



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년03월11일
(11) 등록번호 10-1602876
(24) 등록일자 2016년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/32 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/32 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0103214
(22) 출원일자 2015년07월21일
심사청구일자 2015년07월21일
(65) 공개번호 10-2016-0011599
(43) 공개일자 2016년02월01일
(30) 우선권주장
1020140092687 2014년07월22일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌
KR1020100053466 A*
KR1020100045683 A*
KR1020090008290 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
아주대학교산학협력단
경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)
재단법인 의약바이오컨버전스연구단
경기 수원시 영통구 광교로 145, 차세대융합기술
연구원내 B동 8층 (이의동)

(72) 발명자
김용성
경기도 수원시 팔달구 권광로 246, 110동 1703호
(인계동, 래미안노블클래스아파트)
최동기
경기도 수원시 장안구 경수대로976번길 22, 108동
1504호 (조원동, 수원 한일타운)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 21 항

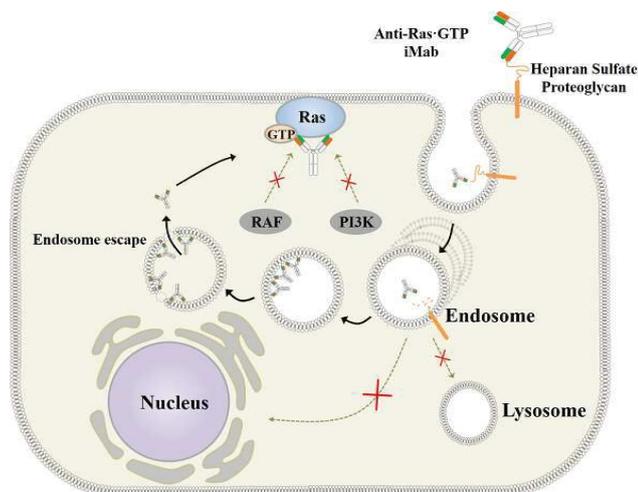
심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 **완전한 이뮤노글로불린 형태의 세포질 침투능을 갖는 항체를 이용하여 세포내 활성화된 RAS를 억제하는 방법 및 그의 이용**

(57) 요약

본 발명은 완전한 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 형태의 세포질 침투능을 갖는 항체를 이용하여 세포내 활성화된 RAS를 억제하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 완전한 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 형태의 항체가 살아있는 세포의 세포질을 세포내재화 및 엔도솜 탈출을 통해 능동적으로 침투하여 세포질 내 활성화된 RAS와 결 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



합하는 것을 유도하는 중쇄가변영역 (VH) 및 이를 포함하는 항체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 항체를 이용하여 암 또는 종양 세포의 성장을 억제시키는 방법 및 암 또는 종양을 치료하는 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 세포질 내 RAS에 특이적으로 결합하는 중쇄가변영역의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 항체에 융합된 펩타이드, 단백질, 소분자 약물, 나노입자 및 리포솜으로 이루어진 군으로부터 선택된 생체 활성분자에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 항체, 또는 이에 융합된 펩타이드, 단백질, 소분자 약물, 나노입자 및 리포솜으로 이루어진 군으로부터 선택된 생체활성분자를 포함하는, 암의 예방, 치료 또는 진단용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 경쇄가변영역 및 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.

본 발명에서 제공하는 완전한 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 형태의 세포질 침투능을 갖는 항체를 이용하여 세포내 활성화된 RAS를 억제하는 방법은 상기 항체가 살아있는 세포내부로 침투하여 세포질에 위치하고 있는 활성화된(GTP가 결합된) RAS를 특이적 인지가 가능한 항체에 의하여 달성되며, 이로써 살아있는 세포내부 세포질에 위치하고 있는 활성화된(GTP가 결합된) RAS를 표적 및 그 활성을 저해할 수 있다.

또한, 본 발명에서 제공하는 상기 항체의 경쇄가변영역 또는 이를 포함하는 항체는 특별한 외부 단백질 전달 시스템 없이 살아있는 세포내부로 침투하여 세포질에 분포할 수 있다. 특히, 본 발명에서 제공하는 항체의 경쇄가변영역은 다양한 인간 중쇄가변영역(VH)과의 상호작용 결합이 용이하면서 세포질 침투를 통해 세포질에 잔류 가능한 특성을 가지며, 상기 경쇄 가변 영역을 포함하는 완전 IgG 형태의 단일클론항체는 세포내부 침투 및 세포질에 분포하며, 세포에 비특이적 세포독성을 보이지 않는다.

본 발명에 따른 항체 중쇄가변영역, 이를 포함하는 항체는 기존 다양한 종양치료제의 주요 약물 저항성 관련 인자인 RAS 돌연변이를 선택적 저해가 가능하면서 기존 치료제와의 병행치료를 통해 효과적인 항암 활성을 기대할 수 있다. 본 발명에 따른 세포질 침투 완전한 이뮤노글로불린 형태의 항체를 이용하여 인간 항체 중쇄가변영역 (VH)이 가지는 항원 고특이성 및 고친화도에 영항하지 않으면서 세포내부로 침투 및 세포질에 잔류하는 특성을 부여할 수 있으며, 이를 통해 현재 소분자 약물을 이용한 질병 치료에 표적물질로 분류되고 있는 세포질 내에 존재하면서 단백질과 단백질 사이에 넓고 평평한 표면을 통해 구조복합성 상호작용을 이루는 종양 및 질환 관련 인자에 대한 치료 및 진단에 높은 효과를 기대할 수 있다.

(52) CPC특허분류

- A61K 47/48 (2013.01)
- C07K 16/46 (2013.01)
- C07K 2317/24 (2013.01)
- C07K 2317/56 (2013.01)

김성훈

서울특별시 강남구 남부순환로363길 30, 102동 1105호 (도곡동, 도곡쌍용예가)

(72) 발명자

신승민

서울특별시 성북구 오패산로 46, 121동 1902호 (하월곡동, 월곡두산위브아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013M3A6A4043874
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	글로벌프린티어사업 (혁신형의약바이오 컨버전스)
연구과제명	ARS 타겟 다기능 항체 개발
기여율	40/100
주관기관	아주대학교 산학협력단
연구기간	2013.09.01 ~ 2015.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2014M3C1A3051470
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	미래유망융합기술파이오니어사업
연구과제명	세포내 단백질 상호작용 제어 항체 기술
기여율	60/100
주관기관	아주대학교 산학협력단
연구기간	2014.09.15 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

완전한 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 형태의 세포질 침투능을 갖는 인간화 항체를 이용하여 세포질 내 GTP가 결합되어 활성화된 RAS (Ras-GTP)를 억제하는 방법으로서,

상기 항체는 세포질 내 활성화된 RAS에 특이적으로 결합하는 것으로,

상기 항체는 세포질 내 GTP가 결합되어 활성화된 RAS (Ras-GTP)에 특이적으로 결합하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하며,

상기 중쇄가변영역 (VH)는

- i) 서열번호 8의 CDR1, 서열번호 9의 CDR2 및 서열번호 10의 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역;
- ii) 서열번호 11의 CDR1, 서열번호 12의 CDR2 및 서열번호 13의 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역;
- iii) 서열번호 14의 CDR1, 서열번호 15의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역;
- iv) 서열번호 17의 CDR1, 서열번호 18의 CDR2 및 서열번호 19의 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역;
- v) 서열번호 20의 CDR1, 서열번호 21의 CDR2 및 서열번호 22의 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역;
- vi) 서열번호 23의 CDR1, 서열번호 24의 CDR2 및 서열번호 25의 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역; 및
- vii) 서열번호 26의 CDR1, 서열번호 27의 CDR2 및 서열번호 28의 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상이며,

상기 항체는 세포질 침투능을 가지는 경쇄가변영역 (VL)을 포함하며,

- (1) 상기 경쇄가변영역은 서열번호 32의 CDR1, 서열번호 33의 CDR2, 및 서열번호 34의 CDR3를 포함하거나;
- (2) 상기 경쇄가변영역은 서열번호 38의 CDR1, 서열번호 39의 CDR2, 및 서열번호 40의 CDR3를 포함하며,

상기 (1) 또는 (2)의 경쇄가변영역은 N 말단으로부터 2번째 및 4번째 아미노산에 각각 류신 (leucine, L) 및 메티오닌 (Methionine, M)을 포함하는 것인, 방법.

(단, 상기 아미노산 위치는 카바트 (Kabat) 번호에 따름.)

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서 상기 항체는 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 세포질 내 GTP가 결합되어 활성화된 RAS (Ras-GTP)는 야생형 또는 돌연변이형인 것인, 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 중쇄가변영역 (VH)은 서열번호 1 내지 7로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 것인, 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 살아있는 세포에 능동적으로 침투하는 것인, 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 세포질 침투능은 세포 내재화를 통해 세포내로 침투한 후 엔도솜 탈출에 의한 것인, 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역은 경쇄 가변 영역의 N 말단으로부터 9, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 22, 42, 45, 58, 60, 79, 및 85번째 아미노산에 각각

세린 (serine, S), 세린 (serine, S), 알라닌 (Alanine, A), 발린 (Valine, V), 아스파르트 산 (aspartic acid, D), 발린 (Valine, V), 이소류신 (Isoleucine, I), 트리오닌 (Threonine, T), 라이신 (Lysine, K), 라이신 (Lysine, K), 발린 (Valine, V), 세린 (serine, S), 글루타민 (Glutamine, Q) 및 트리오닌 (Threonine, T)을 포함하는 것인, 방법.

(단, 상기 아미노산 위치는 카바트 (Kabat) 번호에 따름.)

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역은 경쇄 가변 영역의 N 말단으로부터 89 번째 및 91번째 아미노산에 각각 글루타민 (Glutamine, Q) 및 타이로신 (Tyrosine, Y)을 포함하는 것인, 방법.

(단, 상기 아미노산 위치는 카바트 (Kabat) 번호에 따름.)

청구항 15

청구항 1에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 29, 30, 및 31으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 것인, 방법.

청구항 16

청구항 1에 있어서, 상기 항체와 세포질 내 GTP가 결합되어 활성화된 RAS (Ras-GTP)의 결합은 세포내에서 B-Raf, C-Raf 또는 PI3K와 GTP가 결합되어 활성화된 RAS (Ras-GTP)의 결합을 억제하는 것인, 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

완전한 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 형태의 인간화 항체가 세포질을 침투하여 세포질 내 GTP가 결합되어 활성화된 RAS (Ras-GTP)와 결합하는 것을 유도하는 중쇄가변영역 (VH) 및, 세포질 침투능을 가지는 경쇄가변영역 (VL)을 포함하는 항체로서,

상기 중쇄가변영역 (VH)는

- i) 서열번호 8의 CDR1, 서열번호 9의 CDR2 및 서열번호 10의 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역;
- ii) 서열번호 11의 CDR1, 서열번호 12의 CDR2 및 서열번호 13의 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역;
- iii) 서열번호 14의 CDR1, 서열번호 15의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역;
- iv) 서열번호 17의 CDR1, 서열번호 18의 CDR2 및 서열번호 19의 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역;
- v) 서열번호 20의 CDR1, 서열번호 21의 CDR2 및 서열번호 22의 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역;
- vi) 서열번호 23의 CDR1, 서열번호 24의 CDR2 및 서열번호 25의 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역; 및
- vii) 서열번호 26의 CDR1, 서열번호 27의 CDR2 및 서열번호 28의 CDR3를 포함하는 중쇄가변영역으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 중쇄가변영역이며,

(1) 상기 경쇄가변영역은 서열번호 32의 CDR1, 서열번호 33의 CDR2, 및 서열번호 34의 CDR3를 포함하거나;

(2) 상기 경쇄가변영역은 서열번호 38의 CDR1, 서열번호 39의 CDR2, 및 서열번호 40의 CDR3를 포함하며,

상기 (1) 또는 (2)의 경쇄가변영역은 N 말단으로부터 2번째 및 4번째 아미노산에 각각 류신 (leucine, L) 및 메티오닌 (Methionine, M) 을 포함하는 것인, 항체.

(단, 상기 아미노산 위치는 카바트 (Kabat) 번호에 따름.)

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 항체는 살아있는 세포에 능동적으로 침투하여 세포질 내 GTP가 결합되어 활성화된 RAS (Ras-GTP)에 특이적으로 결합하는 것인, 항체.

청구항 22

삭제

청구항 23

청구항 20에 있어서, 상기 항체는 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 항체.

청구항 24

삭제

청구항 25

청구항 20에 있어서, 상기 세포질 침투능은 세포 내재화를 통해 세포내로 침투한 후 엔도솜 탈출에 의한 것인, 항체.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

청구항 20에 있어서, 상기 경쇄가변영역은 경쇄 가변 영역의 N 말단으로부터 9, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 22, 42, 45, 58, 60, 79, 및 85번째 아미노산에 각각

세린 (serine, S), 세린 (serine, S), 알라닌 (Alanine, A), 발린 (Valine, V), 아스파르트 산 (aspartic acid, D), 발린 (Valine, V), 이소류신 (Isoleucine, I), 트리오닌 (Threonine, T), 라이신 (Lysine, K), 라이신 (Lysine, K), 발린 (Valine, V), 세린 (serine, S), 글루타민 (Glutamine, Q) 및 트리오닌 (Threonine, T)을 포함하는 것인, 항체.

(단, 상기 아미노산 위치는 카바트 (Kabat) 번호에 따름.)

청구항 29

청구항 20에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역은 경쇄 가변 영역의 N 말단으로부터 89 번째 및 91번째 아미노산에 각각 글루타민 (Glutamine, Q) 및 타이로신 (Tyrosine, Y)을 포함하는 것인, 항체.

(단, 상기 아미노산 위치는 카바트 (Kabat) 번호에 따름.)

청구항 30

청구항 20에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 29, 30, 및 31으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 것인, 항체.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

청구항 20의 항체와 펩타이드, 단백질, 소분자 약물, 나노입자 및 리포솜으로 이루어진 군으로부터 선택된 생체 활성분자가 융합된 접합체.

청구항 36

청구항 35에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 41로 이루어진 RGD4C 또는 서열번호 42로 이루어진 RGD10인 것인, 접합체.

청구항 37

청구항 20의 항체, 또는 상기 항체와 펩타이드, 단백질, 소분자 약물, 나노입자 및 리포솜으로 이루어진 군으로부터 선택된 생체활성분자가 융합된 접합체를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 38

청구항 20의 항체, 또는 상기 항체와 펩타이드, 단백질, 소분자 약물, 나노입자 및 리포솜으로 이루어진 군으로부터 선택된 생체활성분자가 융합된 접합체를 포함하는, 암의 진단용 조성물.

청구항 39

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 완전한 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 형태의 세포질 침투능을 갖는 항체를 이용하여 세포내 활성화된(GTP가 결합된) RAS를 억제하는 방법에 관한 것이다.
- [0002] 또한, 본 발명은 완전한 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 형태의 항체가 세포질을 침투하여 세포질 내 활성화된 RAS와 결합하는 것을 유도하는 중쇄가변영역 (VH) 및 이를 포함하는 항체에 관한 것이다.
- [0003] 또한, 본 발명은 상기 항체를 이용하여 암 또는 종양 세포의 성장을 억제시키는 방법 및 암 또는 종양을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0004] 또한 본 발명은 세포질 내 RAS에 특이적으로 결합하는 중쇄가변영역의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0005] 또한, 본 발명은 상기 항체에 융합된 펩타이드, 단백질, 소분자 약물, 나노입자 및 리포솜으로 이루어진 군으로부터 선택된 생체활성분자에 관한 것이다.
- [0006] 또한, 본 발명은 상기 항체, 또는 이에 융합된 펩타이드, 단백질, 소분자 약물, 나노입자 및 리포솜으로 이루어진 군으로부터 선택된 생체활성분자를 포함하는, 암의 예방, 치료 또는 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0007] 또한, 본 발명은 상기 경쇄가변영역 및 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.

배경 기술

- [0008] 완전한 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 형태의 항체는 중쇄(heavy chain, 50 kDa) 단백질 2개와 경쇄(light chain, 25 kDa) 단백질 2개로 만들어진 Y자 모양의 매우 안정된 구조(분자량, 150 kDa)를 형성하고 있다. 항체의 경쇄와 중쇄는 아미노산 서열이 항체들마다 서로 다른 가변영역(variable region)과 아미노산 서열이 같은 불변영역(constant region)으로 나뉘어져 있으며, 중쇄 불변영역에는 CH1, hinge, CH2, CH3 도메인이 존재하고, 경쇄불변영역에는 C κ 또는 C λ 도메인이 존재한다. 항체의 중쇄 및 경쇄 가변영역 안에는 항체마다 아미노산 서열이 특히 다른 부분이 있는데, 항원과 결합하는 부위를 구성하고 있기 때문에 상보성 결정 영역(complementarity determining regions, CDRs)이라고도 부른다. 항체의 입체 구조를 살펴보면, 이들 CDRs은 항체의 표면에서 고리(loop) 모양을 하고 있고 고리 아래에는 이를 구조적으로 지지해주는 FR(framework region)이 존재한다. 중쇄와 경쇄에는 각각 세 개씩의 고리구조가 존재하며, 이들 여섯 개의 고리 지역 구조는 서로 합쳐져서 항원과 직접적으로 접촉하고 있다. 항체의 중쇄 불변영역(Fc)은 FcRn(neonatal Fc receptor)과의 결합을 통해 혈액 내 긴 반감기를 보장하며 이 특징으로 소분자 약물과 다르게 체내에서 장시간 동안 지속될 수 있다. 또한 Fc γ R(Fc gamma receptor)등과의 결합을 통해 항체-의존성 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity) 및 보체-의존성 세포독성(complement-dependent cellular cytotoxicity)을 통해 표지물질을 과발현하는 세포에 대한 특이적 세포사멸 유도가 가능하다. 최근 인간의 여러 질병에 대한 치료목적으로 여러 종에서 개발된 항체의 경우, 면역원성을 극복하기 위해 인간항체 FR(framework)(framework)로 CDR-grafting 하는 방법 등 다양한 인간화 방법을 통해서 향상된 치료 효과를 기대할 수 있다.
- [0009] 기존 항체는 큰 사이즈와 친수성 특징으로 살아있는 세포내부로 직접 침투하지 못한다. 따라서, 기존의 대부분의 항체는 세포외로 분비된 단백질 또는 세포막 단백질을 특이적으로 표적하고 있다 (Kim SJ et al., 2005). 일반적 항체와 고분자 바이오 의약품은 소수성인 세포막 통과가 불가능하여 세포질 내부의 다양한 질병관련 물질과 결합 및 저해하지 못하는 한계가 있다. 일반적으로 세포의 성장, 특이적 억제등과 같은 기작연구를 위한 실험에서 사용되는 세포내부 물질과 특이적 결합하는 상업적 항체들은 살아있는 세포에 대해서 직접 처리하지 못하고, 세포내부 물질과 결합하기 위해서는 양친매성 글리코사이드인 사포닌(saponin)을 이용한 세포막 투과화(permeabilization)과정을 통해 세포막에 천공을 형성하기 위한 전처리 과정이 반드시 필요하다. 저분자 물질, 핵산 또는 나노입자 등의 경우 다양한 시약, 전기천공법 또는 열충격 등의 방법을 사용하여 살아있는 세포내부로 수송이 가능하지만, 단백질 및 항체의 경우 상기한 대부분의 시약과 실험조건 등이 고유한 3차 구조에 악영향을 미쳐 활성을 소실할 수 있다. 세포내부 단백질을 특이적 결합하고, 활성을 저해하는 세포내 항체(intracellular antibody, intrabody)가 개발되고 있지만, 이 또한 살아있는 세포의 세포막을 침투하는 활성이

없어 유전자 치료(gene therapy)용도로만 적용이 가능하여 향후 응용가능성이 매우 제한된다 (Manikandan J et al., 2007).

[0010] 상기와 같이 완전 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 항체를 포함한 다양한 형태의 항체절편, 재조합단백질 등 고분자 물질과는 반대로 소분자 물질의 경우, 작은 크기와 소수성(hydrophobic)의 특징을 이용하여 효과적으로 살아있는 세포내부로 침투가 용이하다. 하지만 소분자 약물은 세포내부의 다양한 질환관련 물질에 대해서 특이적 결합을 하기 위해 표적물질 표면에 소수성 포켓(hydrophobic pocket)이 필요하며, 이러한 소수성 포켓을 가지는 표적물질은 세포내부의 전체 질환관련 물질의 약 10 % 내외이기 때문에 대부분의 세포내부의 병원성 단백질을 특이적으로 표적하지 못한다 (Imai K et al., 2006).

[0011] 암을 포함한 여러 질환들에서 세포내 단백질-단백질 상호작용(protein-protein interaction, PPI)에 중요한 역할을 하는 효소 또는 전사, 신호전달 관련 여러 단백질의 돌연변이 및 비정상적 과발현되는 현상이 발생한다. 특히 이러한 단백질 중 넓고 평평한 표면을 통해 구조복합성 상호작용을 이루고 있는 질환관련 물질에 대해서는 상기 기술한 바와 같이 소분자 약물에 의한 특이적 저해가 어렵다 (Blundell et al., 2006). 한 예로, 현재 효과적인 치료물질이 없는 세포질 중요 종양 관련 인자 중 하나인 RAS는 세포막 수용체를 통해 세포 외부의 신호를 세포 내 신호전달 체계로 전달하는 분자적 스위치(molecular switch)역할을 하며, 인간 암의 약 30 %, 주로 대장암과 췌장암에서 세포내에 발암관련 돌연변이체로 인한 상시 활성화되어 있으며, 이러한 발암관련 돌연변이는 기존의 항암치료에 대한 강한 내성을 부여하여 주요한 종양관련인자로 알려져 있다 (Scheffzek K et al., 1997).

[0012] 현재 기술적 한계를 극복하기 위해 단백질-단백질 상호작용을 효과적으로 저해할 수 있는 항체절편 또는 재조합 단백질 같은 고분자 물질을 살아있는 세포내부로 침투능을 부여하기 위한 다양한 연구가 이루어졌는데, 염기성 아미노산 서열 및 소수성(hydrophobic), 양친매성(amphipathic)의 특성을 갖는 단백질 투과 도메인(Protein Transduction Domain, PTD)들이 살아있는 세포에 대해서 세포침투능을 갖는 것으로 밝혀졌으며 (Leena N et al., 2007), 이를 이용한 세포내부 특정 단백질을 인식하기 위해 투과 도메인을 유전공학적으로 다양한 형태의 항체절편과 융합하는 시도가 많이 진행되었다. 하지만 융합단백질의 경우, 대부분 동물세포에서 분비가 되지 않거나 굉장히 소량만 상등액으로 유출되며 (NaKajima O et al., 2004), 아르기닌이 풍부한 단백질 투과 도메인과의 융합단백질은 숙주의 푸린 프로테아제(Furin protease)에 취약하다는 생산적 문제를 지니고 있다 (Chauhan A et al., 2007). 또한 융합단백질의 세포내부로 침투 효율이 좋지 못하여 치료용 항체로의 개발이 어려운 문제가 있다 (Falnes P et al., 2001). 발현 문제를 극복하기 위해 단백질을 정제한 이후 세포 투과 도메인을 화학적 공유 결합 또는 바이오틴-스트렙토비딘(biotin-streptavidin) 등의 결합 등을 통해 융합하는 연구가 진행되고 있으나 해당 단백질의 구조에 변형을 초래하고 있다.

[0013] 그 밖에 일부 자가항체를 이용한 연구에서 항체 및 단쇄가변영역(scFv) 항체절편이 세포 내재화를 통해 세포 내부로 침투가 가능하다는 보고가 있다. 자가항체(autoantibody)는 자가면역 질환을 가진 사람과 마우스에서 주로 발견되는 항-DNA항체(anti-DNA antibody)이며 이 중 일부는 살아있는 세포에 대해서 세포내부로 침투하는 특성을 갖는다 (Michael R et al., 1995; Michael P et al., 1996; Jeske Zack D et al., 1996). 현재까지 보고된 세포침투 자가항체들은 대부분 세포 내부로 유입된 후에 핵에 위치하며, 핵에서 활성을 보이는 특정 단백질과의 융합을 통해 효과를 보기 위한 연구가 활발히 진행 중이다 (Weisbart et al., 2012). 하지만 자가항체를 이용한 살아있는 세포에 대한 세포침투는 최종적으로 핵에 위치하여 세포내부의 세포질에 있는 다양한 질환관련 물질을 특이적 결합 및 활성을 저해할 수 없는 한계를 지니고 있다.

[0014] 자연계 고분자 물질 중에서 세포내부로 침투하는 특성을 갖는 대표물질로 바이러스(HIV, HSV), 독소(콜레라톡신, 디프테리아톡신)가 있다. 이들은 능동적 세포내부 수송기작인 세포내재화(Endocytosis) 의해 세포내로 침투한다고 알려져 있다. 이러한 세포내재화는 크게 세가지 경로로 분류되며, 리간드 결합에 의한 수용체의 세포 내재화에 관여하는 clathrin에 의한 내포작용 또는 콜레라톡신 등과 같은 일부 독소에서 확인되는 caveolae에 의한 내포작용, 텍스트란, 에볼라바이러스 등에서 확인되는 macropinocytosis가 있다. Clathrin과 caveolae가 관여하는 내포작용은 주로 막에 분포하는 수용체가 특정 리간드와 결합되면서 시작된다. Clathrin은 세포막 안쪽 표면에 위치하는데, 물질이 수용체와 결합하면 clathrin 단백질이 섬유질 껍질을 만들어 소포를 형성하고 소포가 세포질 안으로 이동하게 된다. Caveolae는 caveolin-1 단백질이 작용하여 올리고머를 형성하면서 caveosome이라는 안정한 구조의 소포를 만들어 세포질 안으로 이동하게 된다. Macropinocytosis는 세포막 일부분이 돌출되어 물질을 감싸 macropinosome을 형성하여 세포질 안으로 이동하게 된다 (Gerber et al., 2013). 이러한 세포내재화 경로를 통해 세포질 침투한 물질들은 추가적인 엔도솜 탈출 기작이 없을 경우, 대부분 라이

소중 경로를 통해 분해된다.

- [0015] 상기와 같은 라이소좀 경로를 통해 분해되는 것을 피하기 위해 바이러스, 독소 등은 엔도솜(endosome)에서 세포질로 탈출하는 기작을 가지고 있다. 아직까지 엔도솜 탈출 기작(endosomal escape)에 대한 명확히 밝혀져 있지 않지만 현재까지 엔도솜 탈출 기작에 대한 가설로는 크게 3가지가 있다. 첫 번째 가설은 엔도솜 막에 구멍을 형성하는 기작으로서 엔도솜막에 양이온 양친매성 펩타이드(Cationic amphiphilic peptides)와 같은 물질이 음전하의 세포 이중 지질막에 결합하여 내부 응력(internal stress) 또는 내막 수축을 일으켜 결과적으로 원통형의 구멍(barrel-stave pore) 또는 도넛형의 통로(toroidal channel)를 형성한다는 것이며 (Jenssen et al., 2006), 두 번째 가설은 양성자 스펀지 효과에 의하여 엔도솜이 터지는 기작으로 양성자와 아민기(protonated amine group)에 의해 아민기를 가진 물질이 높은 완충 효과를 통해 엔도솜의 삼투압 증가로 엔도솜막이 붕괴될 수 있다는 것이다 (Lin and Engbersen, 2008). 세 번째로는, 중성에서 친수성 코일 모양 유지하지만 엔도솜과 같은 산성에서는 소수성 나선형 구조로 변형되는 특정 모티프가 엔도솜막과의 융합을 통해 엔도솜을 탈출한다는 가설이 있다 (Horth et al., 1991). 하지만 위 가설로 현재까지 자연계에 존재하는 다양한 물질에 대한 엔도솜 탈출기작을 증명하기 위한 연구결과가 부족하다.
- [0016] 따라서 본 발명자는 중쇄가변영역(VH) 라이브러리를 구축을 통해 활성화된 RAS에 대해서 특이적 결합능을 가지는 중쇄가변영역(VH)를 선별하였고, 이를 살아있는 세포내부로 침투 및 세포질에 분포하는 특징을 갖는 인간화 경쇄가변영역(VL)을 갖는 경쇄와 동시발현하여 완전한 이뮤노글로불린 형태의 항체를 구축함으로써, 살아있는 세포의 내부 침투하여 세포질에 있는 활성화된 RAS에 특이적으로 결합하는 완전한 이뮤노글로불린형태의 항-RAS 세포질 침투 항체를 제작하였다.
- [0017] 또한, 본 발명자는 살아있는 세포내부로 침투 및 세포질에 분포하는 완전한 이뮤노글로불린 형태의 항체를 발굴하기 위해 세포내부로 침투 및 세포질에 분포하는 인간화 경쇄가변영역(VL) 단일도메인을 개발하였다. 또한, 안정적인 완전한 이뮤노글로불린형태의 단일클론항체 구축을 위하여, 세포질 침투능을 갖는 경쇄가변영역 단일도메인(VL) 항체질편을 다양한 인간 중쇄가변영역(VH)와 상호작용 결합이 용이하면서 세포내부로 침투 및 세포질에 분포하는 활성을 유지하도록 개량하여, 세포내부로 침투 및 세포질에 분포하는 완전한 이뮤노글로불린 형태의 단일클론항체 개발했다.
- [0018] 더욱이, 본 발명자는 상기 항-RAS 세포질 침투 단일클론항체가 다양한 RAS 돌연변이 의존적 암세포주의 내부로 침투하여, 세포질에 있는 RAS 돌연변이 특이적 중화에 의한 세포성장 저해를 보임을 확인하였으며, 상기 항체가 종양조직특이성을 부여하기 위한 펩타이드를 융합한 형태에서도 세포질 침투 및 활성화된 RAS 중화능에 대한 악영향없이, RAS 돌연변이 의존적 종양에서 활성화된 RAS를 특이적 억제시키는 활성을 발휘함을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0019] 따라서, 본 발명의 일 양상은 완전한 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 형태의 세포질 침투능을 갖는 항체를 이용하여 세포내 활성화된 RAS를 억제하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0020] 또한, 본 발명의 일 양상은 완전한 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 형태의 항체가 세포질을 침투하여 세포질내 활성화된 RAS와 결합하는 것을 유도하는 중쇄가변영역 (VH) 및 이를 포함하는 항체를 제공하는 것이다.
- [0021] 또한, 본 발명의 일 양상은 상기 항체를 이용하여 암 또는 종양 세포의 성장을 억제시키는 방법 및 암 또는 종양을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0022] 또한 본 발명의 일 양상은 세포질 내 RAS에 특이적으로 결합하는 중쇄가변영역의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0023] 또한, 본 발명의 일 양상은 상기 항체에 융합된 펩타이드, 단백질, 소분자 약물, 나노입자 및 리포솜으로 이루어진 군으로부터 선택된 생체활성분자를 제공하는 것이다.
- [0024] 또한, 본 발명의 일 양상은 상기 항체, 또는 이에 융합된 펩타이드, 단백질, 소분자 약물, 나노입자 및 리포솜

으로 이루어진 군으로부터 선택된 생체활성분자를 포함하는, 암의 예방, 치료 또는 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0025] 또한, 본 발명의 일 양상은 상기 경쇄가변영역 및 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0026] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 살아있는 세포에 세포내제화(endocytosis) 및 엔도솜 탈출(endosome escape) 통해 능동적으로 세포질로 침투하는 완전한 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 형태의 세포질 침투 항체를 이용하여 세포내 활성화된 RAS를 억제하는 방법으로서, 상기 항체는 세포질 내 활성화된 RAS에 특이적으로 결합하는 것인, 방법을 제공한다.

