 상대적으로 안정한 사건임을 의미하는 선택적 압력의 부재 중에서의 100개 초과의 관에 대하여 조직 배양한다. 아데노-연관 바이러스는 또한 염색체외 양상(extrachromosomal fashion)으로 기능할 수 있다.

[0113] 다른 벡터에는 플라스미드 벡터가 포함된다. 플라스미드 벡터는 당해 기술분야에서 광범위하게 개시되었고 당해 기술분야에서 숙련된 자에게 충분히 공지되어 있다. 예를 들어, SANBROOK et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989를 참조. 최근 수년간에, 플라스미드 벡터가 항원-인코딩 유전자를 생체 중의 세포로 전달하기 위한 DNA 백신으로서 사용되었다. 이들이 많은 바이러스 벡터에 대한 것과 동일한 안전성 염려를 갖지 않기 때문에 특히 유리하다. 그러나, 숙주 세포에 대하여 적합한 프로모터를 갖는 이들 플라스미드들은 플라스미드 내에 작동가능하게 인코딩된 유전자로부터 펩티드를 발현할 수 있다. 일부 통상적으로 사용되는 플라스미드는 pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 및 pBlueScript를 포함한다. 다른 플라스미드가 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 충분히 공지되어 있다. 추가로, 플라스미드는 DNA의 특이적인 단편을 제거하고 첨가하도록 제한 효소 및 결찰 반응을 사용하여 커스텀 디자인될 수 있다. 플라스미드는 비경구, 점막 및 국부의 다양한 경로들에 의하여 전달될 수 있다. 예를 들어, DNA 플라스미드는 점막내, 진피내, 피하 또는 다른 경로로 주사될 수 있다. 이는 또한 비강내 스프레이 또는 점적, 직장 좌약 및 경구로 투여될 수 있다. 이는 또한 유전자-건을 사용하여 표피 또는 점막 표면 내로 투여될 수 있다. 플라스미드는 수용액, 금 입자 상에 건조되거나 리포좀, 덴드리머, 코클리에이트(cochleate) 및 미세캡슐형성을 포함하나 이로 제한되지 않는 다른 DNA 전달 시스템과 연관하여 주어질 수 있다.

[0114] *췌장암을 예방하거나 치료하는 방법*

[0115] 본 발명은 추가로 대상체에 치료학적으로 유효한 양의 βig-h3 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 대상체 중의 췌관 선암을 예방하거나 치료하는 방법을 고려한다.

[0116] 하나의 양태에 있어서, 본 발명은 치료학적으로 유효한 양의 βig-h3 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 대상체 중의 췌장 종양 성장을 억제하는 방법을 제공한다.

[0117] 상기 개시된 바와 같은 βig-h3 길항제의 "치료학적으로 유효한 양(therapeutically effective amount)"에 대하여는 길항제가 췌관 선암을 예방하거나 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 그러나, 본 발명의 화합물 및 조성물의 총 1일 사용량이 참여 의사에 의하여 건전한 의학적 판단의 관점 이내에서 결정될 수 있음은 이해될 수 있을 것이다. 임의의 특정한 대상체에 대한 특정한 치료학적으로 유효한 투여량 수준은 치료되는 장애 및 장애의 중증도; 채용되는 특정한 화합물의 활성; 채용되는 특정한 조성물, 대상체의 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 성별 및 식이요법; 채용되는 특정한 화합물의 투여의 시간, 투여의 경로 및 배설의 속도; 치료의 지속기간; 채용되는 특정한 폴리펩티드와 조합되거나 동시적으로 사용되는 약물; 의료 분야에서 충분히 공지된 유사한 인자들을 포함하여 다양한 인자들에 의하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 소정의 치료학적 효과를 달성하는 데 요구되는 것 보다 더 낮은 수준으로 화합물의 투여량을 시작하고 소정의 효과가 달성될 때까지 투여량을 점진적으로 증가시키는 것이 당해 기술분야에서 숙련된 자에게는 충분히 공지되어 있다. 그러나, 제품의 1일 투여량은 성인 당 1일 당 0.01 내지 1,000 ㎎의 넓은 범위를 넘어서 변할 수 있다. 바람직하게는, 조성물은 치료되어야 할 대상체에 대한 투여량의 대증적 조정을 위하여 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 및 500 ㎎의 활성 성분을 포함한다. 약제는 전형적으로 약 0.01 ㎎ 내지 약 500 ㎎의 활성 성분, 바람직하게는 1 ㎎ 내지 약 100 ㎎의 활성 성분을 포함한다. 약물의 유효한 양은 통상적으로 1일 당 0.0002 ㎎/㎏ 내지 약 20 ㎎/㎏ 체중, 특히 1일 당 약 0.001 ㎎/㎏ 내지 7 ㎎/㎏ 체중의 투여량 수준으로 공급된다.

[0118] 본 발명은 또한 혈중에 높은 수준의 βig-h3을 갖는 대상체에서의 PDAC를 βig-h3 길항제로 치료하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0119] 본 발명은 또한 혈중에 높은 수준의 βig-h3을 갖는 대상체에서의 PDAC의 치료에서 사용하기 위한 βig-h3 길항제에 관한 것이다.

[0120] 상기 방법 및 용도는 상기 대상체로부터 수득되는 혈액 샘플 중의 βig-h3 단백질의 수준을 측정하고 대조 참조

값과 비교하는 단계를 포함한다.

[0121] 높은 수준의 βig-h3은 췌관 선암을 앓거나 이로 발전할 높은 위험을 예측하고 βig-h3 길항제가 반드시 사용되어야 함을 의미한다.

[0122] 전형적으로, 체액 샘플은 대상체로부터 수득되고 βig-h3의 수준이 이 샘플 중에서 측정된다. 결국, 통계학적 분석에 의해 βig-h3 수준의 감소가 특히 높은 수준의 βig-h3를 나타내는 이러한 환자들에게 이로울 수 있다는 것이 밝혀졌다.

[0123] *본 발명의 약제학적 조성물:*

[0124] 상기 개시된 바와 같은 βig-h3 길항제는 약제학적으로 허용가능한 부형제 및 선택적으로 생분해성 폴리머 등과 같은 지연-방출 매트릭스와 결합되어 치료학적 조성물을 형성할 수 있다.

[0125] 따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 βig-h3 길항제 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0126] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 βig-h3 길항제 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 췌관 선암의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0127] "약제학적으로(Pharmaceutically)" 또는 "약제학적으로 허용가능한(pharmaceutically acceptable)"은 포유동물, 특히 인간에 적절하게 투여되는 경우에 유해작용, 알러지 반응 또는 다른 부작용을 일으키지 않는 분자 독립체 및 조성물을 의미한다. 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제는 비-독성 고체, 반-고체 또는 액체 충진제, 희석제, 캡슐화제 또는 임의의 형태의 제형 보조제를 의미한다.

[0128] 치료 응용에 있어서, 이미 질환으로 고통받는 환자에, 개시된 바와 같이, 질환 및 그의 합병증의 증후군을 치유하거나 적어도 부분적으로 중단시키기에 충분한 양으로 조성물이 투여된다. 약제학적 조성물의 적절한 투여량은 여러 가지 잘-구축된 프로토콜 중의 임의의 하나에 따라 용이하게 결정된다. 예를 들어, 체중 킬로그램 당 생물활성제의 최대 내약 투여량을 결정하는 데 동물 시험(예를 들어 마우스 또는 랫트에 대한)이 통상적으로 사용된다. 일반적으로, 시험되는 동물 종 중의 적어도 하나는 포유류이다. 동물 시험으로부터의 결과는 예를 들어 인간 등과 같은 다른 종에서의 사용을 위한 투여량을 결정하도록 외삽될 수 있다. 유효 투여량을 구성하는 것은 질환 또는 상태의 속성 및 중증도 그리고 환자의 건강의 일반적인 상태에 의존적이다.

[0129] 치료적 처치(therapeutical treatment)에 있어서, 약제학적 조성물 중에 포함된 길항제는 소정의 반응이 달성될 때까지 여러 투여량으로 또는 단일 투여량으로 투여될 수 있다. 처치는 전형적으로 모니터링되고 필요에 따라 반복적인 투여량이 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 βig-h3의 비활성화가 요구될 때마다 구축된 투여량 체제에 따라 투여될 수 있다.

[0130] 제품의 1일 투여량은 성인 당 1일 당 0.01 내지 1,000 ㎎의 넓은 범위를 넘어서 변할 수 있다. 바람직하게는, 조성물은 치료되어야 할 대상체에 대한 투여량의 대증적 조정을 위하여 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 및 500 ㎎의 활성 성분을 포함한다. 약제는 전형적으로 약 0.01 ㎎ 내지 약 500 ㎎의 활성 성분, 바람직하게는 1 ㎎ 내지 약 100 ㎎의 활성 성분을 포함한다. 약물의 유효한 양은 통상적으로 1일 당 0.0002 ㎎/㎏ 내지 약 20 ㎎/㎏ 체중, 특히 1일 당 약 0.001 ㎎/㎏ 내지 10 ㎎/㎏ 체중의 투여량 수준으로 공급된다. 그러나, 임의의 특정한 환자에 대한 특정한 투여량 수준 및 투여량의 빈도는 변할 수 있고 채용되는 특정한 화합물의 활성, 그 화합물의 대사 안정성 및 작용의 시간, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 식이요법, 투여의 방법 및 시간, 배설의 속도, 약물 조합, 특정한 상태의 중증도 및 치료를 수행하는 숙주를 포함하여 다양한 인자들에 의존적일 수 있다는 것은 이해될 수 있을 것이다.

[0131] 경구, 설하, 피하, 근육내, 정맥내, 경피, 국소 또는 직장 투여를 위한 본 발명의 약제학적 조성물에 있어서, 단독으로 또는 다른 유효 성분과의 조합으로 유효 성분은 통상의 약제학적 지지체와의 혼합물로서 단위 투여 형태로 동물 및 인간에 투여될 수 있다. 적절한 단위 투여 형태는 정제, 겔 캡슐, 분말, 과립 및 구강 현탁액 또는 용액 등과 같은 경구 형태, 설하 및 구강 투여 형태, 에어로졸, 임플란트, 피하, 경피, 국소, 복강내, 근육내, 정맥내, 피하, 경피, 척추강내 및 비강내 투여 형태 및 직장 투여 형태를 포함한다.

[0132] 적절한 단위 투여 형태는 경구로 취하여질 수 있는 정제, 젤라틴 캡슐, 분말, 과립 및 용액 또는 현탁액 등과 같은 경구 투여를 위한 형태, 설하 및 구강 투여, 에어로졸, 임플란트를 위한 형태, 피하, 근육내, 정맥내, 비강내 또는 안구내 투여를 위한 형태 및 직장 투여를 위한 형태를 포함한다.

