

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0081965

(43) 공개일자 2023년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/2863 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-0156920

(22) 출원일자 2022년11월22일

심사청구일자 2022년11월22일

(30) 우선권주장

1020210169089 2021년11월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인

주식회사 헤지호그

서울특별시 구로구 가마산로 211,3층 302호 (구로동)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김보람

경기도 안양시 만안구 연현로 29, 104동 203호(석수동, 안양석수하우스토리아파트)

허민규

경기도 용인시 수지구 수풍로 38, 201동 1104호(풍덕천동, 수지2차 삼성래미안)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충현

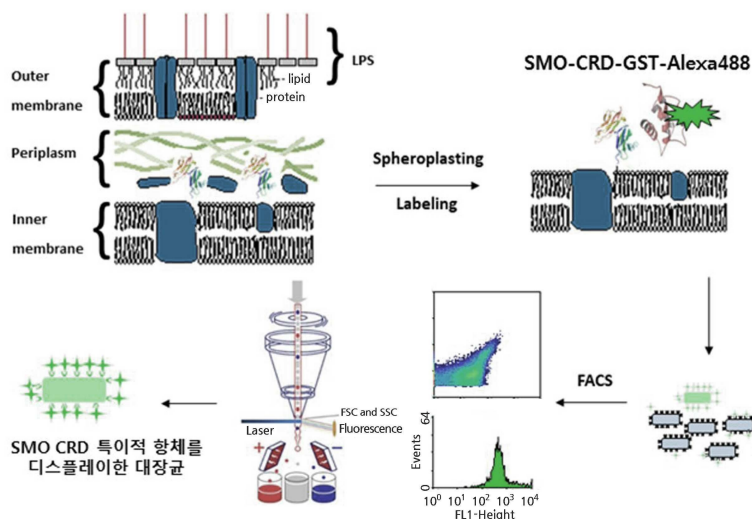
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 SMO 인간 항체

(57) 요약

본 발명은 SMO (smoothened) 단백질을 항원으로 인식하여 이에 특이적으로 결합하는 신규한 인간항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 본 발명의 항체는 암세포의 증식, 이동, 침투, 전이 등의 주요 암진행 과정에 직접적으로 관여하는 SMO 단백질에 특이적으로 결합하여 이의 진행을 차단함으로써, 대장암 등의 다양한 암, 또는 내성암, 전이암 또는 재발암에 대한 치료제로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

G01N 33/574 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

임햇님

서울특별시 마포구 새터산7길 26, 301호(성산동,
 해비치하우스)

이지선

서울특별시 은평구 은평로 220, 106동 1505호(응암
 동, 녹번역e편한세상캐슬)

오상철

서울특별시 강남구 선릉로 120, 7동 602호(대치동,
 개포1,2차 우성아파트)

정상택

서울특별시 강남구 선릉로69길 20, 112동 6층 702
 호(역삼동, 역삼 e-편한세상)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711131419
과제번호	2018M3A9G1075561
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	시장연계미래바이오기술개발
연구과제명	Bio-SPC 설립을 통해 표적항암제 내성 극복을 위한 항체 개발 및 상용화
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(주)헤지호그
연구기간	2018.04.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

SMO (smoothened) 단백질을 항원으로 인식하여 이에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기의 CDR 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편:

- (a) 서열번호 1의 CDRH1;
- (b) 서열번호 2의 CDRH2;
- (c) 서열번호 3의 CDRH3, 또는 상기 서열번호 3에서 6번째, 7번째, 8번째, 11번째, 12번째 및 18번째 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 아미노산을 포함하는 CDRH3;
- (d) 서열번호 4의 CDRL1;
- (e) 서열번호 5의 CDRL2; 및
- (f) 서열번호 6의 CDRL3, 또는 상기 서열번호 6에서 6번째 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 아미노산을 포함하는 CDRL3.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 서열번호 3의 6번째 아미노산은 Y에서 H로 치환된 것을 특징으로 하는, 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 서열번호 3의 7번째 아미노산은 Y에서 L로 치환된 것을 특징으로 하는, 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 서열번호 3의 8번째 아미노산은 G에서 D로 치환된 것을 특징으로 하는, 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 서열번호 3의 11번째 아미노산은 T에서 N으로 치환된 것을 특징으로 하는, 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 서열번호 3의 12번째 아미노산은 Y에서 F로 치환된 것을 특징으로 하는, 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 서열번호 3의 18번째 아미노산은 F에서 V로 치환된 것을 특징으로 하는, 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 서열번호 6의 6번째 아미노산은 S에서 P로 치환된 것을 특징으로 하는, 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 CDRH3는 서열번호 3, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는, 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 CDRL3는 서열번호 6 및 서열번호 13의 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는, 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 11

서열번호 1의 CDRH1; 서열번호 2의 CDRH2; 하기 일반식 1로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 CDRH3; 서열번호 4의 CDRL1; 서열번호 5의 CDRL2; 및 하기 일반식 2로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 CDRL3;을 포함하는, SMO (smoothened) 단백질을 항원으로 인식하여 이에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편:

일반식 1

A-R-R-A-H-X1-X2-X3-G-S-X4-X5-N-P-S-W-Y-X6-D-L;

일반식 2

Q-Q-G-Y-S-X7-P-R-T;

상기 일반식 1에서 X1은 Y 또는 H이며, X2는 Y 또는 L이며, X3는 G 또는 D이며, X4는 T 또는 N이며, X5는 Y 또는 F이며, X6는 F 또는 V이며, 상기 일반식 2에서 X7은 S 또는 P이다.

청구항 12

서열번호 14의 CDRH1; 서열번호 15의 CDRH2; 서열번호 16의 CDRH3; 서열번호 17의 CDRL1; 서열번호 18의 CDRL2; 및 서열번호 19의 CDRL3;을 포함하는, SMO (smoothened) 단백질을 항원으로 인식하여 이에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 13

제 1 항, 제 11 항 또는 제 12 항의 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자.

청구항 14

제 13 항의 핵산분자를 포함하는 벡터.

청구항 15

제 14 항의 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 16

제 1 항, 제 11 항 또는 제 12 항의 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 17

제 1 항, 제 11 항 또는 제 12 항의 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 피검자로부터 체외로 분리된 샘플에 처리하는 단계를 포함하는, 샘플 중에 포함된 SMO(smoothened) 단백질의 정량 방법.

청구항 18

하기의 단계를 포함하는 SMO(smoothened) 단백질의 과발현에 의한 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법:

- (a) 피검자로부터 체외로 분리된 샘플을 취득하는 단계;
- (b) 제 1 항, 제 11 항 또는 제 12 항의 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 상기 샘플에 처리하는 단계; 및
- (c) 상기 피검자의 샘플 중에 포함된 SMO 단백질의 발현양이 정상군 샘플 중에 포함된 SMO 단백질의 발현양 보다 높은지 여부를 확인하는 단계.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 상기 SMO 단백질의 과발현에 의한 질환은 암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 1 항, 제 11 항 또는 제 12 항의 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 SMO(smoothened) 단백질 정량 키트.

청구항 21

제 1 항, 제 11 항 또는 제 12 항의 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암의 진단용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 SMO 단백질을 항원으로 인식하여 이에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 암은 우리나라 사망원인 1위를 차지하고 있다. 이중에서도 발생률과 사망률이 가장 높은 것은 대장암이다. 가장 최근들어 한국에서 대장암의 발생률과 사망률이 매우 급증하고 있다. 한국에서는 대장내시경을 이용한 대장암 조기검진 프로그램을 통해, 수술이 가능한 시점에 진단되어 초기 치료받는 경우가 많다. 그럼에도 4, 5명 중 1명은 진단 당시에 이미 다른 장기에 암이 전이되어 있는 사례들이 발생하여, 수술이 어려운 4기로 진단된다. 암에 대한 치료방법 또는 치료제들이 다방면으로 개발되어 왔으나, 대개 수술과 항암화학요법, 방사선 치료를 병기에 따라 적절히 병행하거나 단독으로 사용하고 있다.
- [0004] 현재, 일반적인 암 환자의 치료목표는 생존기간을 연장하고 증상을 완화하는 것이 주된 목표이므로, 개발된 치료방법들 역시 과거에 비해 생존기간을 연장하거나 증상을 완화하는데는 우수할지 몰라도, 암의 완치와 관련된 항암효과는 여전히 만족스럽지 못한 상황에 있다.
- [0005] 한편 치료제로는, 베바시주맵(상품명 : 아바스틴), 세툽시맵(상품명 : 엘비투스)과 같은 다양한 표적치료제들이 개발되어 있다. 구체적으로 베바시주맵은 암세포와 VEGF(혈관내피세포 성장인자)와의 상호작용을 파악하여, VEGF 경로를 차단함으로써 신생혈관 생성을 억제하여 암 세포의 성장과 전이를 저해하는 항암제로, 이는 다른 항암제와 병용투여되어 치료효과를 증진시키기 위해 주로 사용되고 있다. 이러한 베바시주맵과 같은 VEGF 표적치료제는 효과를 미리 예측할 수 있는 예측 지표가 밝혀지지 않아, 현재 특정 유전자 검사 등의 진단없이 사용되고 있다.
- [0006] 또한, 세툽시맵(상품명 : 엘비투스)은 암세포의 신호전달체계를 막아, 암의 성장을 저해하는 효과를 갖는 항암제이며, 대장암의 대표적인 표적치료제이다. 이는 상피성장인자 수용체에 대한 항체로써, 성장인자가 세포 내로 신호를 주어 세포가 분열하는 것을 막게 하여 암세포의 성장을 억제하는 효과를 갖는 것이다.
- [0007] 이 밖에도 일반암 뿐만 아니라 항암제에 대한 내성암 또는 암의 재발에 효과적인 방법과 약물을 개발하기 위한 다양한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있다. 그러나, 대부분의 암의 치료는 암의 크기를 줄이는 것에 치중되어 있고, 항암제에 대한 내성을 갖는 암이나 암의 재발에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다. 특히 암의 병기를 결정하는 데서 중요한 것은 암의 크기가 아니라 암이 조직에 침투한 정도이기 때문에, 암의 성장, 전이, 내성암 등의 전반적인 암의 증상과 관련이 있는 생체분자를 규명하고, 이를 표적으로 하여 암의 성장과 전이, 내성암의 성장과 전이 모두를 제어할 수 있는 새로운 암 표적 치료의 생물 지표의 발굴에 대한 필요성이 대두되고 있는 실정이다.
- [0009] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 이에 본 발명자들은 헤지호그(hedgehog, Hh) 신호전달 경로 중에서, SMO 단백질이 일반 암뿐만 아니라 항암제-내성 암의 성장과 전이와 관련이 있음을 확인하였고, 이를 표적으로 하여 암/내성암의 성장 및 전이를 제어할 수 있는 신규 항-SMO 인간항체를 발굴하고자 예의 노력한 결과, 본 발명을 완성하였다.
- [0013] 따라서 본 발명의 목적은, SMO (smoothened) 단백질을 항원으로 인식하여 이에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자를 제공하는데 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 제공하는데 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공하는데 있다.

- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물을 제공하는데 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 이를 필요로 하는 대상(subject)에게 치료학적 유효량 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공하는데 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터의 치료 용도(for use in therapy)를 제공하는데 있다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 피검자로부터 체외로 분리된 샘플에 처리하는 단계를 포함하는, 샘플 중에 포함된 SMO(smoothened) 단백질의 정량 방법을 제공하는데 있다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 목적은, SMO(smoothened) 단백질의 과발현에 의한 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 SMO(smoothened) 단백질 정량 키트를 제공하는데 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암의 진단용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0027] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 SMO (smoothened) 단백질을 항원으로 인식하여 이에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0029] 헤지호그(Hedgehog, Hh)는 배아 발생 과정에서 중요하게 작용하는 단백질로서 세포 증식, 이동 및 분화 조절을 통하여 배아 패턴형성에 해당하는 등쪽과 배쪽의 축형성, 신경계, 근골격계 등을 포함한 다양한 장기 발생에 작용한다. 성체에 있어서의 헤지호그는 줄기세포의 유지에 관여하며, 헤지호그의 성체 조직 내에서의 비정상적인 과다 활성화는 기저세포암, 수뇌암 등과 같은 다양한 암을 유발하는 것으로 알려져 있다. 이에 발생과정 이후의 헤지호그 신호전달 활성화는 성체에서는 일부 특정 조직에서만 활성이 유지되고, 대부분의 체세포에서는 감소된다. 이에 반해 체세포 단계에서 헤지호그 신호전달 신호전달 유전자(Ptch, Smo, Sufu, Gli 등) 돌연변이에 의해 과도한 신호전달 활성이 발생할 경우, 암 발생이 유발되는 것으로 알려져 있다.
- [0030] 헤지호그 신호전달 경로는 세포막에 있는 12-막 관통형 수용체인 Patched1(Ptch1)에 Sonic Hedgehog가 결합함으로써 시작되며, Ptch1은 7-막 관통형의 Gli 단백질 결합 수용체인 SMO를 억제하는 작용이 있으나, Ptch1에 Sonic Hedgehog이 결합하면 Ptch1은 SMO를 저해하는 작용을 잃게 된다. 그 결과, SMO가 활성화되고, 활성화된 SMO에 의해 전사인자인 Gli가 활성화되어 헤지호그 표적 유전자의 발현이 활성화된다. 즉, 리간드로 작용하는 헤지호그가 세포막에 존재하는 Ptch1 수용체에 결합하여 Ptch1에 의해서 활성이 억제되고 있는 다른 GPCR-like 막 통과 단백질인 SMO의 원발섬모로의 이동을 촉진하고, 헤지호그 신호전달 최종 역활자인 Gli 전사인자의 활성을 촉진시킨다.
- [0031] SMO가 Gli 전사인자 활성을 조절하는 방식은 헤지호그에 의해 원발섬모로 이동한 SMO가 하위 신호단계에서 Gli 전사인자가 핵으로 이동하는 것을 억제하는 Sufu를 조절하거나 또는 원발섬모 내에서 Gli 단백질의 안정성을 증가시키고 비활성 상태인 Gli를 전사 활성을 갖는 상태로 전환을 유발하여 Gli 전사인자에 의해서 헤지호그에 작용을 받는 유전자 발현 증가를 유도하여 세포 이동, 증식 및 분화 과정이 진행되도록 한다.
- [0032] 이에 본 발명자들은 암을 제어할 수 있는 새로운 인간항체를 발굴하고자 노력한 결과, 헤지호그 신호전달 경로 (Sonic(SHH))/PATCHED/(PTCH1)/SMOTHENED(SMO))에서 다양한 암들과 관련이 있는 SMO 단백질을 타겟으로 하여