[0027] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0028] 본 발명의 상기 방법은 완전한 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 형태의 항체가 세포질을 침투하여 세포질 내 활성화된 RAS와 결합하는 것을 유도하는 중쇄 가변영역 (VH)에 의하여, 세포내 활성화된 RAS를 억제하도록 한다.

[0029] 완전한 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 형태의 항체에 살아있는 세포막을 세포내제화를 통해 침투 후 엔도솜 탈출하여 세포질에 위치하도록 유도할 수 있는 경쇄가변영역 (VL)에 의하여, 완전한 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 형태의 항체가 세포막을 침투하여 세포질에 위치할 수 있다.

[0030] 즉, 본 발명의 상기 방법은 항체가 세포질을 투과하여 세포질에 위치하고 있는 활성화된(GTP)가 결합된 종양관련인자 RAS에 특이적 결합 및 활성을 저해하도록 유도하는 방법을 제공한다.

[0031] 상기 항체는 키메라, 인간, 또는 인간화된 항체일 수 있다.

[0032] 또한, 상기 항체는 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE일 수 있으며, 예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgE, IgA1, IgA5, 또는 IgD 타입일 수 있으며, 가장 바람직하게는 IgG 타입의 단일클론항체일 수 있다.

[0033] 완전한 이뮤노글로불린 형태의 항체는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합(disulfide bond, SS-bond) 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나뉘어지며, 중쇄 불변 영역은 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 불변 영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.

[0034] "중쇄(heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VH 및 3 개의 불변 영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3를 포함하는 전장 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다. 또한, 용어 "경쇄(light chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VL 및 불변 영역 도메인 CL을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.

[0035] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 항체는 세포질 내 활성화된 RAS를 표적하여 특이적으로 결합하는 것일 수 있다. 상기 활성화된 RAS는 GTP가 결합된 종양관련인자로서, 상기 RAS는 돌연변이 형태일 수 있다. 상기 RAS의 돌연변이는 질환과 관계되는 다양한 형태로 그 종류에 제한이 없으나, 예를 들면, KRas, HRas, NRas 의 12번 Glycine, 13번 Glycine, 61번 glutamine 잔기의 치환된 돌연변이들일 수 있다.

[0036] 상기와 같은 완전한 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 형태의 항체와 세포내 활성화된 RAS와의 결합은 세포질 내의 활성화된 RAS에 특이적으로 결합하는 중쇄 가변 영역 (VH)에 의한 것이다.

[0037] 본 발명의 일 양상에서, 세포질 내의 활성화된 RAS에 특이적으로 결합하는 중쇄 가변 영역 (VH)은

[0038] 서열번호 8, 11, 14, 17, 20, 23, 및 26으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 CDR1또는 이와 상동성이 90% 이상인 서열;

[0039] 서열번호 9, 12, 15, 18, 21, 24, 및 27로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 CDR2 또는 이와 상동성이 90% 이상인 서열; 및

[0040] 서열번호 10, 13, 16, 19, 22, 25, 및 28로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 CDR3 또는 이와 상동성이 90% 이상인 서열; 을 포함하는 것 일 수 있다.

[0041] 상기 서열번호의 서열정보는 하기와 같다.

중쇄가변영역 명칭	CDR1 서열	서열번호	CDR2 서열	서열번호	CDR3 서열	서열번호
Kabat No.	31 32 33 34 35		50 51 52 52a 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65		95 96 97 98 99 100 100a 101 102	
RT4	S Y A M S	8	T I S R S G H S T Y Y A D S V K G	9	R F G S I V F D Y	10
RT11	S Y S M S	11	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	12	G F F - - - M D Y	13
RT13	T F S M S	14	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	15	G T F G - - F D Y	16
RT14	T F S M S	17	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	18	P R G W - - F D Y	19
RT15	T F S M S	20	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	21	R F G S - - F D Y	22
RT16	T F S M S	23	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	24	S S G R F V F D Y	25
RT17	T F S M S	26	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	27	G R F G S V F D Y	28

[0042]

[0043] 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명의 중쇄가변영역은 서열번호 8의 CDR1, 서열번호 9의 CDR2, 및 서열번호 10의 CDR3를 포함한 것일 수 있다.

[0044] 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명의 중쇄가변영역은 서열번호 11의 CDR1, 서열번호 12의 CDR2, 및 서열번호 13의 CDR3를 포함한 것일 수 있다.

[0045] 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명의 중쇄가변영역은 서열번호 14의 CDR1, 서열번호 15의 CDR2, 및 서열번호 16의 CDR3를 포함한 것일 수 있다.

[0046] 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명의 중쇄가변영역은 서열번호 17의 CDR1, 서열번호 18의 CDR2, 및 서열번호 19의 CDR3를 포함한 것일 수 있다.

[0047] 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명의 중쇄가변영역은 서열번호 20의 CDR1, 서열번호 21의 CDR2, 및 서열번호 22의 CDR3를 포함한 것일 수 있다.

[0048] 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명의 중쇄가변영역은 서열번호 23의 CDR1, 서열번호 24의 CDR2, 및 서열번호 25의 CDR3를 포함한 것일 수 있다.

[0049] 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명의 중쇄가변영역은 서열번호 26의 CDR1, 서열번호 27의 CDR2, 및 서열번호 28의 CDR3를 포함한 것일 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명의 바람직한 구체예에서 상기 중쇄가변영역 (VH)은 서열번호 1 내지 7로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다.

[0051] 상기 서열번호의 서열정보는 하기와 같다.

중쇄가변영역 명칭	서열	서열번호
RT4	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSYMSWVRQAPGKLEWVSTISRSGHSTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRFGSIVFOYWGQGLTVTVSS	서열번호1
RT11	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSYMSWVRQAPGKLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFF---MDYWGQGLTVTVSS	서열번호2
RT13	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSTFSMSWVRQAPGKLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTFG---FDYWGQGLTVTVSS	서열번호3
RT14	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSTFSMSWVRQAPGKLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGW---FDYWGQGLTVTVSS	서열번호4
RT15	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSTFSMSWVRQAPGKLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRFGS---FDYWGQGLTVTVSS	서열번호5
RT16	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSTFSMSWVRQAPGKLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSGRFVFDYWGQGLTVTVSS	서열번호6
RT17	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSTFSMSWVRQAPGKLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRFGSVFDYWGQGLTVTVSS	서열번호7

[0052]

상기 RAS에 특이적으로 결합 및 저해하는 중쇄가변영역은 하기와 같은 방법에 의하여 스크리닝 하였다.

[0053]

본 발명의 일 구체예에서는 구축되어진 인간 중쇄가변영역(VH)과 중쇄불변영역(CH1)이 융합되어 있는 상태로 CDR1, CDR2, CDR3 지역에 총 18개 잔기에 대해서 인위적인 돌연변이가 유도된 라이브러리를 이용하여 선별하였다.

[0054]

[0055]

또한 본 발명의 일 구체예에서는 상기 인간 중쇄가변영역(VH)과 중쇄불변영역(CH1)이 융합되어 있는 라이브러리를 이용하여 세포질 침투 인간화 경쇄가변영역(VL)과 결합된 상태에서도 활성화된(GTP가 결합된) RAS에 대해서 특이적으로 결합이 가능한 중쇄가변영역을 선별하였다.

[0056]

본 발명의 일 구체예에서는 표적분자로서 활성화된(GTP가 결합된) RAS 돌연변이체인 KRas G12D를 사용하였다. 본 발명의 일 구체예에 있어서 발암관련 RAS 돌연변이는 주로 12번, 13번, 61번 잔기에서 발생하며, 12번, 13번 잔기는 RAS 단백질의 P-loop에 위치하고 있으며, RAS 단백질과 결합해 있는 GTP를 가수분해하여 비활성화된 형태로 단백질 구조 변화를 유도하는 GAP(GTPase-activating protein)의 결합에 영향을 준다. 또한 61번 잔기는 GAP의 가수분해 활성 부위와 결합하여 GTP가수분해를 막는 역할을 하므로 다양한 발암관련 RAS 돌연변이는 RAS G12D 돌연변이와 신호전달에 관련된 지역(Switch I, Switch II)이 같으므로 K-RAS G12D 돌연변이에 한정되지 아니한다.

[0057]

또한, 상기 일 구체예에 있어서 NRas, HRas는 KRas와 G도메인이라고 불리는 촉매도메인(catalytic domain) 1번 부터 165번 잔기까지의 유사도가 85 %이상이며, 이중 하위 신호물질과 결합하는 부위 Switch I(32번 내지 38번), Switch II(59번 내지 67번) 도메인은 100 %일치한다. 다만, 165번부터 189번까지의 C-말단 초가변형 부위는 15 %의 유사도를 지니고 있으나 구조적으로 하위 신호전달에 영향을 주지 않으므로 표적분자로 사용한 활성화된 KRas G12D에 한정되지 아니한다.

[0058]

본 발명의 일 구체예에 있어서 효모세포표면발현 시스템을 이용하여 중쇄가변영역(VH)과 중쇄불변영역(CH1)이 발현된 상태에서 활성화된(GTP가 결합된) RAS에 대해서 초기 선별 이후 세포질 침투 경쇄가변영역(VL)과 경쇄불변영역(CL)을 포함하는 경쇄를 발현 및 분리하는 효모와 효모접합을 통해 이 결합된 Fab형태로 선별하였다.

- [0059] 본 발명의 일 구체예에서 상기 항체는 살아있는 세포에 능동적으로 침투할 수 있으며, 이러한 세포질 침투능은 세포내 내재화(endocytosis)를 통해 세포내로 침투한 후 엔도솜 탈출(endosome escape)에 의할 수 있다.
- [0060] 상기와 같은 세포질 침투능은 항체가 세포질 침투능을 가지는 경쇄가변영역 (VL)를 포함함으로써 발휘될 수 있다.
- [0061] 본 발명의 일 구체예에서 상기 경쇄 가변영역은
- [0062] 서열번호 32, 35, 및 38로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 CDR1 또는 이와 상동성이 90% 이상인 서열; 및
- [0063] 서열번호 34, 27, 및 40으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 CDR3 또는 이와 상동성이 90% 이상인 서열; 을 포함하는 것일 수 있다.
- [0064] 상기 서열번호의 서열정보는 하기와 같다.

경쇄가변 영역 명칭	CDR1 서열	서열번호	CDR2 서열	서열번호	CDR3 서열	서열번호
Kabat No.	24 25 26 27 27a 27b 27c 27d 27e 27f 28 29 30 31 32 33 34		50 51 52 53 54 55 56		89 90 91 92 93 94 95 96 97	
hT2 VL	K S S Q S L F N S R T R K N Y L A	32	W A S T R E S	33	K Q S Y Y H M Y T	34
hT3 VL	K S S Q S L F N S R T R K N Y L A	35	W A S T R E S	36	K Q S Y Y H M Y T	37
hT4 VL	K S S Q S L F N S R T R K N Y L A	38	W A S T R E S	39	Q Q Y Y Y H M Y T	40

- [0065]
- [0066] 또한, 본 발명의 일 구체예에서 상기 경쇄가변영역은 서열번호 33, 36, 및 39로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 CDR2 또는 이와 상동성이 90% 이상인 서열을 더 포함할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 일 구체예에서 상기 경쇄가변영역은 서열번호 32의 CDR1, 서열번호 33의 CDR2, 및 서열번호 34의 CDR3를 포함한 것일 수 있다.
- [0068] 또한, 본 발명의 다른 구체예에서 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 35의 CDR1, 서열번호 36의 CDR2, 및 서열번호 37의 CDR3를 포함한 것일 수 있다.
- [0069] 또한, 본 발명의 다른 양상에서 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 38의 CDR1, 서열번호 39의 CDR2, 및 서열번호 40의 CDR3를 포함한 것일 수 있다.
- [0070] 본 발명의 일 양상에서, 상기 경쇄가변영역은 경쇄 가변 영역의 N 말단으로부터 2번째 및 4번째 아미노산이 각각 류신 (leucine, L) 및 메티오닌 (Methionine, M)으로 치환된 것일 수 있다.
- [0071] 이는 FR(framework)에 위치하고 있는 CDR 구조결정부위(Vernier zone)에 포함되는 잔기 중 세포질 침투능이 보존된 CDR 구조를 얻기 위해 중요한 2번째, 4번째 잔기를 치환시킨 것이다.
- [0072] 또한, 본 발명의 일 양상에서, 상기 경쇄가변영역은 경쇄 가변 영역의 N 말단으로부터 9, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 22, 42, 45, 58, 60, 79, 및 85번째 아미노산이 각각
- [0073] 세린 (serine, S), 알라닌 (Alanine, A), 발린 (Valine, V), 아스파르트 산 (aspartic acid, D), 발린 (Valine, V), 이소류신 (Isoleucine, I), 트리오닌 (Threonine, T), 라이신 (Lysine, K), 라이신 (Lysine, K), 발린 (Valine, V), 세린 (serine, S), 글루타민 (Glutamine, Q) 및 트리오닌 (Threonine, T)으로 치환된 것일 수 있다.
- [0074] 이는 FDA 승인 후 시장에 판매되고 있는 인간화 치료용 항체 중 안정성이 매우 높으며 VH3소그룹의 중쇄가변영역과 Vκ1소그룹의 경쇄가변영역으로 이루어진 Trastuzumab(Herceptin)의 경쇄가변영역과의 서열 분석을 통해 총 14개의 잔기에 차이가 있음을 확인하여 이를 치환한 것이다.
- [0075] 또한, 본 발명의 다른 양상에서, 상기 경쇄 가변 영역은 경쇄 가변 영역의 N 말단으로부터 89 번째 및 91번째 아미노산이 각각 글루타민 (Glutamine, Q) 및 타이로신 (Tyrosine, Y)으로 치환된 것일 수 있다.
- [0076] 이는 인간 항체 가변영역 간의 인터페이스(VH-VL interface) 분석을 통해 기존 세포질 침투 경쇄 가변 영역의 마우스 유래 CDR-L3에 위치한 2개의 잔기가 차이가 있음을 확인하여 이를 치환한 것이다.

[0077] 본 발명의 바람직한 양상에서, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 29, 30, 및 31으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다.

[0078] 상기 서열번호의 서열정보는 하기와 같다.

경쇄가변영역 명칭	서 열	서열번호
hT2 VL	1 10 20 abcdef 30 40 50 DLVMTQSPATLSLSPGERATLSCQSSQSLFNSRTRKKNYLAWYQQKPGQAPRLLIYW 60 70 80 90 100 ASTRESGIPDRFSGSGSGTDFLTLSLQPEDFAVYYCKQSYHYMYTFGGGTKVEIKR	29
hT3 VL	1 10 20 abcdef 30 40 50 DLVMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLFNSRTRKKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYW 60 70 80 90 100 ASTRESGVPSRFSGSGSGTDFLTLSLQPEDFATYYCKQSYHYMYTFGGGTKVEIKR	30
hT4 VL	1 10 20 abcdef 30 40 50 DLVMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLFNSRTRKKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYW 60 70 80 90 100 ASTRESGVPSRFSGSGSGTDFLTLSLQPEDFATYYCQQYYHYMYTFGGGTKVEIKR	31

[0079]

[0080] 단, 본 명세서에서 제공하는 서열번호에 명시된 모든 잔기 번호는 Kabat 번호를 사용하였다 (Kabat EA et al., 1991).

[0081] 본 발명의 일 구체예에서 상기 항체와 세포질 내 활성화된 RAS의 결합은 B-Raf, C-Raf 또는 PI3K와 활성화된 RAS의 결합을 억제하는 것 일 수 있다.

[0082] 본 발명의 일 양상에서는 완전한 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 형태의 항체가 세포질을 침투하여 세포질 내 활성화된 RAS와 결합하는 것을 유도하는 중쇄가변영역 (VH)을 제공한다.

[0083] 상기 중쇄가변영역 (VH)는

[0084] 서열번호 8, 11, 14, 17, 20, 23, 및 26으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 CDR1 또는 이와 상동성이 90% 이상인 서열;

[0085] 서열번호 9, 12, 15, 18, 21, 24, 및 27로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 CDR2 또는 이와 상동성이 90% 이상인 서열; 및

[0086] 서열번호 10, 13, 16, 19, 22, 25, 및 28로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 CDR3 또는 이와 상동성이 90% 이상인 서열; 을 포함하는 것일 수 있다.

[0087] 또한, 본 발명의 일 구체예에서는 상기 중쇄가변영역 (VH)은 서열번호 1 내지 7로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다.

[0088] 또한, 본 발명의 일 양상은 상기 중쇄가변영역 (VH)를 포함하는 항체를 제공한다.

[0089] 또한, 본 발명의 일 구체예에서, 상기 항체는 살아있는 세포에 능동적으로 침투하여 세포질 내의 활성화된 RAS에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다.

[0090] 상기 항체는 키메라, 인간, 또는 인간화된 항체일 수 있다.

[0091] 또한, 본 발명의 일 구체예에서, 항체는 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

[0092] 또한, 항체는 세포질 침투능을 가지는 경쇄가변영역 (VL)을 더 포함할 수 있다. 상기 세포질 침투능은 세포 내

재화(endocytosis)를 통해 세포내로 침투한 후 엔도솜 탈출(endosome escape)에 의한 것일 수 있다.

- [0093] 본 발명의 일 구체예에서 상기 경쇄가변영역은
- [0094] 서열번호 32, 35, 및 38로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 CDR1 또는 이와 상동성이 90% 이상인 서열; 및
- [0095] 서열번호 34, 27, 및 40으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 CDR3 또는 이와 상동성이 90% 이상인 서열;을 포함할 수 있다.
- [0096] 또한, 본 발명의 일 구체예에서 상기 경쇄가변영역 (VL)은 경쇄 가변 영역의 N 말단으로부터 2번째 및 4번째 아미노산이 각각 류신 (leucine, L) 및 메티오닌 (Methionine, M)으로 치환된 것 일 수 있다.
- [0097] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 경쇄가변영역은 경쇄 가변 영역의 N 말단으로부터 9, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 22, 42, 45, 58, 60, 79, 및 85번째 아미노산이 각각
- [0098] 세린 (serine, S), 세린 (serine, S), 알라닌 (Alanine, A), 발린 (Valine, V), 아스파르트 산 (aspartic acid, D), 발린 (Valine, V), 이소류신 (Isoleucine, I), 트리오닌 (Threonine, T), 라이신 (Lysine, K), 라이신 (Lysine, K), 발린 (Valine, V), 세린 (serine, S), 글루타민 (Glutamine, Q) 및 트리오닌 (Threonine, T)으로 치환된 것일 수 있다.
- [0099] 또한, 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 경쇄 가변 영역은 경쇄 가변 영역의 N 말단으로부터 89 번째 및 91번째 아미노산이 각각 글루타민 (Glutamine, Q) 및 타이로신 (Tyrosine, Y)으로 치환된 것일 수 있다.
- [0100] 본 발명의 바람직한 구체예에서 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 29, 30, 및 31으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다.
- [0101] 본 발명의 일 양상은 암 또는 종양 세포의 성장을 억제시키는 방법으로서, 상기 방법은 개체 내 세포를 세포질 내 활성화된 RAS에 특이적으로 결합하는 항체에 노출시키는 단계를 포함하는 것인, 방법을 제공한다.
- [0102] 또한, 본 발명의 일 양상은 암 또는 종양을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 개체에 약학적으로 유효한 양의 세포질 내 활성화된 RAS에 특이적으로 결합하는 항체를 투여하는 단계를 포함하는 것인, 방법을 제공한다.
- [0103] 상기 세포질 내 활성화된 RAS에 특이적으로 결합하는 항체는 살아있는 세포내부로 침투하여 세포질에 위치하고 있는 활성화된(GTP가 결합된) RAS를 특이적 인지가 가능한 항체로서, 살아있는 세포내부 세포질에 위치하고 있는 활성화된(GTP가 결합된) RAS를 표적 및 그 활성을 저해할 수 있다. 이에 따라, 본 발명에 따른 항체 중쇄 가변 영역, 이를 포함하는 항체는 기존 다양한 종양치료제의 주요 약물 저항성 관련 인자인 RAS 돌연변이를 선택적 저해가 가능한 바, 암 또는 종양 세포의 성장을 억제시키며, 암 또는 종양을 치료할 수 있다.
- [0104] 또한, 본 발명의 일 양상은 세포질 내 RAS에 특이적으로 결합하는 중쇄가변영역의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0105] 상기 방법은 (1) GTP가 결합된 RAS에 결합할 수 있는 중쇄가변영역 라이브러리를 효모표면발현 시스템을 이용하여 발현하는 단계;
- [0106] (2) GTP가 결합된 RAS와 상기 라이브러리를 결합시키는 단계; 및
- [0107] (3) 상기 GTP가 결합된 RAS와 상기 라이브러리 결합의 친화도를 측정하는 단계를 포함한다.
- [0108] 본 발명의 다른 양상은 상기 항체가 용합된 펩타이드, 단백질, 소분자 약물, 나노입자 및 리포솜으로 이루어진 군으로부터 선택된 생체활성분자를 제공한다.
- [0109] 상기 단백질은 단백질은 항체, 항체의 단편, 면역 글로불린, 펩타이드, 효소, 성장인자 (growth factor), 사이토카인 (cytokine), 전사인자, 독소, 항원성 펩티드, 호르몬, 운반 단백질, 운동 기능 단백질, 수용체, 신호 (signaling) 단백질, 저장 단백질, 막 단백질, 막횡단(transmembrane) 단백질, 내부(internal) 단백질, 외부(external) 단백질, 분비 단백질, 바이러스 단백질, 당 단백질, 절단된 단백질, 단백질 복합체, 또는 화학적으로 개질된 단백질 등일 수 있다.
- [0110] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 세포질 침투를 통하여 활성화된(GTP와 결합하는) RAS를 특이적 결합 및 저해

하는 완전한 이뮤노글로불린 형태의 항체의 경쇄가변영역의 N-말단에 서열번호 41로 이루어진 RGD4C 또는 서열번호 42로 이루어진 RGD10를 융합한 형태를 제공한다. 상기 본 발명의 일 구체예에 있어서 경쇄가변영역 N-말단과 RGD4C 펩타이드는 $(G_4S)_1$ 연결자(linker)로 융합하였고, RGD10 펩타이드는 $(G_4S)_2$ 연결자를 융합하는 것이 바람직하지만 이에 제한 되지 않는다.

[0111] 본 발명에 있어서 소분자 약물은 약 1000 달톤 미만의 분자량을 지니며 질병의 치료제로서 활성도를 지니는 유기 화합물, 무기 화합물 또는 유기금속 화합물을 나타내는 것으로 본원에서 광범위하게 사용된다. 본원에서 소분자 약물은 올리고펩티드 및 약 1000 달톤 미만의 분자량을 지니는 그 밖의 바이오분자(biomolecule)를 포함한다.

[0112] 본 발명에 있어서, 나노입자(nanoparticle)는 직경 1 내지 1000 nm 크기를 갖는 물질들로 이루어진 입자를 의미하며, 상기 나노 입자는 금속 나노 입자, 금속 나노 입자 코어 및 상기 코어를 둘러싸는 금속 셸로 구성되는 금속/금속 코어셸 복합체, 금속 나노 입자 코어 및 상기 코어를 둘러싸는 비금속 셸로 구성되는 금속/비금속 코어셸 또는 비금속 나노 입자 코어 및 상기 코어를 둘러싸는 금속 셸로 구성되는 비금속/금속 코어셸 복합체일 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 금속은 금, 은, 구리, 알루미늄, 니켈, 팔라듐, 백금, 자성철 및 그의 산화물로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정하지는 않으며, 상기 비금속은 실리카, 폴리스티렌, 라텍스 및 아크릴레이트 계열의 물질로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.

[0113] 본 발명에 있어서, 리포솜은 자기 스스로 회합할 수 있는, 수성 내부 구획을 둘러싸는 하나 이상의 지질 이중층 막으로 구성된다. 리포솜은 막 타입 및 그 크기에 의하여 특정 수 있다. 작은 유니라멜라 소포(SUV)는 단일막을 갖고 20nm 내지 50nm의 직경을 가질 수 있다. 큰 유니라멜라 소포(LUV)는 50nm이상의 직경을 가질 수 있다. 올리고라멜라 큰 소포 및 멀티라멜라 큰 소포는 다중, 일반적으로 동심원, 막 층을 가지고 직경이 100nm 이상일 수 있다. 여러 비동심원 막을 가진 리포솜, 즉 더 큰 소포 내에서 포함된 여러 작은 소포는 멀티소포성 소포(multivesicular vesicle)라고 한다.

[0114] 본 발명에 있어서 “융합”은 기능 또는 구조가 다르거나 같은 두 분자를 일체화하는 것으로, 상기 단백질, 소분자 약물, 나노입자 또는 리포솜에 상기 중앙 침투성 펩타이드가 결합할 수 있는 모든 물리, 화학적 또는 생물학적 방법에 의한 융합일 수 있다. 상기 융합은 바람직하게는 연결자 펩타이드에 의한 것일 수 있으며, 이 연결자 펩타이드는 본 발명의 항체 경쇄 가변 영역, 항체, 또는 이의 절편의 다양한 위치에서 상기 생체 활성 분자와의 융합을 증진할 수 있다.

[0115] 또한, 본 발명은 상기 항체, 또는 이에 융합된 펩타이드, 단백질, 소분자 약물, 나노입자 및 리포솜으로 이루어진 군으로부터 선택된 생체활성분자를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0116] 상기 암은 편평상피세포암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐의 선암, 폐의 편평상피암, 복막암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 간세포암, 위장암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁암, 침샘암, 신장암, 간암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 간암 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0117] 상기 조성물이 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 제조되는 경우, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 상기 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유효제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0118] 상기 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화기 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

- [0119] 상기 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 상기 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg 범위 내이다. 용어 "약학적 유효량"은 암을 예방 또는 치료하는 데, 또는 혈관신생으로 인한 질환의 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0120] 상기 조성물은 당해 당업자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 한편, 상기 조성물은 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하므로, 면역 리포솜으로 제형화될 수 있다. 항체를 포함하는 리포솜은 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 면역 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 폴리에틸렌글리콜-유도체화된 포스파티딜에탄올아민을 포함하는 지질 조성물로서 역상 증발법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fab' 단편은 디설파이드-교체 반응을 통해 리포솜에 접합될 수 있다. 독소루비신과 같은 화학치료가 추가로 리포솜 내에 포함될 수 있다.
- [0121] 또한, 본 발명은 상기 항체, 또는 이에 융합된 펩타이드, 단백질, 소분자 약물, 나노입자 및 리포솜으로 이루어진 군으로부터 선택된 생체활성분자를 포함하는 암의 진단용 조성물을 제공한다.
- [0122] 본 명세서에서 사용된 용어 "진단"은 병태 생리의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명에서의 진단은 암의 발병 여부 및 경과를 확인하는 것이다.
- [0123] 상기 완전한 이뮤노글로불린 형태의 항체 및 이의 절편은 영상을 통하여 암을 진단하기 위하여 분자 영상용 형광체와 결합할 수 있다.
- [0124] 상기 분자 영상용 형광체는 형광을 발생시키는 모든 물질을 말하며, 적색이나 근적외선(near-infrared)의 형광을 발광하는 것이 바람직하며, 양자 수득률(quantum yield)이 높은 형광체가 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0125] 상기 분자 영상용 형광체는 상기 완전한 이뮤노글로불린 형태의 항체 및 이의 절편에 특이적으로 결합하는 중앙 침투성 펩타이드와 결합할 수 있는 형광체, 형광 단백질 또는 기타 영상용 물질이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0126] 형광체는 플루오레신(fluorescein), 보디피(BODIPY), 테트라메틸로드아민(Tetramethylrhodamine), 알렉사(Alexa), 시아닌(Cyanine), 알로피코시아닌(allophycocyanine) 또는 이들의 유도체가 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0127] 형광 단백질은 Dronpa 단백질, 형광 발색 유전자(EGFP), 적색 형광 단백질(red fluorescent protein, DsRFP), 근적외선 형광을 나타내는 시아닌 형광체인 Cy5.5 또는 기타 형광 단백질이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0128] 기타 영상용 물질은 산화철, 방사성 동위원소 등이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, MR, PET과 같은 영상 장비에 응용될 수 있다.
- [0129] 또한 본 발명은 상기 중쇄가변영역 또는 이를 포함하는 항체 또는 이의 절편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0130] 상기 "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드의 중합체이다. RNA 게놈 서열, DNA(gDNA 및 cDNA) 및 이로부터 전사되는 RNA 서열을 포괄하며, 특별하게 다른 언급이 없는 한 천연의 폴리뉴클레오티드의 유사체를 포함한다.
- [0131] 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 기술한 경쇄 가변영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열뿐만 아니라, 그 서열에 상보적인(complementary) 서열도 포함한다. 상기 상보적인 서열은 완벽하게 상보적인 서열뿐만 아니라, 실질적으로 상보적인 서열도 포함한다. 이는 당업계에 공지된 가혹 조건(stringent conditions) 하에서, 예를 들어, 서

열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 혼성화될 수 있는 서열을 의미한다.

- [0132] 또한 상기 폴리뉴클레오티드는 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오티드의 추가, 결실 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다. 상기 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 뉴클레오티드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기 뉴클레오티드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 최소 90%의 상동성 또는 최소 95%의 상동성을 나타내는 서열일 수 있다.
- [0133] 또한, 본 발명의 일 양상은 상기 살아있는 세포내부로 침투하여 세포질에 분포하는 완전한 이뮤노글로불린 형태의 항체를 이용하여 세포질 침투를 통해 세포질에 위치하고 있는 활성화된(GTP가 결합된) RAS에 특이적 결합 및 활성을 저해하는 완전한 이뮤노글로불린 형태의 항체의 제조방법을 제공할 수 있다.
- [0134] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 활성화된(GTP가 결합된) RAS 특이적 결합능을 가지고 있는 중쇄가변영역(VH)을 이용한 세포내부로 침투하고 세포질에 분포하여 세포질에 위치하고 있는 활성화된(GTP가 결합된) RAS와 특이적 결합하는 완전 이뮤노글로불린 형태의 항체는 하기와 같은 방법으로 제조될 수 있다.
- [0135] (1) 활성화된(GTP가 결합된) RAS와 특이적 결합하는 인간 중쇄가변영역(VH)과 중쇄불변영역(CH1-hinge-CH2-CH3)이 포함된 핵산(nucleic acids)를 클로닝한 중쇄 발현 벡터를 제조하는 단계;
- [0136] (2) 상기 제조된 중쇄 발현 벡터와 세포질 침투능을 갖는 경쇄가변영역을 포함한 경쇄 발현벡터를 단백질 발현용 동물세포에 동시 형질전환하여 살아있는 세포내부로 침투 및 세포질 분포하여 활성화된(GTP가 결합된) RAS를 특이적 인지하는 완전 이뮤노글로불린 형태의 항체를 발현하는 단계; 및
- [0137] (2) 상기 발현된 활성화된(GTP가 결합된) RAS를 특이적 인지하는 세포질 침투능을 가지는 완전한 이뮤노글로불린 형태의 항체를 정제, 회수하는 단계.
- [0138] 본 발명에서 사용하는 용어 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다. 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지(예를 들면, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예를 들면, CMV, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0139] 상기 재조합 벡터에서 본 발명에서 제공하는 경쇄가변영역, 및 경쇄불변영역(CL), 중쇄가변영역(VH) 및 중쇄불변영역(CH1-hinge-CH2-CH3)은 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다. 용어 "작동적으로 연결된(operatively linked)"은 뉴클레오티드 발현 조절 서열(예를 들면, 프로모터 서열)과 다른 뉴클레오티드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 따라서, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다.
- [0140] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [0141] 상기 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예를 들어, pL λ 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 중결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점, CMV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 계놈으로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈

로바이러스(CMV) 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0142] 본 발명의 또 다른 양상은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공할 수 있다.