[0133] 본 발명의 약제학적 조성물에 있어서, 유효 성분은 일반적으로 1일 투여를 위한 투여량 단위 당 0.5 내지 1000 mg, 바람직하게는 1 내지 500 mg, 보다 바람직하게는 2 내지 200 mg의 상기 유효 성분을 포함하는 투여량 단위로서 제형화된다.

[0134] 정제의 형태로 고체 조성물을 제조하는 경우, 소듐 라우릴설페이트 등과 같은 적심제(wetting agent)가 선택적으로 미분화된 유효 성분에 첨가되고, 계속해서 이는 실리카, 젤라틴, 녹말, 락토오스, 마그네슘스테아레이트, 활석, 아라비아검 등과 같은 약제학적 비히클과 혼합된다. 정제가 처리되어 연장되거나 지연된 활성을 갖도록 그리고 사전설정된 양의 유효 성분이 연속적으로 방출되도록 슈크로스로 여러 중합체 또는 다른 적절한 물질로 정제가 코팅될 수 있다.

[0135] 젤라틴 캡슐의 형태로의 제제는 유효 성분을 글리콜 또는 글리세롤에스테르 등과 같은 희석제와 혼합하고 수득되는 혼합물을 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐 내로 부어넣는 것에 의하여 수득된다.

[0136] 시럽 또는 엘릭서의 형태의 제제는 바람직하게는 무-칼로리인 감미제, 방부제로서 메틸파라벤 및 프로필파라벤, 향미제 및 적절한 착색제와 함께 유효 성분을 포함할 수 있다.

[0137] 수-분산성 분말 또는 과립은 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 분산제 또는 적심제 또는 현탁제와 그리고 또한 감미제 또는 미각교정자(taste corrector)와 혼합된 유효 성분을 포함할 수 있다.

[0138] 직장 투여는 직장 온도에서 용융되는 결합제 예를 들어 카카오버터 또는 폴리에틸렌글리콜로 제조된 좌약을 사용하여 실현된다.

[0139] 비경구, 비강내 또는 안구내 투여는 약제학적으로 화합될 수 있는 분산제 및/또는 적심제 예를 들어 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜 또는 폴리에틸렌글리콜을 포함하는 수성 현탁액, 등장의 식염수 또는 멸균 및 주사가능한 용액을 사용하여 실현된다.

[0140] 따라서 공용매, 예를 들어 에탄올 등과 같은 알코올 또는 폴리에틸렌글리콜 또는 프로필렌글리콜 등과 같은 글리콜 및 Tween. RTM. 80 등과 같은 친수성 계면활성제가 정맥내 경로로 주사가능한 수용액을 제조하는 데 사용될 수 있다. 유효 성분은 트리글리세리드 또는 글리세롤에스테르로 가용화되어 근육내 경로로 주사가능한 오일상 용액을 제조할 수 있다.

[0141] 그 안에 유효 성분이 알코올 용액의 형태로 존재하는 다중적층 패치 또는 저장소를 사용하여 경피 투여가 실행된다.

[0142] 흡입에 의한 투여는 예를 들어 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄 또는 임의의 다른 생물학적으로 화합될 수 있는 추진제 가스와 함께 소르비탄트리올레이트 또는 올레산을 포함하는 에어로졸을 사용하여 실현된다.

[0143] 유효 성분은 또한 선택적으로 하나 이상의 담체 또는 첨가제와 함께 마이크로캡슐 또는 미소구로 제형화될 수 있다.

[0144] 장기 치료의 경우에서 유용한 연장-방출 형태 중에서 임플란트가 사용될 수 있다. 이는 등장 매질 중의 오일상 현탁액의 형태 또는 미소구의 현탁액의 형태로 제조될 수 있다.

[0145] 유효 성분은 또한 사이클로덱스트린, 예를 들어 알파-사이클로덱스트린, 베타-사이클린 또는 감마-사이클로덱스트린, 2-하이드록시프로필-베타-사이클로덱스트린 또는 메틸-베타-사이클로덱스트린과 함께 착체의 형태로 제공될 수 있다.

[0146] **실시예**

[0147] **실시예 1:**

[0148] **재료 및 방법**

[0149] **마우스 모델**

[0150] *p48*-Cre;$Kras^{G12D}$를 사육하고 특정한 무-병원체 조건 내에 수용하고 PANIN의 발달의 모델로 사용하였다. 이러한 마우스는 1.5 개월에서 출발하여 PANIN 병소를 발달시켰다. 특정한 면역 반응에서의 조절에서의 βig-h3 분자의 역할을 결정하기 위하여 독특한 OT1 T 세포 수용체($CD8^+$ T 세포)를 발현하는 OT1/Rag2 KO 유전자 이식 마우스가 사용되었다. 더욱이, βigh3에 대한 중화 항체를 사용하여 PANIN 발달의 초기 단계에서의 분자의 효과를 평가하

였다.

[0151] p48-Cre;Kras^{G12D} 또는 야생형(WT)의 마우스 췌장을 콜라겐 파괴(collagen disruption)에 의하여 단리시켰다. DBA-렉틴-FITC 및 후속하는 항-FITC 자기 비드 및 CAF를 사용하고 항-PDGFRα-PE 및 항-PE 자기 비드 및 MACS Miltenyi 기술을 사용하여 췌관을 단리시켰다. 달리, 순도를 증가시키기 위하여 본 발명자들은 이들을 FACS 분류하였다. 정제된 개체군을 Matrigel 중에 수령자 마우스(면역경쟁 WT C57Bl6 마우스) 중에 주사하였다. 항-TGFBIp 중화 단클론 항체(In-San Kim, Korea Institute of Science and Technology Seoul, Korea에 의해 제공됨) 또는 대조 단클론 항체(BioXCell, USA)로의 항체 복강내 주사가 *p48*-Cre;Kras^{G12D}에 4 주 동안 매주 1회 수행되었다. 달리, 항-TGFBIp 중화 단클론 항체 또는 대조 항체(control Ab)와 융합된 *p48*-Cre;Kras^{G12D} 세포주(앞서 Agbunag et al., 2006에 의해 개시된 바와 같이 *p48*-Cre;Kras^{G12D} 2.5월령 마우스의 췌장들로부터 생성된 2가지 서로 다른 세포주)를 matrigel 중에 면역경쟁 WT C57Bl6 마우스 중에 피하(sc) 주사하였다.

[0152] 피하 이식 이후 종양발생에 대한 T 세포 개체군의 영향이 모두 BioXCell, USA에서 획득한 항-CD8(CD8$^+$ T 세포), 항-CD4(CD4$^+$ T 세포) 또는 항-Gr1(단핵구/마크로파지에 대한)로의 항체 결핍으로 평가될 수 있다.

[0153] **생물학적 자원:**

[0154] PANIN, IPMN 또는 PDAC를 앓는 환자들로부터의 췌장 절편들이 Bucarest, Romanian National Institute for Diabetes, Marseille Hopital La Timone and Lyon, Hopital Edouard Herriot로부터 수집되었다. 파라핀 포매 췌장으로부터의 6-㎛ 조각들이 면역이력화학 및 면역형광을 위하여 염색되었다. 모든 실험 절차는 Romanian National Ethics Committee and French National Ethics Committee에 의해 승인되었다. 혈청들이 CRB(Centre de Ressources Biologiques Centre Leon Berard, Lyon France) BB-0033-00050로부터 회수되었다.

[0155] **세포 배양**

[0156] 배설 림프절, 췌장(앞서 개시된 Agbunag et al., 2006과 같이 콜라게나아제 파괴에 의한), 비장으로부터 추출된 세포들이 96-U자형-웰 플레이트(300 000 세포/웰) 내에서 중화 항-βigh3 항체 또는 대조 항체(BioXCell, USA)의 존재 중에서 6 ㎍/㎖의 최종 농도로 24 시간 동안 배양되었다.

[0157] **유세포 분석**

[0158] 세포외 염색(extracellular staining)을 위하여, 배설 림프절 세포 또는 관류된 췌장을 CD8 V450 랫트 항체(BD Bioscience), 마우스 CD4 V500 랫트 항체(BD Bioscience), 마우스 CD44 A700 랫트 항체(BD Bioscience), CD69 FITC(ImmunoTools)로 염색시켰다. 세포내 염색을 위하여, 배설 림프절 세포를 Golgi plug(BD Pharmingen)의 존재 중에서 10% FCS (Biowest), 10 mM HEPES, 100U/㎖ penicillin G, 100mg/㎖ streptomycin, 2mM L-glutamine (Invitrogen)로 보충된 RPMI 1640 배지(Invitrogen) 중에서 4 시간 동안 37℃에서 5% CO_2 중에서 PMA 및 이오노마이신(1 ㎍/㎖)으로 활성화시켰다. 활성화 이후, 세포를 CD8 V450 랫트 항체(BD Bioscience), 마우스 CD4 V500 랫트 항체(BD Bioscience)로 염색시키고, Cytofix-Cytoperm(BD Pharmingen)을 사용하여 삼투시키고 추가로 항-IFNg(클론 XMG1.2, BD Pharmingen), 항-Granzyme B(클론 GB12, Invitrogen)로 염색시키고 BD Fortessa Flow Cytometer(BD Biosciences)로 유세포 분석을 실행하고 BD FACS Diva 소프트웨어 v5.0.1(BD) 또는 FlowJo(Tree Star, Inc.)로 분석하였다.

[0159] **역전사 및 qPCR**

[0160] RNA를 Qiagen 킷트로 제조업자의 지시에 따라 펠릿화된 소도로부터 추출되었다. RNA 농도를 Nanodrop에서 측정하였다. 역전사(RT)를 등량의 추출된 RNA(300 ng 초과)에 대하여 수행하였다. cDNA로부터, 정량 중합효소연쇄반응(qPCR)을 하기 프라이머: GeneCopoeia로부터의 TBP 정(Forward) 5'-TGGTGTGCACAGGAGCCAAG-3'(서열 번호 3), TBP 역(Reverse) 5'-TTCACATCACAGCTCCCCAC-3'(서열 번호 4) 및 βig-h3 All-in-one TM qPCR (cat no MQP028379) 프라이머를 수반하는 Power SYBR® Master Mix(Life technologies)로 수행하였다.

