

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2012년 10월 11일 (11.10.2012)



(10) 국제공개번호  
WO 2012/138100 A2

- (51) 국제특허분류:  
A61K 39/395 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/002492
- (22) 국제출원일: 2012년 4월 3일 (03.04.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2011-0030871 2011년 4월 4일 (04.04.2011) KR  
10-2012-0001452 2012년 1월 5일 (05.01.2012) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국  
생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE  
OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY)  
[KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806  
Daejeon (KR). (주)에이앤알제라퓨틱스 (ANTIBODY  
AND RECEPTOR THERAPEUTICS CO., LTD.)  
[KR/KR]; 대전광역시 유성구 테크노 1로 11-3 배재대  
학교대덕산학협력관 N306호, 305-509 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 박영우 (PARK, Young  
Woo) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지,  
305-806 Daejeon (KR). 조기원 (JO, Ki Won) [KR/KR];  
대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon

(KR). 이동희 (LEE, Dong Hee) [KR/KR]; 대전광역시  
유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 이은경  
(LEE, Eun Kyung) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은  
동 52번지, 305-806 Daejeon (KR). 장세일 (JANG, Se  
Il) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-  
806 Daejeon (KR). 박찬웅 (PARK, Chan Woong)  
[KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806  
Daejeon (KR). 김동진 (KIM, Dong Jin) [KR/KR]; 대전  
광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806 Daejeon (KR).  
김혜난 (KIM, Hye Nan) [KR/KR]; 대전광역시 유성구  
테크노 1로 11-3 배재대학교대덕산학협력관 N316호,  
305-509 Daejeon (KR). 박윤정 (PARK, Yun Jung)  
[KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번지, 305-806  
Daejeon (KR). 박재은 (PARK, Jae Eun) [KR/KR]; 대전  
광역시 유성구 테크노 1로 11-3 배재대학교대덕산학  
협력관 N316호, 305-509 Daejeon (KR). 박지현 (PARK,  
Ji Hyung) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 어은동 52번  
지, 305-806 Daejeon (KR). 유석호 (YOO, Seok Ho)  
[KR/KR]; 대전광역시 서구 둔산 2동 은하수아파트  
104-510, 302-733 Daejeon (KR). 장명희 (JANG, My-  
eong Hee) [KR/KR]; 대전광역시 대덕구 중리동 239-5  
401호, 306-826 Daejeon (KR).

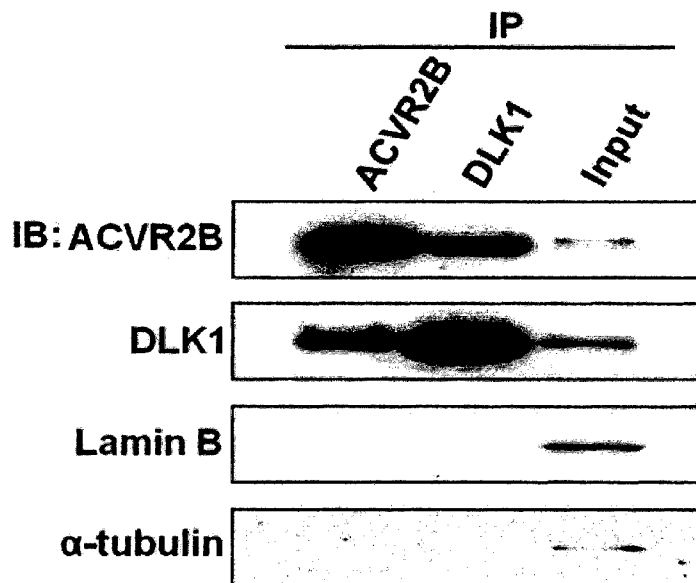
(74) 대리인: 특허법인 이룸 (ERUUM PATENT LAW  
FIRM); 서울특별시 강남구 대치동 1005-8 보성빌딩 5  
층, 135-851 Seoul (KR).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ACTIVIN RECEPTOR TYPE II B INHIBITORS COMPRISING DLK1 EXTRACELLULAR WATER-SOLUBLE DO-  
MAIN

(54) 발명의 명칭: DLK1 세포 외 수용성 도메인을 포함하는 액티빈 수용체 타입 2B 억제제

[Fig 9]