[0143] 숙주 세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 원핵 세포로는, 예를 들어, E. coli JM109, E. coli BL21, E. coli RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776, E. coli W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 슈팅겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(Saccharomyce cerevisiae), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, SP2/0, CHO(Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주 등이 이용될 수 있다.

[0144] 상기 재조합 벡터의 숙주 세포 내로의 삽입은, 당업계에 널리 알려진 삽입 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포솜-매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다. E. coli 등의 미생물을 이용하는 경우 생산성은 동물세포 등에 비하여 높은 편이나 당화(glycosylation) 문제로 인해 인такт(intact)한 Ig 형태의 항체 생산에는 적당하지 않지만, Fab 및 Fv와 같은 항원 결합 단편의 생산에는 사용될 수 있다.

[0145] 상기 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.

발명의 효과

[0146] 본 발명에서 제공하는 완전한 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 형태의 세포질 침투능을 갖는 항체를 이용하여 세포내 활성화된 RAS를 억제하는 방법은 상기 항체가 살아있는 세포내부로 침투하여 세포질에 위치하고 있는 활성화된(GTP가 결합된) RAS를 특이적 인지가 가능한 항체에 의하여 달성되며, 이로서 살아있는 세포내부 세포질에 위치하고 있는 활성화된(GTP가 결합된) RAS를 표적 및 그 활성을 저해할 수 있다.

[0147] 또한, 본 발명에서 제공하는 상기 항체의 경쇄가변영역 또는 이를 포함하는 항체는 특별한 외부 단백질 전달 시스템 없이 살아있는 세포내부로 세포내재화(endocytosis) 및 엔도솜 탈출(endosome) 과정을 통해 침투하여 세포질에 분포할 수 있다. 특히, 본 발명에서 제공하는 항체의 경쇄가변영역은 다양한 인간 중쇄가변영역(VH)과의 상호작용 결합이 용이하면서 세포질 침투를 통해 세포질에 잔류 가능한 특성을 가지며, 상기 경쇄 가변 영역을 포함하는 완전 이뮤노글로불린 형태의 항체는 세포내부 침투 및 세포질에 분포하며, 세포에 비특이적 세포독성을 보이지 않는다.

[0148] 본 발명에 따른 항체 중쇄가변영역, 이를 포함하는 항체는 기존 다양한 중앙치료제의 주요 약물 저항성 관련 인자인 RAS 돌연변이를 선택적 저해가 가능하면서 기존 치료제와의 병행치료를 통해 효과적인 항암 활성을 기대할 수 있다. 본 발명에 따른 세포질 침투 완전한 이뮤노글로불린 형태의 항체를 이용하여 인간 항체 중쇄가변영역(VH)이 가지는 항원 고특이성 및 고친화도에 영향주지 않으면서 세포내부로 침투 및 세포질에 잔류하는 특성을 부여할 수 있으며, 이를 통해 현재 소분자 약물을 이용한 질병 치료에 표적물질로 분류되고 있는 세포질 내에 존재하면서 단백질과 단백질 사이에 넓고 평평한 표면을 통해 구조복합성 상호작용을 이루는 중앙 및 질환 관련 인자에 대한 치료 및 진단에 높은 효과를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0149] 도 1은 세포질 침투능만 보유하고 있는 이뮤노글로불린 형태의 항체 cytotransmab의 중쇄가변영역(VH)를 GTP가 결합된 KRas에 특이적 결합하는 중쇄가변영역(VH)으로 치환한 세포 침투 및 세포내 분포하는 GTP가 결합된 Ras에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 (항-Ras·GTP iMab : internalizing & interfering monoclonal antibody)을 이용하여 Ras 돌연변이 세포에 대한 특이적인 세포독성을 유도하는 전략에 대한 모식도이다.

도 2는 세포질 침투능만 보유하고 있는 Cytotransmab의 중쇄가변영역(VH)를 GTP가 결합된 KRas에 특이적 결합하는 중쇄가변영역(VH)으로 치환을 통해 항-Ras · GTP iMab 구축을 설명한 모식도이다.

도 3는 GTP가 결합된 KRas G12D 단백질에 대해서만 특이적으로 고친화도를 가지는 인간화 항체 중쇄가변영역 단일도메인을 얻기 위한 라이브러리 선별 전략을 나타낸 모식도이다.

도 4는 상기 기술된 GTP가 결합된 KRas G12D에 특이적 고친화도를 얻기 위한 선별과정 단계별 GTP가 결합된 KRas G12D 단독 조건 및 GDP가 결합된 KRas G12D와의 경쟁 조건에서의 결합능을 유세포 분석기로 분석한 자료이다.

도 5a는 마우스 유래 경쇄가변영역 단일도메인인 m3D8 VL로부터, 인간화 항체 중쇄가변영역과 안정한 결합이 이루어지도록 개량한 세포질 침투 인간화 경쇄가변영역 단일도메인 hT3 VL까지의 개량 과정에 이용된 클론을 포함한 서열분석 자료이다.

도 5b는 m3D8 VL과 인간화 경쇄가변영역 단일도메인 hT0 VL, 이의 돌연변이체 hT2 VL, hT3 VL의 WAM 모델링을 이용한 모델 구조를 구조 중첩(superimposing) 방법을 이용하여 비교한 도이다.

도 6a는 경쇄가변영역 단일도메인의 세포질 침투능을 공초점 현미경 (confocal microscopy)으로 관찰한 결과이다.

도 6b는 경쇄가변영역 단일도메인의 세포질 침투 메커니즘을 검증하기 위하여, 공초점 현미경으로 관찰한 결과이다.

도 7a는 hT3 VL 의 다양한 인간 항체 중쇄가변영역에 대해서 적용가능 여부를 확인하기 위해 기존의 인간 항체 Adalimumab(Humira)과 인간화 항체 Bevacizumab(Avastin)의 경쇄가변영역(VL)과 아미노산 서열을 분석한 결과이다.

도 7b는 추가적으로 인간항체 중쇄가변영역과 최적화된 결합을 통해 안정적 cytotransmab 구축을 위한 가변영역 간의 인터페이스 잔기를 분석한 결과이다.

도 8은 cytotransmab 구축을 위해 세포침투능이 없는 경쇄가변영역을 세포질 침투능을 갖는 인간화 경쇄가변영역을 치환하는 방법에 대한 전반적인 모식도이다.

도 9a는 세포질 침투능을 갖는 경쇄가변영역 hT4 VL로 경쇄가변영역이 치환된 cytotransmab들의 세포질 침투능을 검증하기 위하여, 다양한 세포주에서 정제된 cytotransmab 처리 후 1~2개의 세포에 초점을 맞추고 공초점 현미경로 관찰한 결과이다.

도 9b는 상기 도 9a의 공초점 현미경 관찰을 통한 세포질 침투능 검증 실험에서 세포 침투효율을 확인하기 위해 렌즈 배율을 낮추어 여러 개의 세포에 대한 세포질 침투능을 확인한 결과이다.

도 10a는 HeLa와 PANC-1 세포주에서 cytotransmab을 처리하여 세포성장 저해 정도를 in vitro에서 평가하여 그래프로 도식화 한 것이다.

도 10b는 HeLa와 PANC-1 세포주에서 cytotransmab을 처리하여 세포성장 저해 정도를 in vitro에서 확인한 사진을 나타낸 것이다.

도 11은 항-Ras · GTP iMab RT4의 정제 후 환원성 또는 비환원성 조건에서 12 % SDS-PAGE를 통해서 분석한 것이다.

도 12는 야생형 KRas 및 KRas 돌연변이체 KRas G12D, KRas G12V, KRas G13D의 GTP가 결합된 형태와 GDP가 결합된 형태에서의 친화도를 측정하기 위한 ELISA를 수행한 결과이다.

도 13은 SPR (BIAcore 2000)(GE healthcare)를 이용하여 GTP가 결합된 형태의 KRas G12D에 대한 항-Ras · GTP iMab RT4의 친화도 분석 결과를 나타낸다.

도 14는 항-Ras · GTP iMab RT4의 세포질 침투능을 확인하기 위해 공초점 현미경으로 관찰한 결과이다.

도 15는 NIH3T3, NIH3T3 KRas G12V, NIH3T3 HRas G12V 세포주에서 항-Ras · GTP iMab RT4를 처리하여 세포성장 저해 정도를 in vitro에서 평가한 결과이다.

도 16은 NIH3T3 HRas G12V 세포주에서 비부착성 세포 성장 저해를 평가한 결과이다.

- 도 17은 항-Ras · GTP iMab RT4와 세포내 활성화된 HRas G12V 돌연변이와의 중첩 여부를 공초점 현미경으로 확인한 결과이다.
- 도 18은 항-Ras · GTP iMab와 세포내 GTP가 결합된 KRas G12V 돌연변이와의 중첩 여부를 공초점 현미경으로 확인한 결과이다.
- 도 19는 HCT116, PANC-1 세포주에서 RGD-TMab4와 RGD-RT4를 처리하여 세포성장 저해 정도를 in vitro에서 평가한 결과이다.
- 도 20a는 HCT116 세포주를 이중이식한 쥐에서 RGD가 융합된 항-Ras · GTP iMab RT4의 종양 성장 억제 효과를 확인한 실험 결과이다. 도 20b는 RGD가 융합된 항-Ras · GTP iMab RT4의 비특이적 부작용을 확인하기 위해 쥐의 몸무게를 측정된 그래프이다.
- 도 21a는 RT4의 친화도를 개량하기 위한 인간 중쇄가변영역 라이브러리 구축 전략을 나타낸 도면이다.
- 도 21b는 디자인된 라이브러리를 PCR 기법을 이용하여 구축 및 제한효소 NheI, ApaI 처리된 중쇄단일사슬 효모 표면발현 벡터(pYDS-H) 상동 접합 방법을 통해 효모 세포에 형질전환하는 방법을 나타내는 모식도이다.
- 도 22는 상기 기술된 라이브러리 선별과정을 통해서 GTP가 결합된 KRas G12D에 특이적 부유화(enrichment)를 확인하기 위해 각 단계별 라이브러리 발현 효모에 대해서 GTP가 결합된 KRas G12D 및 GDP가 결합된 KRas G12D와의 결합능을 유세포 분석기로 분석한 자료이다.
- 도 23은 상기 3종의 라이브러리를 통해서 선별된 개별클론 서열 분석 자료이다.
- 도 24는 친화도가 개량된 항-RAS · GTP iMab들은 정제 후 환원성 또는 비환원성 조건에서 12 % SDS-PAGE를 통해서 분석한 것이다.
- 도 25는 항-Ras · GTP iMab의 중쇄가변영역을 친화도가 향상된 Ras · GTP 특이적인 중쇄가변영역으로 교체 후 세포 침투능을 갖는지 확인하기 위해 공초점 현미경으로 관찰한 결과이다.
- 도 26a는 KRas G12D의 GTP가 결합된 형태와 GDP가 결합된 형태에서의 친화도가 개량된 항-Ras · GTP iMab들의 친화도를 측정하기 위한 ELISA 수행 결과이다.
- 도 26b는 상기 ELISA 기반 결합능 분석을 통해 선정된 RT11을 다양한 Ras돌연변이에 대해서 GTP가 결합된 Ras 고특이적 결합능을 ELISA를 통해 분석하였다.
- 도 27a는 SPR (BIAcore 2000)(GE healthcare)를 이용하여 KRas G12D에 GTP가 결합형태에 대한 항-Ras · GTP iMab RT11의 친화도 분석 결과를 나타낸다.
- 도 27b는 가장 높은 농도 (1000 nM)의 GTP 또는 GDP가 결합된 KRas G12D에 대한 RT11의 결합능을 SPR을 이용하여 분석한 sensorgram이다.
- 도 28은 항-Ras · GTP iMab RT11이 세포내 KRas와 결합하는 효과 단백질(effector molecule)인 Raf와의 결합을 저해할 수 있는지 경쟁적 ELISA를 통해서 확인한 결과이다.
- 도 29는 친화도가 향상된 항-Ras · GTP iMab의 다양한 종양 세포에 세포 침투능을 갖는지 확인하기 위해 공초점 현미경으로 관찰한 결과이다.
- 도 30은 친화도가 향상된 항-Ras · GTP iMab의 세포질 잔류능을 세포막 비투과 자기소광 형광물질인 calcein (sigma)을 이용하여 공초점 현미경으로 관찰한 결과이다.
- 도 31은 다양한 Ras 야생형 및 Ras 돌연변이 세포주에서 항-Ras · GTP iMab RT11을 처리하여 세포성장 저해 정도를 in vitro에서 평가한 결과이다.
- 도 32는 각각의 세포를 편광현미경을 통해서 세포밀도를 확인한 사진이다.
- 도 33은 RT11과 세포내 활성화된 KRas G12V 돌연변이와의 중첩 여부를 공초점 현미경으로 확인한 결과이다.
- 도 34는 RT11과 세포내 활성화된 Ras 와의 결합 여부를 면역침강법으로 확인한 결과이다.
- 도 35a와 도 35b는 RT11의 Ras · GTP와 효과단백질들 간의 결합 억제 여부를 면역침강법으로 확인한 결과이다.
- 도 36은 상기 구축된 RGD10펩타이드가 융합된 형태의 RT11(RGD10-RT11)의 GTP가 결합된 형태와 GDP가 결합된 형

태의 다양한 Ras 돌연변이에 대한 결합능을 측정된 ELISA 결과이다.

도 37 및 38은 Colo320DM, HCT116, PANC-1, SW480, DLD-1 세포주에서 RGD10-TMab4와 RGD10-RT11을 처리하여 세포성장 저해 정도를 *in vitro*에서 평가한 결과이다.

도 39는 RGD10-TMab4와 RGD10-RT11이 세포 표면의 integrin $\alpha v \beta 3$ 에 특이적으로 결합하는지 확인한 결과이다.

도 40은 RGD10-RT11과 세포내 활성화된 KRas G12V 돌연변이와의 중첩 여부를 공초점 현미경으로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0150] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0151] 실시예 1. 고다양성 인간 VH 라이브러리를 통한 GTP가 결합된 KRas 특이적 결합하는 중쇄가변영역(VH) 선별

[0152] 도 1은 세포질 침투능만 보유하고 있는 IgG 포맷 cytotransmab 의 중쇄가변영역(VH)를 GTP가 결합된 KRas에 특이적 결합하는 중쇄가변영역(VH)으로 치환한 세포 침투 및 세포내 분포하는 GTP가 결합된 Ras에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 (항-Ras·GTP iMab : internalizing & interfering monoclonal antibody)을 이용하여 Ras 돌연변이 세포에 대한 특이적인 세포독성을 유도하는 전략에 대한 모식도이다.

[0153] 도 2는 세포질 침투능만 보유하고 있는 완전 IgG포맷 Cytotransmab의 중쇄가변영역(VH)를 GTP가 결합된 KRas에 특이적 결합하는 중쇄가변영역(VH)으로치환을 통해 항-Ras·GTP iMab 구축을 설명한 모식도이다.

[0154] 상기 항-Ras·GTP iMab에 도입하기 위한 GTP가 결합된 KRas 특이적으로 결합하는 안정적인 인간화 중쇄가변영역 단일도메인(VH) 항체절편을 선별하기 위해서 이전 연구를 통해서 구축된 효모발현 VH 라이브러리를 사용하였다 (Baek and Kim, 2014).

[0155] 구체적으로 사용한 라이브러리의 FR(framework)은 종래 항체들에서 가장 보편적으로 사용된 V 유전자인 IGHV3-23*04, J_H4를 사용하고 있으며, CDR3 길이는 9개의 잔기를 가지는 라이브러리를 사용하였다. 상기 라이브러리의 구축 및 효모 표면 발현 방법은 이미 발표한 논문에서 자세하게 기술되어 있다 (Baek and Kim, 2014).

[0156] 실시예 2. GTP가 결합된 KRas G12D단백질 준비

[0157] 라이브러리 선별 및 친화도 분석을 위한 GTP가 결합된 KRAS G12D 항원을 준비하기 위해 대장균에서 발현 정제한 과정은 이미 발표한 논문에서 자세하게 기술되어 있다 (Tanaka T et al., 2007).

[0158] 구체적으로는, 야생형 KRas와 돌연변이 빈도가 높은 순으로 3가지의 돌연변이 KRAS G12D, KRAS G12V, KRAS G13D의 CAAX 모티프를 포함한 1번부터 188번을 코딩하는 DNA를 대장균 발현 벡터인 pGEX-3X벡터에 제한효소 BamHI/EcoRI를 사용하여 클로닝하였다. 이때 발현벡터는 T7프로모터-GST-KRas를 가지도록 디자인하였다. 모든 KRas 돌연변이는 overlap PCR 기법을 이용하여 돌연변이를 유도하였고, 상기 기술방법을 사용하여 발현 벡터를 구축하였으며, pGEX-3X-KRas 벡터를 대장균에 전기천공법을 이용하여 형질전환하여 선택배지에서 선별하였다. 선별된 대장균을 LB 배지에서 100 μ g/ml 의 암피실린 항생제 존재하에 37 도에서 600 nm 에서의 흡광도 0.6까지 배양 후, 단백질 발현을 위해 0.1 mM IPTG 를 첨가한 후, 30 도에서 5 시간을 더 배양하였다. 이후 원심분리기를 이용하여 대장균을 모은 후 초음파를 이용해 (SONICS)대장균을 분쇄하였다. 원심분리기를 사용해 대장균 분쇄물을 제거한 상등액 만을 얻어 GST 태그가 있는 단백질을 특이적으로 정제하는 Glutathione 수지(Clontech)를 사용하여 정제하였다. Glutathione 수지를 세척하기 위해 세척버퍼 (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM NaH₂PO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 1mM EDTA, 2 mM MgCl₂ pH 7.4) (SIGMA)로 50 ml 세척 후 용출버퍼 (50 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM 환원된 glutathione, 1mM DTT, 2 mM MgCl₂) (SIGMA)를 이용하여 단백질을 용출하였다. 용출된 단백질은 투석방법을 이용하여 저장버퍼 (50 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM DTT, 2 mM MgCl₂) (SIGMA)로 버퍼를 바꾸었다. 정제된 단백질은 280nm 파장에서 흡광도와 흡광계수를 이용하여 정량했다. SDS-PAGE 분석을 통해 약 98% 이상의 순도를 확인하였다.

[0159] 이후 KRAS 단백질에 GTP λ S(Millipore) 또는 GDP(Millipore) 기질을 결합시키기 위해 KRAS 와 기질의 분자비율

을 1대20로 하여 반응버퍼 (50 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 15 mM EDTA) (SIGMA)에서 30 도에서 30분 반응시킨 후 반응을 멈추기 위해 60 mM MgCl₂첨가한 이후 -80 도에서 보관한다.

[0160]

실시에 3. GTP가 결합된 KRas G12D 에 특이적 중쇄가변영역(VH) 선별

[0161]

도 3는 GTP가 결합된 KRas G12D 단백질에 대해서만 특이적으로 고친화도를 가지는 인간화 항체 중쇄가변영역 단일도메인을 얻기 위한 라이브러리 선별 전략을 나타낸 모식도이다.

[0162]

구체적으로는, 실시예 2에서 정제한 GTP가 결합된 KRas G12D를 바이오틴화 시킨 후 (EZ-LINK™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation kit (Pierce Inc., USA)) 효모 세포 표면에 발현된 중쇄가변영역 라이브러리와 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 바이오틴화 된 GTP가 결합된 KRas G12D와 반응한 효모 세포 표면에 중쇄가변영역 라이브러리를 스트렙타아비딘(Streptavidin) Microbead™ (Miltenyi Biotec)와 4 도에서 20분간 반응시킨 후 MACS (magnetic activated cell sorting)을 이용하여 GTP가 결합된 KRASG12D에 고친화도를 가지는 중쇄가변영역을 발현하는 효모를 부유화하였다 (enrichment). 선별된 라이브러리를 발현하는 효모를 선택배지에서 배양 및 SG-CAA+URA (20 g/L Galactose, 6.7 g/L Yeast nitrogen base without amino acids, 5.4 g/L Na₂HPO₄, 8.6 g/L NaH₂PO₄, 5 g/L casamino acids, 0.2 mg/L Uracil) (SIGMA)배지에서 단백질 발현을 유도한 이후 GTP가 결합된 KRas G12D 단독 또는 GTP가 결합된 KRas G12D보다 10배 높은 농도의 바이오틴화 되지 않고 GDP와 결합된 KRas G12D항원을 경쟁적으로 라이브러리가 발현된 효모와 1시간동안 상온에서 반응시킨 후 PE가 접합된 스트렙타아비딘 (Streptavidin-R-phycoerythrin conjugate, SA-PE) (Invitrogen)과 반응하여 FACS (Fluorescence activated cell sorting) (FACS Caliber) (BD biosciences)를 통해 부유화를 확인하였다. FACS 분석을 통해 다음 선별조건 선정 이후 상기와 동일한 조건으로 부유화된 라이브러리를 발현하는 효모에 항원을 결합시킨 후 FACS ariaII 기기를 사용하여 부유화시켰다. 1차 MACS, 1차 FACS 선별을 통해 부유화된 인간화 중쇄가변사슬 라이브러리는 세포질 침투 경쇄단일사슬(hT4 VL)을 분비하는 효모와 효모접합하여 Fab형태로 효모표면에 발현시킨 후 2차 FACS, 3차 FACS선별과정을 진행하였다.

[0163]

구체적으로 중쇄가변영역(VH) 라이브러리와 접합시킬 세포질 침투 경쇄가변영역(VL)을 분비하는 효모를 구축하기 위해 경쇄가변영역 효모 분비 벡터인 pYDS-K에 세포질 침투능이 있는 hT4 VL를 코딩하는 DNA를 제한효소 NheI과 BsiWI를 사용하여 클로닝한 pYDS-K-hT4 VL을 전기천공법으로 접합 α 타입(mating α type)의 효모접합 균주인 YVH10균주에 형질전환하여 선택배지 SD-CAA+Trp (20 g/L Glucose, 6.7 g/L Yeast nitrogen base without amino acids, 5.4 g/L Na₂HPO₄, 8.6 g/L NaH₂PO₄, 5 g/L casamino acids, 0.4 mg/L tryptophan) (SIGMA)에서 선별 배양한 효모와 효모접합하였다.

[0164]

구체적으로 효모 접합의 경우, 600 nm에서 흡광도가 1일 때, 1 X 10⁷의 효모가 있다. 배양된 효모 중 GTP가 결합된 KRas G12D에 선별된 중쇄가변영역 라이브러리가 발현된 효모와 hT4 VL을 포함하고 있는 효모를 각각 1.5 X 10⁷씩 섞고, YPD (20 g/L Dextrose, 20 g/L peptone, 10 g/L yeast extract, 14.7 g/L sodium citrate, 4.29 g/L citric acid, pH 4.5) (SIGMA)로 3회 세척 후, YPD 100 μl로 재부유(resuspension)하여 YPD 플레이트 위에 퍼지지 않도록 드랍한 이후 건조하여 6시간동안 30 도에서 배양한다. 이후 YPD 배지로 건조된 효모 도말 부위를 3번 세척 이 후 최종 효모농도 1 × 10⁶이하가 되도록 선택배지 SD-CAA배지에서 30 도, 24 시간 배양하여 접합된 효모만 선별한다. 선별된 효모에 대해서 SG-CAA 배지로 인간화 항체 Fab 단편 발현을 유도하고 GTP가 결합된 KRas G12D 100 nM 농도에서 GDP가 결합된 KRas G12D 100배 경쟁하여 2, 3 차 FACS를 통해 부유화 하였다.

[0165]

도 4는 상기 기술된 GTP가 결합된 KRas G12D에 특이적 고친화도를 얻기 위한 선별과정 단계별 GTP가 결합된 KRas G12D 단독 조건 및 GDP가 결합된 KRas G12D와의 경쟁 조건에서의 결합능을 유세포 분석기로 분석한 자료이다. 이를 통해 중쇄가변영역(VH) 의존적으로 GTP가 결합된 KRas G12D에 특이적 결합이 가능한 라이브러리 선별이 가능함을 확인하였다.

[0166]

위와 같은 고속선별을 통해 GTP가 결합된 KRas G12D 단백질에 고친화도 및 특이성을 갖는 라이브러리에서 개별 클론 분석을 통해 최종적으로 RT4 클론이 선별되었다.

- [0167] **실시예 4. 세포질 침투 인간화 경쇄가변영역(VL) 단일도메인 개발 논리**
- [0168] 도 5은 cytotransmab으로 명명한 세포 침투를 통해서 세포질에 위치하는 완전한 이뮤노글로불린 형태의 단일클론항체의 개념을 나타낸 모식도이며, 이를 구현하기 위해 인간화 항체 경쇄 가변영역의 세포질 침투능을 이해하기 위해 기존 마우스 유래 경쇄가변영역 단일 도메인 m3D8 VL의 세포질 침투성과 경쇄가변영역 단편에 속한 CDR들의 상관관계에 대한 연구를 참조하였다 (Lee et al., 2013).
- [0169] 도 5a은 마우스 유래 경쇄가변영역 단일도메인인 m3D8 VL로부터, 인간화 항체 중쇄가변영역과 안정한 결합이 이루어지도록 개량한 세포질 침투 인간화 경쇄가변영역 단일도메인 ht3 VL까지의 개량 과정에 이용된 클론을 포함한 서열분석 자료이다.
- [0170] 구체적으로는, 마우스 유래 경쇄가변영역 단일도메인인 m3D8 VL과 이를 CDR-grafting 기술을 이용하여 인간화시킨 ht0 VL의 세포질 침투성을 비교를 통하여, 경쇄가변영역(VL)의 CDR1 서열이 보존됨에도 불구하고 세포질 침투능을 잃어 버린 특성을 확인하였다.
- [0171] 이에 따라, 인간화 항체 경쇄가변영역 단일도메인의 세포질 침투능을 복원하기 위해 CDR1의 구조를 m3D8 VL의 구조와 유사하게 개량 하기 위해 경쇄가변영역 FR(framework)에서 CDR 구조결정부위(Vernier zone)을 비교 분석하였다. 그 결과 2번, 4번 잔기가 마우스 유래 세포질 침투능을 가지는 m3D8 VL과 차이가 있음을 확인하였다. 특히 2번 4번 잔기는 Vernizer zone이면서 CDR1 구조에 큰 영향을 미치는 Upper core 역할을 하고 있으므로 ht0 VL에 복귀 돌연변이를 통하여 m3D8 VL과 유사한 CDR1 구조를 유도한 ht2 VL을 개발하였다 (도 5a 참조).
- [0172] 이후 안정한 cytotransmab 구축을 위해 다양한 인간항체 중쇄가변영역과 상보적으로 안정적인 결합을 이루며, 세포질 침투능을 보존하는 경쇄 가변영역을 개발하고자 안정적인 항체 중 높은 비율을 차지하고 있는 VH3와 Vκ1 소그룹간의 쌍을 모사하기 위해, VH3와 Vκ1 소그룹을 가지고 있으면서 매우 안정한 인간화 치료용 단일클론항체 Trastuzumab(Herceptin)의 경쇄가변영역 FR(framework)과 ht2 VL의 FR(framework)을 비교 분석하여 차이가 있는 14개의 잔기를 Trastuzumab(Herceptin)의 경쇄가변영역 FR(framework) 서열로 돌연변이 시켜 ht3 VL을 개발하였다 (도 5a 참조).
- [0173] 도 5b는 m3D8 VL과 인간화 경쇄가변영역 단일도메인 ht0 VL, 이의 돌연변이체 ht2 VL, ht3 VL의 WAM 모델링을 이용한 모델 구조를 구조 중첩(superimposing) 방법을 이용하여 비교한 도이다. 상기 기술내용과 같이 ht0 VL의 2번 4번 잔기 복귀 돌연변이를 통해 m3D8 VL과의 CDR1 지역 구조적 차이가 줄어드는 것을 확인하였다.
- [0174] **실시예 5. 세포질 침투능을 가지는 인간화 경쇄가변영역(VL) 단일도메인 발현 및 정제**
- [0175] 상기 실시예 4에서 디자인된 ht2 VL, ht3 VL의 실제 세포질 침투능을 비교하기 위하여 인간화 경쇄가변영역(VL) 단일도메인을 정제하였다.
- [0176] 구체적으로는, 세포질 침투능을 갖는 경쇄가변영역 단일도메인 N-말단에 Pho A 시그널 펩타이드와 C-말단에 protein A 태그가 포함된 pIg20 벡터로 NheI/BamHI 제한효소를 이용하여 클로닝하였고, 단백질 발현용 대장균인 BL21(DE3)plysE에 전기천공법을 이용하여 형질전환하였다. 100 ug/ml 암피실린이 포함된 LBA 배지에서 180 rpm, 37 도 조건에서 흡광도 600 nm에서 0.6~0.8까지 배양한 이후 최종 농도 0.5 mM IPTG (Isoprophy β-D-1-thiogalactopyronoside) 처리 후 23 도에서 20시간 발현하였다. 발현 후 고속원심분리기를 이용하여 8,000 rpm에서 30 분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 IgG 세파로오스 수지(GE Healthcare)와 반응시켰다. TBS (Tris-HCl, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4) 50 ml을 이용하여 수지 세척을 한 이후 5 mM NH₄Ac, pH 5.0 버퍼 5ml로 추가적 세척하였다. 이후 0.1 M HAc, pH 3.0 버퍼로 수지에서 단백질을 용출하였고, 투석방법을 이용하여 TBS, pH 7.4 로 버퍼를 교체하였고, BCA(bicinchoninic acid(Pierce))분석 방법을 통해 단백질 농도 측정 및 SDS-PAGE를 통해 단백질의 순도를 확인하였다.
- [0177] **실시예 6. 세포질 침투 인간화 경쇄가변영역(VL) 단일도메인의 세포질 침투능과 세포 침투기작 검증.**
- [0178] 도 6a는 경쇄가변영역 단일도메인의 세포질 침투능을 공초점 현미경 (confocal microscopy)으로 관찰한 결과이다.
- [0179] 구체적으로는, m3D8 VL, ht0 VL, ht2 VL, ht3 VL의 세포질 침투능을 검증하기 위해 24 웰 플레이트에 커버슬립

을 넣고 각 웰 당 5×10^4 개의 HeLa 세포주를 10 % FBS (Fetal bovine Serum)가 포함된 배지 0.5 ml로 넣어 12 시간 동안 5 % CO₂, 37 도 조건에서 배양했다. 세포가 안정화 되면, 각 웰에 새로운 배지 0.5 ml에 m3D8 VL, hT0 VL, hT2 VL 또는 hT3 VL을 10 μM 처리하여 37 도, 5 % CO₂ 조건에서 6 시간동안 배양했다. 이후, 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, 약산성용액(200 mM glycine, 150 mM NaCl pH 2.5)으로 세포 표면에 붙은 단백질을 제거하고, PBS 세척 후, 4 % 파라포름알데히드 첨가 후 25 도 조건으로 10 분간 세포를 고정했다. PBS로 세척하고, PBS에 0.1 % 사포닌, 0.1 % 아지드화 나트륨, 1 % BSA가 첨가되어있는 완충액으로 25 도, 10 분간 배양하여 세포막에 구멍을 형성하는 과정을 거쳤다. 다시 PBS로 세척 후, 비특이적 결합을 억제하기 위해 PBS에 2 % BSA가 첨가된 완충액으로 25 도에서 1 시간 동안 반응시켰다. 경쇄가변영역 단일도메인의 Protein A 태그를 인지하는 Rabbit-IgG(Sigma)를 처리하여 25 도에서 2 시간 염색하고, PBS로 3번 세척 후 적색형광(TRITC)이 연결된 항 Rabbit 항체(sigma)를 처리하여 25 도에서 1 시간 반응시켰다. 마지막으로 Hoechst33342를 이용하여 핵을 염색(적색형광)하여 공초점 현미경으로 관찰했다. hT0 VL을 제외한 m3D8 VL, hT2 VL, hT3 VL 모두 세포질 침투능을 확인했다.