[0161] **면역형광 및 공초점 현미경 분석**

[0162] 파라핀 중에 포함된 마우스 췌장의 5 ㎛ 조각에 대한 절편들을 탈파라핀시켰다. 조각들을 언마스킹 용액(unmasking solution)(Vector H 3300)으로 언마스킹시키고 계속해서 항체 희석액(Dako)으로 30 분 동안 포화시키고 항체 희석액 중에 희석된 1차 항체와 함께 밤새도록 4℃에서 배양시켰다(Sigma로부터의 βig-h3 래빗

항체, Genetex로부터의 αSMA, DSHB로부터의 CK19 CK19 Troma III). 배양된 세포에 대하여는, 세포는 슬라이드 상에서 세포원심분리(cytospin)시키고 0.4% 파라포름알데히드 중에서 10 분 동안 고징시키고 계속해서 0.1% TritonX-100 중에서 10 분 동안 삼투시켰다. 세포를 PBS 0.05% Tween 중에서 세척하고 항체 희석액(Dako)으로 블로킹한 후 4℃에서 Sigma로부터의 βig-h3 래빗 항체, Ebioscience로부터의 CD61, Cell Signalling으로부터의 pErk로 염색하였다. 절편을 종 특이적 항-Fab'2-Alexa 647 및 Alexa 555(Molecular Probes)와 함께 배양시키고 DAPI를 수반하는 Vectashield 봉입제로 봉입시켰다. 각 분자의 편재화의 대표 영상들을 나타내었다. 전체 공초점 분석을 다중으로 반복하였고, 각 분자에 대하여 적어도 20개의 영상들이 분석되었다. 콜로컬화 정량을 위하여 사용되는 방법이 앞서 개시되었다(10). 데이터가 제공되고 Zen 소프트웨어(Zeiss)를 사용하여 분석되었다.

[0163] **통계학적 분석**

[0164] 도면 범례에서 특정된 바와 같이 Student's *t* test(GraphPad Prism)로 *P* 값이 산출되었다. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. **** $P < 0.0001$

[0165] **결과**

[0166] **βig-h3이 췌장 종양형성(pancreatic neoplasia)에서 종양발생 초기에 발현되었다.**

[0167] 본 발명자들은 앞서 C57Bl6에서의 WT 췌장 중에서 βig-h3 단백질이 낮은 수준으로 랑게르한스섬에서 발현되었다고 밝혔다(Patry et al., 2015). 외분비 구획에서는 단백질의 발현이 검출되지 않았다. 대조적으로, 1.5 개월에서 출발하여 종양형성으로 발달하는 p48Cre;$Kras^{G12D}$(KC) 마우스에서(Hingorani et al., 2003), 본 발명자들은 종양형성 병소 주변에서 단백질의 유의미한 발현을 발견하였다. 이러한 발현은 종양형성 발달의 후기 단계(즉 4.5 내지 7 개월)에서 유지되었으나, 불균질하였다. 더욱이, 본 발명자들은 βig-h3 발현이 췌관 마커 사이토케라틴 19(CK19)를 발현하는 종양형성 췌관세포(PANIN) 주변으로 편재화되었다는 것 및 PANIN 발달 1.5 개월이 되자마자 기질 마커 αSMA로 대부분 콜로컬화되었다는 것을 확인하였다. 췌장암을 앓는 환자에서의 발현 단백질 패턴의 연관성을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 췌장 선암(PDAC)에 대한 면역이력화학 염색을 수행하였다. PDAC를 앓는 15개체의 환자를 분석하였고 이들 모두 종양형성 췌관 주변의 기질에서 뿐만 아니라 또한 전이성 암종에서 세포외 구획 중에서 발현된 단백질을 나타내었다. 전체적으로 보아, 이러한 결과들은 TGF-β/액티빈 상과 표적인 βig-h3이 마우스에서의 종양형성 동안 초기에 발현되었다는 것 및 이러한 발현이 인간 PDAC에서의 염색의 동일한 패턴이라는 것을 처음으로 입증하고 있다.

[0168] **βig-h3은 췌장 종양형성에서의 미세환경 구획으로 한정되었다.**

[0169] βig-h3 발현의 패턴이 αSMA로 콜로컬화되었기 때문에, 본 발명자들은 다음으로 어떤 형태의 세포가 단백질을 생성하는 지를 조사하였다. 따라서 본 발명자들은 2.5 개월부터 자기 비드 분류에 의하여 췌장, 췌관 세포 및 암 연관 섬유아세포(CAF)를 단리하였다(도 1a)(재료 및 방법에서 개시됨). mRNA 추출 후 본 발명자들은 βig-h3 전사에 대하여 정량 역전사-중합효소연쇄반응(qRT-PCR)을 수행하였다. 본 발명자들은 βig-h3 단백질의 발현이 CAF 구획으로 제한되었다는 것을 발견하였다(도 1b). 3가지 서로 다른 CAF 세포주(KC 마우스로부터 단리된)가 시험관 내에서 24 시간 동안 완전 배지 또는 TGF-β1(20 ng/㎖)로 자극된 배지 중에서 배양시켰기 때문에 본 발명자들은 단백질의 수준에서 이들 데이터를 확인하였다. 본 발명자들은 CAF가 βig-h3 단백질을 생체 외에서 생성한다는 것과 더욱이 이러한 생산이 TGF-β 치료를 가능하게 하였다는 것을 발견하였다(도 1c).

[0170] **분비된 βig-h3은 $CD8^+$ T 세포 항원-특이적 반응(Ag-specific response)을 약화시킨다**

[0171] 본 발명자들은 앞서 비활성 형태에서 Lck 키나아제를 직접적으로 차단시키는 것에 의하여 βig-h3가 당뇨병원성 T 세포가 소도 베타 세포를 사멸시키는 것을 억제할 수 있다는 것을 나타내었다(Patry et al., 2015). βig-h3이 $CD8^+$ T 세포 항원-특이적 반응을 조절할 수 있는 지의 여부를 결정하기 위하여 본 발명자들은 OT1 CD8+ T 세포를 재조합 βig-h3으로 처리하고 추가로 세포를 특정한 OVA SIINFEKL 동족 펩티드(2개의 서로 다른 농도로)로 처리하였다. 본 발명자들은 활성화 마커 CD69(도 2d) 및 CD44(도 2c)를 발현하는 전체(도 2b) 및 분할 OT1(도 2a) 세포들의 수로 측정된 바와 같이 βig-h3 전처리가 유의미하게 항원-특이적 반응을 감소시킬 수 있다는 것을 입증하였다. 본 발명자들은 추가로 $CD8^+$ T 세포의 CAF로의 공-배양에서 βig-h3에 대한 중화 항체를 사용하였다. 도 2e에서 나타난 바와 같이, 중화 항체의 첨가가 CAF의 면역-억제를 폐지할 수는 없으나 CAF 상청액 중의 분비된 단백질을 차단하는 것은 가능하였다(도 2f). 더욱이, 본 발명자들은 조사된 췌장 KC 세포주로 자극된 KC 마우스의 배수 림프로부터의 T 세포를 사용하는 것에 의하여 이러한 결과를 확증하였다(도 2g). 전체

적으로 보아, 이러한 결과는 최초로 βig-h3가 시험관 내에서 특이적인 항-종양 $CD8^+$ T 세포 반응을 조절할 수 있었다는 것을 나타내고 있다.

[0172] **생체 내 βig-h3 중화가 국소 $CD8^+$ T 세포 반응을 향상시킨다**

[0173] 생체 내 영향을 시험하기 위하여 본 발명자들은 21일령(이유 직후)부터 시작하여 KC 마우스를 중화 βig-h3 항체 또는 동형 대조 항체로 처리하였다. 본 발명자들은 마우스를 매 주당 1회 4주 동안 처리하고 계속해서 FACS 염색, 면역이력화학 및 면역형광에 의하여 췌장 중의 종양형성을 평가하였다. 처리된 마우스는 한배 새끼 대조 항체 처리 마우스에 비하여 감소된 CK19 염색을 나타내었다. 더욱이, 이러한 반응은 면역형광 및 FACS 분석에 의하여 검출된 바와 같이 종양형성 췌장 중의 증가된 수의 $CD8^+$ T 세포와 연관되었다(도 3a). 본 발명자들은 췌관 종양 구획 발현 EPCAM이 감소되었다는 것을 FACS로 확증하였다(도 3b). αSMA 염색에 의해 검출된 바와 같은 CAF의 수는 감소되지 않아 βig-h3 중화가 CAF의 수를 감소시킴이 없이(단지 이들의 반응을 조절하는 것에 의하여) 종양 세포를 사멸시키는 $CD8^+$ 항-종양 반응을 향상시킨다는 것을 암시하고 있다.

[0174] 단지 국소 췌장 항-종양이 종양 세포의 제거를 추진하기에 충분한 지의 여부를 시험하기 위하여, 본 발명자들은 면역경쟁 B6 마우스 내로의 KC 세포의 주사를 수행하였다. 항-bigh3 중화 항체 또는 대조 항체로 처리된 KC 세포주가 피하로 B6(Matrigel 중의) 중에 주사하고 10일 후 희생시켰다. βig-h3 중화 항체의 사용은 종양 크기 및 중량에서의 유의미한 감소를 야기하였다. 보다 중요하게는 이러한 결과는 감소된 EPCAM 염색과 마찬가지로 FACS 염색에 의해 검출된 바와 같이 CAF 수(도 3a, 3b)와 연관되었다. 더욱이, 종양 자체는 더 낮은 암줄기세포(cancer initiating cell)를 나타내었다(문헌에서 $CD45^-CD44^+CD24^{low}$로 정의된 바와 같이). 전체적으로 보아, 이러한 결과는 최초로 βig-h3 중화가 생체 중에서의 CD8 항-종양 반응을 향상시키는 것에 의하여 종양 제거를 야기한다는 것을 밝혔다.

[0175] **βig-h3은 초기 종양 발달의 마커로서 사용될 수 있다**

[0176] βig-h3 발현이 췌장 종양 초기에 발생하기 때문에 본 발명자들은 βig-h3이 혈청 중에서 검출될 수 있고 "예측 마커(predictive marker)"로서 사용될 수 있다는 가설을 세웠다. 본 발명자들은 ELISA를 사용하여 KC 마우스의 야생형의 혈청 중에서의 βig-h3의 양을 검출하였다. 본 발명자들은 야생형 마우스에 비하여 KC 마우스의 혈청 중의 bigh3의 양에서의 유의미한 증가(69.32 ± 35.70 N=6)를 검출하였으며 검출은 ELISA 시험의 문턱값 미만이었다(도 4a).

[0177] 인간 PDAC에서의 개념의 증거로서 본 발명자들은 혈액은행으로부터의 20개체의 건강한 지원자들 및 잠재적인 진단 마커로서 가용성 βig-h3의 존재에 대하여 PDAC를 앓는 20개체의 환자들로부터의 혈청을 시험하였다. 도 4b에 나타난 바와 같이 건강한 지원자들과 PDAC 환자들 간에 유의미한 차이가 있어 이 분자가 바이오 마커로서 잠재적인 흥미를 갖는다는 것을 나타내었다.