이에 특이적으로 결합하는 인간항체를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

- [0033] 본 발명에서 상기 SMO 단백질은 서열번호 40으로 표시될 수 있으며, GenBank에서 서열정보를 확인할 수 있다.
- [0034] SMO(smoothened)는 7-막 관통형의 Gli 단백질 결합 수용체로, 헤지호그(Hedgehog) 신호전달 경로의 최종 역할자인 Gli 전사인자의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다. 그러나 그동안에는 헤지호그 신호전달 과다활성에 의해 발병하는 암을 억제하기 위하여, 헤지호그 신호 전달 경로의 Ptch1 또는 헤지호그 단백질의 활성을 타겟으로 하거나, SMO 저해활성을 억제하기 위하여 신규 화합물이 개발되었을 뿐이다. 이의 경우 완벽하게 헤지호그 신호 전달 경로의 저해가 어려운 문제가 있고, SMO 돌연변이에 의한 항암제 내성 암세포에 대해서는 적용이 어렵다는 문제점이 있다. 따라서 앞서 말한 바와 같이, 다양한 암(일반 암, 내성암, 재발암 등)에 대하여 효과적인 치료효과를 나타내는 SMO 억제제의 개발이 시급하다.
- [0035] 헤지호그의 성체 조직 내에서의 비정상적인 과다 활성(발현)은 기저세포암, 수뇌암 등과 같은 다양한 암을 유발하는 것으로 알려진 바 있다. 포유류의 헤지호그는 Sonic Hedgehog, Indian Hedgehog, Desert hedgehog의 3종류가 있으며, 그 중 가장 많이 연구되고 있는 것은 전신에 발현을 볼 수 있는 Sonic Hedgehog(SHH) signaling pathway이다.
- [0036] 암세포에서는 SMO 단백질의 활성화가 높게 나타나며, 높은 SMO 단백질의 발현 또는 활성화가 암 환자 또는 암 세포의 낮은 생존률과 관련이 있음을 확인하였다.
- [0037] 본 발명자들은 SMO 단백질의 높은 발현이 대장암 환자의 낮은 생존률과 관련이 있다는 것을 확인하였고, 대장암 세포주에서 SMO 단백질 발현이 정상 세포보다 증가되었음을 확인하였으며, 또한, DLD-1, HCT15, HCT116, HT29, WIDR, SW48, SNUC2A, colo205, SNU283, SW480, SW620, HCT8, SNUC1, LS174T 대장암 세포주에서 헤지호그(hedgehog) 신호전달 요소(components) 중에서 SMO, GLI1 단백질의 발현이 증가되었음을 확인하였다. 즉, 헤지호그 최종 신호 역할자인 Gli 단백질은 SMO 단백질의 활성화에 따라 조절되고 있음을 알 수 있다.
- [0038] 본 명세서에서, 용어 "항체"는 면역글로불린 분자 중 어느 유형의 항체(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 또는 IgY)일 수 있으며, 어느 하위 유형의 항체(예를 들어, 인간에 있어서 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4; 및 마우스에 있어서 IgG1, IgG2a, IgG2b, 및 IgG3)일 수 있다. 면역글로불린(예를 들어, IgG1)은 다양한 알로타입(allo type)이 존재할 수 있으며, 본 명세서에서 용어 "항체"는 일반적으로 알려진 아이소타입(isotype) 및 알로타입(allo type)을 포함한다. 또한, 본 명세서에서 용어 "항체"는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 이거나, 이의 하이브리드(hybrid) 유형일 수 있다(예를 들어, IgG2 및 IgG4의 하이브리드).
- [0039] 본 명세서에서 용어 "단일클론항체" 또는 "monoclonal antibody"는 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성(single binding specificity) 및 친화도(affinity)를 나타내는 항체를 의미한다.
- [0040] 본 발명의 단일클론 항체는 예를 들어 문헌 [Kohler et al., Nature 256, 495 (1975)]에서 처음 설명된 하이브리도마 방법에 의해 생산될 수 있거나, 재조합 DNA 방법에 의해 생산될 수 있다. 단일클론 항체는 또한 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991)]에 기재된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 단일클론 항체는 임의의 적합한 공급원으로부터 입수할 수 있는데 본 발명에서의 단일클론 항체는 SMO 항원을 발현하는 세포 또는 SMO 항원을 코딩하는 핵산 형태의 관심있는 항원으로 면역화시킨 마우스로부터 얻은 세포로부터 제조한 하이브리도마로부터 입수할 수 있다. 단일클론 항체는 또한 면역화된 인간 또는 비-인간 포유동물, 예를 들어 래트, 개, 영장류 등의 항체-발현 세포로부터 유래된 하이브리도마로부터 입수할 수 있다.
- [0041] 본 명세서에서 상기 단일클론항체는 이의 단편을 포함하는 의미로 사용되며, 상기 단편은 바람직하게는 항원 결합 단편(antigen binding fragment)을 의미한다. 상기 단편은 당업계에 알려진 다양한 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 파파인(Fab 단편의 생산) 또는 펩신(F(ab')₂)과 같은 효소를 이용하여 면역글로불린 분자의 단백질분해성 절단(proteolytic cleavage)을 통하여, Fab 및 F(ab')₂ 단편을 제조할 수 있다.
- [0042] 본 명세서에서, 용어 "단편"은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv(single chain Fv), 또는 모노머의 VH 또는 VL 도메인을 포함하는 sdAb일 수 있으며, 상기 단편에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0043] 본 발명의 단일클론항체 또는 이의 단편은 서열번호 40으로 표시되는 SMO 단백질에 결합하는 항원 결합 단백질을 포함하고, 이는 SMO에 의해 매개되는 암의 성장과 전이와 관련된 생리학적 효과를 억제한다. 구체적으로 암에 있어서 헤지호그 전달 기전의 활성화를 통해 최종 역할자인 Gli 단백질의 발현이 증가하게 되며, 이 과정에는 헤지호그에 의한 SMO 발현이 관여한다. SMO 단백질의 활성화 또는 발현에 의해, 헤지호그 전달 경로에

따른 GI 단백질이 증가하게 되고, 암이 유발된다. 즉 헤지호그 전달 기전에 의해 증가되거나 활성화된 SMO 단백질은 암의 성장과 발생에 영향을 주는 것으로, 상술한 항원 결합 단백질을 포함하는 단일클론항체 또는 이의 단편을 처리하여 SMO 단백질의 발현 또는 활성을 억제하고 저해하는데 유용하게 작용한다.

[0044] 본 발명에서 "성장을 억제한다"는 본 발명의 단일클론항체 또는 이의 단편과 접촉되지 않은 동일한 세포의 성장과 비교하여 단일클론항체 또는 이의 단편과 접촉되었을 때 세포 성장의 임의 측정가능한 감소(예를 들어 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%의 세포 성장 억제를 포함한다)를 포함하도록 의도되며, 상기 세포 성장의 감소는 다양한 메커니즘에 의해 발생할 수 있다.

[0045] 상기 항원 결합 단백질은 하나 이상의 CDR(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 CDR)을 포함한다. 상기 항원 결합 단백질은 SMO를 항원으로 하여, 이에 결합하도록 하는 것으로, 본원에서 설명되는 하나 이상의 상보성 결정 구역(CDR)을 포함하는 폴리펩타이드이다. 상기 항원 결합 단백질에서 CDR은 적합한 항원 결합 특성이 달성 되도록 CDR을 배향시킨다. 본원에서 제공되는 항원 결합 단백질은 SMO의 발현 또는 활성화를 저해하거나 차단하거나 감소시키거나 조절할 수 있다. 즉 이를 통해 대상 내에 존재하는 SMO를 저해함으로써 헤지호그 전달 경로에 의해 매개되는 암의 발생과 성장 및 전이를 억제할 수 있다.

[0046] 또한, 상기 헤지호그 신호전달 경로의 조절 장애는 화학요법 및 방사선 요법에 의한 내성암 또는 재발암 또는 전이암의 발생에도 기여하는 것으로 알려져 있다. 내성에 근본적인 메커니즘은 확실히 밝혀진 바 없으나, 종래 항암제에 의해 내성된 암 세포에 본 발명의 SMO 항체를 투여한 결과, 암 세포의 성장이 현저히 억제되었음을 확인하였다. 즉 본 발명의 단일클론항체 또는 이의 단편은 일반 암뿐만 아니라, 내성암, 재발암 및 전이암에 대해서도 우수한 치료효과를 가지고 있음을 알 수 있다.

[0047] VH 도메인, 또는 하나 또는 그 이상의 CDR은 중쇄(heavy chain)를 형성하기 위하여 불변 도메인에 연결될 수 있다. 또한, VL 도메인, 또는 하나 또는 그 이상의 CDR은 경쇄(light chain)를 형성하기 위하여 불변 도메인에 연결될 수 있다. 전장(full length) 중쇄 및 전장 경쇄가 결합하여 전장 항체를 구성한다.

[0048] 면역글로불린 사슬의 가변 구역은 일반적으로 가변 구역은 일반적으로 3개의 추가변 구역(보다 종종 "상보성 결정 구역", 즉 CDR로 불림)에 의해 연결된 비교적 보존된 프레임워크 구역 (FR)을 포함하는 동일한 전체 구조를 보인다. 상기 언급된 각각의 중쇄/경쇄쌍의 2개의 사슬로부터의 CDR은 대개 프레임워크 구역에 의해 정렬되어, 표적 단백질 (예를 들어, SMO) 상의 특이적 에피토프와 특이적으로 결합하는 구조를 형성한다. N-말단으로부터 C-말단으로, 천연 발생 경쇄 및 중쇄 가변 구역은 모두 일반적으로 다음 순서의 이들 요소와 일치한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4. 각각의 이들 도메인 내의 위치를 점령하는 아미노산에 숫자를 배정하기 위한 넘버링 시스템이 고안되었다. 상기 넘버링 시스템은 문헌 ([Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 and 1991, NIH, Bethesda, MD)], 또는 [Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol.196:901-917]; [Chothia et al., 1989, Nature 342:878-883])에 정의되어 있다.

[0049] 다양한 중쇄 및 경쇄 가변 구역이 본원을 통해 제공될 수 있으며, 앞서 설명한 바와 같이 각각의 이들 가변 구역은 상기 중쇄 및 경쇄 불변 구역에 부착되어 각각 완전한 항체 중쇄 및 경쇄를 형성할 수 있다. 또한 각각의 형성된 중쇄 및 경쇄 서열은 조합되어 완전한 항체 구조를 형성할 수 있다.

[0050] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 항체는 인간 항체이다.

[0051] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기의 CDR 영역을 포함한다:

[0052] (a) 서열번호 1의 CDRH1;

[0053] (b) 서열번호 2의 CDRH2;

[0054] (c) 서열번호 3의 CDRH3, 또는 상기 서열번호 3에서 6번째, 7번째, 8번째, 11번째, 12번째 및 18번째 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 아미노산을 포함하는 CDRH3;

[0055] (d) 서열번호 4의 CDRL1;

[0056] (e) 서열번호 5의 CDRL2; 및

[0057] (f) 서열번호 6의 CDRL3, 또는 상기 서열번호 6에서 6번째 위치의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 아미노산을 포함하는 CDRL3.

- [0058] 상기 서열번호 3의 6번째 아미노산은 Y(Tyr)에서 H(His)로 치환될 수 있다.
- [0059] 상기 서열번호 3의 7번째 아미노산은 Y(Tyr)에서 L(Leu)로 치환될 수 있다.
- [0060] 상기 서열번호 3의 8번째 아미노산은 G(Gly)에서 D(Asp)로 치환될 수 있다.
- [0061] 상기 서열번호 3의 11번째 아미노산은 T(Thr)에서 N(Asn)으로 치환될 수 있다.
- [0062] 상기 서열번호 3의 12번째 아미노산은 Y(Tyr)에서 F(Phe)로 치환될 수 있다.
- [0063] 상기 서열번호 3의 18번째 아미노산은 F(Phe)에서 V(Val)로 치환될 수 있다.
- [0064] 상기 서열번호 6의 6번째 아미노산은 S(Ser)에서 P(Pro)로 치환될 수 있다.
- [0065] 상기 CDRH3는 서열번호 3, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0066] 상기 CDRL3는 서열번호 6 및 서열번호 13의 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1의 CDRH1; 서열번호 2의 CDRH2; 하기 일반식 1로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 CDRH3; 서열번호 4의 CDRL1; 서열번호 5의 CDRL2; 및 하기 일반식 2로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 CDRL3;을 포함할 수 있다:
- [0068] **일반식 1**
- [0069] A-R-R-A-H-X1-X2-X3-G-S-X4-X5-N-P-S-W-Y-X6-D-L;
- [0070] **일반식 2**
- [0071] Q-Q-G-Y-S-X7-P-R-T;
- [0072] 상기 일반식 1에서 X1은 Y 또는 H이며, X2는 Y 또는 L이며, X3는 G 또는 D이며, X4는 T 또는 N이며, X5는 Y 또는 F이며, X6는 F 또는 V이며, 상기 일반식 2에서 X7은 S 또는 P이다.
- [0073] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 14의 CDRH1; 서열번호 15의 CDRH2; 서열번호 16의 CDRH3; 서열번호 17의 CDRL1; 서열번호 18의 CDRL2; 및 서열번호 19의 CDRL3;을 포함한다.
- [0075] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자를 포함하는 벡터 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.
- [0077] 본 발명의 핵산분자는 단리된 것이거나 재조합된 것일 수 있으며, 단일쇄 및 이중쇄 형태의 DNA 및 RNA뿐만 아니라 대응하는 상보성 서열이 포함된다. "단리된 핵산"은 천연 생성 원천에서 단리된 핵산의 경우, 핵산이 단리된 개체의 게놈에 존재하는 주변 유전 서열로부터 분리된 핵산이다. 주형으로부터 효소적으로 또는 화학적으로 합성된 핵산, 예컨대 PCR 산물, cDNA 분자, 또는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 이러한 절차로부터 생성된 핵산이 단리된 핵산분자로 이해될 수 있다. 단리된 핵산분자는 별도 단편의 형태 또는 더 큰 핵산 구축물의 성분으로서의 핵산 분자를 나타낸다. 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들면, 전서열 또는 분비 리더(leader)의 DNA는 폴리펩타이드가 분비되기 전의 형태인 전단백질(preprotein)로서 발현되는 경우 폴리펩타이드의 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 폴리펩타이드 서열의 전사에 영향을 주는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되며, 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 배치될 때 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로 "작동가능하게 연결된"은 연결될 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우 인접하여 동일한 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다.
- [0078] 그러나 인핸서는 인접하여 위치할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 방법에 따라 사용한다.
- [0079] 본 명세서에서 용어 "벡터"는 핵산 서열을 복제할 수 있는 세포로의 도입을 위해서 핵산 서열을 삽입할 수 있는

전달체를 의미한다. 핵산 서열은 외생 (exogenous) 또는 이종 (heterologous)일 수 있다. 벡터로서는 플라스미드, 코스미드 및 바이러스(예를 들면, 박테리오파지, 아데노바이러스, AAV 등)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 당업자는 표준적인 재조합 기술에 의해 벡터를 구축할 수 있다(Maniatis, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 및 Ausubel et al., In: Current Protocols in Molecular Biology, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994 등).