[0180] 도 6b는 경쇄가변영역 단일도메인의 세포질 침투 메커니즘을 검증하기 위하여, 공초점 현미경으로 관찰한 결과이다.

[0181] 구체적으로는 도 6a와 같이 HeLa 세포주를 준비하여 세포가 안정화 되면, 각 웰에 새로운 배지 0.5 ml에 m3D8 VL, hT2 VL 또는 hT3 VL 10 μM과 녹색형광을 띄는 Alexa Fluor 488-transferrin (TF, 녹색형광), FITC-cholera toxin B (Ctx-B, 녹색형광) 또는 Oregon green-dextran (Dextran, 녹색형광) 10 ug/ml로 회색하여 2 시간 동안 37 도, 5 % CO₂ 조건에서 배양했다. 이후 경쇄가변영역 단일도메인 염색방법은 도 6a와 같다. 도 6b에 나타난 바와 같이, 경쇄가변영역 단일도메인 모두 cholera toxin-B와 중첩함으로써, Caveolae에 의해 세포질 침투하는 것을 확인했다.

[0182] **실시예 7. 인간 항체 중쇄가변영역과 상호작용 결합이 용이한 세포질 침투 인간화 경쇄가변영역(VL) 단일도메인 개발.**

[0183] 도 7a는 hT3 VL 의 다양한 인간 항체 중쇄가변영역에 대해서 적용가능 여부를 확인하기 위해 기존의 인간 항체 Adalimumab(Humira)과 인간화 항체 Bevacizumab(Avastin)의 경쇄가변영역(VL)과 아미노산 서열을 분석한 결과이다.

[0184] 구체적으로는, 중쇄, 경쇄가변영역 간의 결합에 의한 관여하는 인터페이스(VH-VL interface) 잔기를 분석한 결과, VL 도메인의 CDR3에 위치하고 있는 89번째 라이신(Lysine, K), 91번째 세린(Serine, S)이 인간 항체들에서 89번째 글루타민(Glutamine, Q), 91번째 타이로신(Tyrosine, Y)으로 일치함을 확인하였다.

[0185] 상기 잔기에 대한 개량 전략을 구축하기 위해 인터페이스(VH-VL interface) 잔기 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역의 CDR에 대한 영향을 좀더 구체적으로 분석하였다.

[0186] 도 7b는 추가적으로 인간항체 중쇄가변영역과 최적화된 결합을 통해 안정적 cytotransmab 구축을 위한 가변영역 간의 인터페이스 잔기를 분석한 결과이다.

[0187] 구체적으로는, 기존 문헌을 통해 인간 항체 가변영역 간의 인터페이스 잔기 위치 및 반대편 가변영역에 위치한 특정 인터페이스 잔기와 결합빈도, 인터페이스 잔기의 인간항체에서의 사용빈도를 자료를 근거로 hT3 VL과 FDA에 승인된 치료용 항체 Bevacizumab (Avastin), Adalimumab (Humira)의 중쇄, 경쇄 가변영역 간의 인터페이스를 분석하였다(Vargas-Madrado and Paz-Garcia, 2003). 분석 결과 hT3 VL의 마우스 유래 CDR에서 가변영역간의 결합에 관여하는 CDR3에 포함된 89번 91번 잔기가 인간항체 사용빈도가 높은 지역이며, 중쇄가변영역(VH)의 CDR3의 구조에 영향을 줄 수 있음을 확인하였다. 이 두 잔기를 인간항체에서 사용빈도 높은 아미노산으로 돌연변이하여 인간항체 중쇄가변영역과 최적화된 결합을 할 수 있는 hT4 VL을 개발하였다.

[0188] 하기 표 1과 2는 디자인된 세포질 침투능을 갖는 인간 항체 경쇄가변영역 서열을 나타낸다. 표 1은 인간항체 경쇄가변영역 전체 서열을 Kabat 넘버링에 맞게 나타낸 표이며, 표 2는 상기 표 1의 항체 서열에서 CDR 서열만 따로 표기한 내용이다.

표 1

경쇄가변영역 명칭	서열	서열번호
hT2 VL	1 10 20 abcdef 30 40 50 DLVMTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLFNSRTRKINYLAWYQQKPGQAPRLLIYW 60 70 80 90 100 ASTRESGI PDRFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCKQSYHYMYTFGGGTKVEIKR	29
hT3 VL	1 10 20 abcdef 30 40 50 DLVMTQSPSSLSASVGRVITCKSSQSLFNSRTRKINYLAWYQQKPGKAPKLLIYW 60 70 80 90 100 ASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCKQSYHYMYTFGGGTKVEIKR	30
hT4 VL	1 10 20 abcdef 30 40 50 DLVMTQSPSSLSASVGRVITCKSSQSLFNSRTRKINYLAWYQQKPGKAPKLLIYW 60 70 80 90 100 ASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYHYMYTFGGGTKVEIKR	31

[0189]

[0190] 세포질 침투 인간 항체 경쇄가변영역 전체 서열.

표 2

경쇄가변영역 명칭	CDR1 서열	서열번호	CDR2 서열	서열번호	CDR3 서열	서열번호
Kabat No.	24 25 26 27 27a 27b 27c 27d 27e 27f 28 29 30 31 32 33 34		50 51 52 53 54 55 56		89 90 91 92 93 94 95 96 97	
hT2 VL	K S S Q S L F N S R T R K N Y L A	32	W A S T R E S	33	K Q S Y Y H M Y T	34
hT3 VL	K S S Q S L F N S R T R K N Y L A	35	W A S T R E S	36	K Q S Y Y H M Y T	37
hT4 VL	K S S Q S L F N S R T R K N Y L A	38	W A S T R E S	39	Q Q Y Y Y H M Y T	40

[0191]

[0192] 세포질 침투 인간 항체 경쇄가변영역의 CDR 서열.

[0193] 실시예 8. 세포질 침투 인간화 경쇄가변영역(VL) 치환을 통한 cytotransmab 개발 및 발현 정제.

[0194] 도 8은 cytotransmab 구축을 위해 세포침투능이 없는 경쇄가변영역을 세포질 침투능을 갖는 인간화 경쇄가변영역을 치환하는 방법에 대한 전반적인 모식도이다.

[0195] 구체적으로는, 완전한 이뮤노글로불린 형태의 단일클론항체 형태로 생산하기 위한 중쇄 발현백터를 구축하기 위해 5' 말단에 분비 시그널펩타이드를 코딩하는 DNA가 융합된 다양한 항체의 중쇄가변영역(Bevacizumab VH, Adalimumab VH, 인간화 hT0 VH)과 중쇄불변영역(CH1-hinge-CH2-CH3)를 포함하는 중쇄를 코딩하는 DNA를 각각 pcDNA3.4 (Invitrogen) 벡터에 NotI/HindIII로 클로닝하였다. 또한 경쇄를 발현하는 백터를 구축하기 위해 5' 말단에 분비 시그널펩타이드를 코딩하는 DNA가 융합된 세포질 침투 경쇄가변영역(hT4 VL) 또는 모델항체의 경쇄가변영역(Bevacizumab VL, Adalimumab VL)과 경쇄불변영역(CL)을 포함하는 경쇄를 코딩하는 DNA를 각각 pcDNA3.4 (Invitrogen) 벡터에 NotI/HindIII로 클로닝하였다.

[0196] 상기 경쇄, 중쇄 발현 백터를 일시적 트랜스펙션(transient transfection)을 이용하여 단백질을 발현 및 정제하여 수율을 비교하였다. 진탕 플라스크에서, 무혈청 FreeStyle 293 발현 배지(Invitrogen)에서 부유 성장하는 HEK293-F 세포(Invitrogen)를 플라스미드 및 폴리에틸렌이민 (Polyethylenimine, PEI) (Polyscience)의 혼합물

로 트랜스펙션하였다. 진탕 플라스크 (Corning)에 200 mL 트랜스펙션 시, HEK293-F 세포를 2.0×10^6 세포/ml의 밀도로 배지 100ml에 과중하여, 150 rpm, 8 % CO₂에서 배양하였다. 각각의 단일클론항체 생산하기 위해 알맞은 중쇄와 경쇄 플라스미드를 10ml FreeStyle 293 발현 배지 (Invitrogen)에 중쇄 125 µg, 경쇄 125 µg 총 250 µg (2.5 µg/ml)으로 희석하여, PEI 750 µg (7.5 µg/ml)을 희석한 10ml의 배지와 혼합하여 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 그 후, 반응시킨 혼합배지를 앞서 100ml로 과중한 세포에 넣어 4시간 동안 150 rpm, 8% CO₂에서 배양 후, 나머지 100 ml의 FreeStyle 293 발현 배지를 추가하여 6일동안 배양했다. 표준 프로토콜을 참조하여 채취한 세포 배양 상등액으로부터 단백질을 정제하였다. 단백질 A 세파로오스 컬럼 (Protein A Sepharose column) (GE healthcare)에 항체를 적용하고 PBS (pH 7.4)로 세척하였다. 0.1 M 글라이신 완충액을 이용하여 pH 3.0에서 항체를 용리한 후 1M Tris 완충액을 이용하여 샘플을 즉시 중화하였다. 용리한 항체 분획은 투석방법을 통해 PBS (pH7.4)로 완충액을 교환하며 농축을 진행했다. 정제된 단백질은 280nm 파장에서 흡광도와 흡광계수를 이용하여 정량했다.

[0197]

하기 표 3은 정제된 cytotransmab 및 단일클론항체의 배양부피 1 리터당 생산되는 단백질의 수율을 나타낸다. 3회 수행하여 얻은 결과를 통계처리하였으며, ±는 표준편차 값을 나타낸다. 얻어진 단백질의 수율은 인간 중쇄가변영역(VH)와 상호작용 결합이 용이하기 위해 개량된 hT4 VL을 포함한 cytotransmab의 경우, 야생형 단일클론항체와 큰 차이가 없었다.

표 3

IgG clone	VH	VL	IgG purification yield (mg / 1-liter of transfected cells)
TMab2	h3D8 VH	hT2 VL	8.0 ± 0.7
TMab3	h3D8 VH	hT3 VL	8.2 ± 0.5
TMab4	h3D8 VH	hT4 VL	10.8 ± 1.0
Adalimumab	Adalimumab VH	Adalimumab VL	11.6 ± 0.3
HuT2	Adalimumab VH	hT2 VL	2.1 ± 0.6
HuT3	Adalimumab VH	hT3 VL	3.5 ± 0.8
HuT4	Adalimumab VH	hT4 VL	10.9 ± 0.8
Bevacizumab	Bevacizumab VH	Bevacizumab VL	8.8 ± 0.4
AvaT4	Bevacizumab VH	hT4 VL	8.0 ± 1.1

[0198]

[0199]

Cytotransmab과 야생형 IgG 형태의 단일클론항체 Adalimumab, Bevacizumab 의 발현 정제 수율 비교.

[0200]

이를 통해 인터페이스 간기를 추가적으로 개량한 인간화 경쇄가변영역(hT4 VL)이 인간화 항체 중쇄가변영역과 최적화된 결합을 통해 안정적인 발현 및 정제가 가능함을 확인하였다.

[0201]

실시에 9. Cytotransmab들의 세포질 침투능 검증.

[0202]

도 9a는 세포질 침투능을 갖는 경쇄가변영역 hT4 VL로 경쇄가변영역이 치환된 cytotransmab들의 세포질 침투능을 검증하기 위하여, 다양한 세포주에서 1~2개의 세포에 초점을 맞추고 공초점 현미경로 관찰한 결과이다.

[0203]

구체적으로는, 24 웰 플레이트에 각 웰 당 5×10^4 개의 HeLa, PANC-1, HT29, MCF-7 세포를 10 % FBS가 포함된 배지 0.5 ml로 넣어 12 시간 동안 5 % CO₂, 37 도 조건에서 배양했다. 세포가 안정화 되면, 각 웰에 새로운 배지 0.5 ml에 TMab4, Adalimumab(Humira), Bevacizumab(Avastin), HuT4, AvaT4 1 µM로 희석하여 6 시간 동안 37

도, 5 % CO₂ 조건에서 배양했다. 이후, 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, 약산성용액(200 mM glycine, 150 mM NaCl pH 2.5)으로 세포 표면에 붙은 단백질을 제거했다. PBS 세척 후, 4 % 파라포름알데히드 첨가 후 25 도 조건으로 10 분간 세포를 고정했다. 이후 PBS로 세척하고, PBS에 0.1 % 사포닌, 0.1 % 아지드화 나트륨, 1 % BSA가 첨가되어있는 완충액으로 25 도, 10 분간 배양하여 세포막에 구멍을 형성하는 과정을 거쳤다. 다시 PBS로 세척 후, 비특이적 결합을 억제하기 위해 PBS에 2 % BSA가 첨가된 완충액으로 25 도에서 1 시간 동안 반응시켰다. 그 다음, FITC(녹색형광)가 결합되어있는 인간 Fc를 특이적으로 인지하는 항체 (Sigma)로 25 도에서 1.5 시간 염색하고, Hoechst33342를 이용하여 핵을 염색(청색형광)하여 공초점 현미경으로 관찰했다. 세포 외부 분비 단백질을 표적하는 IgG 형태의 단일클론항체 Adalimumab과 Bevacizumab과는 달리 TAb4, HuT4 와 AvaT4는 세포 내부에서 녹색형광이 관찰되었다.

[0204] 도 9b는 상기 도 9a의 공초점 현미경 관찰을 통한 세포질 침투능 검증 실험에서 세포 침투효율을 확인하기 위해 렌즈 배율을 낮추어 여러 개의 세포에 대한 세포질 침투능을 확인한 결과이다.

[0205] 세포질 침투능을 갖는 인간화 경쇄가변영역이 도입된 cytotransmab의 경우, 모든 세포에서 세포질 침투를 통해 세포질에 분포되는 것을 확인하였다.

[0206] **실시예 10. Cytotransmab들의 세포 독성 평가**

[0207] 상기 실시예 9에서 세포질 침투능을 갖고 있는 cytotransmab이 In vitro 상에서, 세포 독성을 가지는 확인하기 위하여 HeLa, PANC-1 세포주에 TAb4, HuT4, Adalimumab, AvaT4, Bevacizumab을 처리하여 세포 성장 저해 정도를 MTT assay (sigma)를 통하여 확인 하였다.

[0208] 구체적으로는, 96웰 플레이트에 웰 당 1x10⁴ 개의 세포 (HeLa, PANC-1)을 각각 10 % FBS가 포함된 배지 0.1 ml 에 희석하여 12 시간, 37 도, 5 % CO₂ 조건에서 배양하였다. 이후, 1 μM의 TAb4, HuT4, Adalimumab, AvaT4, Bevacizumab을 20 시간 또는 4 시간동안 처리 한 후, MTT 용액 (1 mg/ml PBS) 20 μl를 첨가 하였고, 4 시간 동안 더 배양하였다. 형성된 포마잔 (fomazan)을 200 μl의 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)로 용해시키고, 흡광도계로 595 nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포 생존율을 구하였다.

[0209] 도 10a는 HeLa와 PANC-1 세포주에서 cytotransmab을 처리하여 세포성장 저해 정도를 in vitro에서 평가하여 그래프로 도식화 한 것이다. 도 10b는 HeLa와 PANC-1 세포주에서 cytotransmab을 처리하여 세포성장 저해 정도를 in vitro에서 확인한 사진을 나타낸 것이다. 도 10a, 및 도 10b에서 나타난 바와 같이, 모든 항체들이 세포 독성을 보이지 않음을 확인했다.

[0210] **실시예 11. 항-Ras · GTP iMab 발현, 정제 및 KRas 돌연변이들과의 친화도 분석**

[0211] 세포 침투 및 세포질에 위치하는 특성을 갖는 cytotransmab의 중쇄가변영역(VH)을 상기 실시예 3번에서 선별된 RT4 VH로 치환하여 세포 침투를 통해 세포내 GTP가 결합된 Ras를 특이적으로 표적이 가능한 항-Ras · GTP iMab 구축 및 동물세포에서 발현하였다.

[0212] 구체적으로는, 완전한 이뮤노글로불린 형태의 단일클론항체형태로 생산하기 위한 중쇄 발현벡터를 구축하기 위해 5' 말단에 분비 시그널펩타이드를 코딩하는 DNA가 융합된 RT11 중쇄가변영역(RT11 VH)과 중쇄불변영역(CH1-hinge-CH2-CH3)를 포함하는 중쇄를 코딩하는 DNA를 각각pcDNA3.4 (Invitrogen) 벡터에 NotI/HindIII로 클로닝 하였다. 또한 경쇄를 발현하는 벡터를 구축하기 위해 5' 말단에 분비 시그널펩타이드를 코딩하는 DNA가 융합된 세포질 침투 경쇄가변영역(hT4 VL)과 경쇄불변영역(CL)을 포함하는 경쇄를 코딩하는 DNA를각각 pcDNA3.4 (Invitrogen) 벡터에 NotI/HindIII로 클로닝하였다.

[0213] 상기 경쇄, 중쇄 발현 벡터를 일시적 트랜스펙션(transient transfection)을 이용하여 단백질을 발현 및 정제하여 수율을 비교하였다. 진탕 플라스크에서, 무혈청 FreeStyle 293 발현 배지(Invitrogen)에서 부유 성장하는 HEK293-F 세포(Invitrogen)를 플라스미드 및 폴리에틸렌민 (Polyethylenimine, PEI)(Polyscience)의 혼합물로 트랜스펙션하였다. 진탕 플라스크 (Corning)에 200 mL 트랜스펙션 시, HEK293-F 세포를 2.0 × 10⁶ 세포/ml 의 밀도로 배지 100ml에 과중하여, 150 rpm, 8 % CO₂에서 배양하였다. 각각의 단일클론항체 생산하기 위해 알맞은 중쇄와 경쇄 플라스미드를 10ml FreeStyle 293 발현 배지 (Invitrogen)에 중쇄 125 μg, 경쇄 125 μg 총 250

μg (2.5 μg/ml)으로 희석하여, PEI 750 μg (7.5 μg/ml)을 희석한 10ml의 배지와 혼합하여 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 그 후, 반응시킨 혼합배지를 앞서 100ml로 파종한 세포에 넣어 4시간 동안 150 rpm, 8% CO₂에서 배양 후, 나머지 100 ml의 FreeStyle 293 발현 배지를 추가하여 6일동안 배양했다. 표준 프로토콜을 참조하여 채취한 세포 배양 상등액으로부터 단백질을 정제하였다. 단백질 A 세파로오스 컬럼 (Protein A Sepharose column) (GE healthcare)에 항체를 적용하고 PBS (pH 7.4)로 세척하였다. 0.1M 글라이신 완충액을 이용하여 pH 3.0에서 항체를 용리한 후 1M Tris 완충액을 이용하여 샘플을 즉시 중화하였다. 용리한 항체 분획은 투석방법을 통해 PBS (pH7.4)로 완충액을 교환하며 농축을 진행했다. 정제된 단백질은 280nm 파장에서 흡광도와 흡광계수를 이용하여 정량했다.

[0214] 도 11은 항-Ras · GTP iMab RT4의 정제 후 환원성 또는 비환원성 조건에서 12% SDS-PAGE를 통해서 분석한 것이다.

[0215] 구체적으로는, 비환원성 조건에서 약 150 kDa의 분자량을 확인하였으며, 환원성 조건에서 중쇄 50 kDa의 분자량 및 경쇄 25 kDa의 분자량을 보여주었다. 이는 발현 정제된 항-Ras · GTP iMab이 비공유결합을 제거한 용액상태에서 단일체로 존재하며, 비자연적 이황화 결합을 통해 이중체 또는 올리고머를 형성하지 않음을 보여준다.

[0216] 도 12는 야생형 KRas 및 KRas 돌연변이체 KRas G12D, KRas G12V, KRas G13D의 GTP가 결합된 형태와 GDP가 결합된 형태에서의 친화도를 측정하기 위한 ELISA를 수행한 결과이다.

[0217] 구체적으로 표적분자 GTP가 결합된 KRas 돌연변이와 GDP가 결합된 KRas 돌연변이를 96웰 EIA/RIA 플레이트 (COSTAR Corning)에 1시간동안 37 도에서 결합시킨 후 0.1 % TBST (0.1 % Tween20, pH 7.4, 137 mM NaCl, 12mM Tris, 2.7 mM KCl, 5 mM MgCl₂) (SIGMA)로 10분간 3회 씻어낸다. 4% TBSB (4% BSA, pH7.4, 137 mM NaCl, 12mM Tris, 2.7 mM KCl, 10 mM MgCl₂) (SIGMA)로 1시간 동안 결합한 후 0.1% TBST로 10분간 3회 씻어낸다. 이후 항-Ras · GTP iMab RT4 및 Ras 결합능이 없고 세포질 침투능만 있는 cytotransmab Tmab4를 4 % TBSB로 희석하여 100 nM 농도로 결합시킨 후 0.1 % PBST로 10분간 3회 씻어낸다. 표지항체로 염소유래 AP가 접합된 항-인간 항체(alkaline phosphatase-conjugated anti-human mAb) (SIGMA)로 결합시킨다. pNPP(p-nitrophenyl palmitate) (SIGMA)로 반응시켜 405 nm 흡광도를 정량하였다.

[0218] 항-Ras · GTP iMab RT4의 GTP가 결합된 KRas G12D에 대한 결합력을 더 정량적으로 분석하기 위하여 SPR(Surface plasmon resonance)을 수행하였다. Biacore2000 기기(GE healthcare)를 이용하였다.

[0219] 구체적으로는, 항-Ras · GTP iMab RT4를 10 mM Na-아세테이트 완충액(pH 4.0)에 희석하여 CM5 센서칩(GE healthcare)에 약 1100 response units(RU)고정화하였다. Tris 완충액 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.005 % Tween 20)을 30 μl/min 유속으로 분석하였으며, GTP가 결합된 KRas G12D를 1000 nM에서 62.5 nM의 농도로 분석하였다. 결합, 해리 분석후 CM5칩의 재생(regeneration)은완충액(10mM NaOH, 1M NaCl, pH10.0)을 30 μl/min 유속으로 1.5분간 흘려주어 시행되었다. 결합 3분, 해리 3분으로 얻어진 각 센서그램(sensorgram)은 공백 칸(Blank cell)과 비교하여 정상화(normalization) 및 절감(Subtraction)하여 친화도를 계산하였다.

[0220] 도 13은 SPR (BIACORE 2000)(GE healthcare)를 이용하여 KRAS G12D에GTP가 결합형태에 대한 항-Ras · GTP iMab RT4의 친화도 분석 결과를 나타낸다.

[0221] **실시에 12. 항-Ras · GTP iMab RT4의 세포질 침투성 확인.**

[0222] 도 14는 항-Ras · GTP iMab RT4의 세포질 침투성을 확인하기 위해 공초점 현미경으로 관찰한 결과이다. KRas 돌연변이를 갖는 세포주 (PANC-1, HCT116)와 KRas 야생형을 갖은 세포주를 (HT29, HeLa)에서 항-Ras · GTP iMab RT4의 세포 침투성을 관찰했다.

[0223] 구체적으로는, 각각의 세포주들을 24 웰 플레이트에 각 웰 당 5x10⁴ 개로 10 % FBS가 포함된 배지 0.5 ml로 넣어 12 시간 동안 5 % CO₂, 37 도 조건에서 배양했다. 세포가 안정화 되면, 각 웰에 새로운 배지 0.5 ml에 Tmab4, RT4를 1 μM로 희석하여 6시간 동안 37 도, 5% CO₂ 조건에서 배양했다. 이후 이후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, 약산성용액(200 mM glycine, 150 mM NaCl pH 2.5)으로 세포 표면에 붙은 단백질을 제거했다. PBS 세척 후, 4 % 파라포름알데히드 첨가 후 25도 조건으로 10 분간 세포를 고정했다. 이후 PBS로 세척하고,

PBS에 0.1 % 사포닌, 0.1 % 아지드화 나트륨, 1 % BSA가 첨가되어있는 완충액으로 25도, 10 분간 배양하여 세포 막에 구멍을 형성하는 과정을 거쳤다. 다시 PBS로 세척 후, 비특이적 결합을 억제하기 위해 PBS에 2 % BSA가 첨가된 완충액으로 25도에서 1 시간 동안 반응시켰다. 그 다음, FITC(녹색형광)가 결합되어있는 인간 Fc를 특이적으로 인지하는 항체 (Sigma)로 25도에서 1.5 시간염색하고, Hoechst33342를 이용하여 핵을 염색(청색형광)하여 공초점 현미경으로 관찰했다. 항-Ras · GTP iMab들이 세포내 형광이 관찰 되는 것으로 보아, cytotransmab에서 GTP와 결합된 KRas에 특이적 결합하는 중쇄가변영역과 치환을 한 이후에도 세포질 침투성을 잃지 않는 것을 확인하였다.

실시에 13. 항-Ras · GTP iMab RT4의 세포 독성 평가

(1) 항-Ras · GTP iMab의 부작성 세포 성장 억제 평가

도 15는 NIH3T3, NIH3T3 KRas G12V, NIH3T3 HRas G12V 세포주에서 항-Ras · GTP iMab RT4를 처리하여 세포성장 저해 정도를 in vitro에서 평가한 결과이다.

구체적으로는, 항-Ras · GTP iMab RT4가 In vitro 상에서, KRas 돌연변이 의존적 세포주에 특이적인 독성을 가지는지 확인 하기 위해, 야생형 KRas인 마우스 섬유아 세포주인 NIH3T3와 Ras 돌연변이를 인위적으로 과발현시킨 NIH3T3 KRas G12V, NIH3T3 HRas G12V 돌연변이 세포주 그리고 KRas G13D 돌연변이 인간 췌장암 세포주인PANC-1에 TAb4, RT4 1 μM를 각각 처리하여 부작성 세포 성장 저해 정도를 평가하였다.

구체적으로는, 24웰 플레이트에 웰당 2x10³ 개의 세포 NIH3T3, PANC-1을 각각 10 % FBS가 포함된 배지 0.5 ml에 희석하여 12 시간, 37 도, 5 % CO₂ 조건에서 배양하였다. 이후 1 μM의 TAb4, RT4를 72시간씩 두차례 처리하여 총 144 시간 동안 관찰 한 후, 살아 있는 세포의 개수를 카운팅하여 세포의 성장 정도를 비교하였다.

도 15에서 나타난 바와 같이, TAb4에서는 독성을 보이지 않는 반면, RT4는 KRas 돌연변이 세포주(NIH3T3 KRas G12V, NIH3T3 HRas G12V)에서만 세포성장을 억제하였고, NIH3T3 세포주에서는 독성을 보이지 않았다. 또한, KRas G13D 돌연변이인 PANC-1 세포주에서 세포 성장 저해를 확인한 결과로서, TAb4는 독성이 없는 반면, RT4는 세포 성장 억제를 보였다.

(2) 항-Ras · GTP iMab RT4의 비부작성 세포 성장 억제 평가

도 16은 NIH3T3 HRas G12V 세포주에서 비부작성 세포 성장 저해를 평가한 결과이다.

구체적으로는, 항-Ras · GTP iMab가KRas 돌연변이 세포주에서 비부작성 세포 성장 저해를일으키는 확인 하기 위해, NIH3T3 HRas G12V 돌연변이 세포주에서 콜로니 형성능을 측정(colony formation assay)을 하였다. 구체적으로, 우선 2x DMEM 배지와 0.5 ml와 1 % 아가로스 용액 0.5 ml을 섞어 12 웰 플레이트에 플레이팅하여 0.5 % 아가로스 겔로 굳혔다. 이후 2x DMEM 배지 0.4ml, 0.7 % agarose 0.5 ml, NIH3T3 HRas G12V 세포주 1x10³ 개 0.05 ml를 PBS, TAb4, RT4, Lonafarnib (20 μM) 0.05 ml와 섞어 0.5 % 아가로스 겔 위에 플레이팅 하여 굳혔다. 그 후 3일 간격으로 총 21 일 동안, 1x DMEM 배지 0.5 ml에 PBS, TAb4, RT4, Lonafarnib 1 μM로 0.35 % 아가로스 겔 위에 처리 하였다. 21 일에 NBT(nitro-blue tetrazolium) 용액으로 세포를 염색한 후, 콜로니 수를 카운팅 하였다.

상기 부작성 세포 성장 저해 실험 결과와 동일하게, RT4는 콜로니 형성이 억제된 반면, TAb4에서는 콜로니 형성 억제를 보이지 않았다.

위 결과로, 항-Ras · GTP iMab RT4는 세포질에 있는 Ras 돌연변이에 특이적으로 결합하여 부작성 및 비부작성 세포 성장을 억제하는 것을 확인하였다.

실시에 14. 항-Ras · GTP iMab RT4의 세포내 GTP가 결합된 KRas와 특이적 결합 확인.

도 17은 항-Ras · GTP iMab RT4와 세포내 활성화된 HRas G12V 돌연변이와의 중첩 여부를 공초점 현미경으로 확인한 결과이다. 도 18은 항-Ras · GTP iMab와 세포내 GTP가 결합된 KRas G12V 돌연변이와의 중첩 여부를 공초점 현미경으로 확인한 결과이다.