[0178] **실시예 2**

[0179] **βig-h3은 T 세포 표면 상에서 CD61과 상호작용한다**

[0180] βig-h3은 αvβ3 인테그린에의 결합을 통한 신호로 보고되었다(Tumbarello DA, et al. Mol Cancer 2012;11:36). 따라서, 본 발명자들은 CD8+ T 세포의 표면에서의 β3(CD61)의 발현에 대하여 조사하였다. 본 발명자들은 림프절 내 그리고 종양 내에 존재하는 CD8+ T 세포 둘 다 CD61을 발현한다는 것을 발견하였고 추가로 CD61의 발현이 말초 CD8+ T 세포에 비하여 종양 CD8+ T 세포 중에서 유의미하게 더 높았다는 것에 주목하였다(도 5a). 재조합 βig-h3 단백질(rβig-h3)로의 CD8+ T 세포의 처리가 CD61 내재화를 야기하였기 때문에 본 발명자들은 βig-h3이 CD61을 통하여 신호할 수 있다는 것을 확증하였다(도 5b). 이전에 당뇨병에서 보고된 바와 같이(Patry M, Diabetes 2015;64:4212-9), CD8+ T 세포의 rβig-h3로의 처치가 Y505에 대한 Lck의 포스포릴화 및 그의 CD61에 대한 콜로컬화의 결과를 가져왔다(도 5c). 이러한 결과는 CD8+ T 세포의 표면에서의 βig-h3의 CD61과의 상호작용이 Y505에 대한 Lck의 포스포릴화(Davis SJ,. Trends Immunol 2011;32:1-5) 및 후속하여 TCR 신호화 경로의 이러한 초기 키나아제의 차단의 결과를 야기한다는 것을 나타내고 있다.

[0181] **CD8+ T 세포가 생체 중에서의 βig-h3 중화에 대하여 필수적이다**

[0182] βig-h3 중화가 CD8+ T 세포의 국소 축적을 야기하기 때문에, 본 발명자들은 과정에 대한 CD8+ T 세포의 직접적인 기여를 조사할 것을 고려하였다. 이러한 가설을 시험하기 위하여, 본 발명자들은 βig-h3 중화 항체 또는 대

조 항체로 처리된 KC 세포주를 Rag2KO 마우스에 주사하였다. 마우스를 추가로 KC 마우스의 췌장-배설 림프절로부터 단리된 CD8+ T 세포로 정맥내 주사하였다(도 6a). 본 발명자들은 βig-h3 중화 항체로 처리된 KC 세포주로로 주사된 마우스가 CD45+ 세포의 유사한 보충을 나타내는 한편으로, 이들은 대조-조건 처리된 동물에 비하여 CD8+ T 세포의 증가된 축적을 나타내었다는 것을 발견하였다(도 6b 및 6c). 더욱이, 향상된 수의 CD8 T 세포에 수반하여, 본 발명자들은 감소된 개체군의 종양 췌관 CD45-/EPCAM+ 세포를 검출하였다(도 6d). 이러한 결과는 βig-h3의 부재 중에서, CD8+ T 세포의 축적이 감소된 비율의 EPCAM+ 세포에 원인이 있을 것이라는 것을 암시한다. 종양 중에서의 EPCAM+ 개체군의 관측된 감소가 CD8+ T 세포 결핍으로 구제될 수 있다고 예측될 수 있다. 이러한 가설을 시험하기 위하여, 본 발명자들은 βig-h3 중화 항체 또는 대조 항체로 처리되고 후속하여 종양-세포-주사 7일차 및 8일차에서 2회 연속된 정맥내 주사로 CD8+ T 세포에 대하여 결핍된 KC 파생 세포주의 피하 이식을 수행하였다(도 6e). 이러한 처리는 CD4+ T 세포 또는 F4/80 개체군을 변화시키지 않고 CD8+ T 세포 개체군의 90% 이상의 결핍의 결과를 가져왔다. 대조적으로, CD8 세포의 중화는 βig-h3 중화 또는 대조 조건 둘 다에서 EPCAM+ 세포의 동일한 수의 구축을 허용하기에 충분하였다(도 6f). 전체적으로 보아, 이러한 결과는 CD8+ T 세포가 생체 내에서의 종양 성장에 대한 βig-h3 중화 효과가 필수적이라는 것을 나타낸다.

[0183] **βig-h3은 PDAC의 마커로서 사용될 수 있다.**

[0184] 인간 PDAC에서의 개념의 증거로서 본 발명자들은 잠재적인 진단 마커로서의 가용성 βig-h3의 존재에 대하여 혈액은행으로부터의 49개체의 건강한 지원자 및 PDAC를 앓는 104개체의 환자의 혈청의 추가의 군을 시험하였다. 도 7에 나타난 바와 같이 건강한 지원자 및 PDAC 환자 간의 유의미한 차이가 존재하여 이 분자가 바이오 마커로서 잠재적인 흥미를 갖는다는 것을 나타내었다.

[0185] **표 1: 본 발명을 실행하기 위하여 유용한 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스**

표 1

SEQ ID NO	Nucleotide or amino acid sequence
1 (βig-h3 AA sequence)	MALFVRLLAL ALALALGPAA TLAGPAKSPY QLVLQHSRLR GRQHGPNVCA VQKVIGTNRK YFTNCKQWYQ RKICGKSTVI SYECCPGYEK VPGEKGCPAA LPLSNLYETL GVVGSTTTQL YTDRTEKLRP EMEGPGSFTI FAPSNEAWAS LPAEVLDSLV SNVNIELLNA LRYHMVGRRV LTDELKHGMT LTSMYQNSNI QIHHYPNGIV TVNCARLLKA DHHATNGVVH LIDKVISTIT NNIQQIIEIE DTFETLRAAV AASGLNTMLE GNGQYTLLAP TNEAFEKIPS ETLNRILGDP EALRDLLNNH ILKSAMCAEA IVAGLSVETL EGTTLEVGCS GDMLTINGKA IISNKDILAT NGVIHYIDEL LIPDSAKTLF ELAAESDVST AIDLFRQAGL GNHLSGSERL TLLAPLNSVF KDGTPPIDAH TRNLLRNHII KDQLASKYLY HGQTLETLGG KKLRVFVYRN SLCIENSCIA AHDKRGRYGT LFTMDRVLTP PMGTVMDVLK GDNRFSMLVA AIQSAGLTET LNREGVYTVF APTNEAFRAL PPRERSRLLG DAKELANILK YHIGDEILVS GGIGALVRLK SLQGDKLEVS LKNNVVSVNK EPVAEPDIMA TNGVVHVITN VLQPPANRPQ ERGDELADSA LEIFKQASAF SRASQRSVRL APVYQKLLER MKH
2 (βig-h3 nucleic acid sequence)	ctccttgcac gggccggccc agcttccccg ccctggcgt ccgctccctc ccgctgcag cttacttaac ctggcccggg cggcggaggc gctctcactt ccctggagcc gcccgcttgc ccgtcggtcg ctagctcgct cggtgcgcgt cgtcccgctc catggcgctc ttcgtgcggc tgctggctct cgccctggct ctggccctgg gccccgccgc gaccctggcg ggtcccgcca agtcgccctа ccagctggtg ctgcagcaca gcaggctccg gggccgccag cacggcccca acgtgtgtgc tgtgcagaag gttattggca ctaataggaa gtacttcacc aactgcaagc agtggtacca aaggaaaatc tgtggcaaat caacagtcat cagctacgag tgctgtcctg gatatgaaaa ggtccctggg gagaagggct gtccagcagc cctaccactc tcaaaccttt acgagaccct gggagtcgtt ggatccacca ccactcagct gtacacggac cgcacggaga agctgaggcc tgagatggag gggcccggca gcttcaccat cttcgcccct agcaacgagg cctgggctc cttgccagct gaagtgctgg actccctggt cagcaatgtc aacattgagc tgctcaatgc cctccgctac catatggtgg gcaggcgagt cctgactgat gagctgaaac acggcatgac cctcaccctct atgtaccaga attccaacat ccagatccac cactatccta atgggattgt aactgtgaac tgtgcccggc tgctgaaagc cgaccaccat gcaaccaacg gggtggtgca cctcatcgat aaggtcatct ccaccatcac caacaacatc cagcagatca ttgagatcga ggacaccttt gagaccctc gggctgctgt ggctgcatca gggctcaaca cgatgcttga aggtaacggc cagtacacgc ttttggcccc gaccaatgag gccttcgaga agatccctag tgagactttg aaccgtatcc tgggcgaccc agaagccctg agagacctgc tgaacaacca catcttgaag

[0186]

	tcagctatgt gtgctgaagc catcgttgcg gggctgtctg tagagaccct ggagggcacg acactggagg tgggctgcag cggggacatg ctcactatca acgggaaggc gatcatctcc aataaagaca tcctagccac caacggggtg atccactaca ttgatgagct actcatccca gactcagcca agacactatt tgaattggct gcagagtctg atgtgtccac agccattgac cttttcagac aagccggcct cggcaatcat ctctctggaa gtgagcggtt gaccctcctg gctcccctga attctgtatt caaagatgga acccctccaa ttgatgccca tacaaggaat ttgcttcgga accacataat taaagaccag ctggcctcta agtatctgta ccatggacag accctggaaa ctctgggcgg caaaaaactg agagtttttg tttatcgtaa tagcctctgc attgagaaca gctgcatcgc ggcccacgac aagaggggga ggtacgggac cctgttcacg atggaccggg tgctgacccc cccaatgggg actgtcatgg atgtcctgaa gggagacaat cgctttagca tgctggtagc tgccatccag tctgcaggac tgacggagac cctcaaccgg gaaggagtct acacagtctt tgctcccaca aatgaagcct tccgagccct gccaccaaga gaacggagca gactcttggg agatgccaag gaacttgcca acatcctgaa ataccacatt ggtgatgaaa tcctggttag cggaggcatc ggggccctgg tgcggctaaa gtctctccaa ggtgacaagc tggaagtcag cttgaaaaac aatgtggtga gtgtcaacaa ggagcctgtt gccgagcctg acatcatggc cacaaatggc gtggtccatg tcatcaccaa tgttctgcag cctccagcca acagacctca ggaaagaggg gatgaacttg cagactctgc gcttgagatc ttcaaacaag catcagcgtt ttccagggct tcccagaggt ctgtgcgact agcccctgtc tatcaaaagt tattagagag gatgaagcat tagcttgaag cactacagga ggaatgcacc acggcagctc tccgccaatt tctctcagat ttccacagag actgtttgaa tgttttcaaa accaagtatc acactttaat gtacatgggc cgcaccataa tgagatgtga gccttgtgca tgtgggggag gagggagaga gatgtacttt ttaaatcatg ttccccctaa acatggctgt taacccactg catgcagaaa cttggatgtc actgcctgac attcacttcc agagaggacc tatcccaaat gtggaattga ctgcctatgc caagtcccctg gaaaaggagc ttcagtattg tggggctcat aaaacatgaa tcaagcaatc cagcctcatg ggaagtcctg gcacagtttt tgtaaagccc ttgcacagct ggagaaatgg catcattata agctatgagt tgaaatgttc tgtcaaatgt gtctcacatc tacacgtggc ttggaggctt ttatggggcc ctgtccaggt agaaaagaaa tggtatgtag agcttagatt tccctattgt gacagagcca tggtgtgttt gtaataataa aaccaaagaa acata
3 (TBPi Forward primer)	TGGTGTGCACAGGAGCCAAG
3 (TBPi Reverse primer)	TTCACATCACAGCTCCCCAC