[0080] 본 명세서에서 용어 "발현 벡터"는 전사되는 유전자 산물 중 적어도 일부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함한 벡터를 의미한다. 일부의 경우에는 그 후 RNA 분자가 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드로 번역된다. 발현 벡터에는 다양한 조절서열을 포함할 수 있다. 전사 및 번역을 조절하는 조절서열과 함께 벡터 및 발현 벡터에는 또 다른 기능도 제공하는 핵산 서열도 포함될 수 있다.

[0081] 본 명세서에서 용어 "숙주세포"는 진핵생물 및 원핵생물을 포함하며, 상기 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 코딩되는 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형질 전환 가능한 생물을 의미한다. 숙주세포는 상기 벡터에 의해 형질감염(transfected) 또는 형질전환(transformed) 될 수 있으며, 이는 외생의 핵산분자가 숙주세포 내에 전달되거나 도입되는 과정을 의미한다.

[0082] 본 발명의 숙주세포는 제한되지 않으나, 진핵세포, 바람직하게는 곤충세포 또는 포유동물 세포, 보다 바람직하게는 곤충세포의 경우 Sf9, 포유동물 세포의 경우 HEK293 세포, HeLa 세포, ARPE-19 세포, RPE-1 세포, HepG2 세포, Hep3B 세포, Huh-7 세포, C8D1a 세포, Neuro2A 세포, CHO 세포, MES13 세포, BHK-21 세포, COS7 세포, COP5 세포, A549 세포, MCF-7 세포, HC70 세포, HCC1428 세포, BT-549 세포, PC3 세포, LNCaP 세포, Capan-1 세포, Panc-1 세포, MIA PaCa-2 세포, SW480 세포, HCT166 세포, LoVo 세포, A172 세포, MKN-45 세포, MKN-74 세포, Kato-III 세포, NCI-N87 세포, HT-144 세포, SK-MEL-2 세포, SH-SY5Y 세포, C6 세포, HT-22 세포, PC-12 세포, NIH3T3 세포 등을 이용할 수 있다.

[0083] 본 발명의 숙주세포는 바람직하게는 단리된 숙주세포이다.

[0085] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0086] 본 발명의 약제학적 조성물은 (a) 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다.

[0088] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 이를 필요로 하는 대상(subject)에게 치료학적 유효량 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0090] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터의 치료 용도를 제공한다.

[0092] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 치료 용도는 암 치료 용도인 것이다.

[0093] 본 발명이 예방 또는 치료하고자 하는 암의 종류는 제한되지 않으며, 백혈병(leukemias) 및 급성 림프구 백혈병(acute lymphocytic leukemia), 급성 비림프구 백혈병(acute nonlymphocytic leukemias), 만성 림프구 백혈병(chronic lymphocytic leukemia), 만성 골수 백혈병(chronic myelogenous leukemia), 호지킨 병(Hodgkin's Disease), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphomas) 및 다발 골수종(multiple myeloma) 등과 같은 림프종(lymphomas), 뇌종양(brain tumors), 교모세포종(glioblastoma), 신경모세포종(neuroblastoma), 횡문근육종(Rhabdomyosarcoma), 망막모세포종(retinoblastoma), 윌름즈종양(Wilms Tumor), 골종양(bone tumors) 및 연부조직육종(soft-tissue sarcomas) 등과 같은 소아 고형 종양(childhood solid tumors), 폐암(lung cancer), 유방암(breast cancer), 전립선암(prostate cancer), 요로암(urinary cancers), 자궁암(uterine cancers), 구강암(oral cancers), 췌장암(pancreatic cancer), 흑색종(melanoma) 및 기타 피부암(skin cancers), 위암

(stomach cancer), 대장암(Colon cancer), 난소암(ovarian cancer), 뇌종양(brain tumors), 간암(liver cancer), 후두암(laryngeal cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 식도암(esophageal cancer) 및 고환암(testicular cancer) 등과 같은 성인들의 통상의 고형 종양(common solid tumors)들을 포함하여 다수의 암들을 치료하도록 투여될 수 있다.

[0094] 또한, 상기 암은 진행성, 내성암, 재발암 또는 전이암일 수 있다. 특히 상기 내성암은 암 치료용 약물에 대한 내성을 갖는 암으로, 암 치료용 약물로는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테오미드, 수니티닙, 카보플라틴, 소라페닙, 베마시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 비스쿰알bum, 아스파라기나제, 트레티노닌, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙티세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레볼린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 쟈시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토퍼, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 란티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미토산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 테모졸로마이드, 부설판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴, 보리노스텐, 엔티노스텐, 5FU 및 카르무스틴으로 등이 있을 수 있다.

[0095] 본 명세서에서 용어 "예방"은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상(subject)에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.

[0096] 본 명세서에서 용어 "치료"는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 대상에게 투여하면 SMO 단백질의 활성 또는 발현을 억제함으로써 암세포의 증식을 억제하여 암의 진행을 저해하거나, 이로 인한 증상을 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터는 그 자체로 암 치료용 조성물에 포함될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 이의 치료 반응성을 향상시키는 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 "치료" 또는 "치료제"는 "치료 보조" 또는 "치료 보조제"의 의미를 포함한다.

[0097] 본 명세서에서 용어 "투여" 또는 "투여하다"는 본 발명의 약제학적 조성물의 약제학적 유효량 또는 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터의 치료학적 유효량을 대상에 직접적으로 투여함으로써 대상의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.

[0098] 본 발명에서 용어 "치료학적 유효량"은 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 조성물 내의 약리성분이 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 "예방적 유효량"을 포함하는 의미이다.

[0099] 본 명세서에서 용어 "대상" 또는 "subject"는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이 등을 포함하는 포유동물을 의미한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상은 인간이다.

[0100] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0101] 본 발명의 항체 (이를 코딩하는 핵산 또는 벡터 포함) 또는 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 바람직하게는 비경구 투여이며, 예컨대, 정맥 내 주입, 경피 투여, 피하 주입, 근육 내 주입, 유리체 내

주입(intravitreal injection), 망막 하 주입(subretinal injection), 맥락막위공간 주입(suprachoroidal injection), 점안 투여(eye drop administration), 뇌실 내 주입(intracerebroventricular injection), 척추강 내 주입(intrathecal injection), 양막 내 주입 (intraamniotic injection), 동맥 내 주입 (intraarterial injection), 관절강 내 주입 (intraarticular injection), 심장 내 주입 (intracardiac injection), 음경해면체 내 주입 (intracavernous injection), 뇌 내 주입 (intracerebral injection), 뇌수조 주입 (intracisternal injection), 관상 내 주입 (intracoronary injection), 두개 내 주입 (intracranial injection), 경막 내 주입 (intradural injection), 경막 외 주입 (epidural injection), 해마 내 주입 (intrahippocampal injection), 비강 내 주입 (intranasal injection), 골강 내 주입 (intraosseous injection), 복강 내 주입 (intraperitoneal injection), 흉강 내 주입 (intrapleural injection), 척수 내 주입 (intraspinal injection), 흉곽 내 주입 (intrathoracic injection), 흉선 내 주입 (intrathymic injection), 자궁 내 주입 (intrauterine injection), 질 내 주입 (intravaginal injection), 심실 내 주입 (intraventricular injection), 방광 내 주입 (intravesical injection), 결막 하 주입 (subconjunctival injection), 종양 내 주입 (intratumoral injection), 국소 주입 및 복강 주입(intraperitoneal injection) 등으로 투여할 수 있다.

[0102] 본 발명의 약제학적 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 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-100 mg/kg이다.

[0103] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 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 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

[0104] 본 발명의 약제학적 조성물은 단독의 요법으로 이용될 수 있으나, 다른 통상적인 화학 요법 또는 방사 요법과 함께 이용될 수도 있으며, 이러한 병행 요법을 실시하는 경우에는 보다 효과적으로 암 치료를 할 수 있다. 본 발명의 조성물과 함께 이용될 수 있는 화학 요법제는 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 프로카르바진(procarbazine), 메클로레타민(mechlorethamine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 멜팔란(melphalan), 클로라부실(chlorambucil), 비술판(bisulfan), 니트로소우레아(nitrosourea), 디악티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 블레오마이신(bleomycin), 플리코마이신(plicomycin), 미토마이신(mitomycin), 에토포시드(etoposide), 탁목시펜(tamoxifen), 택솔(taxol), 트랜스플라티늄(transplatinum), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 빈크리스틴(vincristin), 빈블라스틴(vinblastin) 및 메토티렉세이트(methotrexate) 등을 포함한다. 본 발명의 조성물과 함께 이용될 수 있는 방사 요법은 X-선 조사 및 γ -선 조사 등이다.

[0106] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 단일클론항체 또는 이의 단편을 피검자로부터 체외로 분리된 샘플에 처리하는 단계를 포함하는, 샘플 중에 포함된 SMO 단백질의 정량 방법을 제공한다.

[0107] 본 발명의 단일클론항체 또는 이의 단편은 SMO 단백질에 특이적으로 결합하기 때문에 이를 이용하면 샘플 중에 포함된 SMO 단백질의 발현양을 정확하게 측정 가능할 수 있다. 게다가 암 치료용 약물에 의한 내성암, 재발암 또는 전이암과 관련된 다양한 SMO 단백질의 발현량도 측정할 수 있다.

[0109] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 하기의 단계를 포함하는 SMO 단백질의 과발현에 의한 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:

[0110] (a) 피검자로부터 체외로 분리된 샘플을 취득하는 단계;

- [0111] (b) 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 상기 샘플에 처리하는 단계; 및
- [0112] (c) 상기 피검자의 샘플 중에 포함된 SMO의 발현양이 정상군 샘플 중에 포함된 SMO의 발현양 보다 높은지 여부를 확인하는 단계.
- [0113] 상기 SMO 단백질은 대장암 등의 다양한 암, 또는 암 치료용 약물에 의한 내성암, 전이암, 재발암 등에서 과발현되어 암세포의 증식, 이동, 침투, 전이 등의 주요 암진행 과정에 직접적으로 관여하기 때문에, SMO 단백질의 발현량을 정상인과 비교함으로써, SMO 단백질의 과발현에 의한 질환의 진단을 위한 정보를 제공할 수 있다.
- [0114] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 SMO 단백질의 과발현에 의한 질환은 암이다.
- [0116] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 SMO(smoothened) 단백질 정량 키트를 제공한다.
- [0117] 본 발명의 정량 키트는 항원항체 결합반응을 통하여 상기 항체에 대한 항원을 분석함으로써 SMO 단백질 양을 정량할 수 있으며, 상기 항원항체 결합반응은 통상의 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), RIA(Radioimmunoassay), 샌드위치 측정법(Sandwich assay), 폴리아크릴아미드 겔 상의 웨스턴 블롯(Western Blot), 면역블롯 분석(Immunoblot assay) 및 면역조직화학염색 방법(Immunohistochemical staining)으로 이루어지는 군에서 선택되는 것이 바람직하나 이에 제한되지 않는다.
- [0118] 항원-항체 결합 반응을 위한 고정체로는 니트로셀룰로오스 막, PVDF막, 폴리비닐(Polyvinyl) 수지 또는 폴리스티렌(Polystyrene) 수지로 합성된 웰 플레이트(Well plate) 및 유리로 된 슬라이드 글라스(Slide glass)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0119] 상기 2차 항체는 발색반응을 하는 통상의 발색제로 표지되는 것이 바람직하며, HRP(Horseradish peroxidase), 알칼리성 인산분해효소(Alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(Coloid gold), FITC(Poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(Rhodamine-B-isothiocyanate) 등의 형광물질(Fluorescein) 및 색소(Dye)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 표지체가 사용될 수 있다. 발색을 유도하는 기질은 발색반응을 하는 표지체에 따라 사용하는 것이 바람직하며, TMB(3,3',5,5'-tetramethyl bezidine), ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] 및 OPD(ophenylenediamine)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 사용하는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0121] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 단일클론항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암의 진단용 조성물을 제공한다.
- [0122] 본 발명에서 사용되는 항체 또는 그의 항원결합 단편과 대상이 되는 암에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0123] 본 명세서에서 용어 "진단"은 특정 질환에 대한 개체(피검자)의 감수성(susceptibility)의 판정, 특정 질환을 현재 개체가 가지고 있는 지 여부의 판정, 및 특정 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)의 판정을 포함한다.
- [0124] SMO 단백질은 다양한 암 조직에서 과발현되어 암세포의 증식, 이동, 침투, 전이 등의 주요 암 진행 과정에 직접적으로 관여하기 때문에, 암의 진단 마커로서 활용될 수 있다. SMO에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체는 생물학적 시료 내 종양의 존재를 정확하게 판정할 수 있다.
- [0125] 본 명세서에서 용어 "진단용 조성물"은 피검자의 암 발병 여부를 판단하거나 SMO 단백질의 발현량 측정수단으로서 본 발명의 항체를 포함하는 통합적인 혼합물(mixture) 또는 장비(device)를 의미하며, 이에 "진단용 키트"로 표현될 수도 있다.
- [0126] 본 명세서에서 용어 "샘플" 또는 "생물학적 시료"란 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 림프액, 척수액, 조직 부검 시료(뇌, 피부, 림프절, 척수 등), 세포 배양 상등액, 파열된 진행세포 및 세균 발현계를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