[0237] 구체적으로는, 24 웰 플레이트에 fibronectin (sigma)를 코팅한 후, mCherry(적색형광) HRas G12V, mCherry(적색형광) KRas G12V가 발현되는 NIH3T3 세포주를 각각 웰당 2×10^4 개를 0.5ml에 희석하여 12 시간, 37 도, 5 % CO₂ 조건에서 배양한 후, TAb4, RT4 2 μ M을 처리하여 37도, 12 시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, 약산성용액(200 mM glycine, 150 mM NaCl pH 2.5)으로 세포 표면에 붙은 단백질들을 제거했다. PBS 세척 후, 4 % 파라포름알데히드 첨가 후 25도 조건으로 10 분간 세포를 고정했다. 이후 PBS로 세척하고, PBS에 0.1 % 사포닌, 0.1 % 아지드화 나트륨, 1 % BSA가 첨가되어있는 완충액으로 25도, 10 분간 배양하여 세포막에 구멍을 형성하는 과정을 거쳤다. 다시 PBS로 세척 후, 비특이적 결합을 억제하기 위해 PBS에 2 % BSA가 첨가된 완충액으로 25도에서 1 시간 동안 반응시켰다. 그 다음, FITC(녹색형광)가 결합되어있는 인간 Fc를 특이적으로 인지하는 항체 (Sigma)로 25도에서 1.5 시간염색하고, Hoechst33342를 이용하여 핵을 염색(청색형광)하여 공초점 현미경으로 관찰했다. 도 17와 18번에 나타난 바와 같이, 적색형광의 활성화된 Ras가 위치하는 세포내막 부분에 녹색형광의 RT4가 중첩된 반면, TAb는 중첩되지 않았다.

[0238] 상기 실험 결과로 세포내의 GTP가 결합된 Ras와 항-Ras · GTP iMab RT4가 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다.

[0239] **실시에 15. RGD가 융합된 항-Ras · GTP iMab RT4의 세포 독성 평가**

[0240] In vivo실험을 위해서는 종양 조직특이성을 부여할 필요가 있다. 기존 cytotransmab의 경우, 세포표면에 HSPG와 결합하며 그 밖의 어떠한 종양조직특이성을 갖지 않고 있기 때문에 in vivo실험에서 종양에 대한 특이적 생장 저해를 하지 못할 가능성이 높다. 이를 개선하기 위해 신생혈관세포 및 다양한 종양에서 과발현되는 인테그린(Integrin $\alpha v \beta 3$)에 특이성을 갖는 RGD4C 펩타이드(CDCRGDCFC, 서열번호 41)를 경쇄 N-말단에 GGGGS 1 개의 링커를 사용하여 유전공학적으로 융합하였다. RGD4C 펩타이드의 경우, 기존 RGD 펩타이드보다 높은 친화도를 가지고 있으며, 유전공학적으로 융합이 가능하고, N-말단에 융합시에도 RGD 펩타이드의 특정 구조를 유지할 수 있는 특징이 있다 (Koivunen E et al., 1995).

[0241] 도 19은 HCT116, PANC-1 세포주에서 RGD-TAb4와 RGD-RT4를 처리하여 세포성장 저해 정도를 in vitro에서 평가한 결과이다.

[0242] In vitro 상에서, RGD-TAb4 와 RGD-RT4 자체가 세포 독성을 가지는지 확인 하기 위해, KRas G13D 돌연변이를 가지고 있는 인간 대장암 세포주인 HCT116과 KRas G12D 돌연변이를 가지고 있는 인간 췌장암 세포주인 PANC-1에 RGD-TAb4와 RGD-RT4를 각각 처리하여 세포 성장 저해 정도를 평가하였다.

[0243] 구체적으로는, 24 웰 플레이트에 웰당 5×10^3 개의 세포 HCT116, PANC-1을 각각 10 % FBS가 포함된 배지 0.5 ml에 희석하여 12 시간, 37 도, 5 % CO₂ 조건에서 배양하였다. 이후 1 μ M의 RGD-TAb4, RGD-RT4를 72시간씩 두차례 처리하여 총 144 시간 동안 관찰 한 후, 살아 있는 세포의 개수를 카운팅하여 세포의 성장 정도를 비교하였다.

[0244] 도 19에서 나타난 바와 같이, RGD-TAb4는 HCT116와 PANC-1 세포주에서 각각 약 20 %, 15 % RGD-RT4는 각각 약 40 %, 50 %정도 세포성장을 억제하였다. 기존 연구에서 RGD4C 펩타이드의 경우, 인테그린 $\alpha v \beta 5$ 에 대해서 인테그린 $\alpha v \beta 3$ 와 비교하였을 때 약 3배 정도 친화도가 낮으나 인테그린 $\alpha v \beta 3$ 는 주로 신생혈관세포에 과발현되며, 인테그린 $\alpha v \beta 5$ 는 다양한 종양세포에서 발현되어 RGD4C 펩타이드는 HCT116, PANC-1 세포주의 $\alpha v \beta 5$ 과 결합하여 세포부착을 저해하는 활성을 보인다 (Cao L et al., 2008).

[0245] 이를 통해 RGD4C 펩타이드가 융합된 TAb4의 경우 세포독성을 보인다고 확인하기 어렵다. 추가적으로 RGD-TAb4와 RGD-RT4를 비교하였을 때, RGD 펩타이드가 결합되어 있어도, Ras 특이적 세포 성장을 억제 할 수 있음을 간접적으로 확인하였다.

[0246] **실시에 16. RGD가 융합된 항-Ras · GTP iMab의 종양 성장 저해 확인**

[0247] 도 20a는 HCT116 세포주를 이중이식한 쥐에서 RGD가 융합된 항-Ras · GTP iMab RT4의 종양 성장 억제 효과를 확인한 실험 결과이다. 도 14b는 RGD가 융합된 항-Ras · GTP iMab RT4의 비특이적 부작용을 확인하기 위해 쥐의 몸무게를 측정하여 그 그래프이다.

- [0248] 구체적으로는, 상기 실시예 15의 In vitro 결과를 바탕으로, In vivo 상에서 RGD-RT4의 종양 성장 저해를 확인하기 위하여, Balb/c 누드 마우스에 KRas G13D 돌연변이 인간 대장암 세포주인 HCT116를 마우스 당 5×10^6 개의 세포를 피하주사로 주입시켰고, 약 6 일 후 종양의 부피가 약 50 mm^3 정도가 되었을 때, 각각 PBS, RGD-TMab4, RGD-RT4를 20 mg/kg으로 정맥 주사하였다. 2일 간격으로 총 9 회 정맥 주사 하였고, 캘리퍼(Caliper)를 이용하여 18 일간 종양 부피를 측정하였다.
- [0249] 도 20a에 나타난 바와 같이, 대조군인 PBS에 비해 RGD-TMab4와 RGD-RT4는 암세포의 성장을 억제하였고, RGD-TMab4 보다 RGD-RT4가 더 효과적으로 종양 성장을 억제함을 확인 하였다. 또한, 도 20b에서 나타난 바와 같이, RGD-RT4 실험군 마우스의 체중의 변화가 없는 것을 확인하였으며, 이에 따라 다른 독성은 없음을 확인 하였다.
- [0250] **실시예 17. 항-Ras · GTP iMab RT4의 친화도 개량을 위한 라이브러리 구축 및 선별**
- [0251] 항-Ras · GTP iMab RT4의 경우, Ras 특이적 생물학적 활성을 나타내지만 SPR 분석을 통해 얻은 친화도가 약 110 nM 수준으로 IgG 포맷 항체임에도 불구하고 항원에 대한 친화도가 매우 낮다. 이를 극복하고 낮은 농도에서도 생물학적 활성을 향상시키기 위해 친화도 개량이 필요하다.
- [0252] 도 21a는 RT4의 친화도를 개량하기 위한 인간 중쇄가변영역 라이브러리 구축 전략을 나타낸 도면이다. 친화도 개량하기 위해 항원 결합에 중요한 역할을 하는 CDR3(95번~100a번)의 길이를 6개(라이브러리 6), 7개(라이브러리 7), 9개(라이브러리 9)로 다양하게 부여하고, 모든 아미노산을 코딩할 수 있는 디제너레이트 코돈(NNK)를 사용하였다. 또한 친화도 개량 및 RT4의 항원 결합부위를 보존하기 위해 용매접근성이 용이한 CDR1(31번~33번잔기)과 CDR2(50번, 52번~56번 잔기)에 대해서는 기존 RT4서열을 50% 확률로 보존할 수 있는 spiked 올리고머를 사용하였다. 이는 각각 잔기에 대한 아미노산을 코딩하는 3개 뉴클레오타이드에서 각각 야생형 뉴클레오타이드를 79 퍼센트 유지하고 나머지 뉴클레오타이드 비율을 7 퍼센트로 프라이머를 디자인하므로써 PCR 과정에서 야생형 아미노산이 50 퍼센트가 유지되도록 하는 기술이다.
- [0253] 도 21b는 디자인된 라이브러리를 PCR 기법을 이용하여 구축 및 제한효소 NheI, ApaI 처리된 중쇄단일사슬 효모 표면발현 벡터(pYDS-H) 상동 접합 방법을 통해 효모 세포에 형질전환하는 방법을 나타내는 모식도이다.
- [0254] 구체적으로 디자인된 라이브러리 코딩하는 DNA는 PCR 기법을 이용하여 증폭 후 에탄올 침전법을 사용하여 농축하였다. 상동성 접합(Homologous recombination)을 위한 pYDS-H 중쇄단일사슬 효모 표면 발현 벡터는 NheI과 ApaI 제한효소를 처리하여 및 아가로스 젤 추출법을 이용하여 정제 및 에탄올 침전법을 이용하여 농축하였다. 각각 라이브러리 코딩 DNA 12 μg 에 대하여 제한효소 처리된 5 μg 벡터를 효모표면 발현용 접합A타입(Mating type A) 효모 JAR200에 전기천공법으로 형질전환하였고 (Baek D.S and Kim Y.S, 2014; Lorenzo B et al., 2010), 계단식 희석(serial dilution)을 통해 선택배지 SD-CAA+URA (20 g/L Glucose, 6.7 g/L Yeast nitrogen base without amino acids, 5.4 g/L Na_2HPO_4 , 8.6 g/L NaH_2PO_4 , 5 g/L casamino acids, 0.2 mg/L Uracil)에 자란 콜로니의 수를 측정하여 라이브러리 크기를 확인하였다.
- [0255] 각각의 라이브러리 선별 방법은 실시예 3 및 도 4와 같은 방법으로 중쇄가변영역 단독 발현 효모 라이브러리를 이용하여 GTP가 결합된 KRas G12D에 대해서 100 nM의 항원 농도로 1차 MACS 이후 효모접합을 통해 Fab 형태 라이브러리에 대해서 1, 2, 3차 FACS 선별시에는 바이오틴화가 되지 않은 GDP가 결합된 KRas G12D와 경쟁 결합을 통해 GTP가 결합된 KRas G12D 특이적 클론을 선별하였다.
- [0256] 도 22은 상기 기술된 라이브러리 선별과정을 통해서 GTP가 결합된 KRas G12D에 특이적 부유화(enrichment)를 확인하기 위해 대표적으로 라이브러리 6(CDR3 길이가 6개 잔기로 이루어진 라이브러리)의 각 단계별 라이브러리 발현 효모에 대해서 GTP가 결합된 KRas G12D 및 GDP가 결합된 KRas G12D와의 결합능을 유세포 분석기로 분석한 자료이다. 이를 통해 선별된 라이브러리는 GTP가 결합된 KRas G12D에 특이적으로 결합하고, 주형으로 사용한 RT4보다 높은 결합능을 확인하였다.
- [0257] 도 23은 상기 3종의 라이브러리를 통해서 선별된 개별클론 서열 분석 자료이며, 라이브러리를 통해서 돌연변이를 유도한 CDR 지역의 잔기만 돌연변이가 됨을 확인하였다.
- [0258] 하기 표 4는 RT4를 포함하여 RT4를 주형으로 한 친화도 개량 라이브러리로부터 선별된 개별클론들의 인간 항체 중쇄가변영역(VH) 서열이며, 하기 표 5는 상기 선별된 Ras · GTP 특이적 중쇄가변영역(VH)들의 CDR 1, 2 및 3의 서열이다.

표 4

중쇄가변영역 명칭	서열	서열번호
RT4	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISRSGHSTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRFGSIVFDYWGQGGLVTVSS	서열번호1
RT11	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKGLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFF---MDYWGQGGLVTVSS	서열번호2
RT13	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFSMSWVRQAPGKGLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTFG---FDYWGQGGLVTVSS	서열번호3
RT14	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFSMSWVRQAPGKGLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPRGW---FDYWGQGGLVTVSS	서열번호4
RT15	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFSMSWVRQAPGKGLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRFGS---FDYWGQGGLVTVSS	서열번호5
RT16	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFSMSWVRQAPGKGLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSGRFVFDYWGQGGLVTVSS	서열번호6
RT17	10 20 30 40 50 a EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFSMSWVRQAPGKGLEWVSYISRTSHTTY 60 70 80 abc 90 a101 110 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRFGSVFDYWGQGGLVTVSS	서열번호7

[0259]

[0260]

항-Ras · GTP iMab에 사용된 Ras · GTP 특이적 결합능을 보이는 인간 항체 중쇄가변영역(VH) 서열.

표 5

중쇄가변영역 명칭	CDR1 서열	서열번호	CDR2 서열	서열번호	CDR3 서열	서열번호
Kabat No.	31 32 33 34 35		50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65		95 96 97 98 99 100 100a 101 102	
RT4	S Y A M S	8	T I S R S G H S T Y Y A D S V K G	9	R F G S I V F D Y	10
RT11	S Y S M S	11	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	12	G F F - - - M D Y	13
RT13	T F S M S	14	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	15	G T F G - - F D Y	16
RT14	T F S M S	17	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	18	P R G W - - F D Y	19
RT15	T F S M S	20	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	21	R F G S - - F D Y	22
RT16	T F S M S	23	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	24	S S G R F V F D Y	25
RT17	T F S M S	26	Y I S R T S H T T Y Y A D S V K G	27	G R F G S V F D Y	28

[0261]

- [0262] 항-Ras · GTP iMab에 사용된 Ras · GTP 특이적 결합능을 보이는 인간 항체 중쇄가변영역(VH)의 CDR 서열.
- [0263] **실시에 18. 친화도 개량된 항-Ras · GTP iMab들의 발현 및 정제**
- [0264] 상기 실시예 11과 같이 라이브러리 선별을 통해 Ras · GTP에 향상된 친화도를 갖는 중쇄가변영역과 중쇄불변영역(CH1-hinge-CH2-CH3)이 포함된 중쇄를 동물발현 벡터에 클로닝하고, 세포질 침투 인간화 경쇄 발현벡터와 HEK293F 단백질 발현 세포에 동시에 일시적 트랜스펙션(transient transfection)하여 항-Ras · GTP iMab을 발현하였고, 상기 실시예 11과 동일하게 정제하였다.
- [0265] 도 24는 친화도가 개량된 항-RAS · GTP iMab들은 정제 후 환원성 또는 비환원성 조건에서 12 % SDS-PAGE를 통해서 분석한 것이다.
- [0266] 구체적으로는, 실시예 11과 같이 비환원성 조건에서 약 150 kDa의 분자량을 확인하였으며, 환원성 조건에서 중쇄 50 kDa의 분자량 및 경쇄 25 kDa의 분자량을 보여주었다. 이는 발현 정제된 항-RAS · GTP iMab들이 용액상태에서 단일체로 존재하며, 비자연적 이황화 결합을 통해 이중체 또는 올리고머를 형성하지 않음을 확인하였다.
- [0267] **실시에 19. 친화도 개량된 항 Ras · GTP iMab들의 세포 침투능 확인.**
- [0268] 도 25는 항-Ras · GTP iMab의 중쇄가변영역을 친화도가 향상된 Ras · GTP 특이적인 중쇄가변영역으로 교체 후 세포 침투능을 갖는지 확인하기 위해 공초점 현미경으로 관찰한 결과이다.
- [0269] 구체적으로는, HeLa 세포주를 24 웰 플레이트에 각 웰 당 5×10^4 개로 10 % FBS가 포함된 배지 0.5 ml로 넣어 12 시간 동안 5 % CO₂, 37 도 조건에서 배양했다. 세포가 안정화 되면, 각 웰에 새로운 배지 0.5 ml에 TAb4, RT11, RT13, RT14, RT15, RT16, 그리고 RT17을 각각 1 μM로 희석하여 6시간 동안 37 도, 5 % CO₂ 조건에서 배양했다. 이후 과정은 상기 실시예 14의 RT4염색과정과 동일하게 진행했다. 친화도 향상된 항-Ras · GTP iMab들인 RT11, RT13, RT14, RT15, RT16 그리고 RT17의 세포내 형광이 관찰 되는 것으로 보아, 세포침투능을 가짐을 확인하였다.
- [0270] **실시에 20. 친화도 개량된 항-Ras · GTP iMab들의 GTP가 결합된 Ras특이적 결합능 분석.**
- [0271] 도 26a는 KRas G12D의 GTP가 결합된 형태와 GDP가 결합된 형태에서의 친화도가 개량된 항-Ras · GTP iMab들의 친화도를 측정하기 위한 ELISA 수행 결과이다.
- [0272] 구체적으로 상기 실시예 11과 동일한 방법으로 표적분자 GTP가 결합된 KRas G12D와 GDP가 결합된 KRas G12D를 96웰 EIA/RIA 플레이트(COSTAR Corning)에 1시간동안 37 도에서 결합시킨 후 0.1 % TBST (0.1 % Tween20, pH 7.4, 137 mM NaCl, 12mM Tris, 2.7 mM KCl, 5 mM MgCl₂) (SIGMA)로 10분간 3회 씻어낸다. 4% TBSB (4% BSA, pH7.4, 137 mM NaCl, 12mM Tris, 2.7 mM KCl, 10 mM MgCl₂) (SIGMA)로 1시간 동안 결합한 후 0.1% TBST로 10분간 3회 씻어낸다. 이후 항-Ras · GTP iMab들을 4 % TBSB로 희석하여 농도별로 결합시킨 후 0.1 % TBST로 10분간 3회 씻어낸다. 표지항체로 염소유래 HRP가 접합된 항-인간 항체(HRP-conjugated anti-human mAb) (SIGMA)로 결합시킨다. Ultra TMB-ELISA 기질혼탁액(Thermo scientific)을 사용하여 반응시킨 후 450 nm 흡광도를 정량하였다.
- [0273] 도 26a에 나타난 바와 같이, 친화도 개량된 항-Ras · GTP iMab들 중에서 GTP가 결합된 KRas G12D에 특이적으로 높은 친화도를 보이는 클론으로 RT11을 선정하였다.
- [0274] 도 26b는 상기 ELISA 기반 결합능 분석을 통해 선정된 RT11을 다양한 Ras돌연변이에 대해서 결합능을 ELISA를 통해 분석하였다.
- [0275] 구체적으로, 상기 친화도가 개량된 항-Ras · GTP iMab 결합능 분석에 사용한 동일한 ELISA방법을 사용하여 GTP 또는 GDP가 결합된 야생형 KRas, KRas G12D, KRas G12V, KRas G13D, 야생형 HRas, HRas G12V에 대한 결합능을 확인하였다.
- [0276] 도 26b에 나타난 바와 같이, 항-Ras · GTP iMab RT11은 다양한 돌연변이 Ras에 대해서 GTP가 결합된 형태에서만

결합함을 확인하였다.

- [0277] **실시예 21. KRas G12D 에 대한 항-Ras · GTP iMab RT11 결합능 정량분석.**
- [0278] 항-Ras · GTP iMab RT11의 GTP가 결합된 KRas G12D에 대한 정량적 결합능을 분석하기 위하여 SPR(Surface plasmon resonance)을 수행하였다. Biacore2000 기기(GE healthcare)를 이용하였다.
- [0279] 도 27a는 SPR (BIACORE 2000)(GE healthcare)를 이용하여 KRas G12D에 GTP가 결합형태에 대한 항-Ras · GTP iMab RT11의 친화도 분석 결과를 나타낸다.
- [0280] 도 27b는 가장 높은 농도 (1000 nM)의 GTP 또는 GDP가 결합된 KRas G12D에 대한 RT11의 결합능을 분석한 sensorgram이다.
- [0281] 구체적으로는, 상기 실시예 11과 동일한 방법으로 항-Ras · GTP iMab RT11를 CM5 센서칩(GE healthcare)에 약 1100 response units(RU)고정화하였다. Tris 완충액 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.005 % Tween 20)을 30 μl/min 유속으로 분석하였으며, GTP 또는 GDP가 결합된 KRas G12D를 1000 nM에서 62.5 nM의 농도로 분석하였다.
- [0282] 상기 결과를 통해서 RT11이 높은 친화도(12.9 nM)로 GTP가 결합된 KRas G12D에 고특이적으로 결합함을 확인하였다.
- [0283] **실시예 22. 항-Ras · GTP iMab RT11에 의한 GTP 결합 KRas와 Raf 결합저해능 분석.**
- [0284] 도 28은 항-Ras · GTP iMab RT11이 세포내 KRas와 결합하는 효과 단백질(effector molecule)인 Raf와의 결합을 저해할 수 있는지 경쟁적 ELISA를 통해서 확인한 결과이다.
- [0285] 구체적으로는, 효과단백질 cRaf(NM_002880.2)의 Ras 결합부위(RBD:1-149) 단편을 대장균 발현 벡터 pGEX-3X에 제한효소 BamHI/EcoRI를 사용하여 클로닝 후 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 발현 정제하였다. 이후 정제된 cRaf-RBD를 96웰 EIA/RIA 플레이트(COSTAR Corning)에 1시간동안 37 도에서 결합시킨 후 0.1 % TBST (0.1 % Tween20, pH 7.4, 137 mM NaCl, 12mM Tris, 2.7 mM KCl, 5 mM MgCl₂) (SIGMA)로 10분간 3회 씻어낸다. 4% TBSB (4% BSA, pH7.4, 137 mM NaCl, 12mM Tris, 2.7 mM KCl, 10 mM MgCl₂) (SIGMA)로 1시간 동안 결합한 후 0.1% TBST로 10분간 3회 씻어낸다. 이후 1 μM 바이오틴화 된 GTP 결합 KRas G12D와 1 μM부터 5.64 pM까지의 다양한 농도의 항-Ras · GTP iMab RT11을 4 % TBSB로 희석하여 농도별로 결합시킨 후 0.1 % TBST로 10분간 3회 씻어낸다. 표지항체로 염소유래 AP가 접합된 항-인간 항체(alkaline phosphatase-conjugated anti-human mAb) (SIGMA)로 결합시킨다. pNPP(p-nitrophenyl palmitate) (SIGMA)로 반응시켜 405 nm 흡광도를 정량하였다.
- [0286] 도 28에 나타난 바와 같이 항-Ras · GTP iMab RT11은 효과단백질 cRaf와의 결합저해능 (IC₅₀=35 nM)을 보임을 확인하였다.
- [0287] **실시예 23. 항-Ras · GTP iMab RT11의 다양한 종양 세포 침투능 확인.**
- [0288] 도 29는 친화도가 향상된 항-Ras · GTP iMab의 다양한 종양 세포에 세포 침투능을 갖는지 확인하기 위해 공초점 현미경으로 관찰한 결과이다.
- [0289] 다양한 종양 세포주로는 인간 대장암 세포주인 SW480 (KRasG12V 돌연변이), PANC-1 (KRas G12D 돌연변이), DLD-1 (KRas G13D 돌연변이), HCT116 (KRas G13D 돌연변이)와 인간 섬유육종 세포주인 HT1080 (NRas Q61L 돌연변이)를 Ras 돌연변이 세포주로 사용하였고, Ras 야생형 세포주로 인간 유방암 세포주인 MCF7, 인간 대장암 세포주인 HT29, CaCo2, Colo320DM 세포주를 사용하였다.
- [0290] 구체적으로는, 위의 다양한 Ras 돌연변이 및 Ras 야생형 세포주를 24 웰 플레이트에 각 웰 당 5x10⁴ 개로 10 % FBS가 포함된 배지 0.5 ml로 넣어 12 시간 동안 5 % CO₂, 37 도 조건에서 배양했다. 세포가 안정화 되면, 각 웰에 새로운 배지 0.5 ml에 Tmab4, RT11을 각각 2 μM로 희석하여 12시간 동안 37 도, 5 % CO₂ 조건에서 배양했다. 이후 과정은 상기 실시예 14의 RT4염색과정과 동일하게 했다. 친화도 향상된 항-Ras · GTP iMab인

RT11은 다양한 종양 세포내 형광이 관찰 되는 것으로 보아, TMab4와 동일하게 다양한 종양 세포주에 세포침투능을 가짐을 확인하였다.

[0291] **실시에 24. 항-Ras · GTP iMab RT11의 세포질 잔류능 확인.**

[0292] 도 30은 친화도가 향상된 항-Ras · GTP iMab의 세포질 잔류능을 세포막 비투과 자기소광 형광물질인 calcein (sigma)을 이용하여 공초점 현미경으로 관찰한 결과이다.

[0293] 구체적으로는, HCT116 세포주를 24 웰 플레이트에 웰당 5×10^4 개로 10 % FBS가 포함된 배지 0.5 ml에 희석하여 12 시간, 37 도, 5 % CO₂ 조건에서 배양하였다. 이후 1 μM의 TMab4와 RT4 를 4 시간 처리한 뒤, Calcein 100 μM 와 함께 2 시간 더 처리하였다. 이후, 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, 약산성용액(200 mM glycine, 150 mM NaCl pH 2.5)으로 세포 표면에 붙은 calcein 들을 제거했다. PBS 세척 후, 4 % 파라포름알데히드 첨가 후 25 도 조건으로 10 분간 세포를 고정했다. 이후 PBS로 세척하고, Hoechst33342를 이용하여 핵을 염색(청색형광)하여 공초점 현미경으로 관찰했다. 도 30에 나타난 바와 같이, 항-Ras · GTP iMab인 RT11와 cytotransmab인 TMab4 둘 다, 세포질 전체에 calcein 형광이 관찰된 것을 확인하였다. 반면, PBS에서는 소포 (vesicle) 모양의 형광만 관찰되었다. 위 결과를 통하여, 항-Ras · GTP iMab RT11이 세포질에 잔류하는 것을 확인하였다.

[0294] **실시에 25. 항-Ras · GTP iMab RT11의 세포 독성 평가**

[0295] 도 31은 다양한 Ras 야생형 및 Ras 돌연변이 세포주에서 항-Ras · GTP iMab RT11을 처리하여 세포성장 저해 정도를 in vitro에서 평가한 결과이며, 도 32는 각각의 세포를 편광현미경을 통해서 세포밀도를 확인한 사진이다.

[0296] 구체적으로는, 항-Ras · GTP iMab RT11이 In vitro 상에서, Ras 돌연변이 의존적 세포주에 특이적인 독성을 가지는지 확인 하기 위해, Ras 야생형 세포주로 마우스 섬유아 세포주인 NIH3T3와 인간 대장암 세포주인 Colo320DM을 이용하였으며, 마우스 NIH3T3 KRas G12V 돌연변이 세포주, 인간 대장암 세포주인 HCT116 (KRas G13D), SW480 (KRas G12V), DLD-1 (KRas G13D), 인간 췌장암 세포주인 PANC-1 (KRas G12D)를 이용하여 세포 성장 저해 정도를 평가하였다.

[0297] 구체적으로는, 위의 세포주들을 24웰 플레이트에 웰 당 $2-5 \times 10^3$ 개로 10 % FBS가 포함된 배지 0.5 ml에 희석하여 12 시간, 37 도, 5 % CO₂ 조건에서 배양하였다. 이후 2 μM의 TMab4, RT11을 72 시간씩 두 차례 처리하여 총 144 시간 동안 관찰 한 후, 살아 있는 세포의 개수를 카운팅하여 세포의 성장 정도를 비교하였다.

[0298] 도 31, 32에서 나타난 바와 같이, TMab4에서는 독성을 보이지 않는 반면, RT11은 Ras 돌연변이 세포주(NIH3T3 KRas G12V, HCT116, PANC-1, SW480, DLD-1)에서만 세포성장을 억제하였고, Ras 야생형 세포주(NIH3T3, Colo320DM)에서는 독성을 보이지 않았다.

[0299] **실시에 26. 항-Ras · GTP iMab RT11의 세포내의 활성화된 Ras와 특이적 결합 및 효과 단백질 결합 억제능 확인**

[0300] **(1) 항-Ras · GTP iMab RT11의 세포내의 Ras활TP와 특이적 결합 확인**

[0301] 도 33은 RT11과 세포내 활성화된 KRas G12V 돌연변이와의 중첩 여부를 공초점 현미경으로 확인한 결과이다.

[0302] 구체적으로는, 24 웰 플레이트에 fibronectin (sigma)를 코팅한 후, mCherry(적색형광) KRas G12V가 발현되는 NIH3T3 세포주를 각각 웰당 2×10^2 개를 0.5 ml에 희석하여 12 시간, 37 도, 5 % CO₂ 조건에서 배양한 후, TMab4 와 RT11 각각 2 μM을 처리하여 37 도, 12 시간 배양하였다. 이후 상기 실시예 14와 동일한 조건으로 염색하여 공초점 현미경으로 관찰하였다.

[0303] 도 33에 나타난 바와 같이, 적색형광의 활성화된 Ras가 위치하는 세포내막 부분에 녹색형광의 RT11 가 중첩된 반면, TMab는 중첩되지 않았다.

[0304] 도 34는 RT11과 세포내 활성화된 Ras 와의 결합 여부를 면역침강법으로 확인한 결과이다.

[0305] 구체적으로는, 100 mm³ 플레이트에 KRas G12V 돌연변이가 발현되는 NIH3T3 세포주와 HCT116 세포주를 각각 웰당

2x10⁶ 개를 10ml에 희석하여 12 시간, 37 도, 5 % CO₂ 조건에서 배양한 후, TMab4와 RT11 각각 2 μM을 처리하여 37 도, 12 시간 배양하였다. 이후, 세포 용해 버퍼 (25 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 10 mM MgCl₂, 10 % glycerol, protease inhibitors)를 이용하여 세포를 용해 시킨 후, 세포 잔해물을 침전 시켜 제거한다. 이후, 세포 용해물에 Protein A/G 아가로스를 첨가하여 2 시간 반응 시킨 후, 항체를 침강시킨다. 이후 항 KRas 항체(santa cruz)와 Human Fc 항체(sigma)를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0306] 도 34번에 나타난 바와 같이, RT11에서만 KRas가 관찰된 반면, TMab4와 PBS에서는 관찰되지 않았다.

[0307] 상기 실험 결과로 세포내의 활성화된 Ras와 RT11이 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다.

[0308] **(2) 항-Ras · GTP iMab RT11의 Ras별TP와 효과단백질(effector molecule)간 결합 억제 확인**

[0309] 도 35a와 도 35b는 RT11의 Ras · GTP와 효과단백질들 간의 결합 억제 여부를 면역침강법으로 확인한 결과이다.