(57) Abstract: The present invention relates to an  
activin receptor type II B (ACVR2B) inhibitor  
which comprises the delta-like 1 homolog (DLK1)  
extracellular water-soluble domain. More specific-  
ally, the present invention relates to an extracellular  
soluble domain of DLK1; fragments of the extracel-  
lular soluble domain of DLK1; mutants of the extra-  
cellular soluble domain of DLK1; a composition for  
suppressing ligand linkage with the ACVR2B re-  
ceptor, which includes a fragment of the mutants as  
an active ingredient; and a pharmaceutical composi-  
tion for prevention and treatment of diseases which  
comprises the same. The composition of the present  
invention competitively binds to the ACVR2B re-  
ceptor and inhibits the binding of an ACVR2B lig-  
and to the ACVR2B receptor, which inhibits protein  
signalling associated with such ligands, and will be  
useful for prevention and treatment of diseases asso-  
ciated therewith.

(57) 요약서: 본 발명은 DLK1(delta-like 1 homo-  
log)의 세포 외 영역 수용성 도메인을 포함하는  
액티빈 수용체 타입 2B 억제제에 관한 것이다.  
보다 구체적으로 본 발명은, DLK1의 세포 외  
수용성 도메인, DLK1의 세포 외 수용성 도메인  
의

[다음 쪽 계속]



- (81) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,

KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**공개:**

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

단편, DLK1의 세포 외 수용성 도메인의 변이체(mutant) 또는 상기 변이체의 단편을 유효성분으로 포함하는, 액티빈 수용체 타입 2B(activin receptor type II B, ACVR2B)와 ACVR2B를 수용체로 가지는 리간드의 결합 억제용 조성물 및 이를 포함하는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 등에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 액티빈 수용체 타입 2B에 결합하는 리간드들과 액티빈 수용체 타입 2B에 경쟁적으로 결합함으로써, 리간드가 상기 수용체에 결합하는 것을 억제하며, 리간드들과 관련된 단백질 신호전달을 억제하는바, 관련 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

## 명세서

### 발명의 명칭: D L K 1 세포 외 수용성 도메인을 포함하는 액티빈 수용체 타입 2B 억제제

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 DLK1(delta-like 1 homolog)의 세포 외 영역 수용성 도메인을 포함하는 액티빈 수용체 타입 2B 억제제에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은, DLK1의 세포 외 수용성 도메인, DLK1의 세포 외 수용성 도메인의 단편, DLK1의 세포 외 수용성 도메인의 변이체(mutant) 또는 상기 변이체의 단편을 유효성분으로 포함하는, 액티빈 수용체 타입 2B(activin receptor type II B, ACVR2B)와 ACVR2B를 수용체로 가지는 리간드의 결합 억제용 조성물 및 이를 포함하는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 등에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 암이란 "제어되지 않는 세포성장"으로 특징지어지며, 이러한 비정상적인 세포 성장에 의해 종양(tumor)이라고 불리는 세포 덩어리가 형성되어 주위의 조직으로 침투하고, 심한 경우에는 신체의 다른 기관으로 전이되기도 한다. 이러한 암은 수술, 방사선 및 화학요법으로 치료를 하더라도 많은 경우에 근본적인 치유가 되지 못하고 환자에게 고통을 주며 궁극적으로는 죽음에 이르게 하는 난치성 만성질환이다.
- [3] 전 세계적으로 암으로 고통받는 환자는 2000만 명이 넘으며, 매년 600만 명이상이 암으로 사망하고 있고, 2020년경에는 1,100만 명이 암으로 사망할 것으로 예측되므로 암은 시급히 그 치료법을 찾아내어야 할 중요 질환이다. 암은 나라마다 차이는 있지만, 선진국이나 우리나라의 경우 전체 사망원인의 20% 이상을 차지하고 있다. 암은 혈액암과 고형암으로 크게 분류되며, 폐암, 위암, 유방암, 구강암, 간암, 자궁암, 식도암, 피부암 등 신체의 거의 모든 부위에서 발생한다. 이들 악성종양을 치료하기 위해 사용하는 방법들 중 수술이나 방사선 요법을 제외한 화학요법제를 총칭하여 항암제라고 하며, 주로 핵산의 합성을 저해하여 항암활성을 나타내는 물질이 대부분이다.
- [4] 한편, 노취/델타/서레이트계(notch/delta/serrate family)에 속하는 DLK1(delta-like 1 homolog)은 염색체 14q32에 위치하는 dlk1 유전자에 암호화되어 있는 막통과(transmembrane) 당단백질로 383개의 아미노산으로 구성되어 있다. 상기 단백질은 280개의 세포 외 지역과 24개의 막 통과 지역, 56개의 세포 내 지역으로 나뉘며, 이중 세포막 바깥 부분에 6개의 상피세포 성장 인자 유사 반복(epidermal growth factor like repeat) 도메인을 가지고 있으며, 3개의 N-당화(glycosylation)와 7개의 O-당화 위치를 가지고 있다. DLK1은 막단백질이기도 하지만, 종양괴사인자 알파 전환 효소(Tumor necrosis factor alpha converting enzyme; TACE)에 의해 세포막 바깥 부분이 세포막에서 떨어져 나와(shedding), 따로