발명의 효과

- [0128] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0129] (i) 본 발명은 SMO (smoothened) 단백질을 항원으로 인식하여 이에 특이적으로 결합하는 신규한 인간항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0130] (ii) 본 발명의 항체는 암세포의 증식, 이동, 침투, 전이 등의 주요 암진행 과정에 직접적으로 관여하는 SMO 단백질을 특이적으로 결합하여 이의 진행을 차단함으로써, 대장암 등의 다양한 암, 또는 내성암, 전이암 또는 재발암에 대한 치료제로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0132] 도 1은 제작된 dimeric, tetrameric SMO CRD 영역 항원 단백질의 동물세포용 발현 벡터와 동물세포에서 발현 정제 후 SDS-PAGE gel 사진을 나타낸다.
- 도 2는 유세포 분리기를 이용한 항체 탐색의 모식도이다.
- 도 3은 SMO scFv 항체 변이체들의 유세포 분석기를 통한 SMO CRD 결합력 분석결과이다.
- 도 4는 탐색을 통해 발굴된 SMO CRD에 높은 결합 친화도를 보이는 scFv 인간 항체 변이체의 아미노산 서열 분석 결과를 나타낸다.
- 도 5는 3종 항체의 동물세포 발현 벡터와 동물세포에서 발현 정제 후 SDS-PAGE gel 사진을 나타낸다.
- 도 6은 SMO에 대한 3종의 항체의 결합력을 확인하기 위해 진행한 ELISA 결과를 나타낸다.
- 도 7은 SMO에 대한 3종의 항체의 결합력을 확인하기 위해 진행한 유세포 분석기결과를 나타낸다.
- 도 8은 SMO에 대한 3종의 항체의 효능을 확인하기 위해 NIH3T3 GLI 세포주를 이용하여 GLI luciferase activity 측정 결과를 나타낸다.
- 도 9는 탐색을 통해 발굴된 SMO CRD에 결합 친화도가 증가한 scFv 인간 항체 변이체의 FACS data를 나타낸다.
- 도 10은 SMO 결합 scFv 항체 변이체의 유세포 분석기를 통한 SMO CRD 결합력 향상 확인 결과이다.
- 도 11은 1종 항체의 동물세포 발현 벡터와 동물세포에서 발현 정제 후 SDS-PAGE gel 사진을 나타낸다.
- 도 12는 SMO에 대한 결합력이 향상된 항체의 결합력을 확인하기 위해 진행한 ELISA 결과를 나타낸다.
- 도 13은 SMO에 대한 결합력이 향상된 1종의 항체의 결합력을 확인하기 위해 진행한 유세포 분석기 결과를 나타낸다.
- 도 14는 SMO에 대한 4종의 항체의 효능을 확인하기 위해 NIH3T3 GLI 세포주에서 SHH에 의해 활성화된 GLI luciferase activity 측정 결과를 나타낸다.
- 도 15는 SMO에 대한 4종의 항체의 효능을 확인하기 위해 NIH3T3 GLI 세포주에서 hydroxysterol 20(s)에 의해 활성화된 GLI luciferase activity 측정 결과를 나타낸다.
- 도 16은 SMO 항체에 의한 암 이동성 억제능을 확인하기 위해 SKOV3 암세포주를 이용하여 transwell migration assay를 수행한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0133] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0135] 실시예

[0136] <실시예 1> SMO의 세포 외부 영역 중 CRD (Cysteine rich domain) 영역을 이용한 항원 제작

[0137] 본 연구에서는 SMO와 결합하는 IgG를 발굴하기 위하여 SMO의 CRD (Cystine rich Domain)영역을 항원으로 준비하였다. 또한 유세포 분리기를 이용하여 항체를 스크리닝하는 것에 보다 적합한 항원을 제작하고자 GST (Glutathione-S-transferase) tag를 fusion한 dimeric 형태와 Streptavidin tag를 fusion한 tetrameric 형태의 항원을 만들 동물 세포 발현용 벡터를 제작하였다 (도 1). 그 후 Expi293F 동물세포에 transfection하였다. Transfection 하루 전날 Expi293F cell을 2×10^6 cells/ml의 density로 300 ml 계대배양하고 다음날 Polyethylenimine (PEI, Polyscience, 23966)을 이용하여 transfection하였다. Freestyle 293 expression 배양액 (Gibco, 12338-018) 30 ml에 각각의 유전자를 먼저 섞고, 다음으로 PEI:변이체 유전자 = 4:1 비율로 섞어 상온에서 20분간 두었다가 전날 계대배양 해 놓은 cells에 섞고 shaking CO₂ incubator에서 37 °C, 125 rpm, 8% CO₂ 조건으로 7일간 배양한 후 원심 분리하여 상등액만 취하였다. 그 후 25x PBS를 이용해 equilibrium을 맞추었다. Bottle top filter를 이용해 0.2 µm filter (Merck Millipore)로 여과하였다. 여과된 배양액을 각각 GSH resin과 Ni-NTA resin 1 ml을 넣어 주고 4°C에서 16 시간 교반 한 후 column을 통해 흘려주어 resin을 회수한 후 5 ml PBS로 wash후 4 ml의 50 mM Tris-HCl & 10 mM reduced glutation (SIGMA) with pH 8.0 및 250 mM imidazole로 elution 받았다. Centrifugal filter units 3K (Merck Millipore)을 사용하여 PBS로 buffer change 진행 후 SDS-PAGE를 통해 각각 정제된 2종 항원 단백질의 크기와 순도를 분석하였다 (도 1).

[0139] <실시예 2> Alexa488 형광 표지된 dimeric 형태의 SMO CRD 영역과 유세포 분리기를 통한 초고속 탐색 시스템 활용한 인간 항체 스크리닝

[0140] 앞서 준비된 항원 단백질 중 GST (Glutathione-S-transferase)가 fusion된 항원 단백질을 유세포 분리기를 이용한 스크리닝에 사용하기 위해 Alexa488 형광분자를 표지화하였다. 본 발명자들이 선행연구를 통해 구축한 박테리아 디스플레이된 인간 scFv 항체 라이브러리를 이용하여 SMO CRD 영역에 결합하는 인간 항체 스크리닝을 진행하였다. 라이브러리 세포 1 ml을 2% glucose와 40 µg/ml의 chloramphenicol이 포함된 25 ml TB배지에서 37°C, 250 rpm으로 4시간 배양하였다. 배양된 세포를 40 µg/ml의 chloramphenicol이 포함된 100 ml의 TB배지에 1:100 비율로 OD600 = 0.5까지 배양한 후 20분간 25°C, 250 rpm에서 cooling 과정을 거쳐 1 mM IPTG를 첨가하여 25°C, 250 rpm, 5시간 동안 Induction을 하여 단백질이 과발현된 대장균을 OD600 = 8을 기준으로 harvest 하였다. 세포들을 유세포 분리기를 이용한 스크리닝에 적합한 spheroplasts 형태로 만들기 위해 세포를 1 ml의 10 Mm Tris-HCl (pH 8.0)을 사용하여 resuspension으로 2번의 세척을 통해 잔여 배지를 제거하였고 1 ml의 STE [0.5 M sucrose, 10 Mm Tris-HCl, 10 Mm EDTA (pH 8.0)] 용액에서 37°C, 30분간 rotation을 통해 osmotic shock을 주는 방법으로 세포 외막을 제거하였다. 1 ml의 Solution A와 50 mg/ml lysozyme solution 20 µl를 혼합한 용액에서 37°C, 15분간 rotation하여 peptidoglycan 층을 제거하였고 1 ml의 PBS로 세척한 뒤 300 µl를 700 µl의 PBS와 200 nM(monomer 기준)의 SMO-CRD-GST-Alexa488 probe를 넣고 상온에서 1시간 동안 rotation하여 spheroplast에 형광 probe를 labeling하였다. 항원 결합력 증가로 높은 형광을 보이는 클론들을 유세포분리기를 이용하여 회수하였다 (도 2). 회수된 클론들에서 scFv 유전자들을 PCR방법으로 증폭하고, 배양, 발현 유도, 세포외막과 peptidoglycan layer를 없애는 spheroplasting 과정, 항원 labeling, 그리고 flow cytometry의 선택적인 gating을 통해 SMO CRD 영역에 높은 친화도를 보이는 spheroplast들을 sorting하는 과정을 반복하였다. 유세포 분석기를 이용한 sorting 과정과 sorting 순도 (purity)를 높이기 위한 resorting 과정 후에, 농축과정, PCR 증폭을 통한 sorting된 scFv 변이체 유전자 확보 과정, subcloning 과정, transformation 과정을 거치고, 원하는 클론들을 증폭 (enrich)하기 위해 다음 라운드의 sorting 과정을 수행하였다. 반복되는 여러 round의 탐색 과정으로 SMO CRD 영역에 결합력이 우수한 scFv 변이체 클론들을 확보하였다.

[0142] <실시예 3> 유세포 분석기를 이용한 선별된 항체 변이체들의 SMO CRD 영역에 대한 결합력 분석

[0143] scFv 항체 변이체들의 SMO CRD 영역에 대한 결합력을 확인하기 위해 유세포 분석기를 이용한 결합력 분석을 진행하였다. 이를 위하여 앞서 사용된 방식으로 각각의 변이체와 대조군으로 사용될 initial library를 spheroplast들로 제조하였다. 준비된 spheroplast들에 스크리닝에 이용된 SMO CRD-GST-Alexa488 항원을 200 nM의 농도로 결합시키고 상온에서 1시간 동안 incubation하였다. Non-specific한 결합을 제거하기 위해 PBS로 두 차례 세척한 후 유세포 분석기를 이용하여 SMO CRD 영역에 대한 결합력을 분석하였다. 분석 결과, 3종의

scFv 변이체들 (도 3)에서 대조군인 initail library에 비해 월등히 증가된 형광 신호를 나타내었으며, 이를 통해 SMO CRD 영역에 결합하는 scFv 항체 변이체들을 발명하였음을 확인하였다.

[0145] <실시예 4> 확보된 SMO 결합 항체 변이체들의 유전자 서열 확인

[0146] 확보한 scFv 변이체 클론들의 유전자 서열을 확인하기 위하여 Sanger sequencing을 이용하여 DNA 염기 서열을 분석하였다. 분석을 통해 SMO에 결합력을 가지는 3종의 scFv 항체의 아미노산 서열을 확인하였다 (도 4).

[0148] <실시예 5> 3종의 scFv 변이체들의 항체 생산 및 정제

[0149] 앞서 진행한 실험에 따라 선별된 3종의 scFv 항체 변이체를 IgG 형태로도 SMO와의 결합력을 가지는지를 확인하기 위하여 3종의 scFv의 heavy chain, light chain 발현 백터를 각각 제작하였다. 그 후 Expi293F 동물세포에 transfection하였다. Transfection 하루 전날 Expi293F cell을 2×10^6 cells/ml의 density로 계대배양하고 다음날 Polyethylenimine (PEI, Polyscience, 23966)을 이용하여 transfection하였다. Freestyle 293 expression 배양액 (Gibco, 12338-018) 100 ml에 변이체들의 중쇄유전자와 경쇄유전자를 1:1의 비율로 먼저 섞고, 다음으로 PEI: 변이체유전자 = 4:1 비율로 섞어 상온에서 20 분간 두었다가 전날 계대배양해 놓은 cells에 섞고 shaking CO₂ incubator에서 37°C, 125 rpm, 8% CO₂ 조건으로 7일간 배양한 후 원심 분리하여 상등액만 취하였다. 그 후 25x PBS를 이용해 equilibrium을 맞추었다. Bottle top filter를 이용해 0.2 µm filter (Merck Millipore)로 여과하였다. 여과된 배양액을 Protein A resin 500 µl을 넣고 4°C에서 16 시간 교반한 후 column을 통해 흘려주어 resin을 회수한 후 5 ml PBS로 wash 후 3 ml 100 mM glycine pH 2.7 buffer로 elution 받은 후 1M Tris-HCl pH 8.0을 이용하여 중화시켰다. buffer를 바꾸기 위하여 centrifugal filter units 3K (Merck Millipore)을 사용하여 PBS로 buffer change 진행 후 SDS-PAGE를 통해 각각 정제된 3종의 항체의 크기와 순도를 분석하였다 (도 5).

[0151] <실시예 6> SMO 결합 항체들의 SMO CRD에 대한 결합력 분석

[0152] 단백질 상에서 SMO에 대한 항체의 결합력을 측정해 보기 위하여 ELISA 실험을 진행하였다. 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 µg/ml로 GST tag를 fusion한 dimeric 형태의 SMO CRD와 Streptavidin tag를 fusion한 tetrameric 형태의 SMO CRD를 50 µl씩 서로 다른 Flat Bottom Polystyrene High Bind 96 well microplate (costar)에 4°C, 16시간 동안 고정화 한 후 100 µl의 4% skim milk (GenomicBase) (in 0.05% PBST pH 6.0/pH 7.4)로 상온에서 2시간 동안 blocking 하였다. 0.05% PBST 180 µl로 4회씩 wash를 진행한 뒤 1% skim milk (in 0.05% PBST)으로 serially dilution 된 3종의 항체와 대조군인 Trastuzumab을 50 µl 각 well에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. Wash 과정 후 anti-Human HRP conjugate (Jackson ImmunoResearch) 50 µl씩을 이용해 상온에서 1시간 동안 항체 반응을 진행하고 wash 과정을 수행하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution(Thermo Fisher Scientific) 50 µl씩 첨가해 발색 한 뒤 2 M H₂SO₄ 50 µl씩 넣어주어 반응을 종료시킨 다음 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해 분석하였다 (도 6).

[0154] <실시예 7> SMO 결합 항체들의 HCT116 세포주 SMO에 대한 결합력 확인

[0155] 대장암 세포주인 HCT116에서 SMO 결합 항체들의 결합력을 확인하기 위해 유세포 분석기를 이용한 결합력 분석을 진행하였다. 준비된 HCT116 세포에 BSA blocking 30분 후 SMO 결합 항체 10 µg의 농도로 결합시키고 상온에서 1시간 동안 incubation 하였다. 1시간 후 PBS로 세척한 후 Alexa 594 2차 항체 2 µl 씩 반응시켜 상온에서 1시간 동안 incubation 하였다. 1시간 후 Non-specific한 결합을 제거하기 위해 PBS로 washing 후 유세포 분석기를 이용하여 SMO 결합 항체들의 결합력을 분석하였다. 분석 결과, 3종의 scFv 변이체들이 47, 42, 40 순으로 HCT116 세포 SMO에 결합력이 증가됨을 확인하였다 (도 7).

[0157] <실시예 8> SMO 결합 항체에 의한 헤지호그 신호전달 억제 확인

[0158] 본 발명의 항체들이 헤지호그 신호 전달을 억제 여부를 확인하기 위해 아래와 같이 실험을 수행하였다. 헤지

호그 신호전달은 헤지호그 리간드에 의해 PTCH, SMO 수용체로 신호가 전달되며 최종 단계 전사인자인 GLI 단백질이 다양한 유전자 발현을 조절한다. 이런 신호전달을 확인하기 위해 GLI 단백질 결합 부위에 luciferase가 결합된 reporter plasmid를 포함하는 NIH3T3 세포에서 cell based assay를 수행하였다. NIH3T3 GLI 세포주를 96well plate에 well 당 2.5×10^4 세포수로 깔아주고 다음날 SMO 결합 항체를 농도 1, 10, 50, 100 μg 으로 처리해 준다. 2시간 후 리간드인 oxysterol 20(s)와 oxysterol 25를 7.5 μM 로 처리한다. 항체 처리 24시간 후 promega kit를 이용하여 luciferase activity를 측정하였다. 측정 결과, 3종의 scFv 변이체들이 유세포분석기에 의한 결합력과 동일하게 47, 42, 40 순으로 NIH3T3 GLI 세포주의 GLI 전사활성 억제능이 결합력이 증가됨을 확인하였다 (도 8).