[0310] 구체적으로는, 100 mm³ 플레이트에 KRas G12V 돌연변이가 발현되는 NIH3T3 세포주와 HCT116 세포주를 각각 웰당 2x10⁶ 개를 10 ml에 희석하여 12 시간, 37 도, 5 % CO₂ 조건에서 배양한 후, TMab4와 RT11 각각 2 μM을 처리하여 37 도, 12 시간 배양하였다. 이후, 세포 용해 버퍼 (25 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 10 mM MgCl₂, 10 % glycerol, protease inhibitors)를 이용하여 세포를 용해 시킨 후, 세포 잔해물을 침전 시켜 제거한다. 이후, KRas G12V 돌연변이 세포 용해물에는 항 HA 항체(Covance)를 2 시간 반응 시킨 후, Protein A/G agarose를 이용하여 항 HA 항체를 침강시킨다. HCT116 세포 용해물에는 Raf-1 RBD agarose (Millipore)를 첨가하여 2 시간 반응 시킨 후 침강 시킨다. 이후 항 B-Raf, C-Raf, PI3K, KRas 항체(santa cruz)와 Human Fc 항체(sigma)를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0311] 도 35a에 나타난 바와 같이, 항-Ras별TP iMab인 RT11에서만 효과 단백질인 B-Raf, C-Raf와 Ras · GTP간의 결합이 억제된 것을 확인한 반면, TMab4에서는 결합이 억제되지 않은 것을 확인하였다. 도 29b에도 동일하게 항-Ras · GTP iMab인 RT11에서만 효과 단백질인 C-Raf와 Ras · GTP간의 결합이 억제된 것을 확인한 반면, TMab4에서는 결합이 억제되지 않은 것을 확인하였다.

[0312] 상기 실험 결과로 RT11이 세포내의 Ras · GTP와 특이적으로 결합하여 효과 단백질인 B-Raf, C-Raf와의 결합을 억제하는 것을 확인하였다.

[0313] **실시에 27. RGD10펩타이드가 융합된 항-Ras · GTP iMab RT11 구축 및 Ras · GTP와 결합능 분석**

[0314] 상기 실시에 15과 같이 항-Ras · GTP iMab RT11은 세포표면의 HSPG와 결합을 통해서 세포질 침투가 이루어지기 때문에 in vivo 실험을 위해서 조직특이성을 부여할 필요가 있으며, 이를 위해 신생혈관세포 및 다양한 종양에서 과발현되는 인테그린(Integrin αvβ3)에 특이성을 갖는 RGD10펩타이드(DGARYCRGDCFDG, 서열번호 42)를 경쇄 N-말단에 GGGGSGGGGS 총 10개의 잔기로 이루어진 링커를 사용하여 유전공학적으로 융합하였다. RGD10펩타이드의 경우, 기존 RT4와 융합하였던 RGD4C 펩타이드와 비교하여 인테그린에 대한 친화도가 비슷하며, 펩타이드 내의 이황화결합이 1개로서 항체 N-말단에 융합이 RGD4C보다 용이할 것으로 예상되어 항-Ras · GTP iMab RT11에 유전공학적으로 융합하였다.

[0315] 도 36은 상기 구축된 RGD10펩타이드가 융합된 형태의 RT11의 GTP가 결합된 형태와 GDP가 결합된 형태의 다양한 Ras 돌연변이에 대한 결합능을 측정된 ELISA 결과이다.

[0316] 구체적으로 상기 실시에 11와 동일한 방법으로 표적분자 GTP가 결합된 KRas G12D와 GDP가 결합된 Ras를 96웰 EIA/RIA 플레이트(COSTAR Corning)에 1시간동안 37 도에서 결합시킨 후 0.1 % TBST (0.1 % Tween20, pH 7.4, 137 mM NaCl, 12mM Tris, 2.7 mM KCl, 5 mM MgCl₂) (SIGMA)로 10분간 3회 씻어낸다. 4% TBSB (4% BSA, pH7.4, 137 mM NaCl, 12mM Tris, 2.7 mM KCl, 10 mM MgCl₂) (SIGMA)로 1시간 동안 결합한 후 0.1% TBST로 10분간 3회 씻어낸다. 이후 iMab들을 4 % TBSB로 희석하여 10 nM 농도로 결합시킨 후 0.1 % TBST로 10분간 3회 씻어낸다. 표지항체로 염소유래 HRP가 접합된 항-인간 항체(HRP-conjugated anti-human mAb) (SIGMA)로 결합시킨다. Ultra TMB-ELISA 기질혼탁액(Thermo scientific)을 사용하여 반응시킨 후 450 nm 흡광도를 정량하였다.

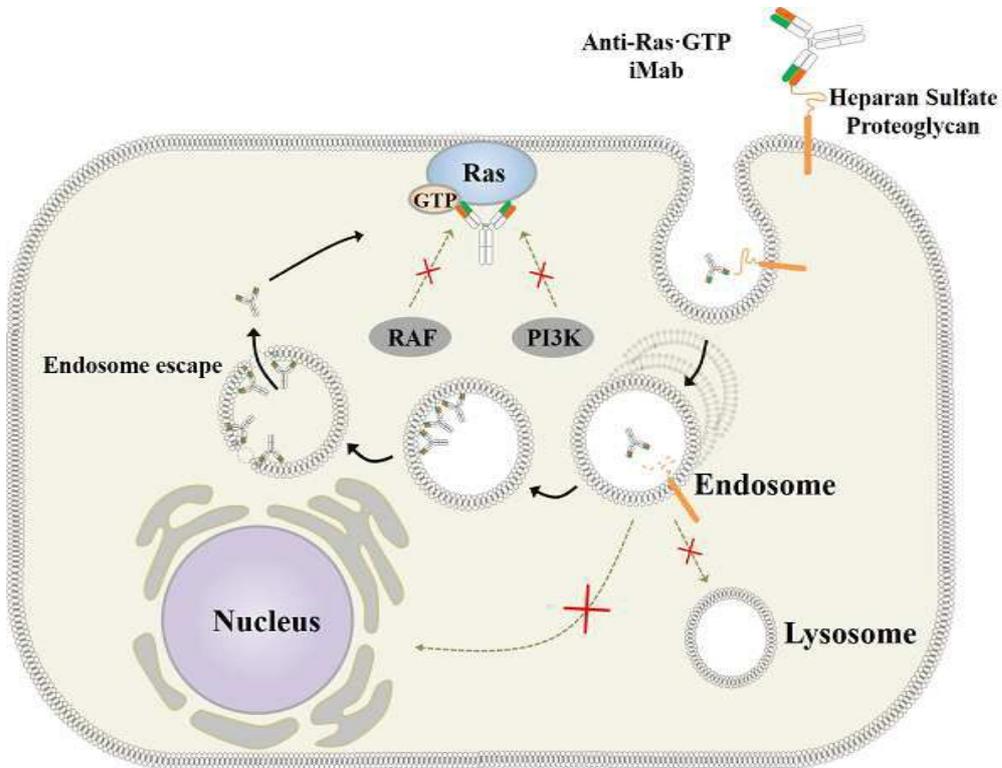
[0317] 도 36에 나타난 바와 같이, RT11과 RGD10 펩타이드가 융합된 RGD10-RT11이 GTP가 결합된 Ras 돌연변이들에 대해

서 같은 결합력을 보임을 확인하였다.

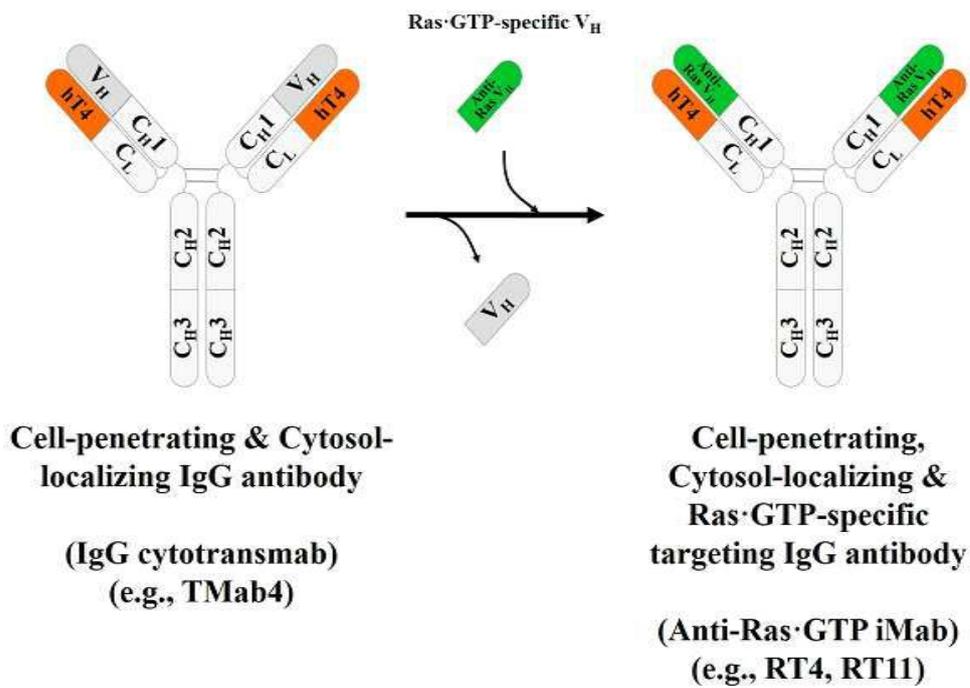
- [0318] **실시예 28. RGD10이 융합된 항-Ras · GTP iMab RT11의 세포 독성 평가**
- [0319] 도 37 및 38은 Colo320DM, HCT116, PANC-1, SW480, DLD-1 세포주에서 RGD10-TMab4와 RGD10-RT11을 처리하여 세포 성장 저해 정도를 *in vitro*에서 평가한 결과이다.
- [0320] *In vitro* 상에서, RGD10-TMab4 와 RGD-RT11 자체가 세포 독성을 가지는지 확인 하기 위해, Ras 야생형 세포주 로 인간 대장암 세포주인 Colo320DM을 이용하였으며, 인간 대장암 세포주인 HCT116 (KRas G13D), SW480 (KRas G12V), DLD-1 (KRas G13D), 인간 췌장암 세포주인 PANC-1 (KRas G12D)를 이용하여 세포 성장 저해 정도를 평가 하였다.
- [0321] 구체적으로는, 24 웰 플레이트에 웰당 5×10^3 개의 세포를 각각 10 % FBS가 포함된 배지 0.5 ml에 희석하여 12 시간, 37 도, 5 % CO₂ 조건에서 배양하였다. 이후 1 μM의 RGD10-TMab4, RGD10-RT11을 72시간씩 두차례 처리하여 총 144 시간 동안 관찰 한 후, 살아 있는 세포의 개수를 카운팅하여 세포의 성장 정도를 비교하였다.
- [0322] 도 37에서 나타난 바와 같이, RGD10-TMab4와 RGD10-RT11을 비교하였을 때, KRas 돌연변이 세포주 (HCT116, SW480, DLD-1, PANC-1)에서 8~12 % 정도 세포성장차이를 보이는 반면, Ras 야생형 세포주에서는 세포성장차이를 보이지 않았다. 따라서 RGD10-TMab4와 RGD10-RT11를 비교하였을 때, RGD10 펩타이드가 결합되어 있어도, Ras 특 이적 세포 성장을 억제 할 수 있음을 확인하였다.
- [0323] **실시예 29. RGD10이 융합된 항-Ras · GTP iMab RT11의 integrin α v β3 특이적 결합확인**
- [0324] 도 39는 RGD10-TMab4와 RGD10-RT11이 세포 표면의 integrin α v β3에 특이적으로 결합하는지 확인한 결과이다.
- [0325] 구체적으로는, K562 세포주와 K562 integrin α v β3 과발현 세포주 2×10^5 개를 1.5ml에 옮긴 후 세척버퍼 (pH 7.4 PBS, 2 % FBS)로 2회 세척한다. TMab4, RGD10-TMab4, RGD10-RT11 100 nM와 Heparin 300 IU/ml (sigma)을 섞어준 후 4 도에서 1 시간동안 세포와 반응 시킨다. 세척버퍼로 2회 세척해준 후, Alexa488 (녹색형광)이 결합 되어 있는 인간 IgG를 특이적으로 인지하는 항체 (Invitrogen)로 4 도에서 1 시간 염색하고 세척버퍼로 2회 세 척준 후, FACS를 이용하여 분석하였다.
- [0326] 도 39에 나타난 바와 같이, TMab4와 달리 RGD10-TMab4, RGD10-RT11은 K562 integrin α v β3세포에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다. 이를 통해 RGD10 펩타이드가 integrin α v β3에 특이적으로 결합하는 것을 확인하 였다.
- [0327] **실시예 30. 항-Ras · GTP iMab RT11의 세포내의 Ras원TP와 특이적 결합 확인**
- [0328] 도 40은 RGD10-RT11과 세포내 활성화된 KRas G12V 돌연변이와의 중첩 여부를 공초점 현미경으로 확인한 결과이 다.
- [0329] 구체적으로는, 24 웰 플레이트에 fibronectin (sigma)를 코팅한 후, mCherry(적색형광) KRas G12V가 발현되는 NIH3T3 세포주를 각각 웰당 2×10^2 개를 0.5 ml에 희석하여 12 시간, 37 도, 5 % CO₂ 조건에서 배양한 후, RGD10-TMab4와 RGD10-RT11 각각 1 μM을 처리하여 37 도, 12 시간 배양하였다. 이후 상기 실시예 14와 동일한 조건으로 염색하여 공초점 현미경으로 관찰하였다.
- [0330] 도 40에 나타난 바와 같이, 적색형광의 활성화된 Ras가 위치하는 세포내막 부분에 녹색형광의 RGD10-RT11 가 중 첩된 반면, RGD10-TMab는 중첩되지 않았다.
- [0331] 상기 실험 결과로 세포내의 활성화된 Ras와 RGD10-RT11이 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다.

도면

도면1

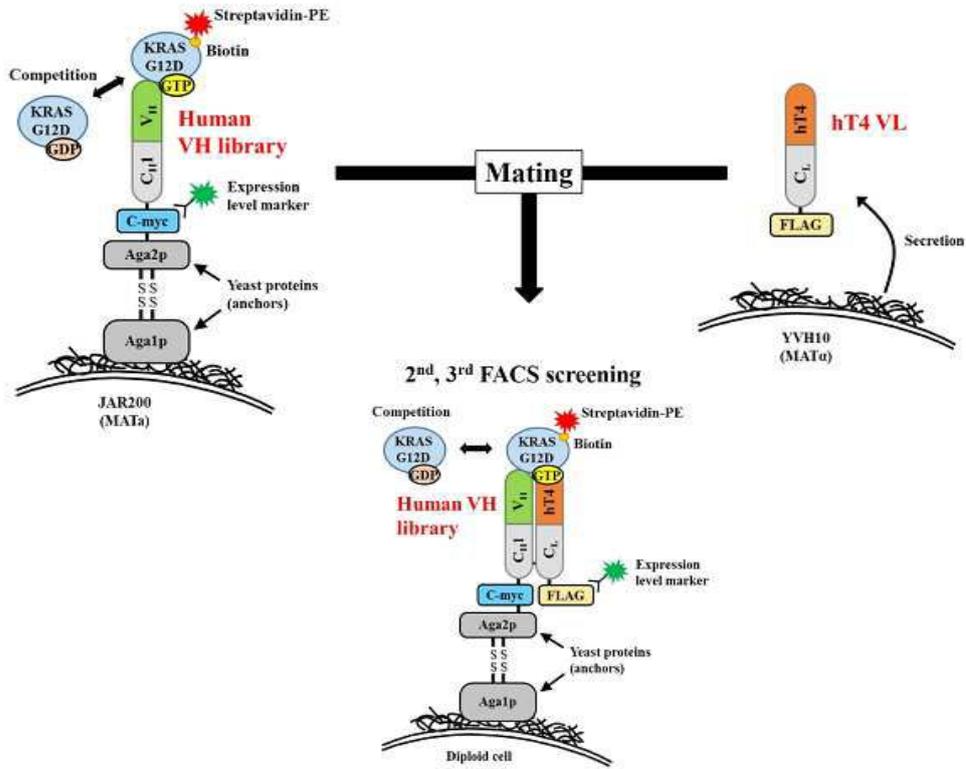


도면2

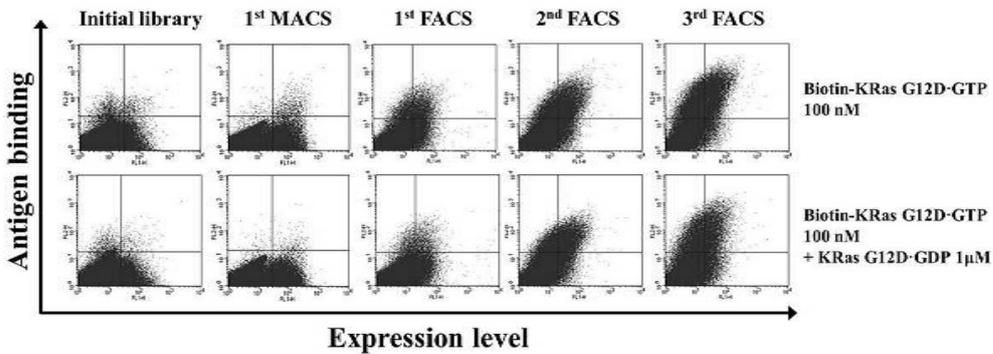


도면3

1st MACS, FACS screening



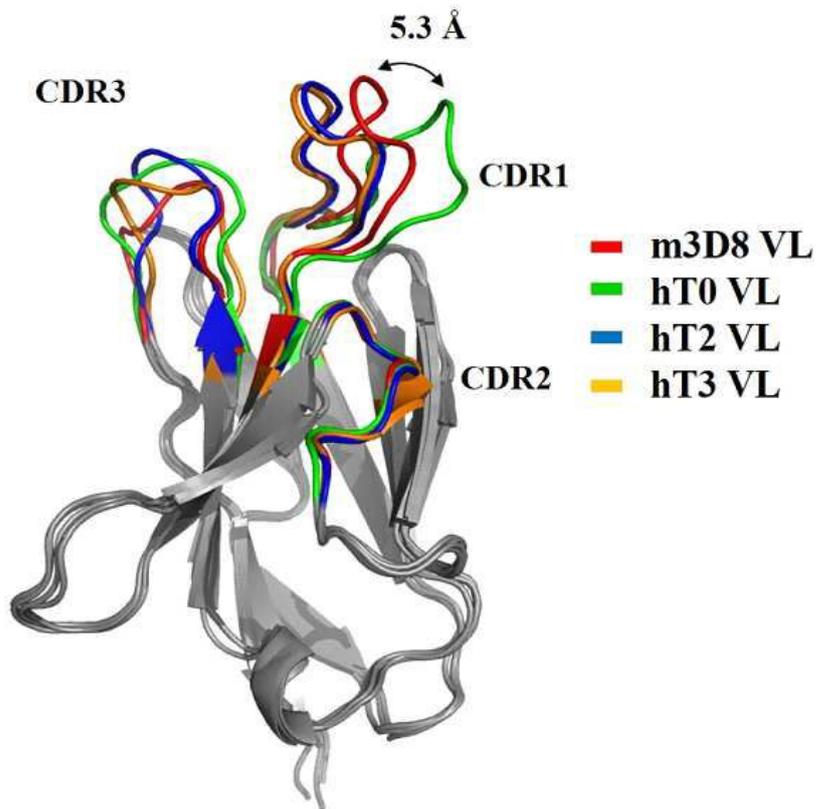
도면4



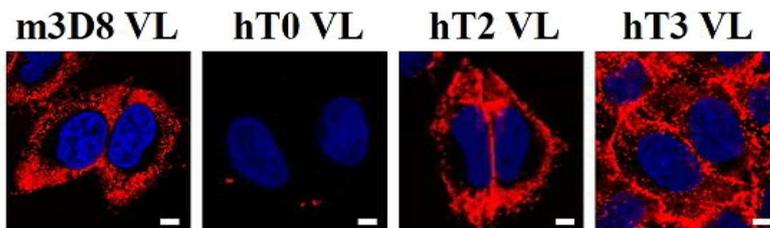
도면5a

	10	20	CDR1					40	CDR2	
			a	b	c	d	e	f	30	50
m3D8 VL (Vk8)	DLVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSC	[KSSQSLFNSRTRKKNYLA]	WYQQKPGQSPKLLIY	[WASTRES]						
hT0 VL (Vk3)	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	[KSSQSLFNSRTRKKNYLA]	WYQQKPGQAPRLLIY	[WASTRES]						
hT2 VL (Vk3)	DLV MTQSPATLSLSPGERATLSC	[KSSQSLFNSRTRKKNYLA]	WYQQKPGQAPRLLIY	[WASTRES]						
hT3 VL (Vk1)	DLV MTQSPSSLSASV GD RVIT ITC	[KSSQSLFNSRTRKKNYLA]	WYQQKPG KAP KLLIY	[WASTRES]						
	60	70	CDR3		90	100				
m3D8 VL (Vk8)	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC	[KQSYHHMYT]	FGSGTKLEIKR							
hT0 VL (Vk3)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC	[KQSYHHMYT]	FGQGTKVEIKR							
hT2 VL (Vk3)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC	[KQSYHHMYT]	FGQGTKVEIKR							
hT3 VL (Vk1)	GVPS RFGSGSGSGTDFTLTISS LQ PEDFAT YYC	[KQSYHHMYT]	FGQGTKVEIKR							

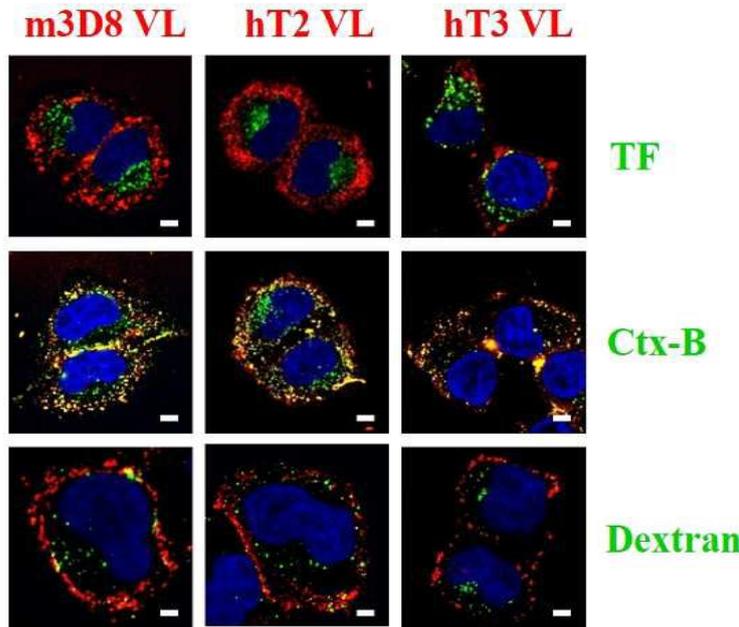
도면5b



도면6a



도면6b

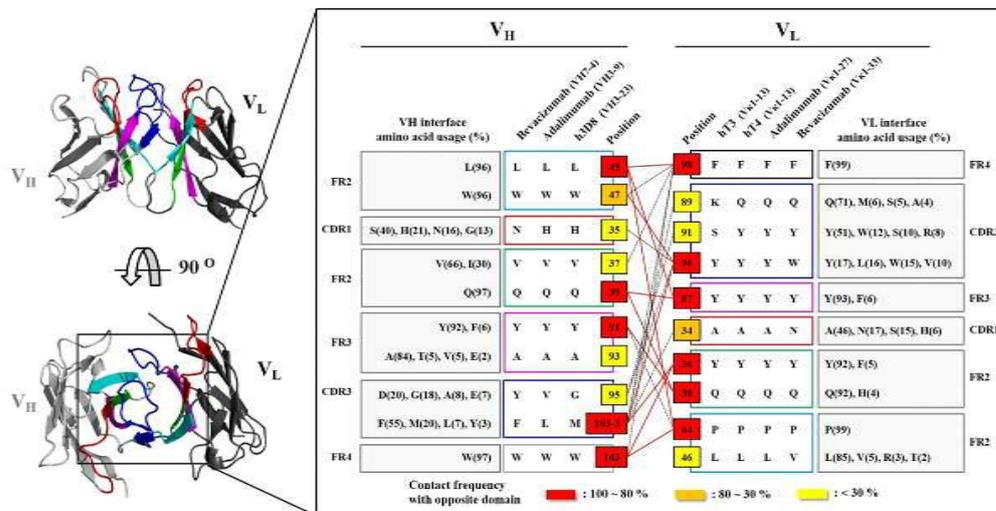


도면7a

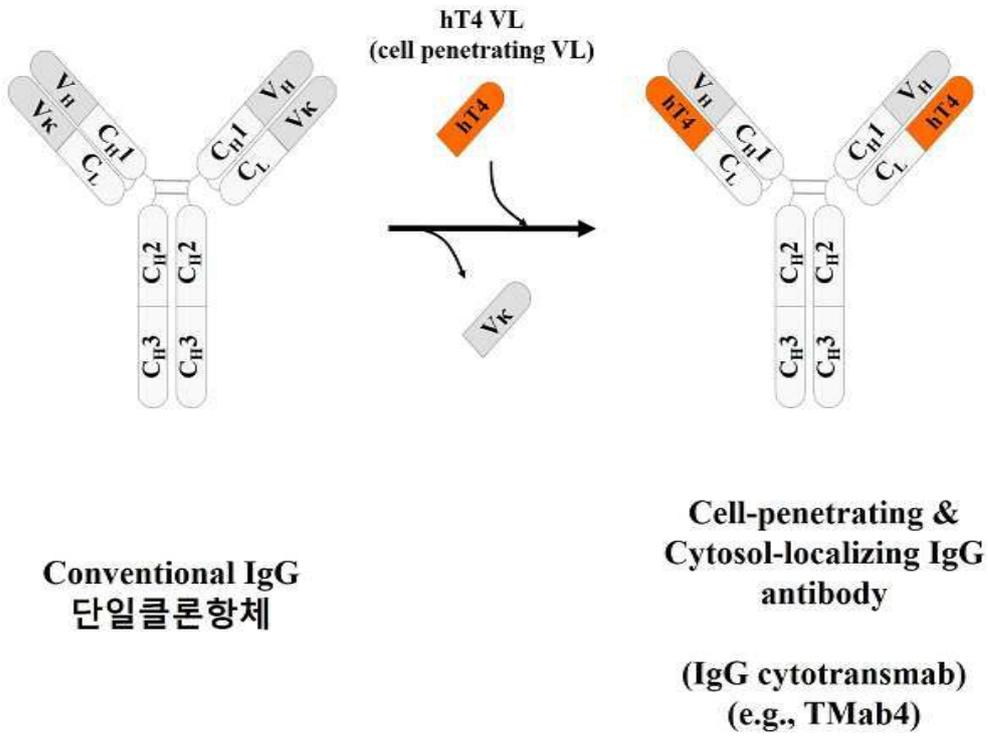
	10	20	CDR1 abcdef 30					40	50	CDR2
hT3 VL (Vk1)	DLVMTQSPSSLSASVGDRVITTC	[KSSQSLFNSRTRKNYLA]	WYQQKPGKAPKLLIY	[WASTRES]						
hT4 VL (Vk1)	DLVMTQSPSSLSASVGDRVITTC	[KSSQSLFNSRTRKNYLA]	WYQQKPGKAPKLLIY	[WASTRES]						
Adalimumab VL (Vk1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	[RASQGIR-----NYLA]	WYQQKPGKAPKLLIY	[AASTLQS]						
Bevacizumab VL (Vk1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	[SASQDIS-----NYLN]	WYQQKPGKAPKLLIY	[FTSSLSHS]						

	60	70	80	CDR3 90		100
hT3 VL (Vk1)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	[KOSYHHMYT]	FGQGTKVEIKR			
hT4 VL (Vk1)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	[QQYYHHMYT]	FGQGTKVEIKR			
Adalimumab VL (Vk1)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC	[QRYNRAPYT]	FGQGTKVEIKR			
Bevacizumab VL (Vk1)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	[QQYSTVFPWT]	FGQGTKVEIKR			