기능을 가지기도 하는 단백질로 잘 알려져 있다.

- [5] DLK1과 암과의 관련성에 대한 연구로는 뇌암세포(glioma)에서 DLK1의 발현이 과발현되어 있으며, DLK1의 cDNA를 뇌암세포에 과발현시키면 뇌암세포의 증식(proliferation)이 증가하여 전이(migration)가 증가한다는 보고가 있었으며(Yin D et al., *Oncogene*, 25: 1852-1861, 2006), 간암에서 DLK1의 발현이 정상 간세포에 비해 올라가 있으며, siRNA 실험을 통하여 DLK1의 발현을 감소시켰을 때 종양의 크기가 감소한다는 보고가 있었다(Huang J et al., *Carcinogenesis*, 28(5): 1094-1103, 2007).
- [6] 또한, 본 발명자들은 대한민국등록특허 제10-0982170호에서 DLK1의 세포 외 영역 수용성 도메인 및 상기 도메인과 IgG 항체의 Fc 도메인이 접합된 DLK1-Fc 융합 단백질이 항암효과를 나타낼 수 있음을 최초로 규명한바 있다. 그러나, 상기 DLK1의 세포 외 영역 수용성 도메인의 항암작용이 어떤 작용기전에 의한 것인지는 전혀 알려진 바가 없었다.
- [7]
- [8] 이에, 본 발명자들은 DLK1의 세포 외 영역 수용성 도메인의 항암작용 기전을 밝히기 위하여 예의 노력한 결과, DLK1의 세포 외 영역 수용성 도메인이 액티빈과 경쟁적으로 액티빈 수용체 타입 2B(Activin receptor type II B)에 결합하여 액티빈 신호전달을 차단함으로써 항암효과를 나타냄을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.
- [9] 또한, 상기 DLK1의 세포 외 영역 수용성 도메인에 특이적으로 결합하는 인간 항체가 암 세포의 전이를 억제할 수 있을 뿐만 아니라, DLK1의 세포 외 영역 수용성 도메인의 액티빈 수용체 타입 2B에 대한 결합력을 현저히 상승시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [10] 본 발명의 목적은 DLK1(delta-like 1 homolog)의 세포 외 수용성 도메인을 유효성분으로 포함하는, 액티빈 수용체 타입 2B(activin receptor type II B, ACVR2B)와 ACVR2B를 수용체로 가지는 리간드의 결합 억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 ACVR2B의 신호전달과 관련된 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 ACVR2B의 신호전달과 관련된 질환의 진단용 키트를 제공하는 것이다.

### 과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여, DLK1(delta-like 1 homolog)의 세포 외 수용성 도메인, DLK1의 세포 외 수용성 도메인의 단편, DLK1의 세포 외 수용성 도메인의 변이체(mutant) 또는 상기 변이체의 단편을 유효성분으로 포함하는,