[0160]

<실시예 9> 유세포 분리를 통한 초고속 탐색 시스템 활용한 SMO CRD 영역과 결합력이 향상된 인간 항체 스크리닝

[0161]

SMO CRD에 대한 결합력이 확인된 3종의 항체를 모항체로 SMO와의 결합력을 높이기 위한 실험을 설계하였다. 이를 위하여 scFv로 display 되어있는 #40, #42, #47 항체의 중쇄(heavy chain)에 CDR(Complementarity-Determining Domain) 3의 아미노산을 하나씩 치환하는 CDRH3 NNK 라이브러리를 제작하였다. 또한 1차 항체 발굴에 이용되었던 항원인 SMO-CRD-GST-Alexa488 probe와 박테리아 디스플레이된 인간 scFv 항체 Error-prone 라이브러리를 이용하여 SMO CRD영역에 결합하는 인간 항체 스크리닝을 진행하였다. 라이브러리 세포 1 ml을 2% glucose와 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 chloramphenicol이 포함된 25 ml TB배지에서 37℃, 250 rpm으로 4시간 배양한다. 배양된 세포를 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 chloramphenicol이 포함된 100 ml의 TB배지에 1:100 비율로 OD600 = 0.5까지 배양한 후 20분간 25℃, 250 rpm에서 cooling 과정을 거쳐 1 mM IPTG를 첨가하여 25℃, 250 rpm, 5시간 동안 Induction을 하여 단백질이 과발현된 대장균을 OD600 = 8을 기준으로 harvest하였다. 세포들을 유세포 분리를 이용한 스크리닝에 적합한 spheroplasts형태로 만들기 위해 세포를 1 ml의 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)을 사용하여 resuspension으로 2번의 세척을 통해 잔여 배지를 제거하였고 1 ml의 STE [0.5 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA (pH 8.0)] 용액에서 37℃, 30분간 rotation을 통해 osmotic shock을 주는 방법으로 세포 외막을 제거하였다. 1 ml의 Solution A와 50 mg/ml lysozyme solution 20 μl 를 혼합한 용액에서 37℃, 15분간 rotation하여 peptidoglycan 층을 제거하였고 1 ml의 PBS로 세척한 뒤 300 μl 를 700 μl 의 PBS와 200 nM(monomer 기준)의 SMO CRD-GST-Alexa488 probe를 넣고 상온에서 1시간 동안 rotation하여 spheroplast에 형광 probe를 labeling하였다. 항원 결합력 증가로 높은 형광을 보이는 클론들을 유세포분리를 이용하여 회수하였다. 회수된 클론들에서 scFv 유전자들을 PCR방법으로 증폭하고, 배양, 발현유도, 세포외막과 peptidoglycan layer를 없애는 spheroplasting 과정, 항원 labeling, 그리고 flow cytometry의 선택적인 gating을 통해 SMO CRD 영역에 높은 친화도를 보이는 spheroplast들을 sorting하는 과정을 반복하였다. 유세포 분석기를 이용한 sorting 과정과 sorting 순도 (purity)를 높이기 위한 resorting 과정 후에, 농축과정, PCR 증폭을 통한 sorting된 scFv 변이체 유전자 확보 과정, subcloning 과정, transformation 과정을 거치고, 원하는 클론들을 증폭(enrich)하기 위해 다음 라운드의 sorting 과정을 수행하였다. 반복되는 여러 round의 탐색 과정으로 SMO CRD 영역에 결합력이 향상된 scFv 변이체 클론들을 확보하였다(도 9, FACS data). 이에 대한 CDR 및 FR 서열은 표 1 및 2와 같다.

표 1

[0163]

발굴된 항체들의 CDR 서열

항체	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
#40	GFAIGDNA (서열번호 1)	IRSNSYGGTA (서열번호 2)	ARRAHYYGGSTYNPSWYFDL (서열번호 3)	QDISRR (서열번호 4)	GAS (서열번호 5)	QQGYSSPRT (서열번호 6)
#40-4	#40과 동일	#40과 동일	ARRAHYLGSTYNPSWYFDL(서열 번호 7)	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일
#40-16	#40과 동일	#40과 동일	ARRAHYYGGSNYNPSWYFDL(서열 번호 8)	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일
#40-22	#40과 동일	#40과 동일	ARRAHYYGGSTYNPSWYVDL(서열 번호 9)	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일

#47	#40과 동일	#40과 동일	ARRAHYYDGSTYNPSWYFDL(서열번호 10)	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일
#47-7	#40과 동일	#40과 동일	ARRAHYGGSTYNPSWYFDL(서열번호 11)	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일
#47-14	#40과 동일	#40과 동일	ARRAHYYGGSTFNPSWYFDL(서열번호 12)	#40과 동일	#40과 동일	QQGYSPRPT(서열번호 13)
#42	GYTFASYD(서열번호 14)	INPAGGST(서열번호 15)	ARTPSQTYELDY(서열번호 16)	QGIRND(서열번호 17)	AAS(서열번호 18)	LQSFSTPYT(서열번호 19)

표 2

발굴된 항체들의 FR 서열

항체	FRH1	FRH2	FRH3	FRH4	FRL1	FRL2	FRL3	FRL4
#40	QVQLVQSGGKVQ PGSSRLRSCEAS (서열번호 20)	LNWVRQAPG KGLEWVG (서열번호 21)	EYAASVKGRFTISRDES KNIAYLEMNSLRAEDTA VYYC (서열번호 22)	WGRGTPVTSS (서열번호 23)	EIVLTQSPSFLSA SVGDRVTITCRAS (서열번호 24)	LAWYQRKPG KAPKLLIY (서열번호 25)	NLASGVPSRFTGSGSG TEFTLTISLQSD DFATYYC (서열번호 26)	FGQGTKV DIKR (서열번호 27)
#40-4	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일
#40-16	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일
#40-22	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일	#40과 동일
#47	#40과 동일	#40과 동일	EYAASVKGRFTISKDES KNIAYLEMNSLRAEDTA VYYC (서열번호 28)	WGRGTLV TVSS (서열번호 29)	#40과 동일	LAWYQQKPG KAPKLLIY (서열번호 30)	NLASGVPSRFTGSGSG TEFTLTISLQPD DFATYYC (서열번호 31)	#40과 동일
#47-7	#40과 동일	#40과 동일	#47과 동일	#47과 동일	#40과 동일	#47과 동일	#47과 동일	#40과 동일
#47-14	#40과 동일	#40과 동일	#47과 동일	#47과 동일	#40과 동일	#47과 동일	#47과 동일	#40과 동일
#42	QVRLVQSGAEV KKPGASVKVSC RAS (서열번호 32)	IHWVRQAPGQGP EWGM (서열번호 33)	LYAEGFEGRLTMTDRS MSTAYMELSSLRSED TA VYYC (서열번호 34)	WGQGT LV TVSS (서열번호 35)	ETTLTQSPSSLSA SVGDRVTITCRAS (서열번호 36)	LAWYQQKPG KAPKLLIY (서열번호 37)	TLESGVPPRFSGSGSE TDFTLTLIRLPDDFA TYYC (서열번호 38)	FGQGTQL TVLG (서열번호 39)

<실시예 10> 유세포 분석기를 이용한 결합력이 증가한 항체 변이체들의 SMO CRD 영역에 대한 결합력 분석

scFv 항체 변이체들의 SMO CRD 영역에 대한 결합력이 증가했는지 확인하기 위해 유세포 분석기를 이용한 결합력 분석을 진행하였다. 이를 위하여 앞서 사용된 방식으로 각각의 변이체와 대조군을 spheroplast들로 제조하였다. 준비된 spheroplast들에 스크리닝에 이용된 SMO CRD-GST-Alexa488 항원을 100 nM의 농도로 결합시키고 상온에서 1시간 동안 incubation하였다. Non-specific한 결합을 제거하기 위해 PBS로 두 차례 세척한 후 유세포 분석기를 이용하여 SMO CRD 영역에 대한 결합력을 분석하였다. 분석 결과, #47 항체로부터 도출된 1종의 scFv 변이체가 (도 10)에서 모항체인 #47에 비해 월등히 증가된 형광 신호를 나타내었음을 확인하였다.

[0169]

<실시예 11> 1종의 scFv 변이체의 항체 생산 및 정제

[0170]

선별된 1종의 scFv 항체 변이체를 IgG 형태로도 SMO와의 결합력이 증가하였는지 확인하기 위하여 scFv의 heavy chain, light chain 발현 벡터를 각각 제작하였다. 그 후 Expi293F 동물세포에 transfection하였다. Transfection 하루 전날 Expi293F cell을 2×10^6 cells/ml의 density로 계대배양하고, 다음날 Polyethylenimine (PEI, Polyscience, 23966)을 이용하여 transfection하였다. Freestyle 293 expression 배양액 (Gibco, 12338-018) 100 ml에 변이체들의 중쇄유전자와 경쇄유전자를 1:1의 비율로 먼저 섞고, 다음으로 PEI:변이체 유전자 = 4:1 비율로 섞어 상온에서 20 분간 두었다가 전날 계대배양해 놓은 cells에 섞고 shaking CO₂ incubator에서 37°C, 125 rpm, 8% CO₂ 조건으로 7일간 배양한 후 원심 분리하여 상등액만 취하였다. 그 후 25x PBS를 이용해 equilibrium을 맞추었다. Bottle top filter를 이용해 0.2 µm filter (Merck Millipore)로 여과하였다. 여과된 배양액을 Protein A resin 500 µl을 넣고 4°C에서 16 시간 교반 한 후 column을 통해 흘려주어 resin을 회수한 후 5 ml PBS로 wash 후 3 ml 100 mM glycine pH 2.7 buffer로 elution 받은 후 1M Tris-HCl pH 8.0을 이용하여 중화시켰다. buffer를 바꾸기 위하여 centrifugal filter units 3K (Merck Millipore)을 사용하여 PBS로 buffer change 진행 후 SDS-PAGE를 통해 정제된 1종의 항체의 크기와 순도를 분석하였다 (도 11).

[0172]

<실시예 12> 결합력이 증가한 항체들의 SMO에 대한 결합력 분석

[0173]

단백질 상에서 SMO에 대한 항체의 결합력이 증가하였는지 측정해 보기 위하여 ELISA 실험을 진행하였다. 0.05 M Na₂CO₃ pH 9.6에 4 µg/ml로 GST tag를 fusion한 dimeric 형태의 SMO CRD를 50 µl씩 Flat Bottom Polystyrene High Bind 96 well microplate (Costar)에 4°C, 16 시간 동안 고정화 한 후 100 µl의 4% skim milk (GenomicBase) (in 0.05% PBST pH 6.0/pH 7.4)로 상온에서 2 시간 동안 blocking 하였다. 0.05% PBST 180 µl로 4 회씩 wash를 진행한 뒤 1% skim milk (in 0.05% PBST)으로 serially dilution 된 #47-7 항체와 대조군인 #40, #47, Trastuzumab을 50 µl 각 well에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. Wash 과정 후 anti-Human HRP conjugate (Jackson ImmunoResearch) 50 µl씩을 이용해 상온에서 1 시간 동안 항체 반응을 진행하고 wash 과정을 수행하였다. 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution(Thermo Fisher Scientific) 50 µl씩 첨가해 발색 한 뒤 2 M H₂SO₄ 50 µl씩 넣어주어 반응을 종료시킨 다음 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해 분석하였다 (도 12).

[0175]

<실시예 13> HCT 116 대장암 세포주에서 결합력이 향상된 완전인간 SMO 항체 결합 확인

[0176]

대장암 세포주인 HCT116에서 SMO 결합 항체들의 결합력을 확인하기 위해 유세포 분석기를 이용한 결합력 분석을 진행하였다. 준비된 HCT116 세포에 BSA blocking 30분 후 SMO 결합 항체 10 µg의 농도로 결합시키고 상온에서 1시간 동안 incubation 하였다. 1시간 후 PBS로 세척한 후 Alexa 594 2차 항체 2 µl 씩 반응시켜 상온에서 1시간 동안 incubation 하였다. 1시간 후 Non-specific한 결합을 제거하기 위해 PBS로 washing 후 유세포 분석기를 이용하여 SMO 결합 항체들의 결합력을 분석하였다. 분석 결과, 결합력이 향상된 #47-7이 #47보다 HCT116 세포 SMO에 대해 결합력이 증가됨을 확인하였다 (도 13).

[0178]

<실시예 14> SMO 수용체 결합 항체에 의한 SHH에 의해 활성화된 헤지호그 신호전달 억제능 확인

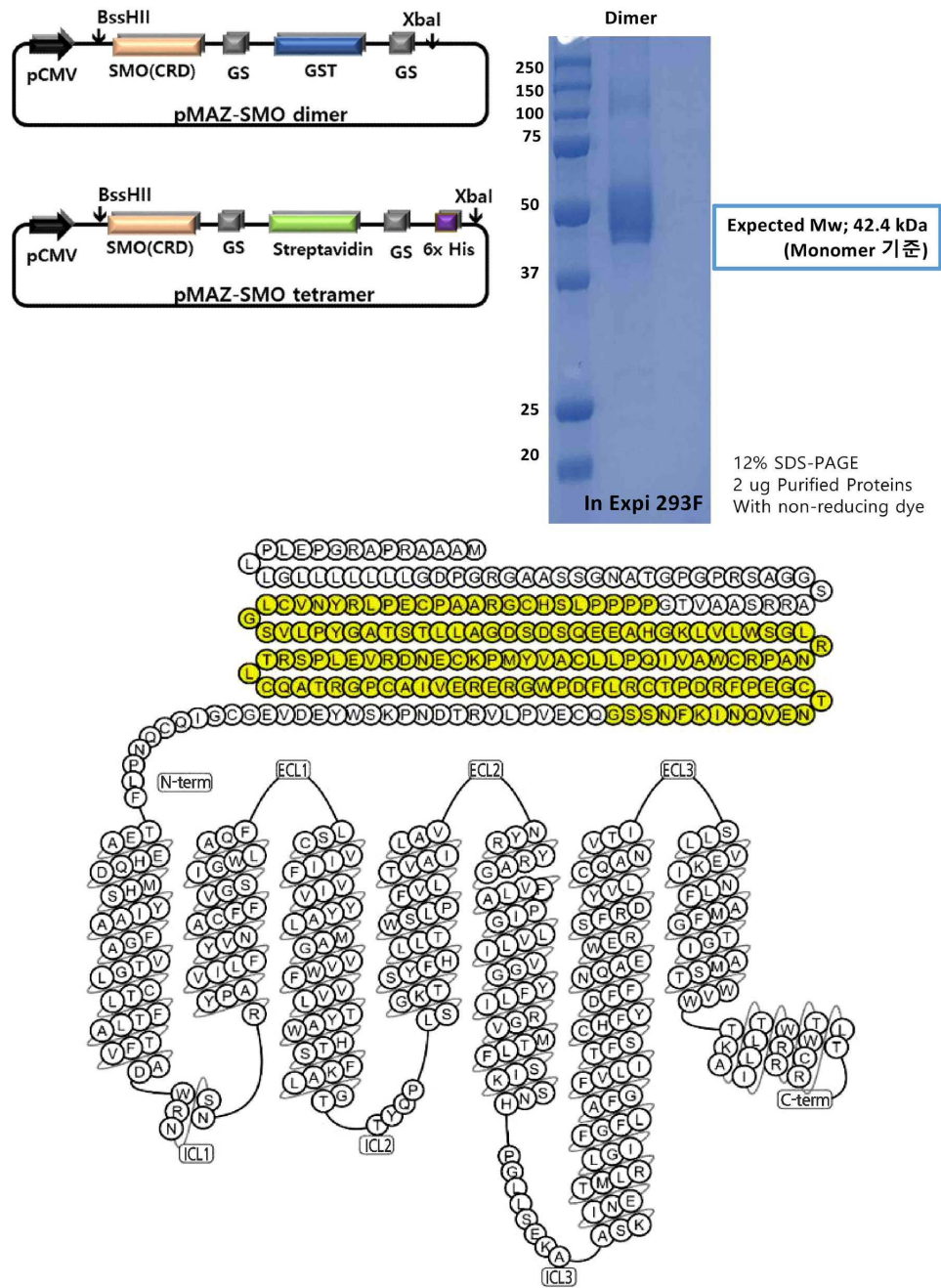
[0179]