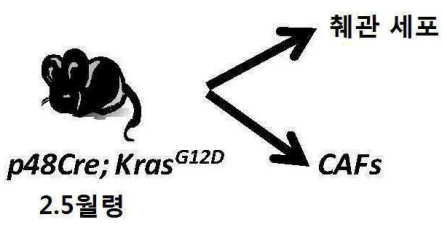
[0187]

[0188] **참조 문헌:**

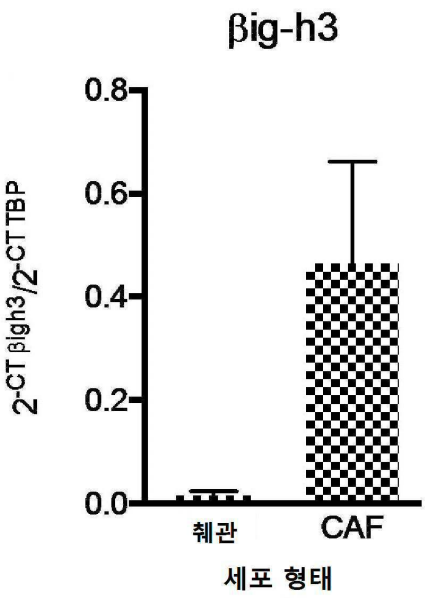
[0189] 본 출원 전체를 통하여, 여러 참조 문헌들이 본 발명이 속하는 분야에서의 현 시점에서의 기술적 수준을 개시하고 있다. 이러한 참조문헌들의 상세들이 본 상세한 설명 내로 참조로 포함된다.

도면

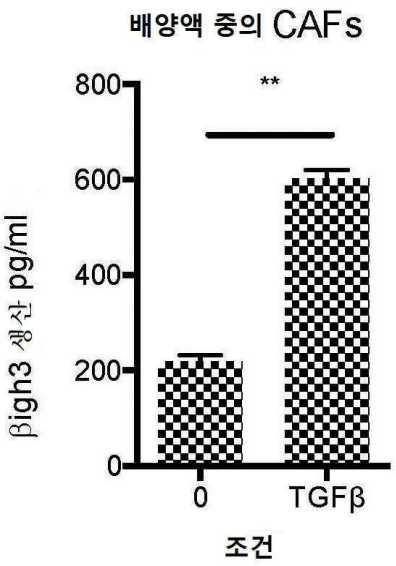
도면1a



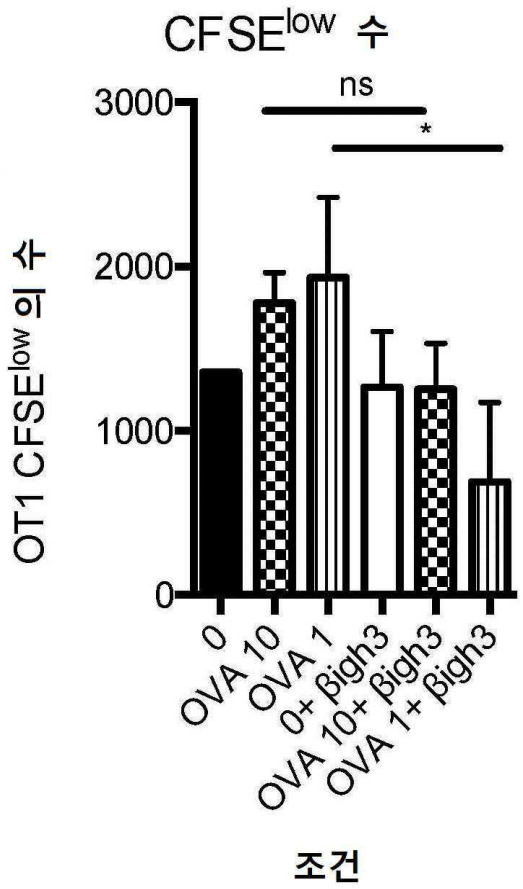
도면1b


βig-h3
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
2-CT βigh3/2-CT TBP
췌관
CAF
세포 형태

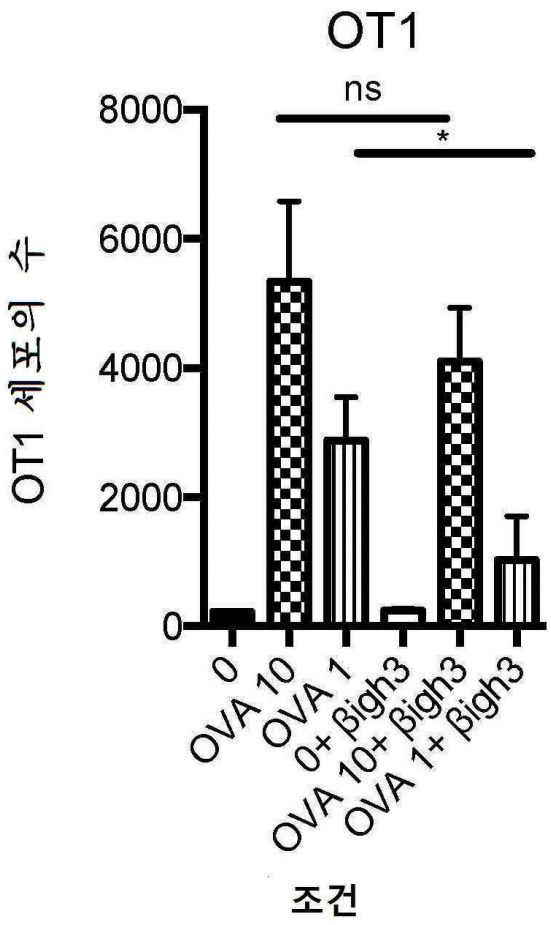
도면1c


배양액 중의 CAFs
**
800
600
400
200
0
βigh3 생산 pg/ml
0
TGFβ
조건

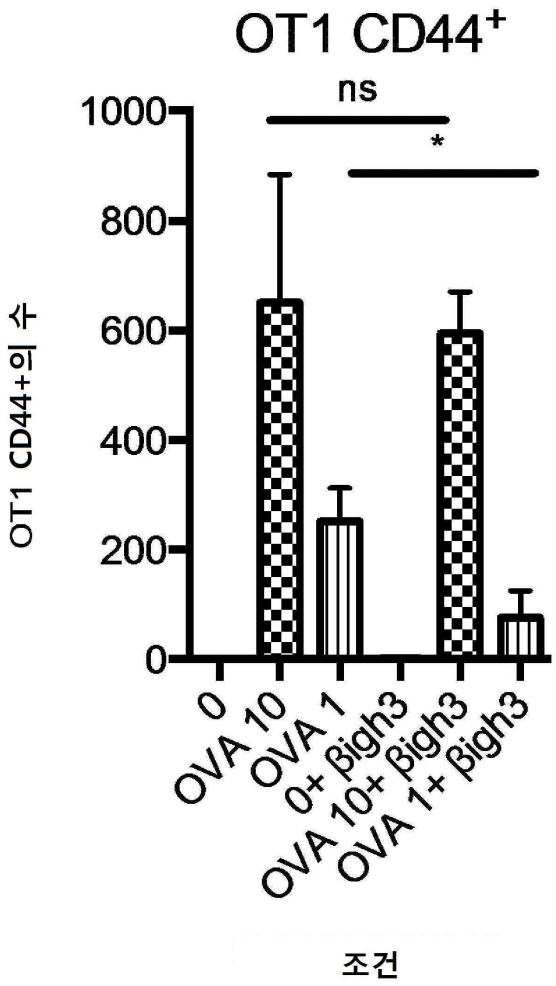
도면2a


CFSE^low 수
ns
*
3000
2000
1000
0
OT1 CFSE^low 의 수
0
OVA 10
OVA 1
0+ βigh3
OVA 10+ βigh3
OVA 1+ βigh3
조건

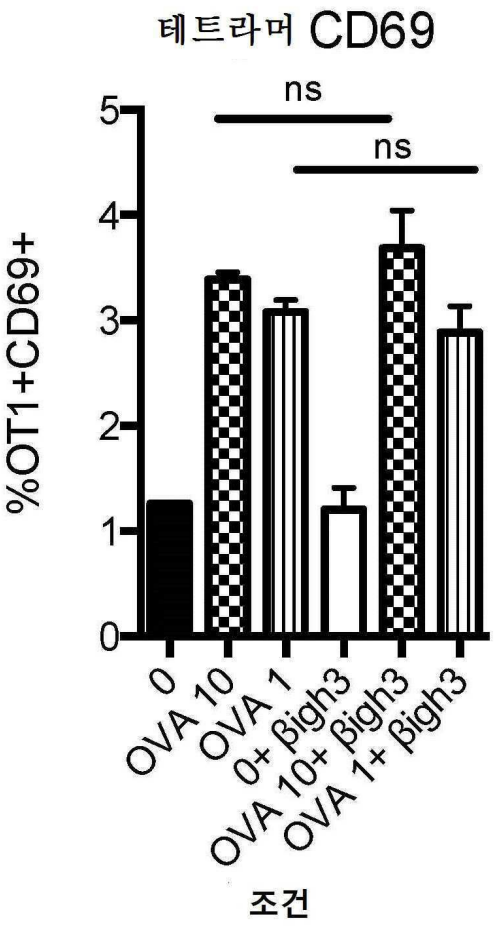
도면2b


OT1
ns
*
8000
6000
4000
2000
0
OT1 세포의 수
0
OVA 10
OVA 1
0+ βigh3
OVA 10+ βigh3
OVA 1+ βigh3
조건

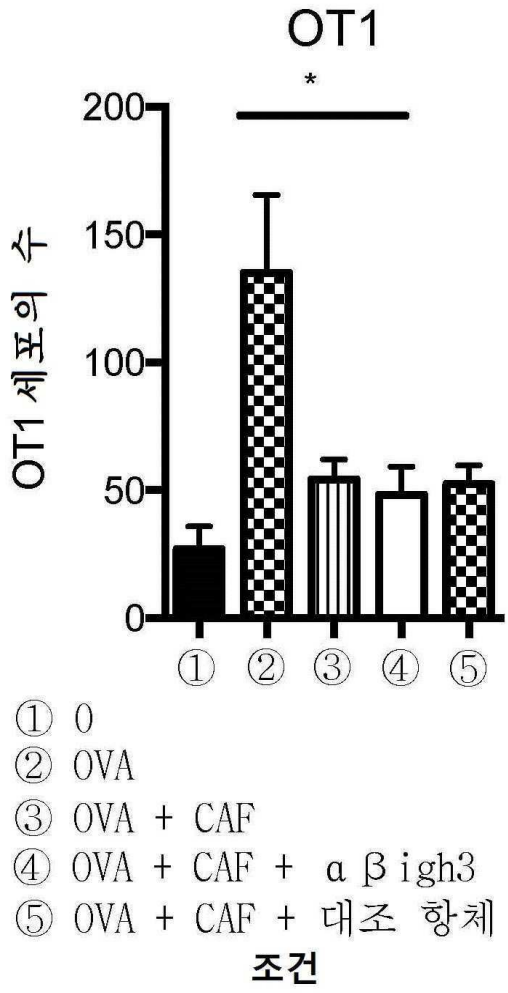
도면2c


OT1 CD44+
ns
*
1000
800
600
400
200
0
OT1 CD44+의 수
0
OVA 10
OVA 1
0+ βigh3
OVA 10+ βigh3
OVA 1+ βigh3
조건