- 액티빈 수용체 타입 2B(activin receptor type II B, ACVR2B)와 ACVR2B를 수용체로 가지는 리간드의 결합 억제용 조성물을 제공한다.
- [14] 본 발명에서 용어, "DLK1(delta-like 1 homolog)"은 염색체 14q32에 위치하는 dlk1 유전자에 암호화되어 있는 383개의 아미노산으로 구성되어 있는 막 통과 당단백질을 의미한다.
- [15] 본 발명에서 용어, "DLK1의 세포 외 영역 수용성 도메인"이란 세포 외 영역, 막 통과 영역 및 세포 내 영역으로 나뉘는 DLK1 단백질 중 세포 외 영역의 수용성 도메인을 의미하며, DLK1의 세포 외 영역 수용성 도메인의 항암효과는 본 발명자들에 의해서 최초로 규명된 바 있다.
- [16] 본 명세서에서 DLK1의 세포 외 영역 수용성 도메인은 수용성 DLK1과 혼용하여 표현할 수 있다.
- [17] 바람직하게, 본 발명의 수용성 DLK1은 수용성 DLK1 활성을 갖는 200 내지 300개의 아미노산으로 이루어질 수 있으며, 보다 바람직하게는 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 수용성 DLK1 활성을 나타내는 아미노산 서열은 제한 없이 포함될 수 있다.
- [18] 본 발명에서 용어, "액티빈"은 분자량이 약 25,000인 펩티드성 호르몬의 일종으로서, 인히빈 A의  $\beta$ 사슬의 호모2합체( $\beta\beta A$ )인 액티빈 A, 인히빈 B의  $\beta$ 사슬의 호모2합체( $\beta\beta B$ )인 액티빈 B, 이들의 헤테로2합체( $\beta A\beta B$ )인 액티빈 AB 등 3종류가 있다. 바람직하게, 상기 액티빈은 액티빈 A일 수 있다.
- [19] 본 발명에서 용어, "액티빈 수용체 타입 2B"는 ACVR2B 유전자에 의해 암호화되어 있는 단백질로서 액티빈 신호전달에 관계된다. 액티빈에 의한 신호전달은 암세포의 증식을 막고, 세포사멸을 통하여 종양 억제 인자(tumor suppressor)로서 작용 하지만, 그 반대로 암 유발 인자(pro-oncogenic factor)로 작용하는 경우도 많이 보고되고 있다.
- [20] 본 발명의 ACVR2B를 수용체로 가지는 리간드들로는 액티빈 (activin A, activin B and inhibin A) (Derynck, Zhang et al. 1998), GDF-8/myostatin (Lee and McPherron 2001), Nodal (Oh and Li 2002), BMP6 (Ebisawa, Tada et al. 1999), BMP7 (Yamashita, ten Dijke et al. 1995), GDF5 (Nishitoh, Ichijo et al. 1996), GDF11 (Oh, Yeo et al. 2002) 등이 알려져 있다. 이들 리간드가 ACVR2B에 결합하게 되면 type I 수용체인 ACVR1A 혹은 ACVR1B 등과 결합하여 복합체(complex)를 형성하게 되고, ACVR2B는 인산화되어 type I 수용체를 활성화시키게 된다. 활성화된 type I 수용체는 전사 조절자인 Smad를 활성화 시켜 세포신호 전달을 수행한다 (Derynck, Zhang et al. 1998).
- [21] 이들 리간드의 ACVR2B를 통한 신호 전달은 매우 다양한 기작을 수행하고 있으며 신호 전달의 조절이 잘못되면 특히 리간드의 과발현으로 신호전달의 과활성화가 일어나며, 이는 다양한 이상증을 나타내는 것이 보고되어 있다. 그 중 대표적인 것들은 다음과 같다.
- [22] 일반적으로 액티빈(activin)은 암세포의 증식을 세포사멸(apoptosis)을 통하여

막는 현상이 잘 알려져 있지만, 액티빈 신호 전달이 과활성화되면 암세포를 더욱 악성화 시켜 전이가 더욱 촉진되게 된다. 이는 TGF-beta에서 잘 알려져 있는 현상이다 (Tang et al., 2003). 그 대표적 예로서, 대장암 4기에서 액티빈 A의 과발현이 보고되어 있으며(Wildi et al., Gut 49:409-417, 2001), 액티빈 A의 과발현은 사람 자궁 내막 선암(endometrial adenocarcinoma)에서 암을 유발하는 것으로 알려져 있다(Tanaka et al., Oncol Rep 11:875-879, 2004). 또한, 액티빈 A는 암세포에서 N-캐드헤린(N-cadherin)의 과발현을 유도하고, 이는 암을 악성(aggressive)으로 바꾸어 암의 예후를 나쁘게 하는 것으로 알려져 있다(Yoshinaga et al., Clin Cancer Res, 10:5702-5707, 2004). 또한, ERBB2에 의해 유도된 암에서는 액티빈 신호전달은 선도 신호(leading edge)로 생각되고 있으며(Landis MD et al., Oncogene, 24: 5173-5190, 2005), 난소암 세포주에서의 액티빈 A에 의한 침윤증가 현상도 보고되어 있다(Steller MD et al., Mol Cancer Res, 3: 50-61, 2005).