본 발명의 항체들이 헤지호그 신호 전달의 억제 여부를 확인하기 위해 아래와 같이 실험을 수행하였다. 헤지호그 신호전달은 헤지호그 리간드에 의해 PTCH, SMO 수용체로 신호가 전달되며 최종 단계 전사인자인 GLI 단백질이 다양한 유전자 발현을 조절한다. 이런 신호전달을 확인하기 위해 GLI 단백질 결합 부위에 luciferase가 결합된 reporter plasmid를 포함하는 NIH3T3 세포에서 cell based assay를 수행하였다. NIH3T3 GLI 세포주를 96 well plate에 well 당 2.5×10^4 세포수로 깔아주고 다음날 SMO 결합 항체를 최고농도 100 ng/mL에서 1/10 로 희석하여 처리해 준다. 항체 처리 1시간 후 SHH 리간드 100 ng/mL로 처리해 준다. 항체 처리 24시간 후 promega kit를 이용하여 luciferase activity를 측정하였다. 측정 결과, 4종의 scFv 변이체들의 GLI 전사활성 억제능을 확인하였다 (도 14).

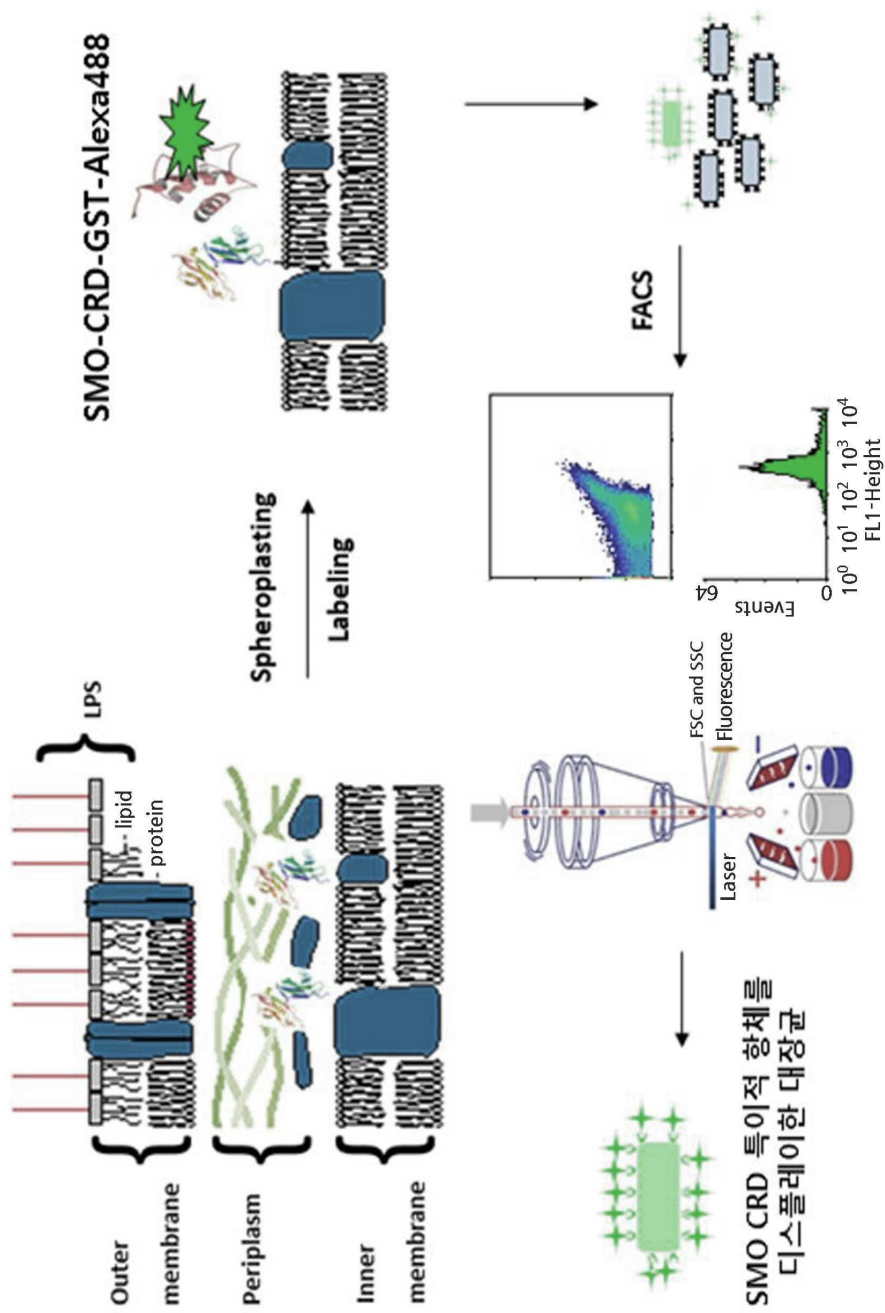
- [0181] <실시예 15> SMO 수용체 결합 항체에 의한 hydroxysterol 20 (s)에 의해 활성화된 헤지호그 신호전달 억제능 확인
- [0182] NIH3T3 GLI 세포주를 이용하여 SMO 결합 항체에 의한 GLI 전사활성 억제능을 확인하였다. NIH3T3 GLI 세포주를 96 well plate에 well 당 2.5×10^4 세포수로 깔아주고 다음날 SMO 결합 항체를 최고농도 10000 ng/mL에서 1/5로 희석하여 처리해 준다. 항체 처리 1시간 후 Hydroxycholesterol 20 (s) 10 μ M로 처리해 준다. 항체 처리 24시간 후 promega kit를 이용하여 luciferase activity를 측정하였다. 측정 결과, 4종의 scFv 변이체들의 GLI 전사활성 억제능을 확인하였다 (도 15).
- [0184] <실시예 16> SKOV3 암세포주에서 SMO 항체 (#40, #42, #47, #47-7)에 의해 암세포 이동성 억제능 확인
- [0185] SKOV3 암세포주를 이용하여 SMO 항체에 의한 암세포 이동성 억제능을 확인하였다. SKOV3 (5×10^4) 세포주를 항체 농도 10 μ g/mL로 30분 처리한 뒤 transwell upper chamber에 깔아준다. lower chamber에는 ligand인 SHH peptide를 100 ng/mL로 처리한다. 48시간 후 Diff quick를 이용하여 transwell을 염색한다. 염색 결과, 대부분 항체가 20-30% 암세포 이동성을 억제하였고, 그 중에 결합력이 향상된 #47-7에서 37%로 가장 좋은 암세포 이동성 억제능을 확인하였다(도 16).
- [0187] 이상, 본 발명의 실시예들에 대하여 설명하였으나, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서, 구성 요소의 부가, 변경, 삭제 또는 추가 등에 의해 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있을 것이며, 이 또한 본 발명의 권리범위 내에 포함된다고 할 것이다.

도면

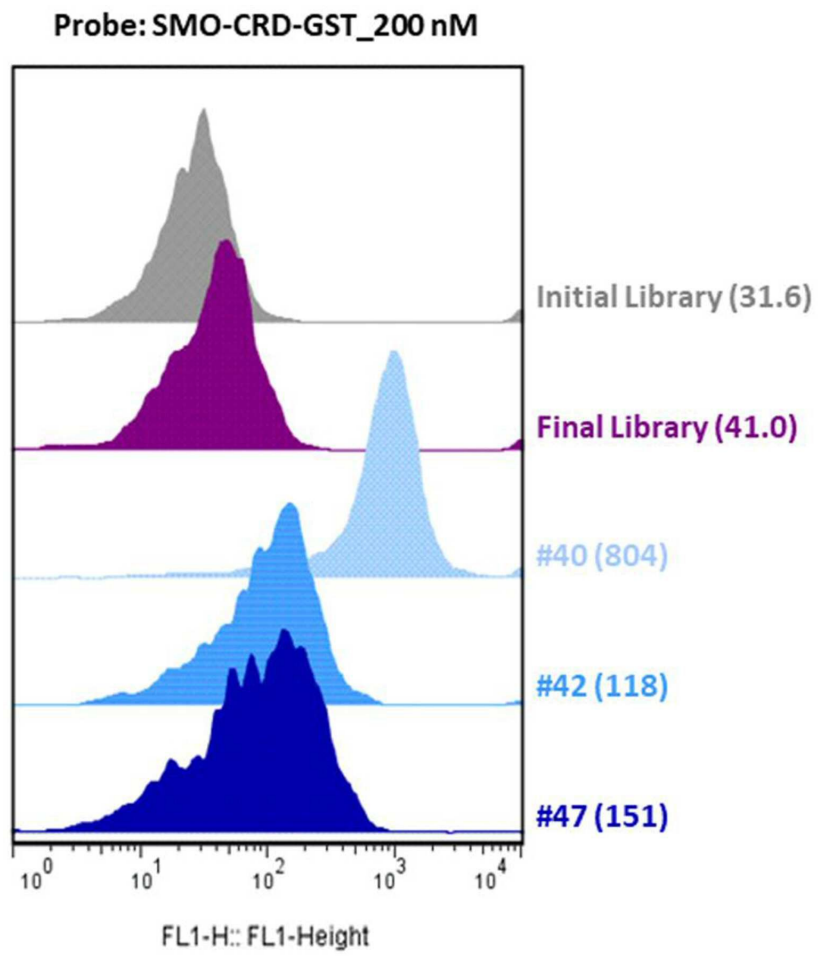
도면1



도면2



도면3

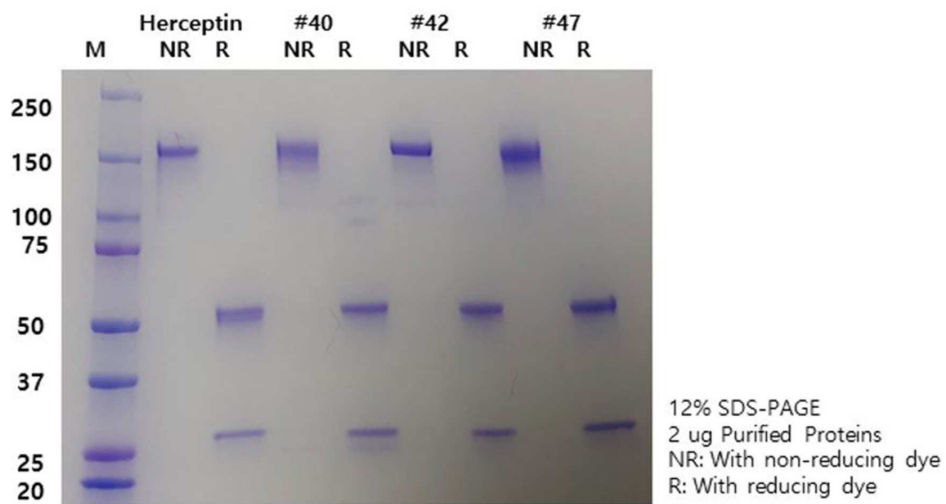
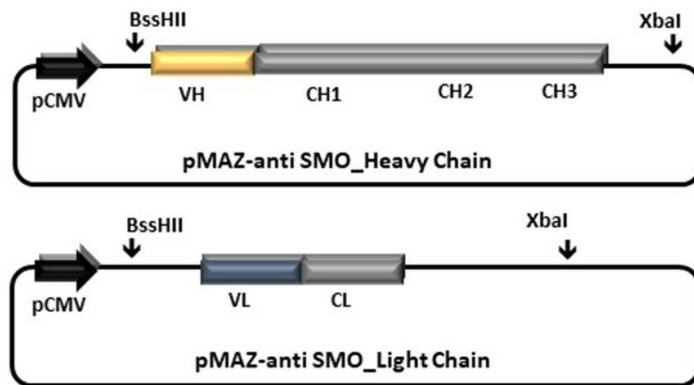