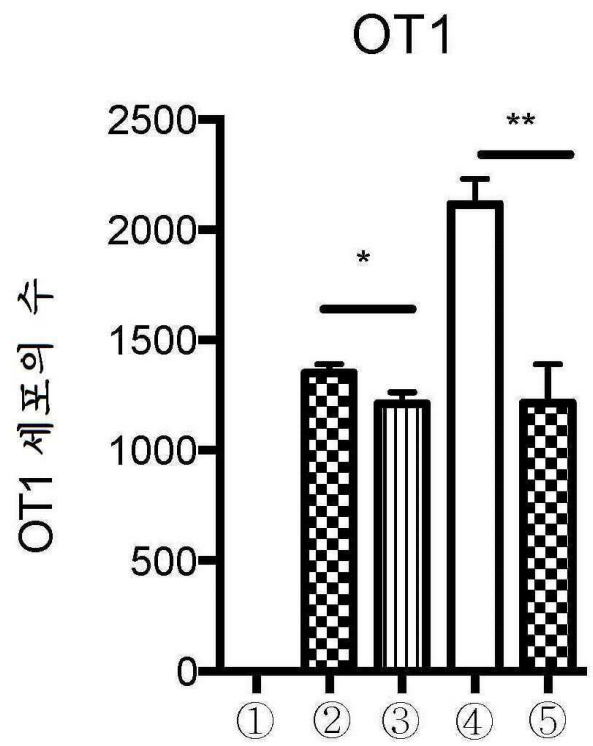
도면2d


테트라머 CD69
ns
ns
%OT1+CD69+
5
4
3
2
1
0
0
OVA 10
OVA 1
0+ βigh3
OVA 10+ βigh3
OVA 1+ βigh3
조건

도면2e


OT1
*
200
150
100
50
0
OT1 세포의 수
① ② ③ ④ ⑤
① 0
② OVA
③ OVA + CAF
④ OVA + CAF + αβigh3
⑤ OVA + CAF + 대조 항체
조건

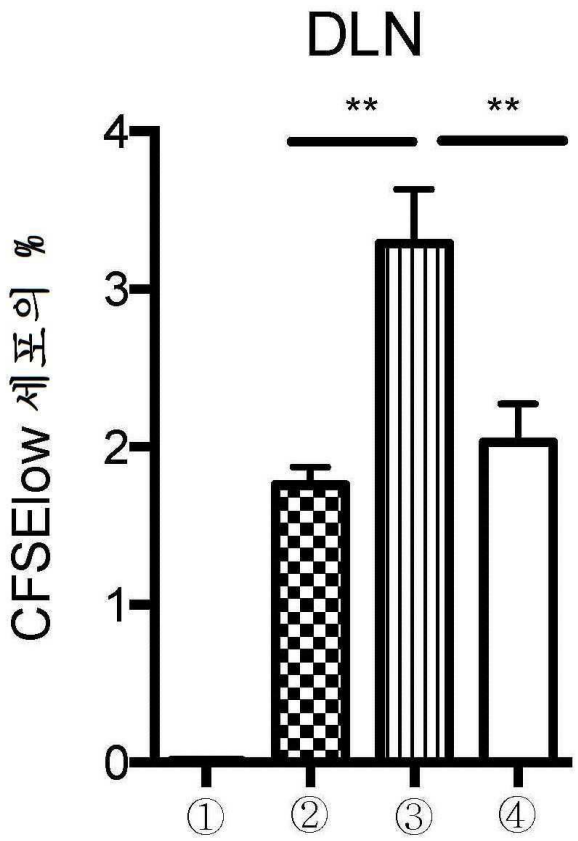
도면2f



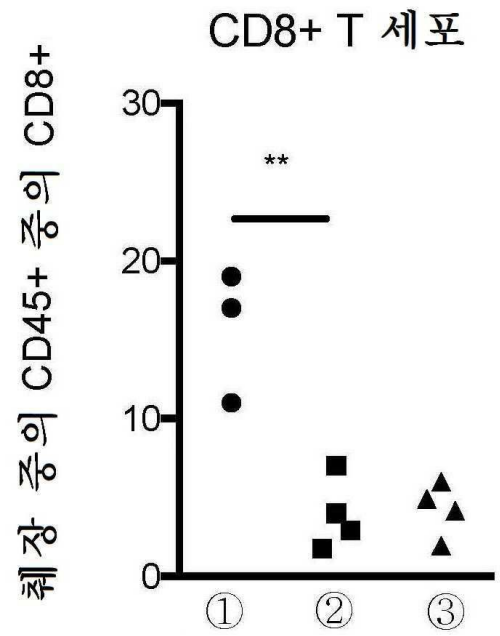
① 0
② OVA
③ OVA + CAF SN
④ OVA + CAF SN + αβigh3
⑤ OVA + CAF SN + 대조 항체