- [23] 또한, 액티빈 A는 포도당 대사에 중요한 역할을 담당하고 있으며, 그 주요 기관인 간, 근육세포, 지방세포 등에 각각 다르게 역할을 수행하고 있다. 먼저 간세포에서 액티빈 A는 간세포 증식을 억제하고 (Yasuda et al., 1993, De Bleser et al 1997), 글리코겐의 분해를 촉진하고 글루코스신생합성(gluconeogenesis)을 촉진하여 혈중 글루코스 농도를 올리는 역할을 하는 것이 보고되어 있다 (Mine et al., 1989). 근육세포에서 액티빈 A의 과발현은 래트(rat)에서 근위축 (muscle atrophy)을 가져오며 (Gilson et al, 2009), 액티빈 A를 처리해 주면 근섬유(myotube)의 형성을 막는다고 알려져 있다 (Link and Nishi, 1997). 또한, 액티빈 A의 지방세포에서의 지방세포 분화 억제 기능은 매우 잘 알려져 있는 현상이다.
- [24] 또한, 액티빈 A는 Th2 세포 (Ogawa et al., 2006), B 세포 (Ogawa et al., 2008), 폐포 대식세포(alveolar macrophage) (Matsuse et al., 1995), 복막 대식세포(peritoneal macrophages) (Ogawa et al., 2000), 단핵구-유래 수지상 세포(monocyte-derived dendritic cells) (Robson et al., 2008), 말포 혈액 골수성 수지상 세포 (peripheral blood myeloid dendritic cells) (Robson et al., 2008), 비만 세포 (mast cells) (Funaba et al., 2003)에서 발현되며, 면역세포를 활성화 시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 액티빈 A를 막음으로써 자가 면역반응 및 염증 반응, 류마티즘 등의 면역 관련 질병 및 염증 유발에 의해 발생하는 섬유증(fibrosis) 등의 예방 및 치료가 가능하다.
- [25] 또한, 액티빈 A의 과발현은 생식 세포 암 발생 (gonadal tumor development), 악액질 (cachexia) 등을 나타내며, 이때 수반되는 증상으로 빈혈 (anemia), 체중감소 (weight loss), 소상 괴사 (focal necrosis), 간의 염증 유발 (inflammation of the liver), 및 위 위축 현상 (atrophy of the stomach) 등을 나타낸다 (Matzuk et al., 1994).
- [26] 그밖에 액티빈 A는 류머티즘 관절염 (rheumatoid arthritis), 뼈 관련 질병 (bone

disorders), 패혈증 (sepsis), 염증성 장 질환 (inflammatory bowel disease), 아테롬성 동맥 경화증 (atherosclerosis), 및 만성 심부전 (chronic heart failure) (Chen et al., 2002; Smith et al., 2004; Werner and Alzheimer, 2006; Yndestad et al., 2004) 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