도면4

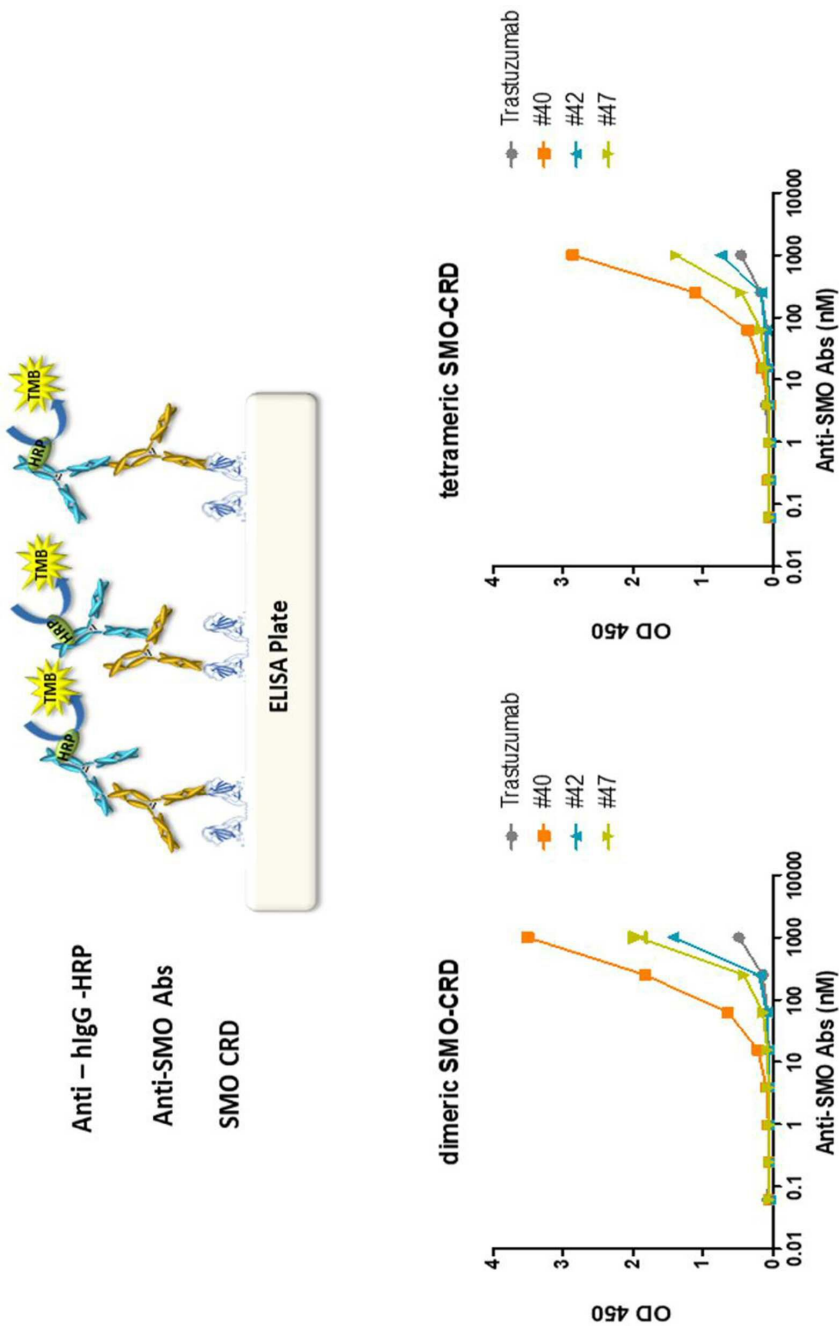
	FR1	CDRH1	FR2	CDRH2	FR3	CDRH3	FR4					
	10	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
#40	QVQLVSGG	VYVFGSSRLSCEAS~GFAICD	NA~LHWRAFGKGL	EWVGY~IRNSISYGGTA~EY	AAVKRFTISRDESKNIAY	LENSIRAE	DTAVIYC~ARRAHYD	GGSTYNESWYFDL~WGRGTIVTSS~				
#47	QVQLVSGG	VYVFGSSRLSCEAS~GFAICD	NA~LHWRAFGKGL	EWVGY~IRNSISYGGTA~EY	AAVKRFTISRDESKNIAY	LENSIRAE	DTAVIYC~ARRAHYD	GGSTYNESWYFDL~WGRGTIVTSS~				
#42	QVRLVSGAEV	KPGASVKVSCRAS~GYTFAS	YD~IHWRAFGKGL	EWVGM~INPAGGST~LV	AEQFGR	LTMTRDRSMSTAN	ELSSIRSEDTAVIYC~ARTPSQ	TVELDY~WGQGLIVTSS~				

	FR1	CDRL1	FR2	CDRL2	FR3	CDRL3	FR4				
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
#40	EIVLTQSP	PSLSASVCDRVITTCRAS~QDISRR~LAWYQKPK	AKPILIIY~GAS~NLASGV	PRFTGSGSGTEFTIT	SSIQDD	FATIYC~QQCYSSPRT~EQG	KVDIKR~				
#47	EIVLTQSP	PSLSASVCDRVITTCRAS~QDISRR~LAWYQKPK	AKPILIIY~GAS~NLASGV	PRFTGSGSGTEFTIT	SSIQDD	FATIYC~QQCYSSPRT~EQG	KVDIKR~				
#42	EIVLTQSP	PSLSASVCDRVITTCRAS~QDISRR~LAWYQKPK	AKPILIIY~GAS~NLASGV	PRFTGSGSGTEFTIT	SSIQDD	FATIYC~QQCYSSPRT~EQG	KVDIKR~				

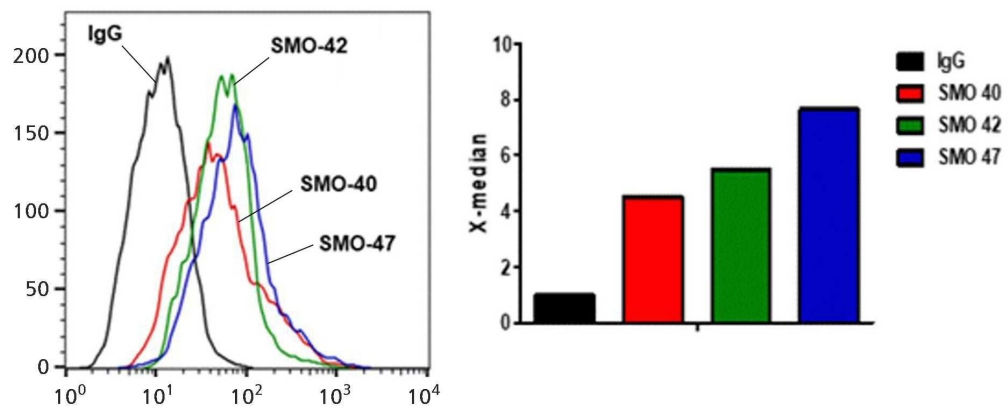
도면5



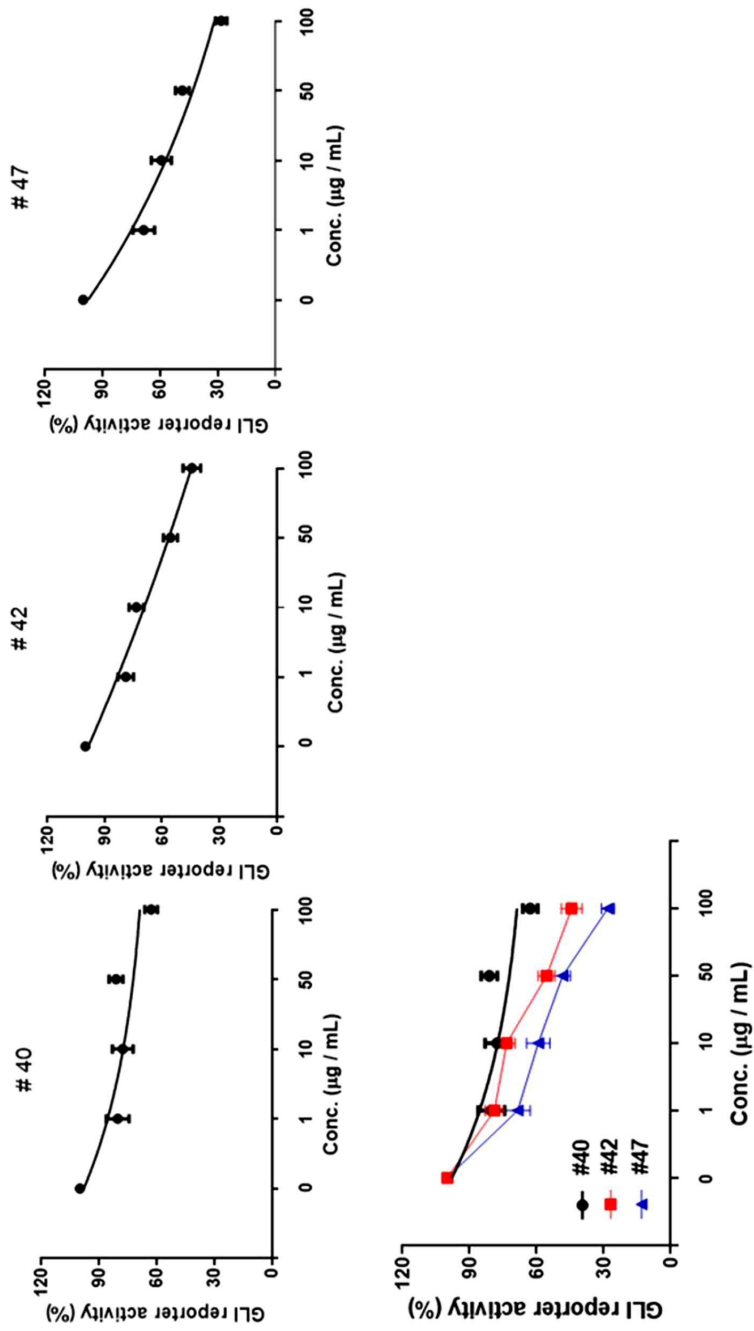
도면6



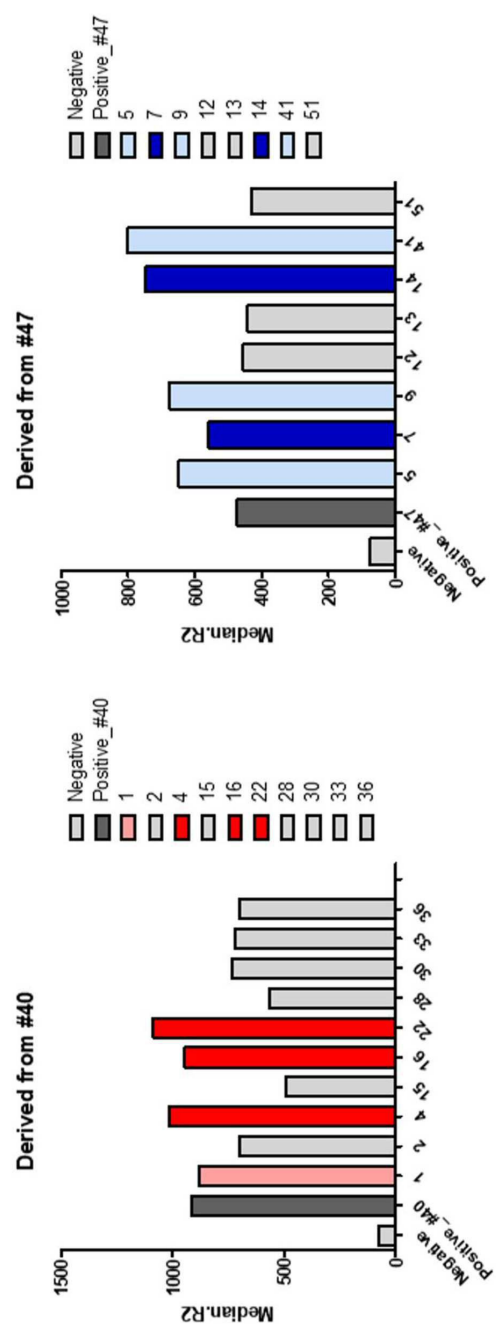
도면7



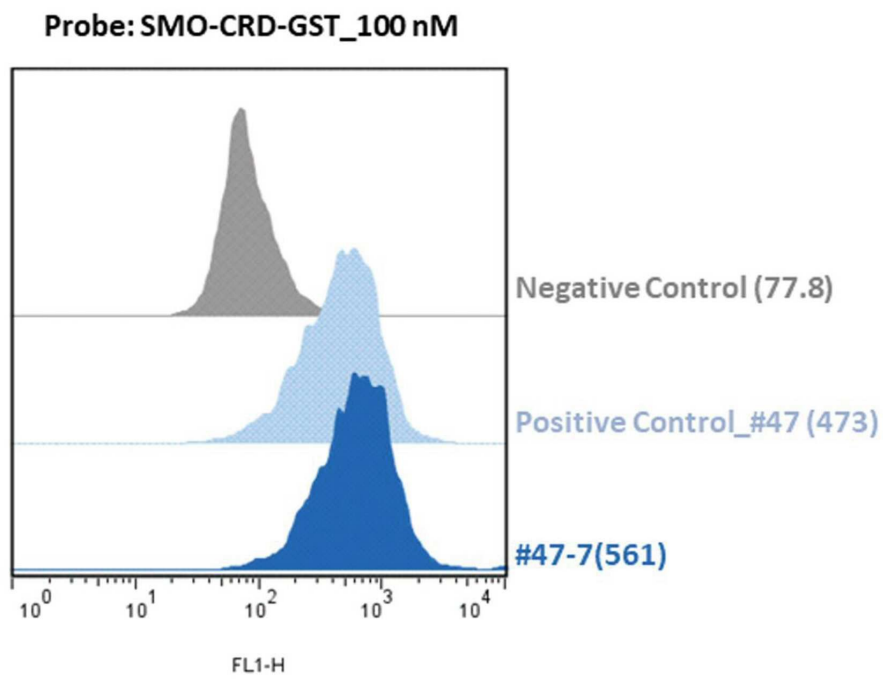
도면8



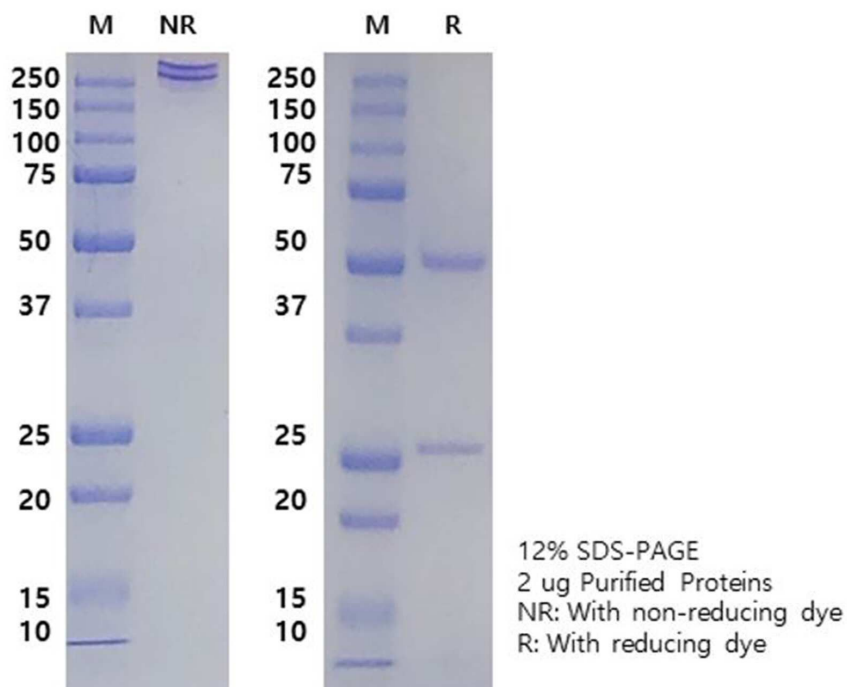
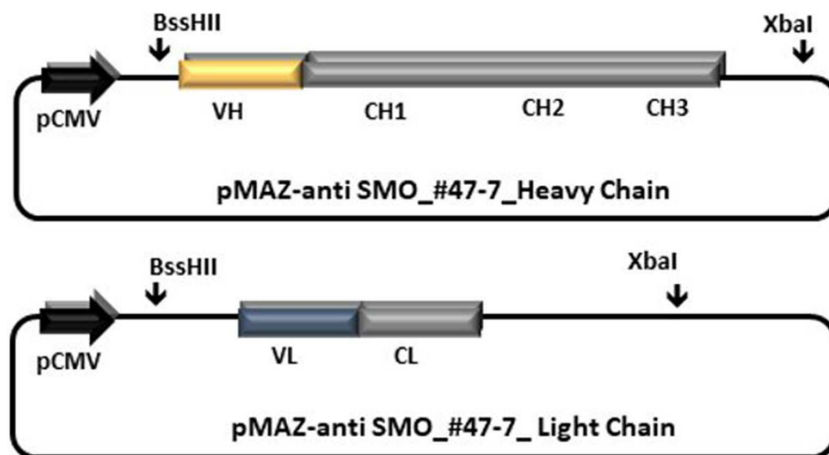
도면9