조건

도면2g

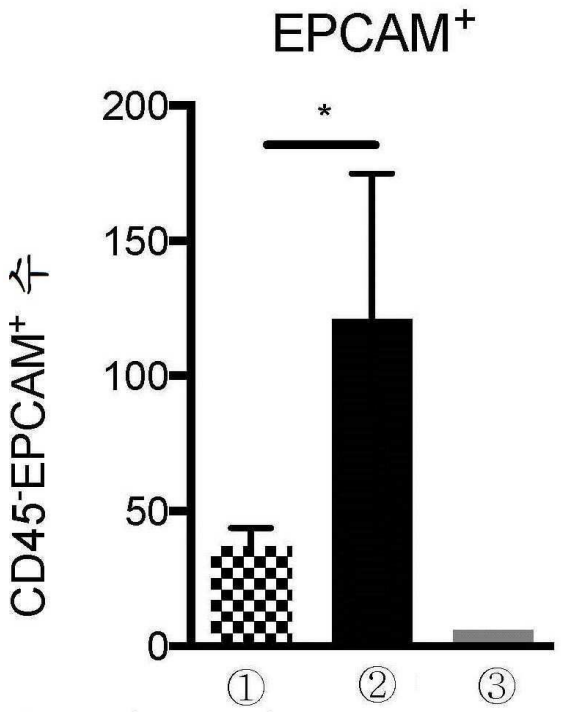


도면3a



① p48+; Kras+ AC αβigh3
② p48+; Kras+ AC 대조
③ 야생형

도면3b

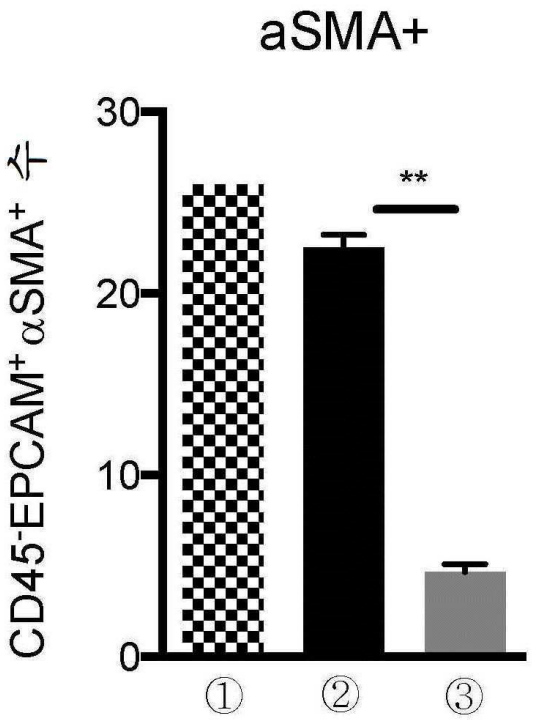


① p48+; Kras+ Ac α-β ig-h3

② p48+; Kras+ Ac 대조

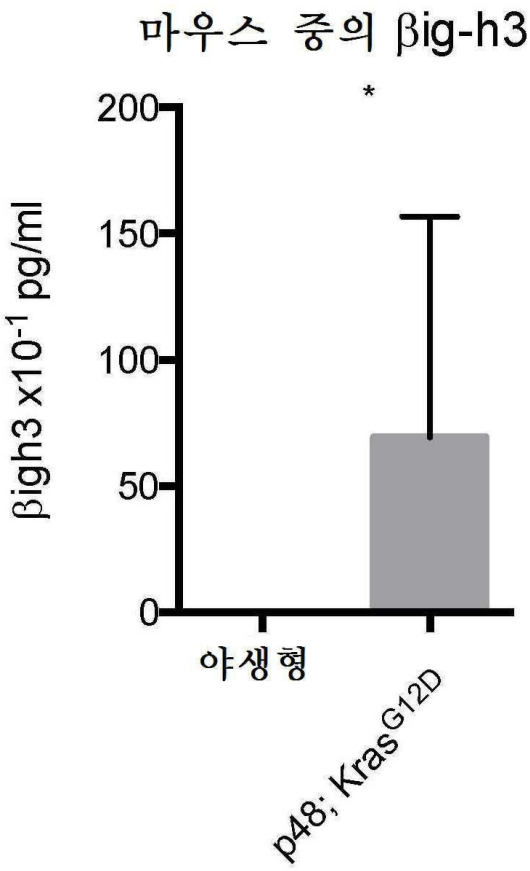
③ 무 Ac α-β ig-h3

도면3c

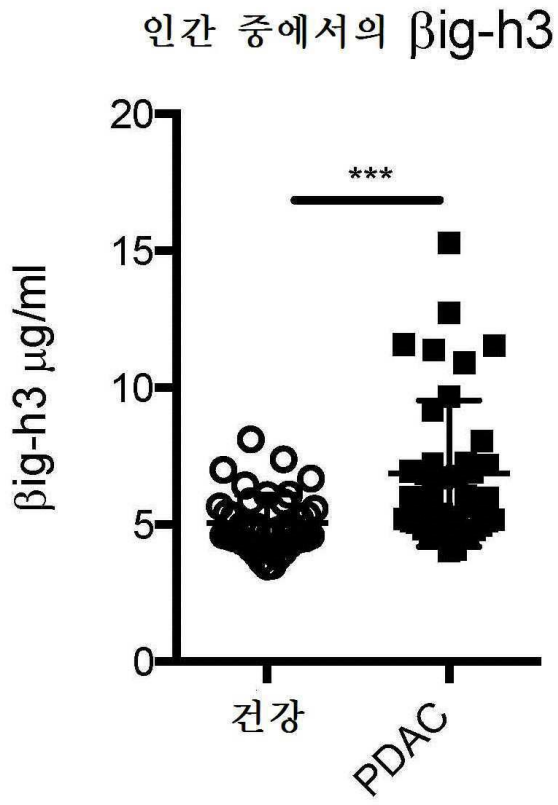


① p48+; Kras+ AC αβigh3
② p48+; Kras+ AC 대조
③ 야생형

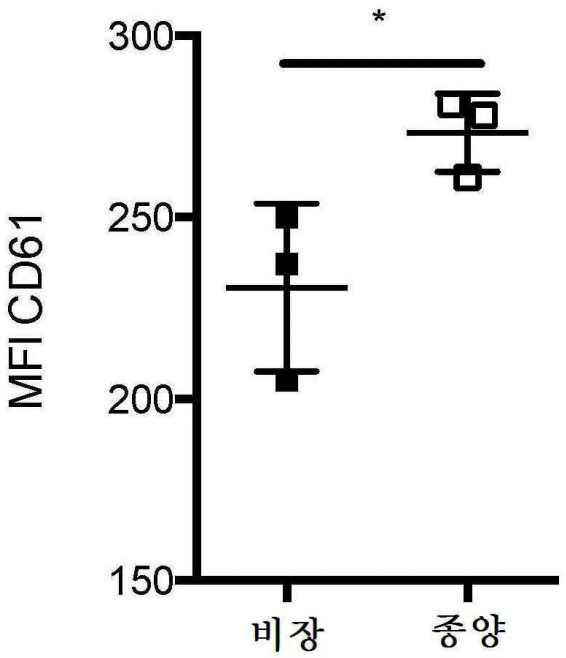
도면4a


마우스 중의 βig-h3
*
200
150
100
50
0
βigh3 x10-1 pg/ml
야생형
p48; KrasG12D

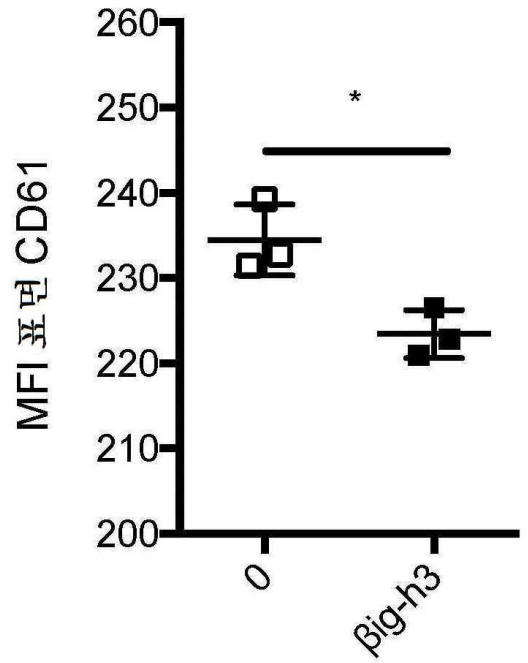
도면4b


인간 중에서의 βig-h3
***
20
15
10
5
0
βig-h3 μg/ml
건강
PDAC

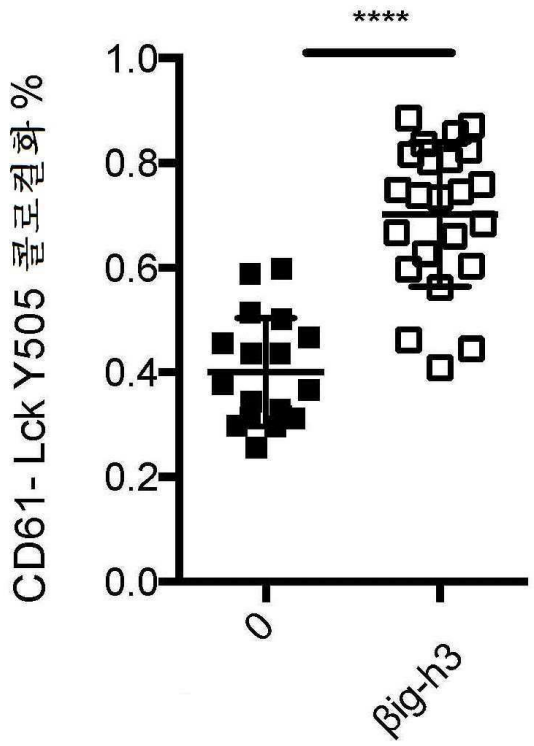
도면5a


*
300
250
200
150
MFI CD61
비장
종양

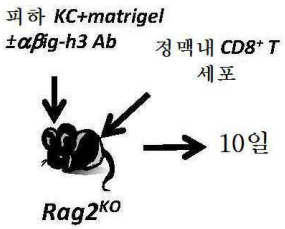
도면5b


*
260
250
240
230
220
210
200
MFI 표면 CD61
0
βig-h3

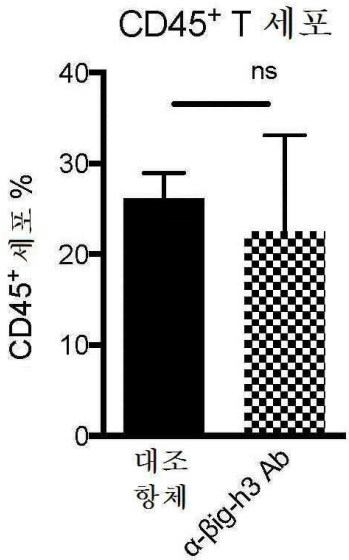
도면5c



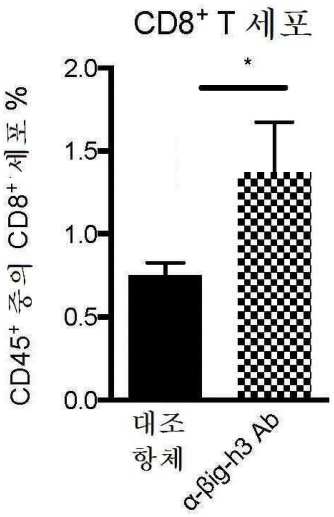
도면6a



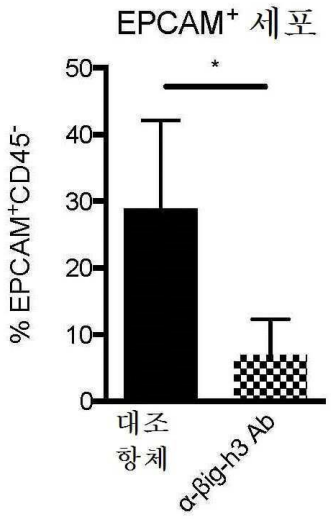
도면6b



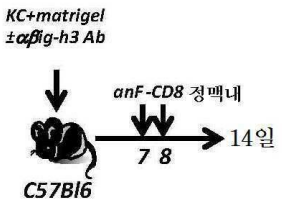
도면6c



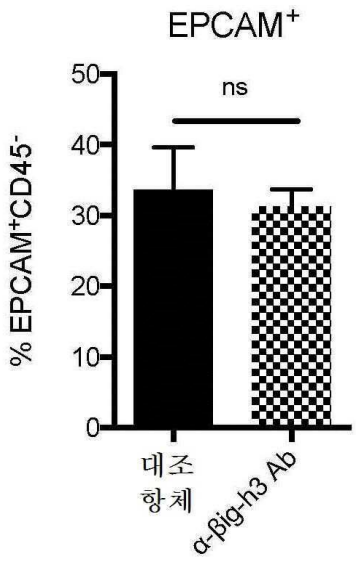
도면6d



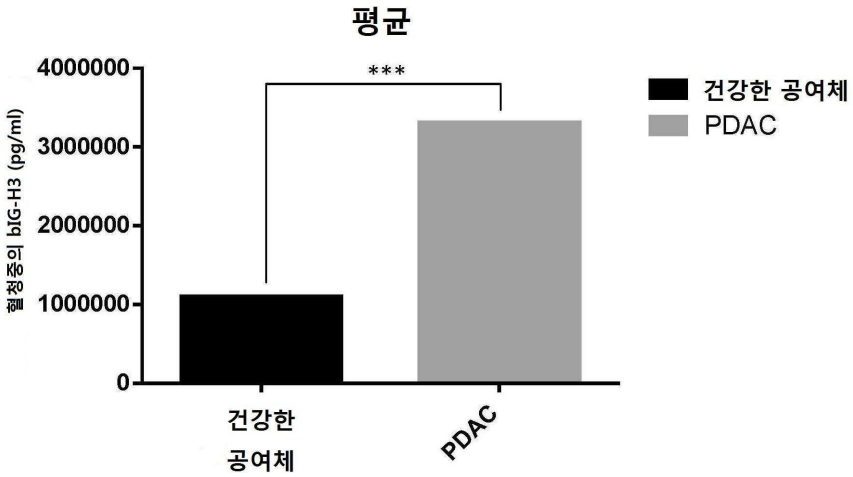
도면6e



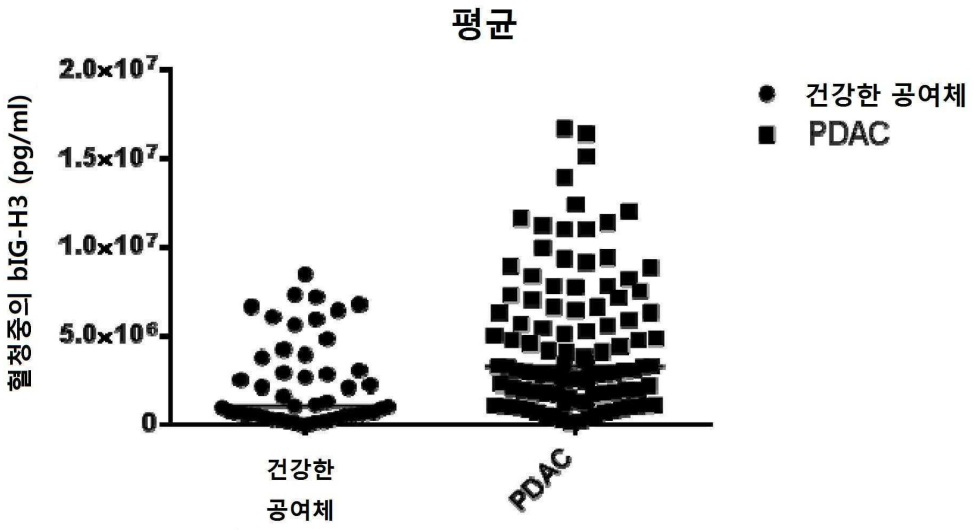
도면6f


EPCAM+
ns
% EPCAM+CD45-
50
40
30
20
10
0
대조
항체
α-βig-h3 Ab

도면7a


평균
***
혈청중의 bIG-H3 (pg/ml)
4000000
3000000
2000000
1000000
0
건강한
공여체
PDAC
건강한 공여체
PDAC