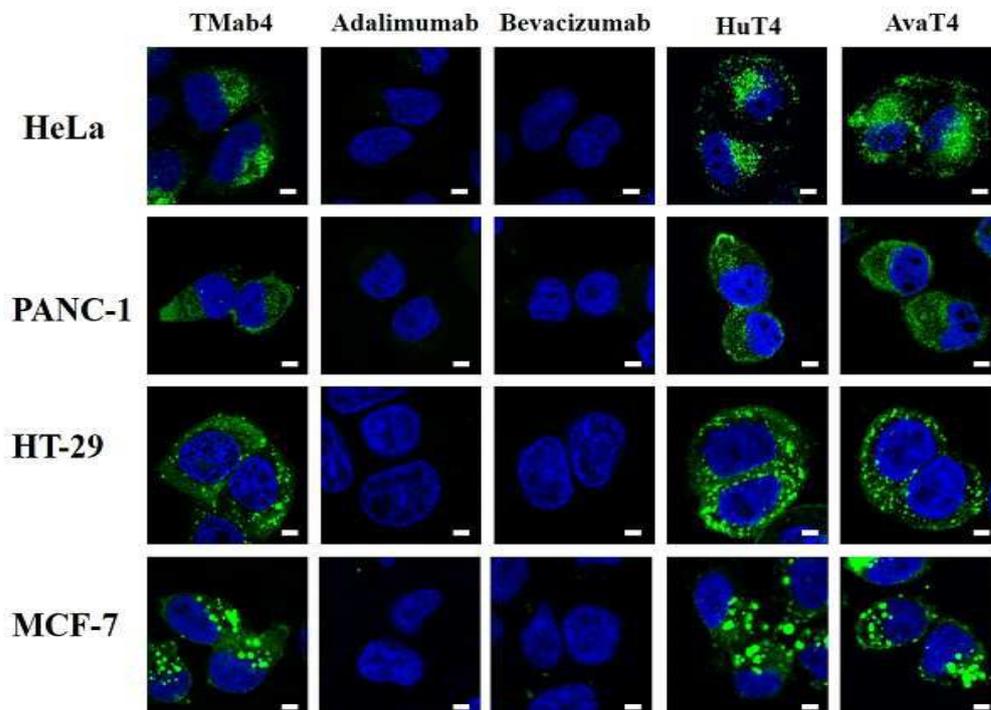
도면7b



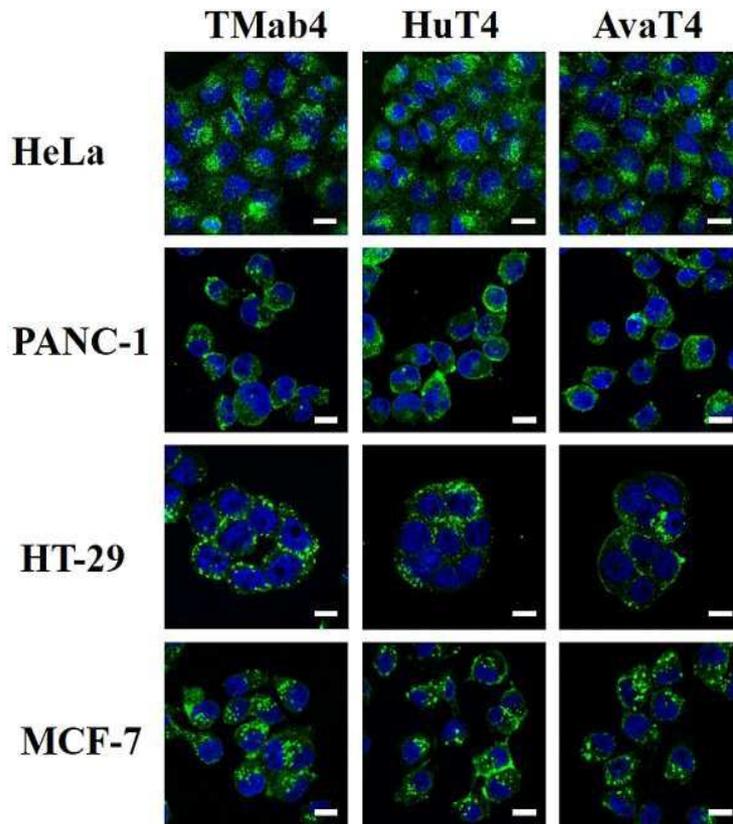
도면8



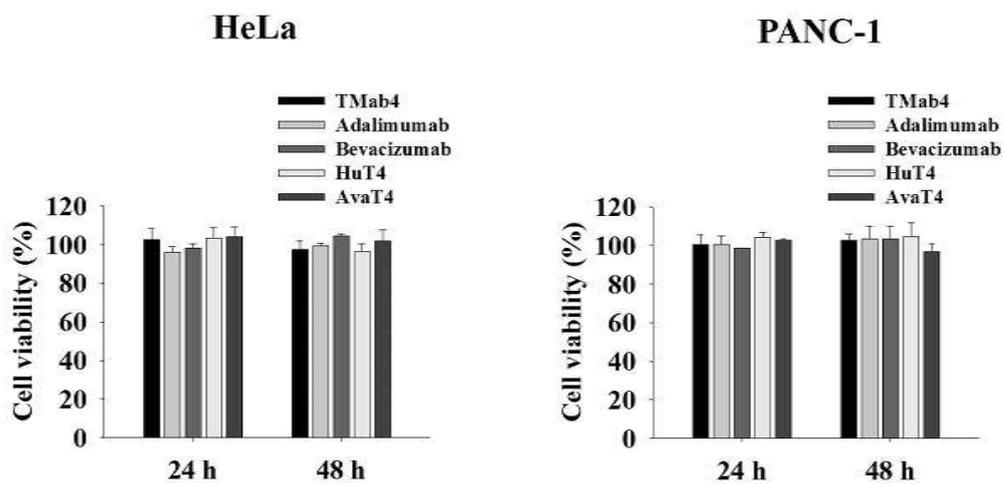
도면9a



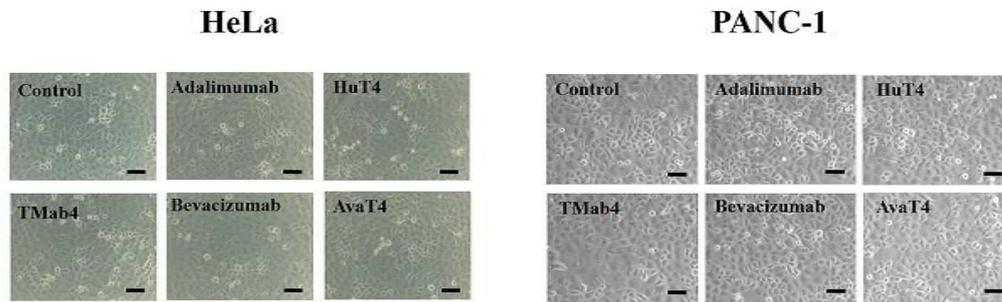
도면9b



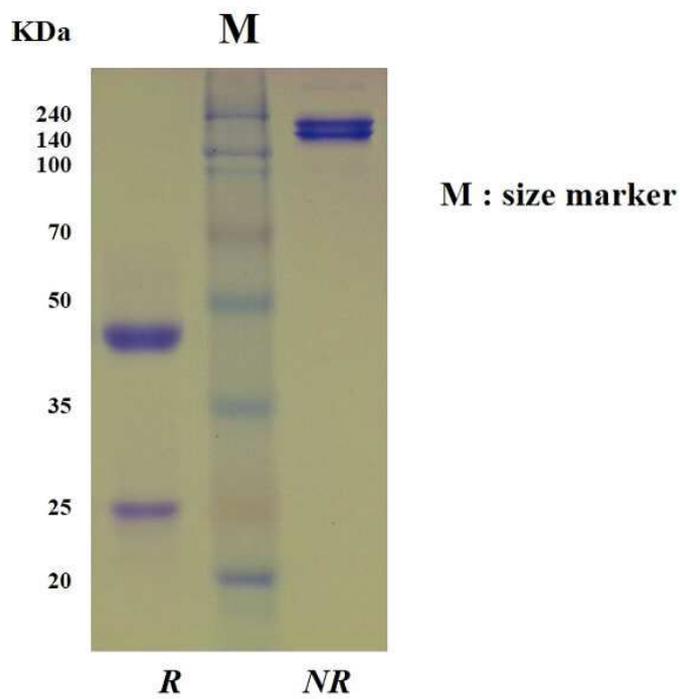
도면10a



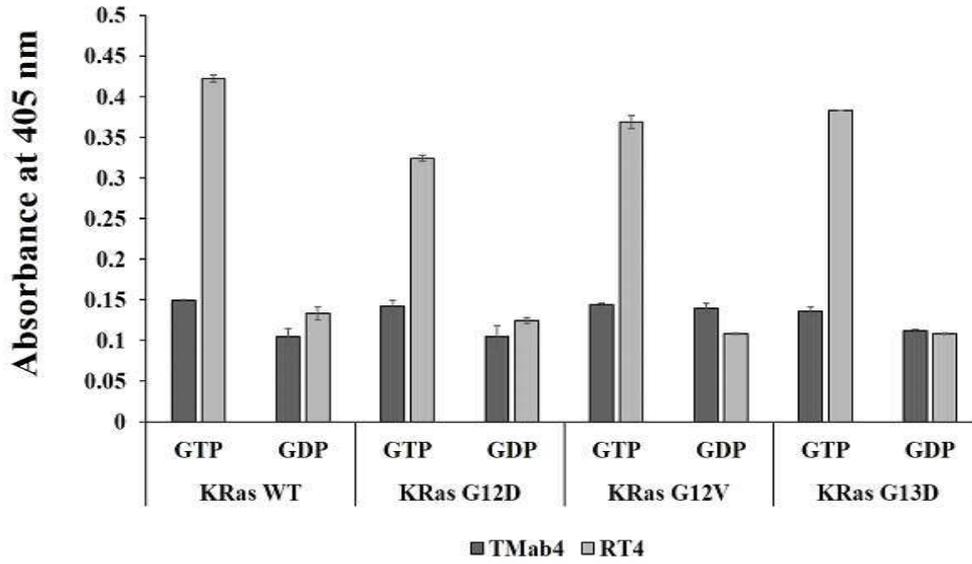
도면10b



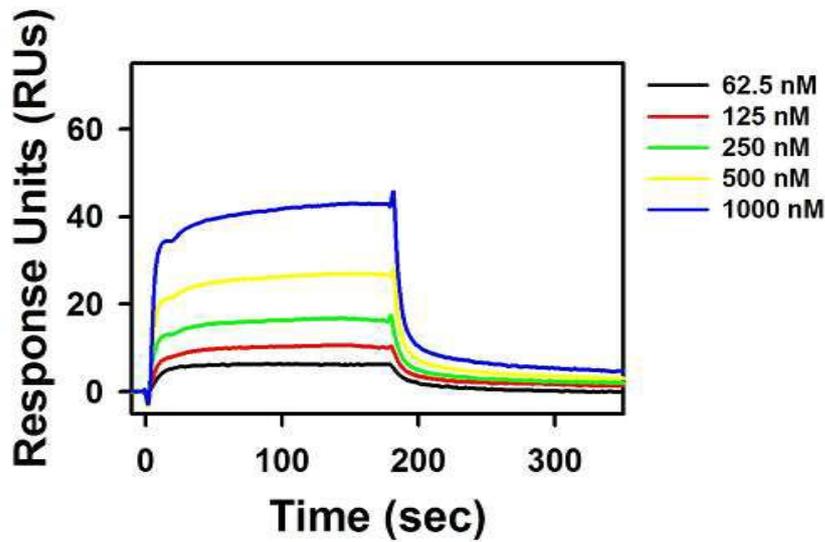
도면11



도면12



도면13



KRas G12D·GTP	k_a (M ⁻¹ S ⁻¹)	k_d (S ⁻¹)	K_D (M)
RT4	2.99×10^4	3.5×10^{-3}	1.1×10^{-7}

도면14

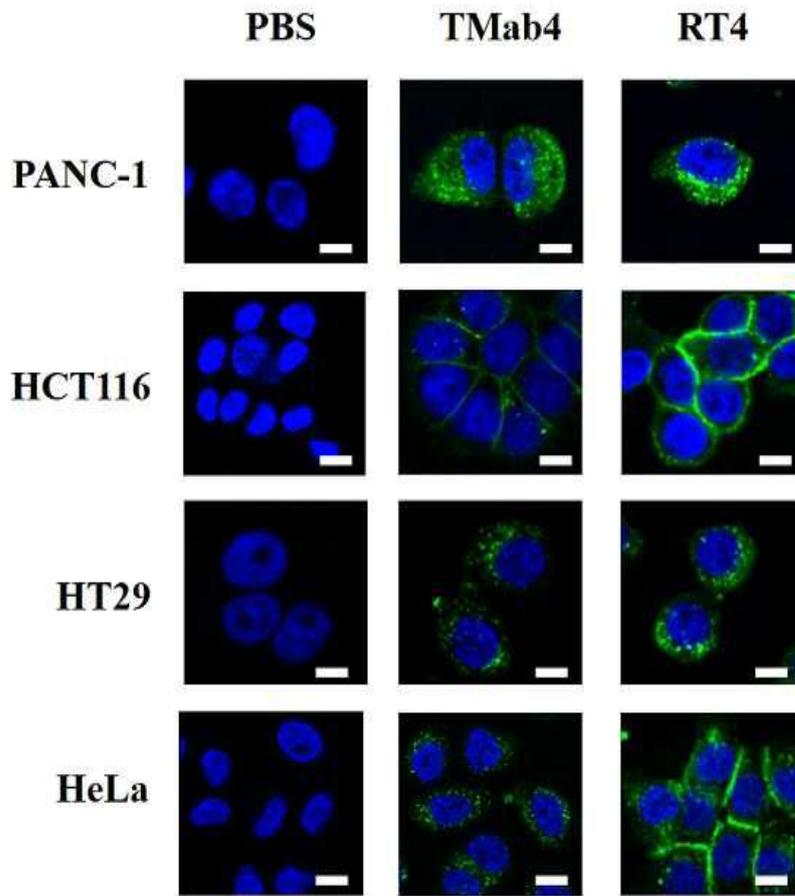
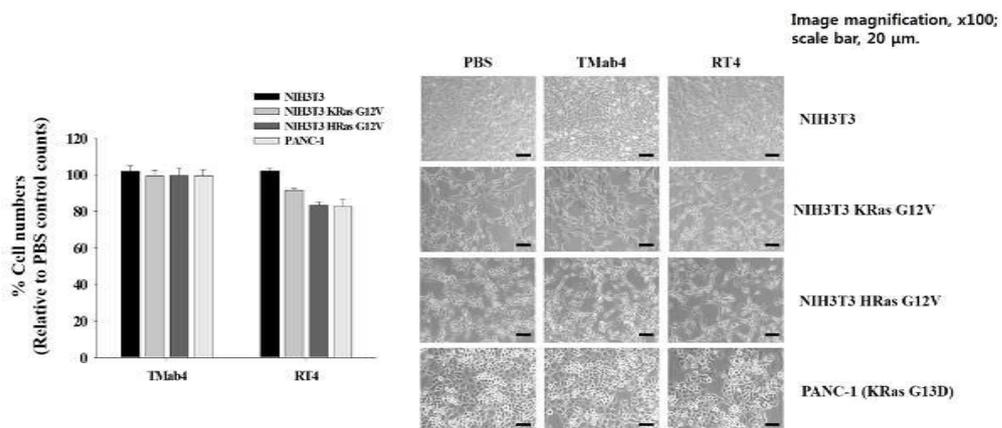
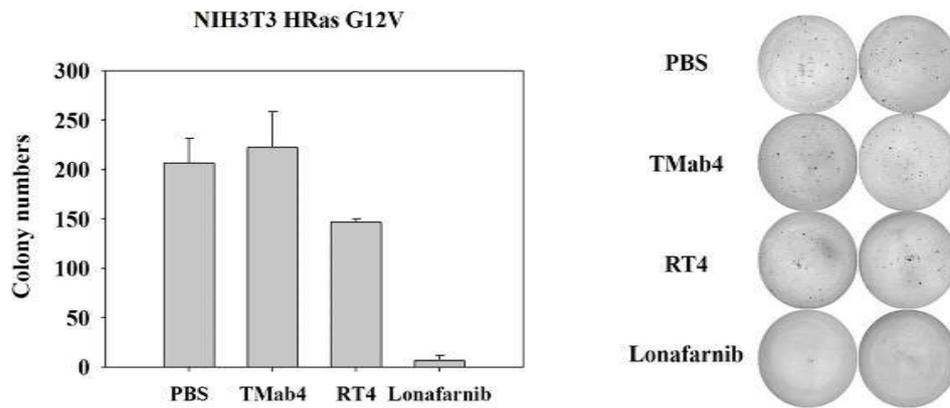


Image magnification, 630x; scale bar, 5 μm.

도면15



도면16



도면17

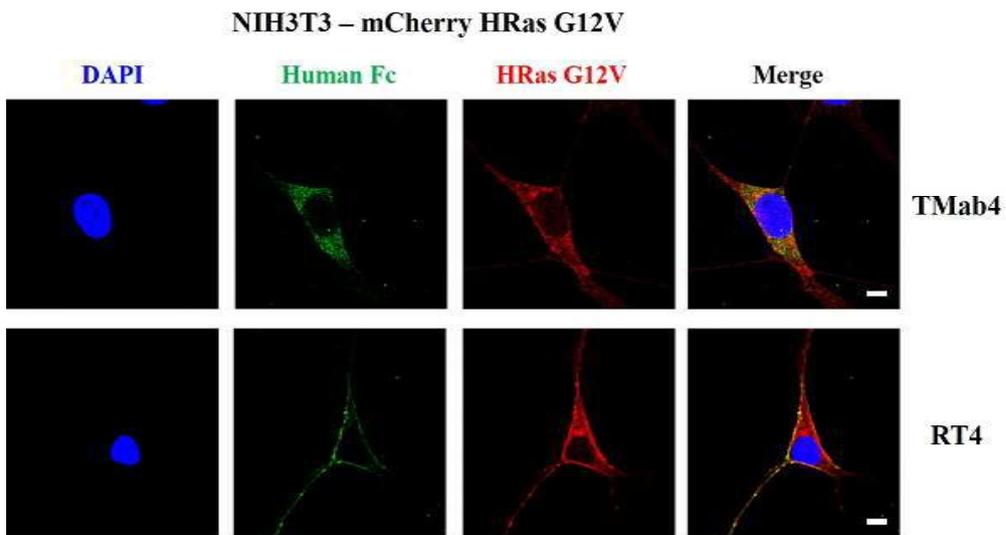
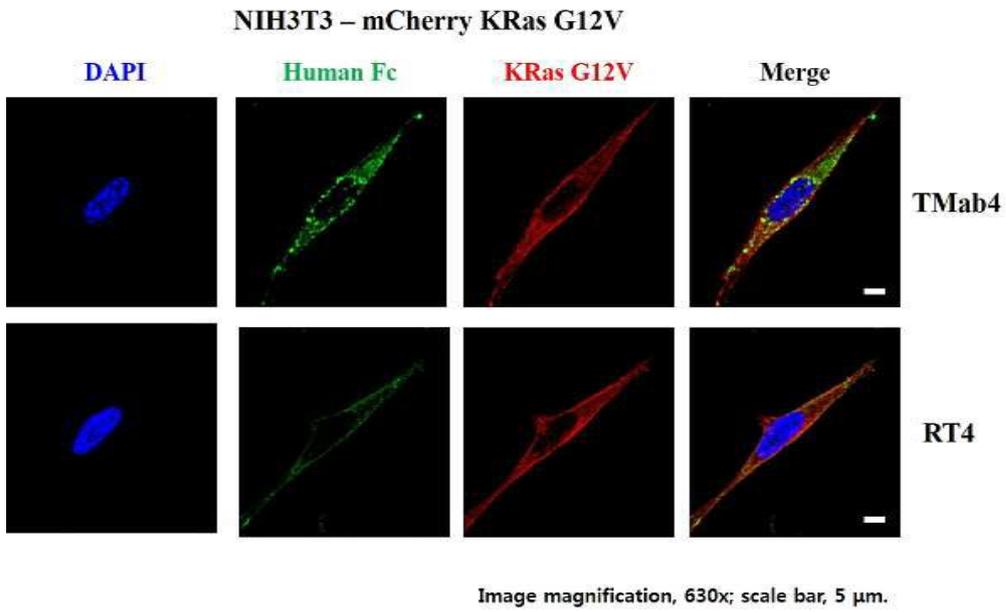
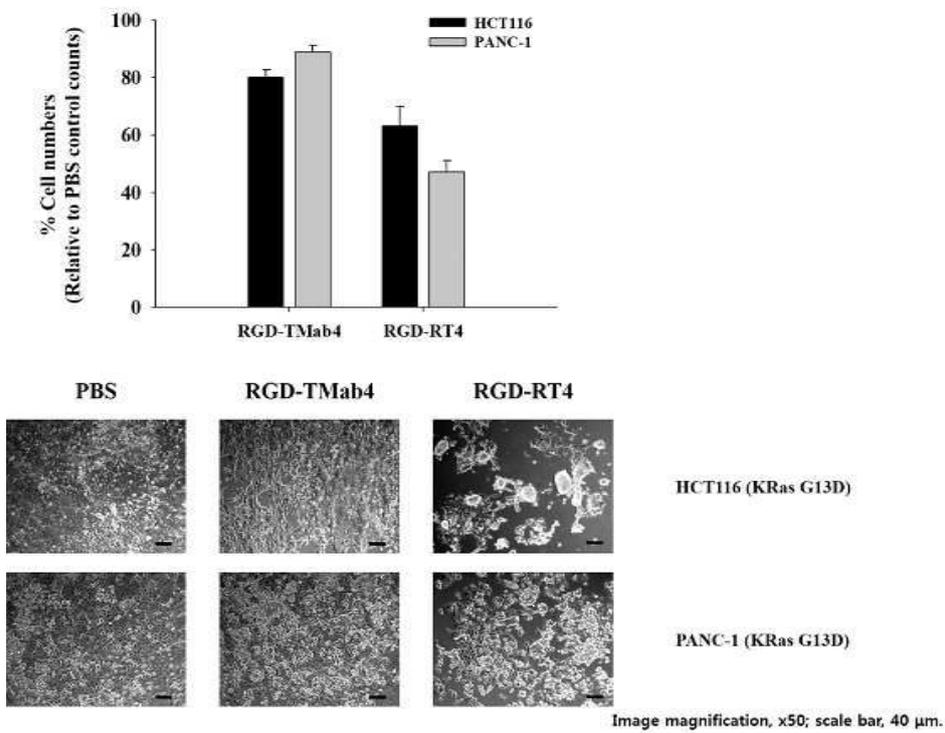


Image magnification, 630x; scale bar, 5 μ m.

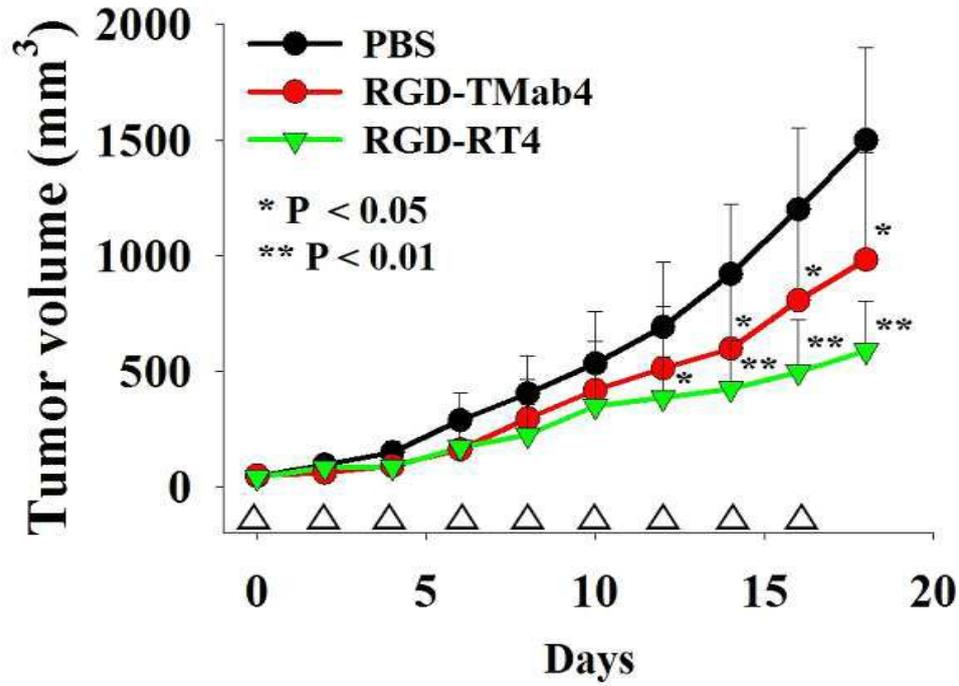
도면18



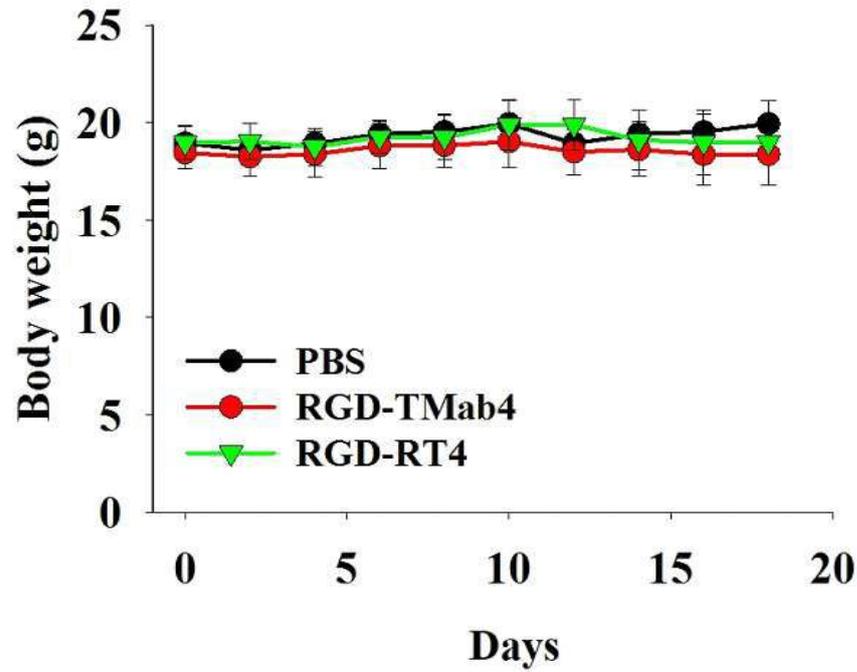
도면19



도면20a



도면20b

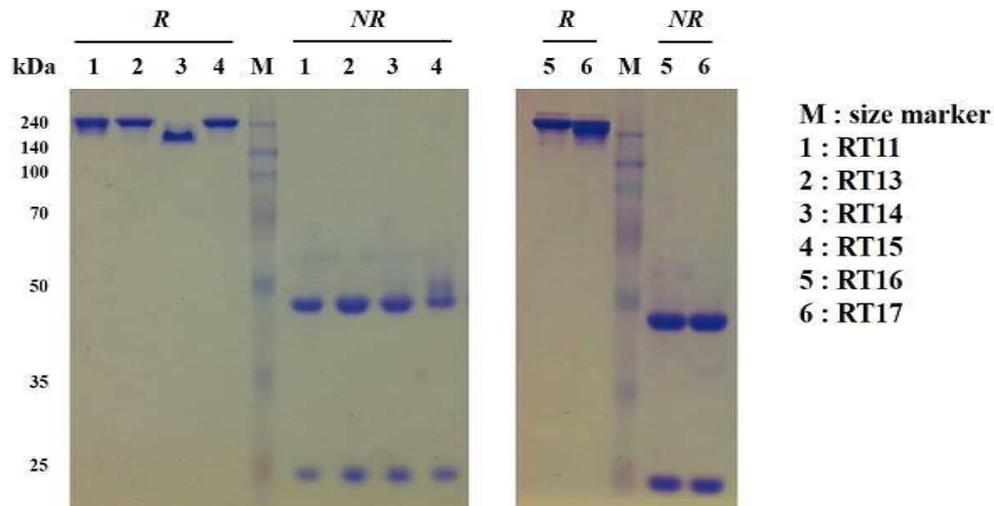


도면23

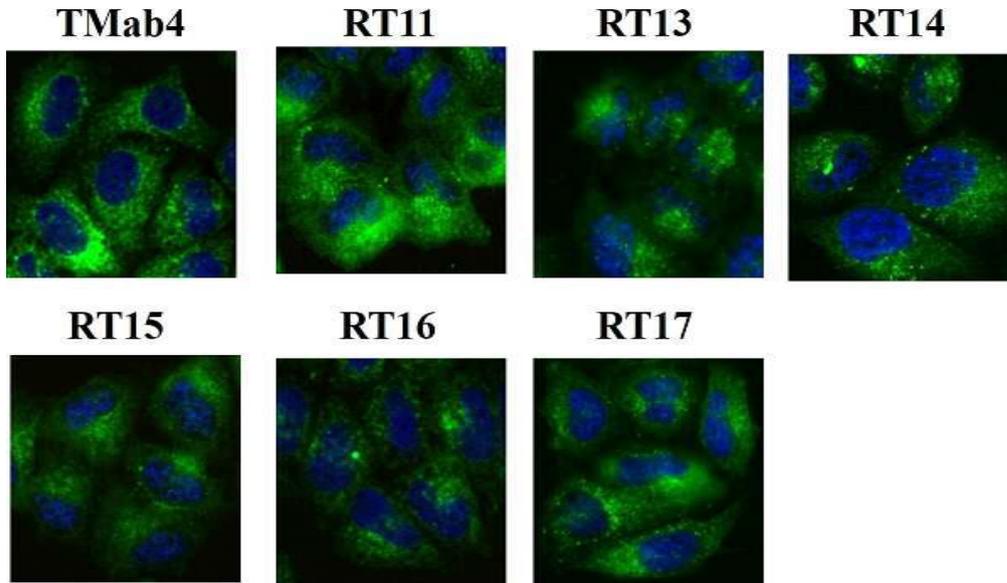
		CDR1	CDR2
Kabat VH	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67		
RT4 VH (library template)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYAMSWVRQAPGKGLEWVST	ISR . . SGHSTYYADSVKGRF
RT11 VH	SYSMS	YISR . . TSHTTYADSVKG--
RT13 VH	TFSMS	YISR . . TSHTTYADSVKG--
RT14 VH	TFSMS	YISR . . TSHTTYADSVKG--
RT15 VH	TFSMS	YISR . . TSHTTYADSVKG--
RT16 VH	TFSMS	YISR . . TSHTTYADSVKG--
RT17 VH	TFSMS	YISR . . TSHTTYADSVKG--

		CDR3
Kabat VH	68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113	
RT4 VH (library template)	T I SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	RFGSIV FDYWGQGT LVTVSS
RT11 VH	GFF MDY
RT13 VH	GTFG FDY
RT14 VH	PRGW FDY
RT15 VH	RFGS FDY
RT16 VH	SSGRFV FDY
RT17 VH	GRFGSV FDY