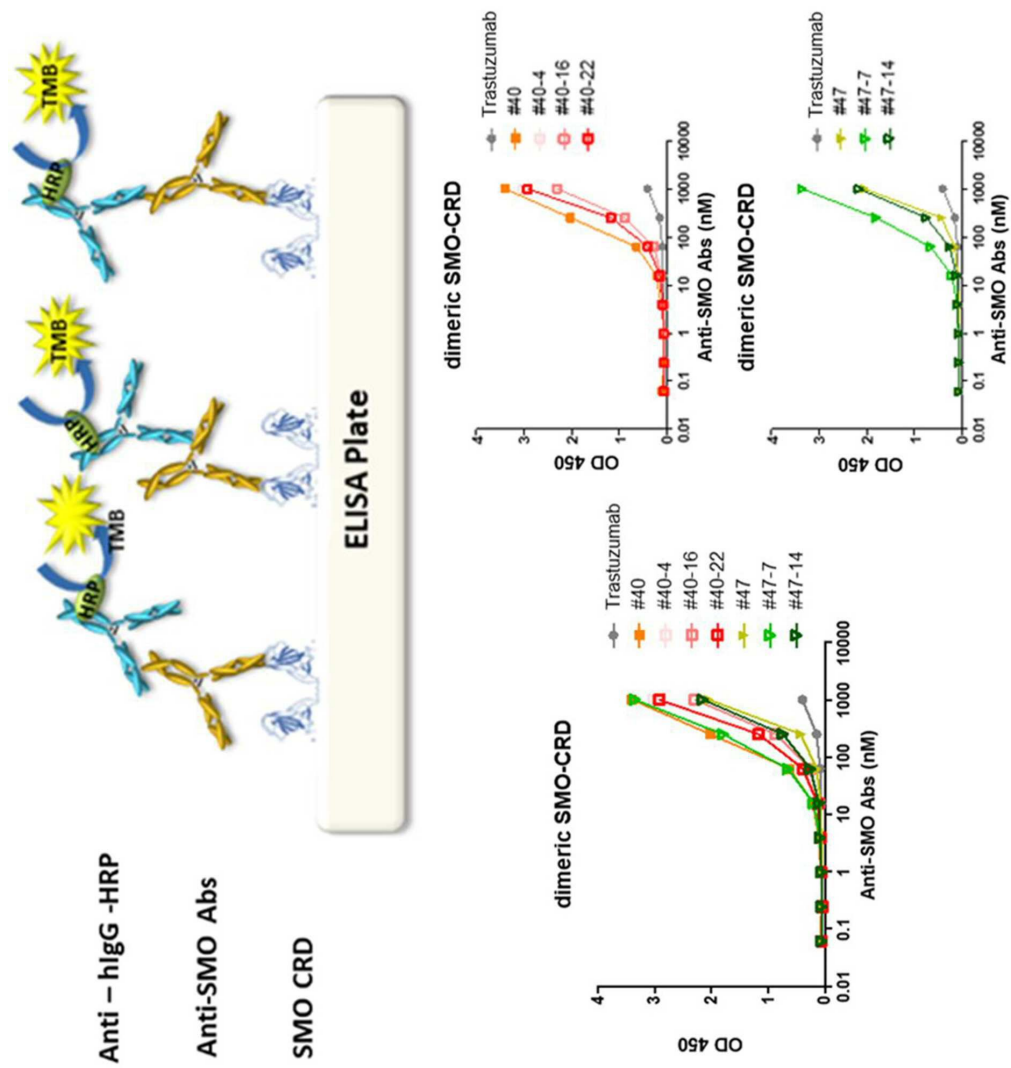
도면10



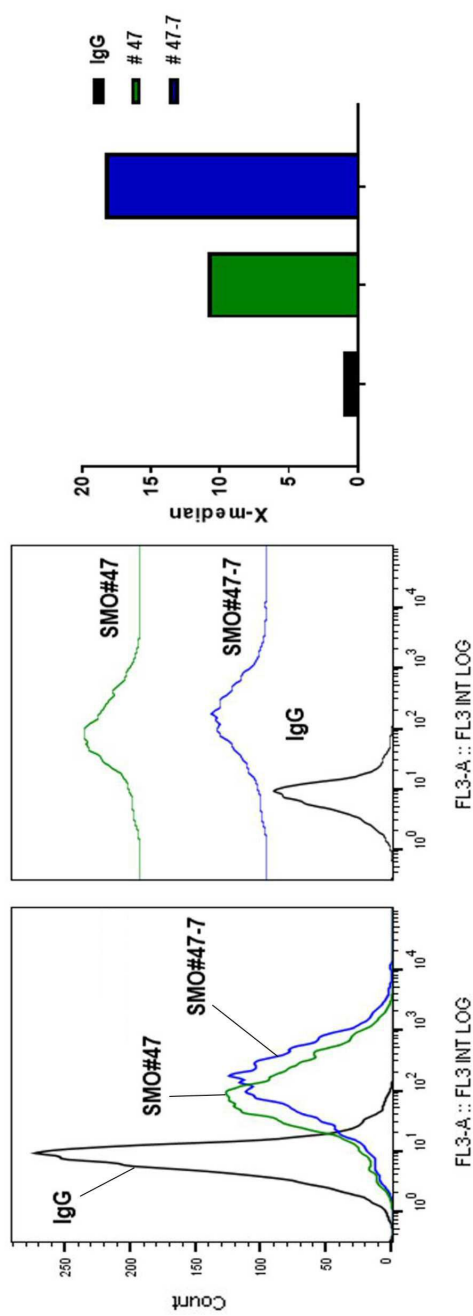
도면11



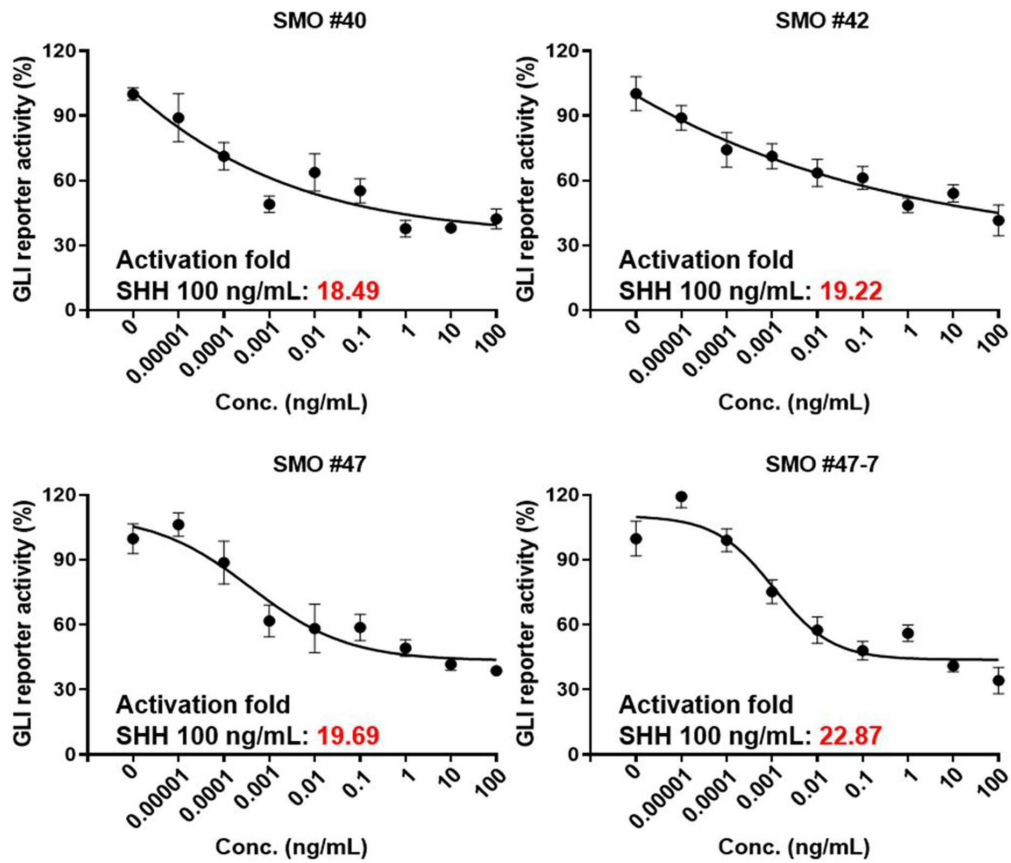
도면12



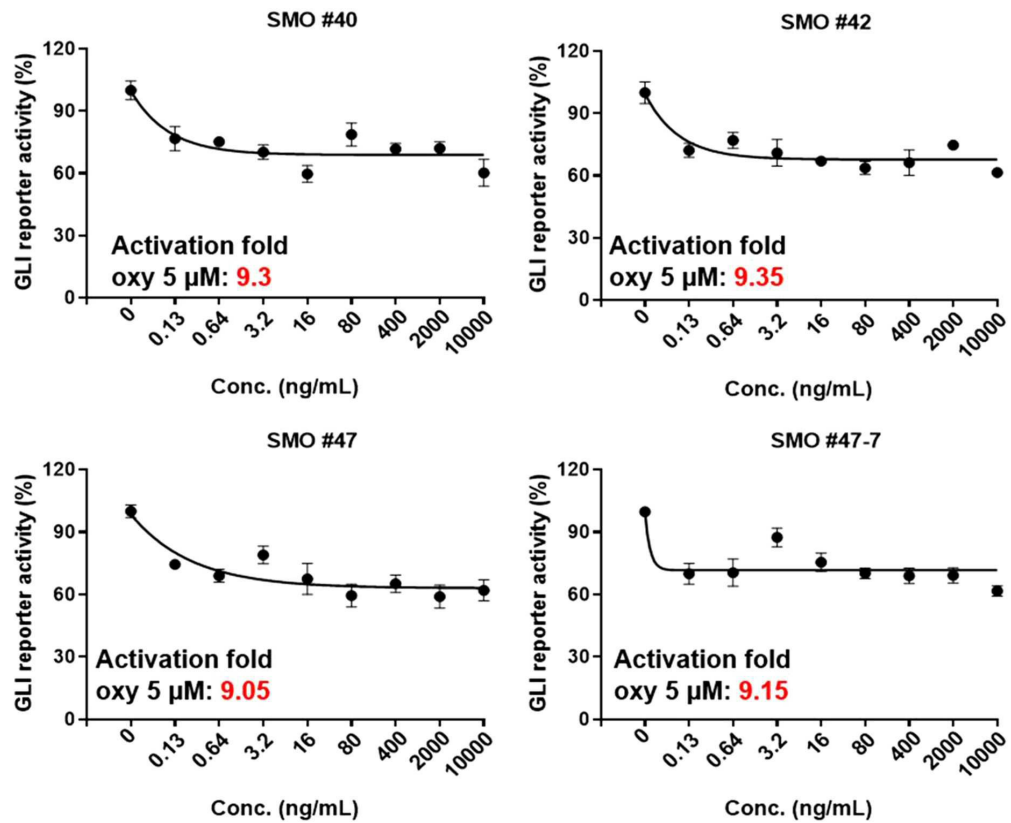
도면13



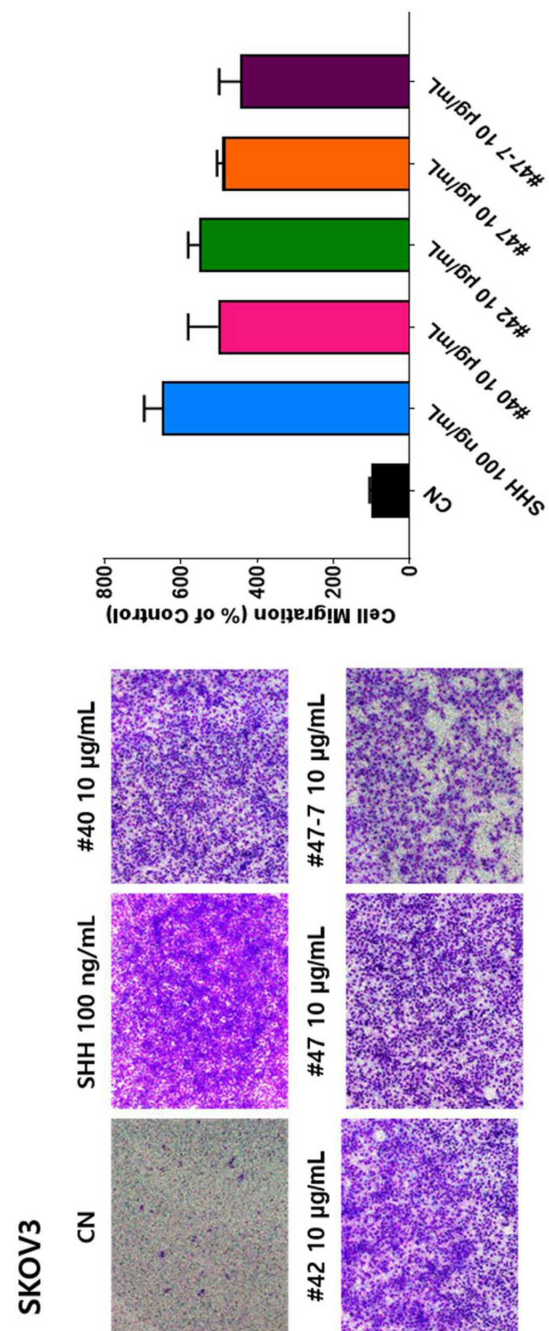
도면14



도면15



도면16



서열 목록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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