도면7b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE)
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
CENTRE LEON BERARD
KIST (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)

<120> EARLY AND NON INVASIVE METHOD FOR ASSESSING A SUBJECT'S RISK OF HAVING PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA AND METHODS OF TREATEMENT OF SUCH DISEASE

<130> IP20213983FR

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 683

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Leu Phe Val Arg Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ala Leu
1 5 10 15

Gly Pro Ala Ala Thr Leu Ala Gly Pro Ala Lys Ser Pro Tyr Gln Leu

20 25 30

Val Leu Gln His Ser Arg Leu Arg Gly Arg Gln His Gly Pro Asn Val

35 40 45

Cys Ala Val Gln Lys Val Ile Gly Thr Asn Arg Lys Tyr Phe Thr Asn

50 55 60

Cys Lys Gln Trp Tyr Gln Arg Lys Ile Cys Gly Lys Ser Thr Val Ile

65 70 75 80

Ser Tyr Glu Cys Cys Pro Gly Tyr Glu Lys Val Pro Gly Glu Lys Gly

85 90 95

Cys Pro Ala Ala Leu Pro Leu Ser Asn Leu Tyr Glu Thr Leu Gly Val

100 105 110

Val Gly Ser Thr Thr Thr Gln Leu Tyr Thr Asp Arg Thr Glu Lys Leu

115 120 125

Arg Pro Glu Met Glu Gly Pro Gly Ser Phe Thr Ile Phe Ala Pro Ser

130 135 140

Asn Glu Ala Trp Ala Ser Leu Pro Ala Glu Val Leu Asp Ser Leu Val

145 150 155 160

Ser Asn Val Asn Ile Glu Leu Leu Asn Ala Leu Arg Tyr His Met Val

165 170 175

Gly Arg Arg Val Leu Thr Asp Glu Leu Lys His Gly Met Thr Leu Thr

180 185 190

Ser Met Tyr Gln Asn Ser Asn Ile Gln Ile His His Tyr Pro Asn Gly

195 200 205

Ile Val Thr Val Asn Cys Ala Arg Leu Leu Lys Ala Asp His His Ala

210 215 220

Thr Asn Gly Val Val His Leu Ile Asp Lys Val Ile Ser Thr Ile Thr

225 230 235 240

Asn Asn Ile Gln Gln Ile Ile Glu Ile Glu Asp Thr Phe Glu Thr Leu

245 250 255

Arg Ala Ala Val Ala Ala Ser Gly Leu Asn Thr Met Leu Glu Gly Asn

260 265 270

Gly Gln Tyr Thr Leu Leu Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Glu Lys Ile
275 280 285
Pro Ser Glu Thr Leu Asn Arg Ile Leu Gly Asp Pro Glu Ala Leu Arg
290 295 300
Asp Leu Leu Asn Asn His Ile Leu Lys Ser Ala Met Cys Ala Glu Ala

305 310 315 320
Ile Val Ala Gly Leu Ser Val Glu Thr Leu Glu Gly Thr Thr Leu Glu
325 330 335
Val Gly Cys Ser Gly Asp Met Leu Thr Ile Asn Gly Lys Ala Ile Ile
340 345 350
Ser Asn Lys Asp Ile Leu Ala Thr Asn Gly Val Ile His Tyr Ile Asp
355 360 365
Glu Leu Leu Ile Pro Asp Ser Ala Lys Thr Leu Phe Glu Leu Ala Ala

370 375 380
Glu Ser Asp Val Ser Thr Ala Ile Asp Leu Phe Arg Gln Ala Gly Leu
385 390 395 400
Gly Asn His Leu Ser Gly Ser Glu Arg Leu Thr Leu Leu Ala Pro Leu
405 410 415
Asn Ser Val Phe Lys Asp Gly Thr Pro Pro Ile Asp Ala His Thr Arg
420 425 430
Asn Leu Leu Arg Asn His Ile Ile Lys Asp Gln Leu Ala Ser Lys Tyr

435 440 445
Leu Tyr His Gly Gln Thr Leu Glu Thr Leu Gly Gly Lys Lys Leu Arg
450 455 460
Val Phe Val Tyr Arg Asn Ser Leu Cys Ile Glu Asn Ser Cys Ile Ala
465 470 475 480
Ala His Asp Lys Arg Gly Arg Tyr Gly Thr Leu Phe Thr Met Asp Arg
485 490 495
Val Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp

500 505 510
Asn Arg Phe Ser Met Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr

515 520 525

Glu Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn

530 535 540

Glu Ala Phe Arg Ala Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly

545 550 555 560

Asp Ala Lys Glu Leu Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu

565 570 575

Ile Leu Val Ser Gly Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu

580 585 590

Gln Gly Asp Lys Leu Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val

595 600 605

Asn Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val

610 615 620

Val His Val Ile Thr Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn Arg Pro Gln

625 630 635 640

Glu Arg Gly Asp Glu Leu Ala Asp Ser Ala Leu Glu Ile Phe Lys Gln

645 650 655

Ala Ser Ala Phe Ser Arg Ala Ser Gln Arg Ser Val Arg Leu Ala Pro

660 665 670

Val Tyr Gln Lys Leu Leu Glu Arg Met Lys His

675 680

<210> 2

<211> 2805

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ctccttgcac gggccggccc agcttccccg cccctggcgt ccgctccctc ccgctcgcag 60

cttacttaac ctggcccggg cggcggaggc gctctcactt ccctggagcc gcccgcttgc 120

ccgtcggtcg ctagctcgct cggtgcgcgt cgtcccgctc catggcgctc ttcgtgcggc 180

tgctggctct cgccctggct ctggccctgg gccccgccgc gaccctggcg ggtcccgcca 240

agtcgcccta ccagctggtg ctgcagcaca gcaggctccg gggccgccag cacggcccca 300

acgtgtgtgc tgtgcagaag gttattggca ctaataggaa gtacttcacc aactgcaagc 360

agtggtacca aaggaaaatc tgtggcaaat caacagtcat cagctacgag tgctgtcctg 420

gatatgaaaa ggtccctggg gagaagggct gtccagcagc cctaccactc tcaaaccttt 480

acgagaccct gggagtcgtt ggatccacca ccactcagct gtacacggac cgcacggaga 540

agctgaggcc tgagatggag gggcccggca gcttcaccat cttcgcccct agcaacgagg 600

cctgggcctc cttgccagct gaagtgctgg actccctggt cagcaatgtc aacattgagc 660

tgctcaatgc cctccgctac catatggtgg gcaggcgagt cctgactgat gagctgaaac 720

acggcatgac cctcacctct atgtaccaga attccaacat ccagatccac cactatccta 780

atgggattgt aactgtgaac tgtgcccggc tgctgaaagc cgaccaccat gcaaccaacg 840

gggtggtgca cctcatcgat aaggtcatct ccaccatcac caacaacatc cagcagatca 900

ttgagatcga ggacaccttt gagacccttc gggctgctgt ggctgcatca gggctcaaca 960

cgatgcttga aggtaacggc cagtacacgc ttttggcccc gaccaatgag gccttcgaga 1020

agatccctag tgagactttg aaccgtatcc tgggcgaccc agaagccctg agagacctgc 1080

tgaacaacca catcttgaag tcagctatgt gtgctgaagc catcgttgcg gggctgtctg 1140

tagagaccct ggagggcacg acactggagg tgggctgcag cggggacatg ctcactatca 1200

acgggaaggc gatcatctcc aataaagaca tcctagccac caacggggtg atccactaca 1260

ttgatgagct actcatccca gactcagcca agacactatt tgaattggct gcagagtctg 1320

atgtgtccac agccattgac cttttcagac aagccggcct cggcaatcat ctctctggaa 1380

gtgagcggtt gaccctcctg gctcccctga attctgtatt caaagatgga acccctccaa 1440

ttgatgccca tacaaggaat ttgcttcgga accacataat taaagaccag ctggcctcta 1500

agtatctgta ccatggacag accctggaaa ctctgggcgg caaaaaactg agagtttttg 1560

tttatcgtaa tagcctctgc attgagaaca gctgcatcgc ggcccacgac aagaggggga 1620

ggtacgggac cctgttcacg atggaccggg tgctgacccc cccaatgggg actgtcatgg 1680

atgtcctgaa gggagacaat cgctttagca tgctggtagc tgccatccag tctgcaggac 1740

tgacggagac cctcaaccgg gaaggagtct acacagtctt tgctcccaca aatgaagcct 1800

tccgagccct gccaccaaga gaacggagca gactcttggg agatgccaag gaacttgcca 1860

acatcctgaa ataccacatt ggtgatgaaa tcctggttag cggaggcatc ggggccctgg 1920

tgcggctaaa gtctctccaa ggtgacaagc tggaagtcag cttgaaaaac aatgtggtga 1980

gtgtcaacaa ggagcctgtt gccgagcctg acatcatggc cacaaatggc gtggtccatg 2040

tcatcaccaa tgttctgcag cctccagcca acagacctca ggaaagaggg gatgaacttg 2100

cagactctgc gcttgagatc ttcaaacaag catcagcgtt ttccagggct tcccagaggt 2160

ctgtgcgact agcccctgtc tatcaaaagt tattagagag gatgaagcat tagcttgaag 2220

cactacagga ggaatgcacc acggcagctc tccgccaatt tctctcagat ttccacagag 2280

actgtttgaa tgttttcaaa accaagtatc acactttaat gtacatgggc cgcaccataa 2340

tgagatgtga gccttgtgca tgtgggggag gagggagaga gatgtacttt ttaaatcatg 2400

ttccccctaa acatggctgt taacccactg catgcagaaa cttggatgtc actgcctgac 2460

attcacttcc agagaggacc tatcccaaat gtggaattga ctgcctatgc caagtccctg 2520

gaaaaggagc ttcagtattg tggggctcat aaaacatgaa tcaagcaatc cagcctcatg 2580

ggaagtcctg gcacagtttt tgtaaagccc ttgcacagct ggagaaatgg catcattata 2640

agctatgagt tgaaatgttc tgtcaaatgt gtctcacatc tacacgtggc ttggaggctt 2700

ttatggggcc ctgtccaggt agaaaagaaa tggtatgtag agcttagatt tccctattgt 2760

gacagagcca tggtgtgttt gtaataataa aaccaaagaa acata 2805

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> TBPi Forward primer

<400> 3

tggtgtgcac aggagccaag 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<

213> Artificial

<220><223> TBPi Reverse primer

<400> 4

ttcacatcac agctccccac 20