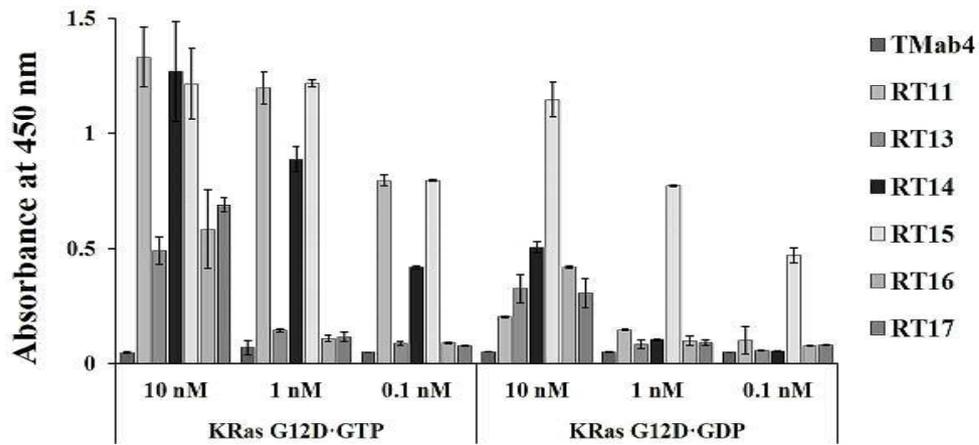
도면24



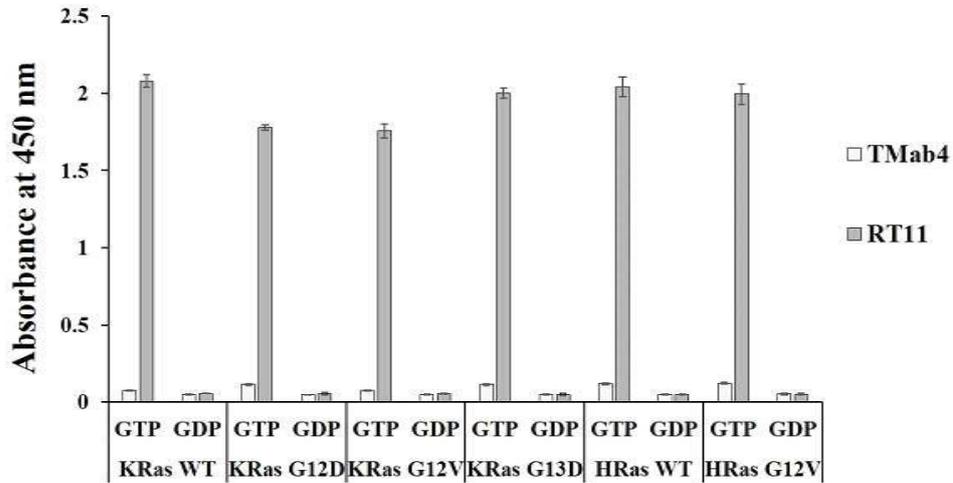
도면25



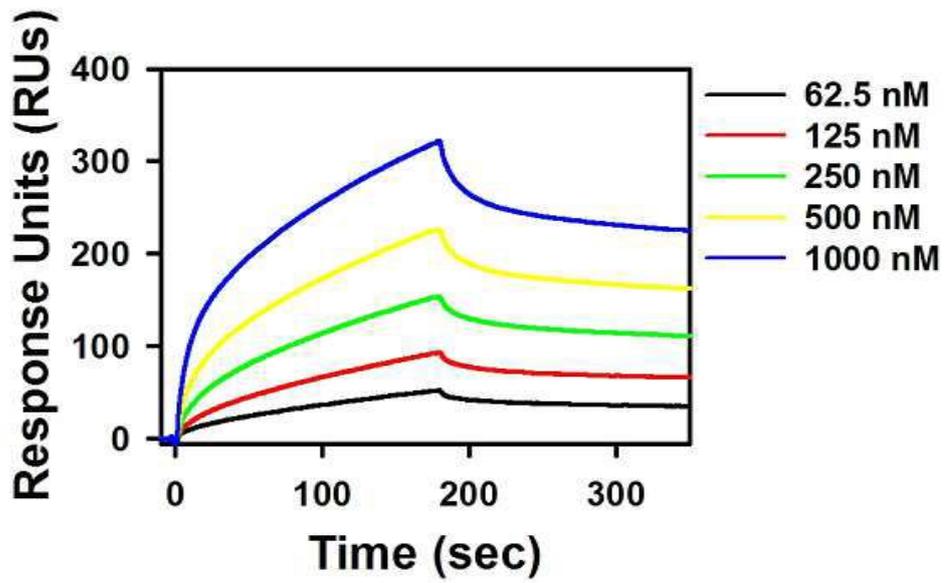
도면26a



도면26b

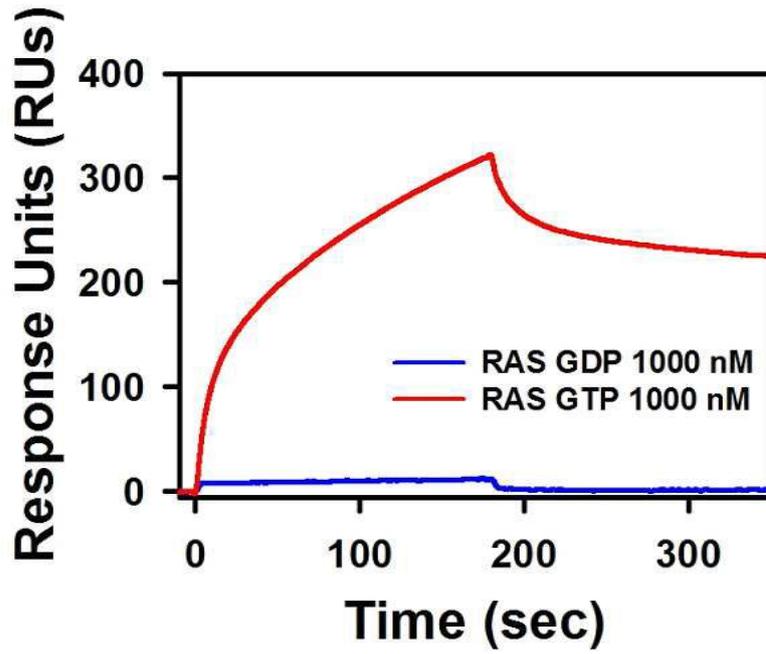


도면27a

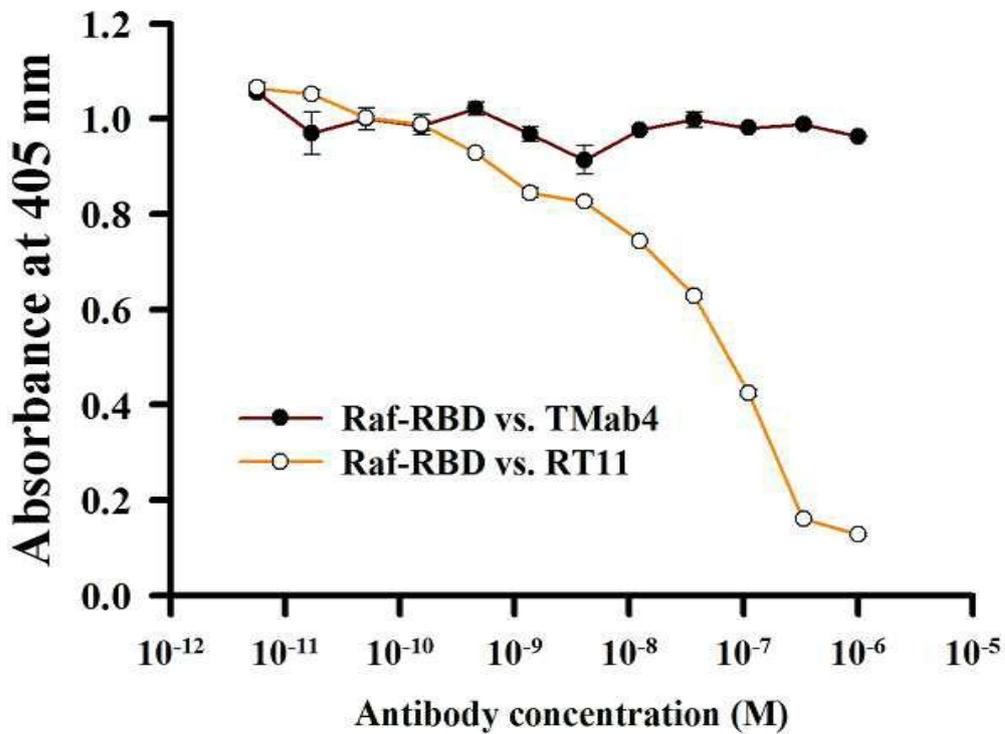


	k_a ($M^{-1}S^{-1}$)	k_d (S^{-1})	K_D (M)
RT11	1.82×10^4	2.34×10^{-4}	1.29×10^{-8}

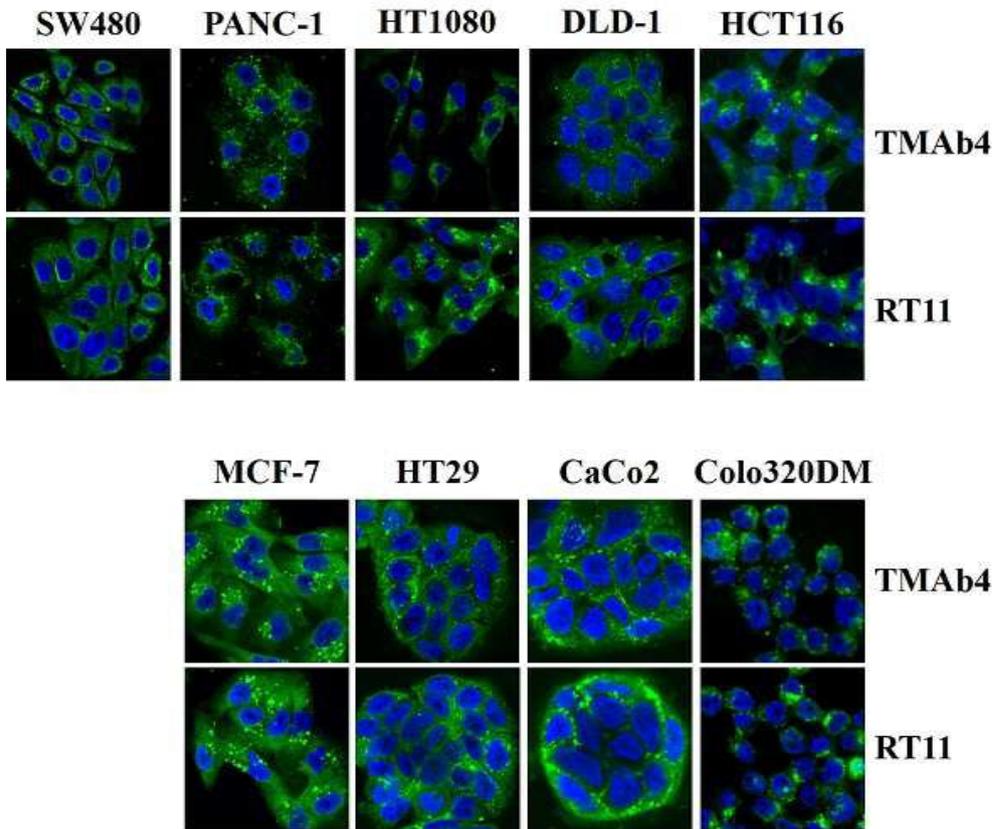
도면27b



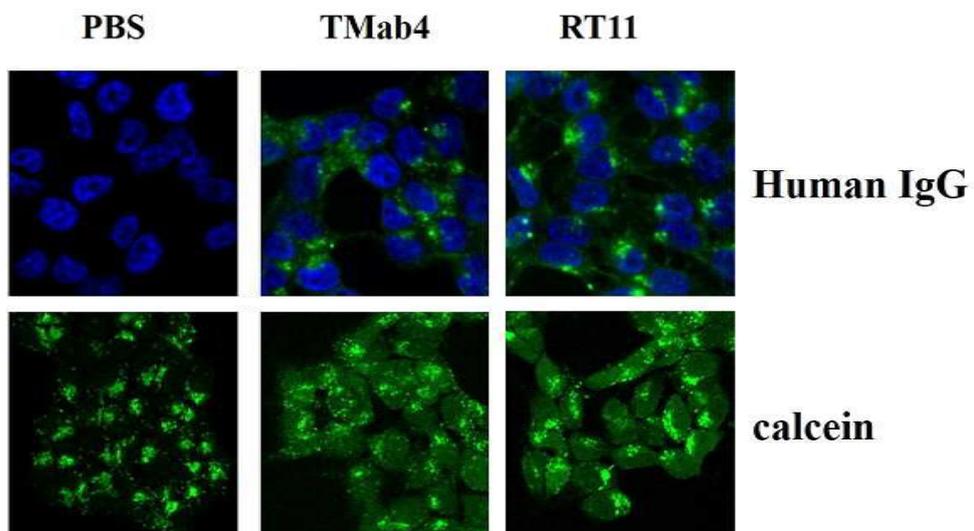
도면28



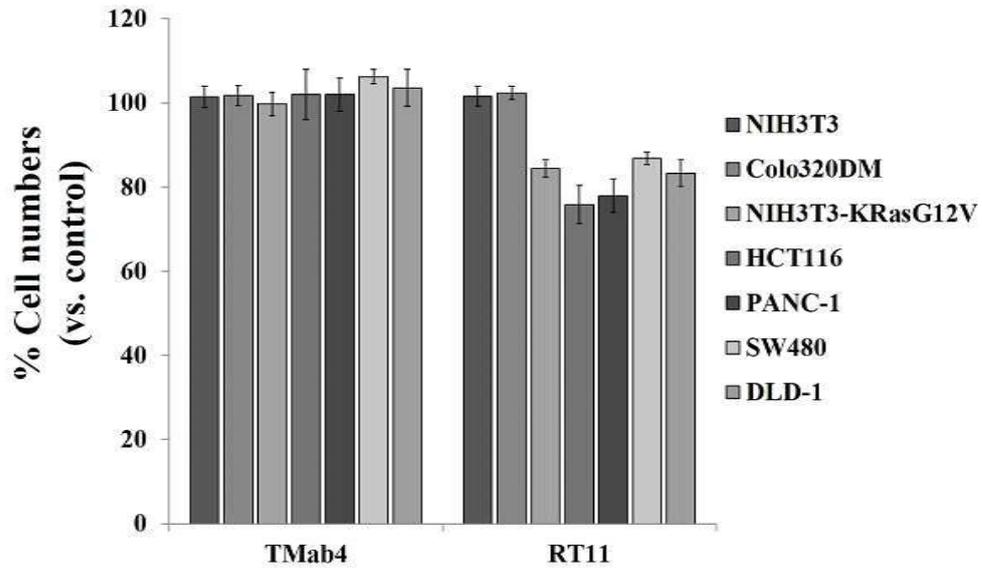
도면29



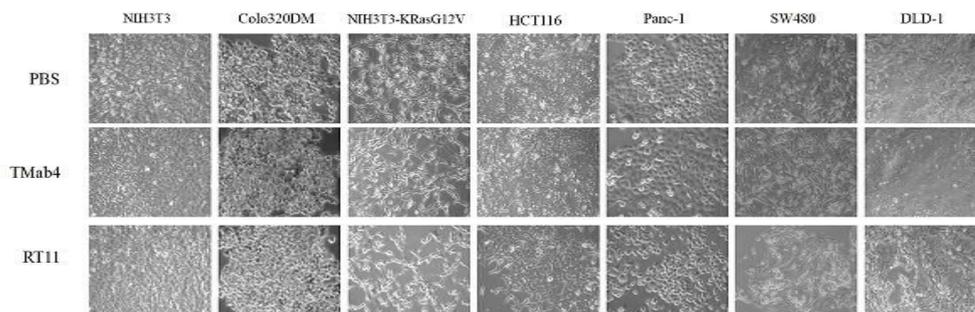
도면30



도면31



도면32



도면33

NIH3T3 – mCherry KRas G12V

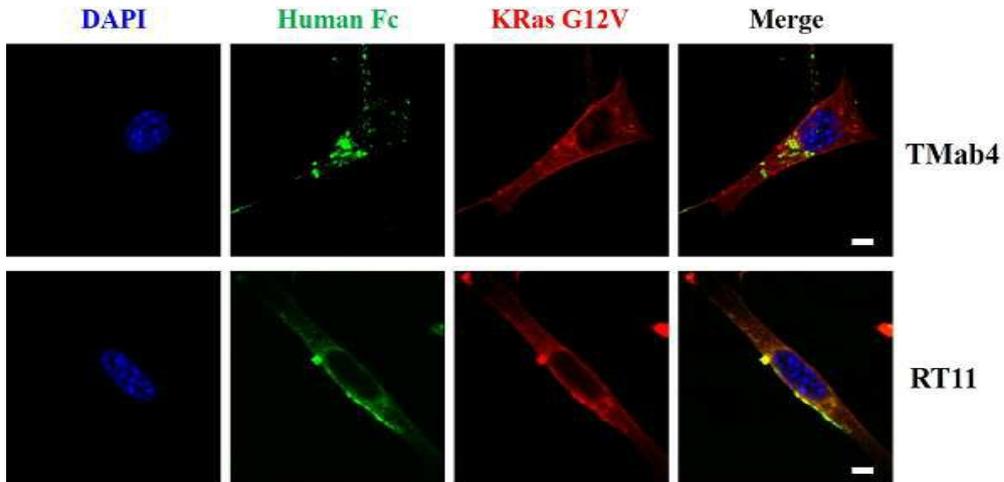
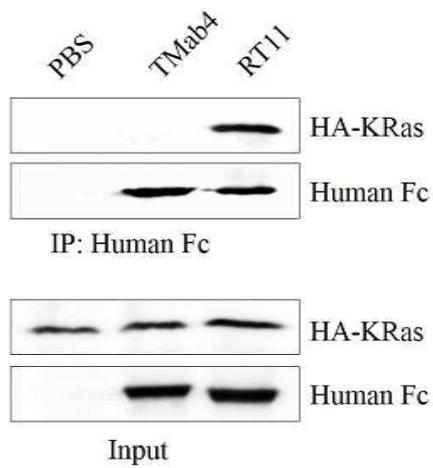


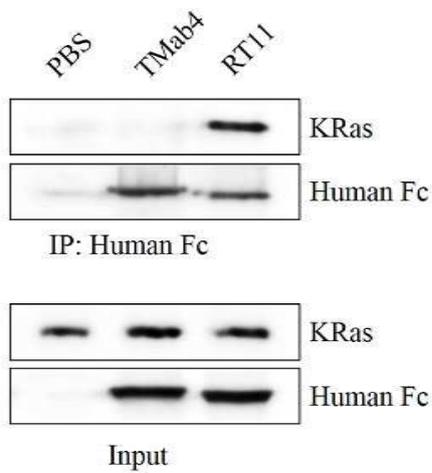
Image magnification, 630x; scale bar, 5 μ m.

도면34

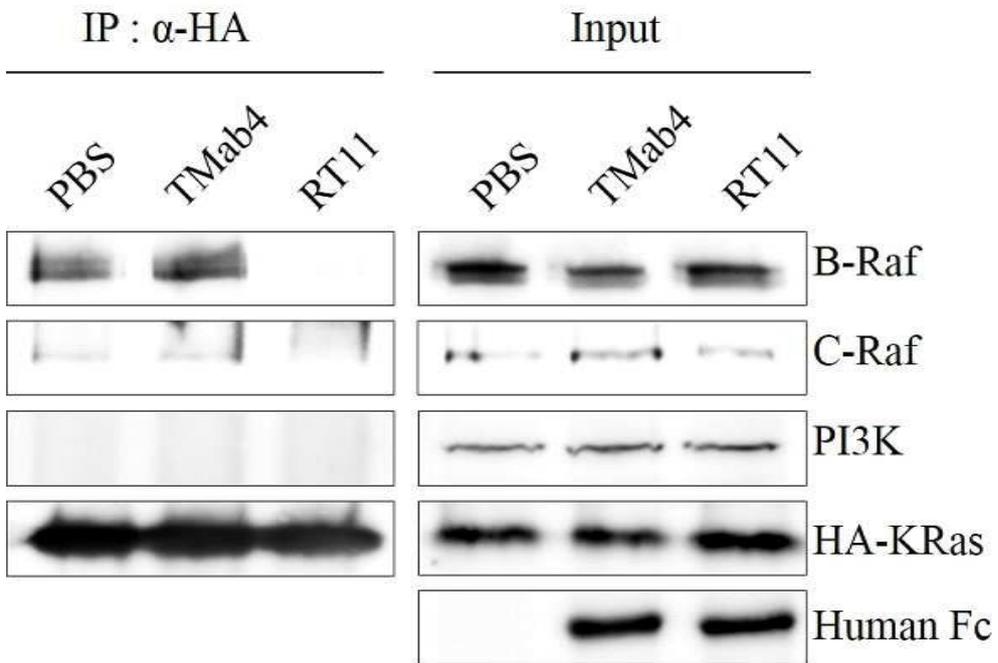
NIH3T3 HA-KRas G12V



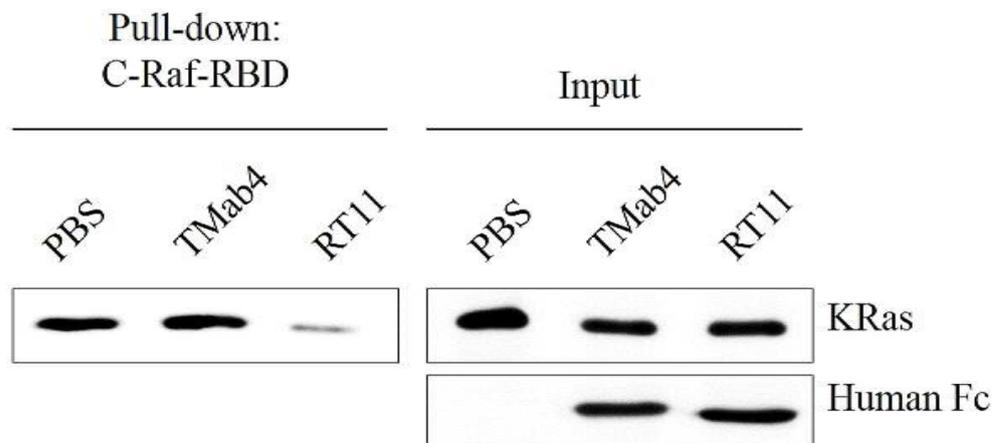
HCT116 KRas G13D



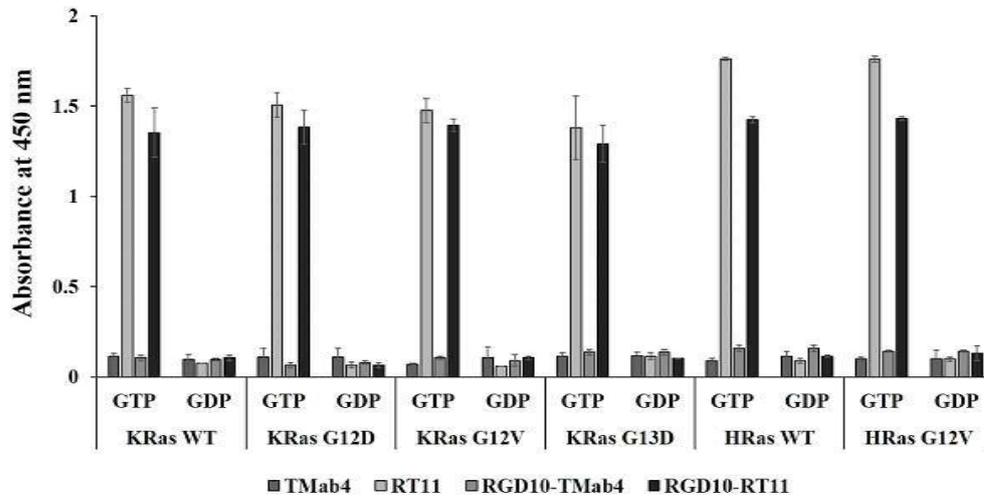
도면35a



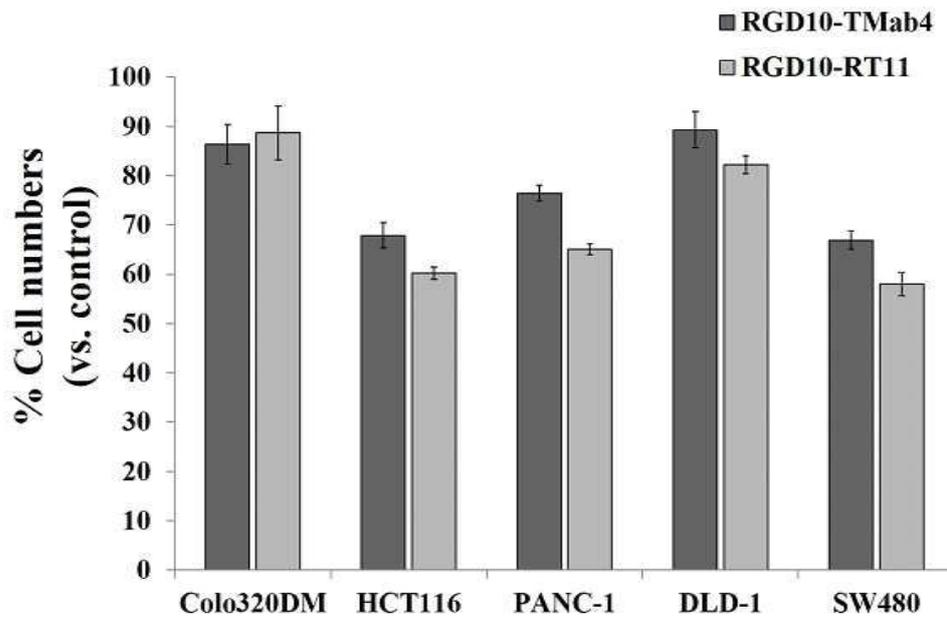
도면35b



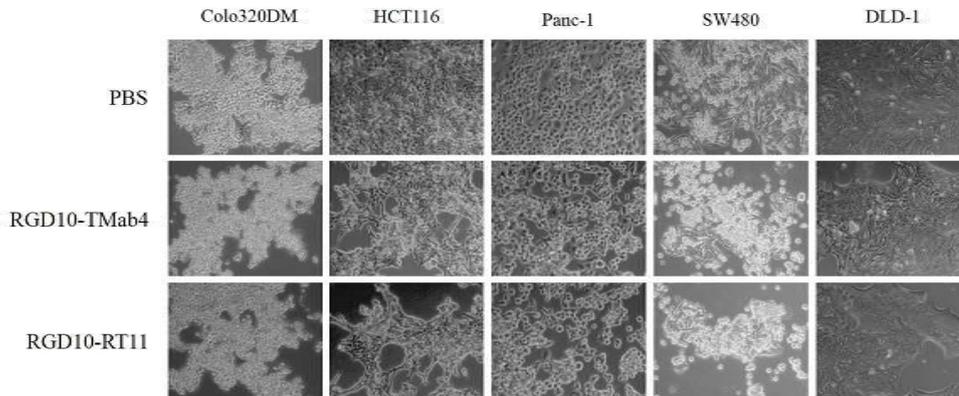
도면36



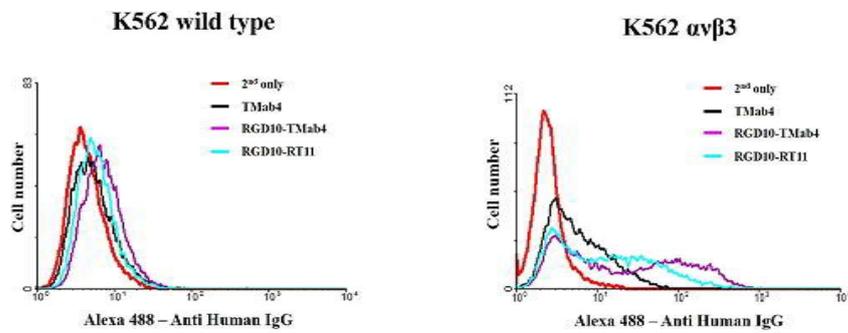
도면37



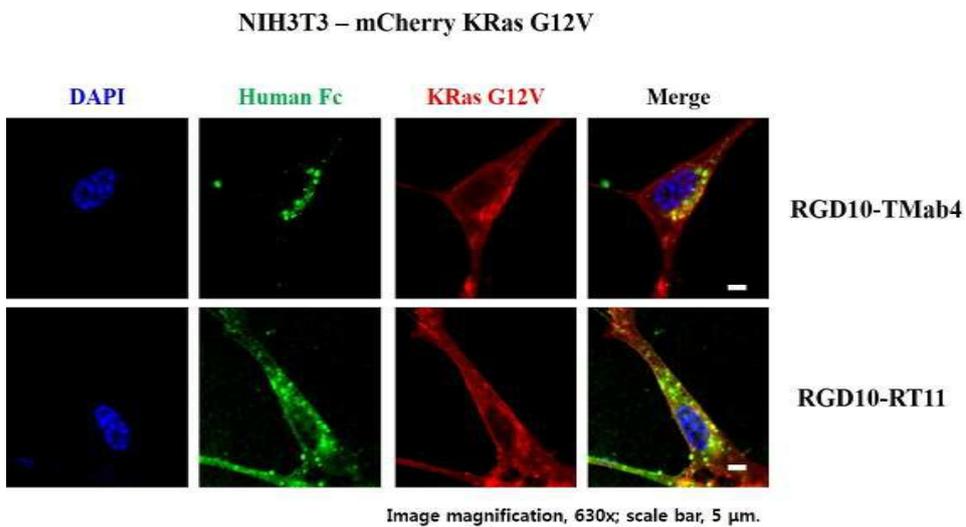
도면38



도면39



도면40



서열목록

- <110> AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
Medicinal Bioconvergence Research Center
- <120> Method for inhibiting activated RAS using intact immunoglobulin

antibody having Cell-penetrating ability and use thereof

<130> 1-46p-1

<150> KR 10-2014-0092687

<151> 2014-07-22

<160> 42

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT4

<400> 1

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 Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
	20	25	30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ser Thr Ile Ser Arg Ser Gly His Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn 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 Lys Arg Phe Gly Ser Ile Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser			

115

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT11

<400> 2

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 Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn 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 Gly Phe Phe Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 3

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT13

<400> 3

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 Phe Thr Phe Ser Thr Phe
 20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT15

<400> 5

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 Phe Thr Phe Ser Thr Phe

20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn 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 Lys Arg Phe Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT16

<400> 6

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 Phe Thr Phe Ser Thr Phe

20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn 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 Ser Gly Arg Phe Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser

115
 <210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT17
 <400> 7

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 Phe Thr Phe Ser Thr Phe
 20 25 30
 Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn 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 Lys Gly Arg Phe Gly Ser Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser

115
 <210> 8
 <211> 5

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT4 CDR1

<400> 8

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT4 CDR2

<400> 9

Thr Ile Ser Arg Ser Gly His Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT4 CDR3

<400> 10

Arg Phe Gly Ser Ile Val Phe Asp Tyr

1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT11 CDR1

<400> 11

Ser Tyr Ser Met Ser

1 5

<210> 12

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT11 CDR2
 <400> 12
 Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> RT11 CDR3
 <400> 13
 Gly Phe Phe Met Asp Tyr
 1 5

<210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> RT13 CDR1
 <400> 14
 Thr Phe Ser Met Ser
 1 5

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> RT13 CDR2
 <400> 15
 Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT13 CDR3

<400> 16

Gly Thr Phe Gly Phe Asp Tyr

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT14 CDR1

<400> 17

Thr Phe Ser Met Ser

1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT14 CDR2

<400> 18

Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT14 CDR3

<400> 19

Pro Arg Gly Trp Phe Asp Tyr

1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT15 CDR1

<400> 20

Thr Phe Ser Met Ser

1 5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT15 CDR2

<400> 21

Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT15 CDR3

<400> 22

Arg Phe Gly Ser Phe Asp Tyr

1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT16 CDR1

<400> 23

Thr Phe Ser Met Ser

1 5

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT16 CDR2

<400> 24

Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT16 CDR3

<400> 25

Ser Ser Gly Arg Phe Val Phe Asp Tyr

1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT17 CDR1

<400> 26

Thr Phe Ser Met Ser

1 5

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT17 CDR2

<400> 27

Tyr Ile Ser Arg Thr Ser His Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RT17 CDR3

<400> 28

Gly Arg Phe Gly Ser Val Phe Asp Tyr

1 5

<210> 29

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hT2 VL

<400> 29

Asp Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser

20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Ile

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln

85 90 95

Ser Tyr Tyr His Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys Arg

<210> 30

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hT3 VL

<400> 30

Asp Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser			
	20	25	30
Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys			
	35	40	45
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
	50	55	60
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
65	70	75	80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln			
	85	90	95
Ser Tyr Tyr His Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile			
	100	105	110

Lys Arg

<210> 31

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hT4 VL

<400> 31

Asp Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser

20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Tyr His Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys Arg

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hT2 VL CDR1

<400> 32

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hT2 VL CDR2

<400> 33

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hT2 VL CDR3

<400> 34

Lys Gln Ser Tyr Tyr His Met Tyr Thr

1 5

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hT3 VL CDR1

<400> 35

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hT3 VL CDR2

<400> 36

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hT3 VL CDR3

<400> 37

Lys Gln Ser Tyr Tyr His Met Tyr Thr

1 5

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hT4 VL CDR1

<400> 38

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hT4 VL CDR2

<400> 39

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hT4 VL CDR3

<400> 40

Gln Gln Tyr Tyr Tyr His Met Tyr Thr

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RGD4C

<400> 41

Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys

1 5
<210> 42
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> RGD10
<400> 42
Asp Gly Ala Arg Tyr Cys Arg Gly Asp Cys Phe Asp Gly
1 5 10