- [27]     액티빈 A의 혈중농도는 만성 간염 (chronic viral hepatitis)와 알코올성 간경변 (alcohol-induced cirrhosis) 환자 (Patella et al., 2001; Yuen et al., 2002) 및 급성 간부전 (acute liver failure) 환자 (Hughes and Evans, 2003), 간암 환자 (Deli et al., 2008) 에서 그 수치가 높게 나타나는 것이 보고되어 있다.
- [28]     지방간 환자 비알콜성 지방간 질환(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD), 비알콜성 지방간염 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)에서도 액티빈 A 혈중 농도가 증가 되어 있으며, 액티빈 A에 의한 지방간 발생이 보고되어 있다 (Yndestad et al., 2009). 또한 액티빈 A는 간섬유증 (hepatic fibrosis)을 일으키는 것도 보고되어 있다 (Yndestad et al., 2009).
- [29]     액티빈 수용체 타입 2B의 또 다른 리간드로 알려져 있는 BMP6와 관련하여, 알츠하이머 환자의 히포캄퍼스와 아밀로이드-베타(amyloid- $\beta$ , A $\beta$ ) 전구체 단백질 (precursor protein) 과발현 쥐(APP transgenic mouse)에서 BMP6 발현이 증가되어 있으며 (Leslie Crews et al., 2010), BMP6 과발현 쥐에서 BMP6의 과발현은 상처의 피부재생(reepithelialization) 및 흉터 형성(scar formation)을 늦추는 것으로 알려져 있다 (Sibylle Kaiser et al., 1998). 또한, 전립선암(prostate cancer)에서 BMP-6의 과발현이 보고되어 있고, 암을 악성화 시켜 뼈로 전이(bone metastasis)를 일으키고 그 예후가 좋지 않음이 보고되었다 (Ye L et al., 2007, S Darby et al., 2008). 따라서 BMP6의 신호전달 억제 역시 많은 적응증을 보여 줄 수 있음을 알 수 있다.
- [30]
- [31]     따라서, 본 발명의 결합 억제용 조성물은 다양한 암과 관련되는 액티빈과 액티빈 수용체 타입 2B간의 결합을 효과적으로 억제할 수 있으므로, 암의 예방 및 치료를 위하여 유용하게 사용할 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 결합 억제용 조성물은 이에 제한되는 것은 아니나, 피부암, 유방암, 자궁암, 대장암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 췌장암 또는 위암의 예방 및 치료를 위하여 유용하게 사용할 수 있다.
- [32]     또한, 본 발명의 결합 억제용 조성물은 대사질환, 면역계 질환 및 간 질환의 예방 및 치료를 위하여 유용하게 사용할 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 결합 억제용 조성물은 이에 제한되는 것은 아니나, 당뇨병, 비만, 자가면역 질환, 류머티즘 관절염, 만성 간염, 알코올성 간경변, 급성 간부전, 간암 또는 지방간의 예방 및 치료를 위하여 유용하게 사용할 수 있다.
- [33]     본 발명에 따른 결합 억제용 조성물의 액티빈 수용체 타입 2B와 리간드 간의 결합 억제 효과는 수용성 DLK1이 액티빈 수용체 타입 2B의 리간드들과 경쟁적으로 액티빈 수용체 타입 2B에 결합함으로써 달성할 수 있다.

- [34] 바람직하게는, 본 발명의 결합 억제용 조성물은 200 내지 300개의 아미노산 서열로 이루어진 수용성 DLK1을 포함할 수 있으며, 보다 바람직하게는 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 수용성 DLK1을 포함할 수 있다.
- [35] 또한, 본 발명의 결합 억제용 조성물은 항체 Fc 영역과 접합된 형태의 수용성 DLK1-Fc 융합 단백질을 포함할 수 있다.
- [36] 또한, 본 발명의 결합 억제용 조성물은 DLK1 세포 외 수용성 도메인에 특이적으로 결합하는 인간 항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 인간 항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편은 수용성 DLK1의 액티빈 수용체 타입 2B에 대한 결합력을 현저히 상승시킬 수 있다.
- [37] 또한, 본 발명의 결합 억제용 조성물은 액티빈 수용체 타입 2B에 대한 공지의 항체, 예컨대 R&D AF339 항체를 추가로 포함할 수 있다.
- [38]
- [39] 상기 목적을 달성하기 위하여 하나의 양태로서, 본 발명은 DLK1(delta-like 1 homolog)의 세포 외 영역 수용성 도메인에 특이적으로 결합하는 인간 항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편을 제공한다.
- [40] 본 발명에서 용어, "인간 항체"는 인간 면역글로불린으로부터 유래하는 분자로서 상보성 결정영역, 구조 영역을 포함한 항체를 구성하는 모든 아미노산 서열 전체가 인간의 면역글로불린으로 구성되어 있는 것을 의미한다.
- [41] 일반적으로 하나의 항체 분자에는 두 개의 중쇄(heavy chain)와 두 개의 경쇄(light chain)가 있으며, 각각의 중쇄와 경쇄는 그의 N-말단에 가변영역을 포함한다. 각 가변영역은 3개의 상보성결정부위(Complementarity determining region, CDR)와 4개의 구조형성부위(framework regions, FRs)로 구성되는데, 상보성결정부위들은 항체의 항원 결합 특이성을 결정하고, 가변영역의 구조형성 부위들로 유지되는 비교적 짧은 펩티드 서열로 존재한다.
- [42] 본 발명의 인간 항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편은 수용성 DLK1에 특이적으로 결합하는 활성을 가지고 있다. 또한, 본 발명의 인간 항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편은 수용성 DLK1에 특이적으로 결합함으로써, 궁극적으로 수용성 DLK1의 액티빈 수용체 타입 2B에 대한 결합력을 상승시키는 활성을 가질 수 있다. 따라서, 본 발명의 인간 항체 또는 이의 항원결합 부위를 포함하는 단편은 DLK1의 세포 외 영역 수용성 도메인의 액티빈 수용체 타입 2B에 대한 결합력을 상승시킴으로써, 액티빈 수용체 타입 2B에 DLK1과 경쟁적으로 결합할 수 있는 다른 리간드의 결합을 차단하여, 신호전달을 억제할 수 있다.
- [43] 또한, 본 발명의 인간 항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편은 저산소 상태에서 세포 내 신호전달을 억제할 수 있다.
- [44] 본 발명의 일실시예에서는, 본 발명의 인간 항체 중 대표적으로 B09 항체가 수용성 DLK1과 결합할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명의 인간 항체가 수용성

DLK1에 특이적으로 결합할 수 있음을 확인하였고(도 21, 22 및 27), 본 발명의 인간 항체를 수용성 DLK1과 함께 처리한 경우 액티빈 수용체 타입 2B에 대한 수용성 DLK1의 결합력이 현저히 상승하였음을 확인하였다(도 25, 27 및 29).

[45] 또한, 본 발명의 일실시예에서는, 본 발명의 인간 항체 중 대표적으로 B09 항체가 저산소 상태에서 세포 내 신호전달을 저해할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명의 인간 항체가 저산소 상태에서 세포의 반응을 억제할 수 있음을 확인하였다(도 28).

[46] 바람직하게, 본 발명의 인간 항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편은 중쇄 가변영역의 일부로서, 서열번호 2(SYAMN), 서열번호 8(DYAIH), 서열번호 14(EHAMH), 서열번호 20(DYAMH), 서열번호 26(LYGMS) 및 서열번호 32(DYYMS)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 중쇄 CDR1 서열; 서열번호 3(TITATSGKTYADSVKG), 서열번호 9(WINPGSGNTKYSHNFEG), 서열번호 15(GINWNSGKTGYADSVKG), 서열번호 21(GISWNSGSIGYADSVKG), 서열번호 27(SIPGSGTRTHYADSVKG) 및 서열번호 33(YISGSGITTYADSVKG)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 중쇄 CDR2 서열; 또는 서열번호 4(GESCSGGACSDFDY), 서열번호 10(SVSAYGSNYFDP), 서열번호 16(SGGYGGNTNWYFDL), 서열번호 22(GPGLATGKGYADY), 서열번호 28(STAYLFDY) 및 서열번호 34(LQGHCSGGACSNWFDA)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 중쇄 CDR3 서열을 포함하는 인간 항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편일 수 있으며, 또한 경쇄 가변영역의 일부로서, 서열번호 5(TGTSSDIGRYNRVS), 서열번호 11(QASQDISNYLN), 서열번호 17(IGTSSNIGVGYDVH), 서열번호 23(RASQRISWLA), 서열번호 29(RASQSIRHYLA) 및 서열번호 35(RASQSILTYLN)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 경쇄 CDR1 서열; 서열번호 6(DVTTRPS), 서열번호 12(STSNLQS), 서열번호 18(GNNNRPS), 서열번호 24(SASTLHN), 서열번호 30(GASSRAT) 및 서열번호 36(AASSLQR)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 경쇄 CDR2 서열; 또는 서열번호 7(GSYAGSYTY), 서열번호 13(QLNSYPL), 서열번호 19(QSYDSRLGV), 서열번호 25(QQGHSPY), 서열번호 31(QHYGSPLH) 및 서열번호 37(QQGYGTPY)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 경쇄 CDR3 서열을 포함하는 인간 항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편일 수 있다.

[47] 보다 바람직하게, 본 발명의 인간 항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편은 중쇄 가변영역으로서, 서열번호 2로 기재된 중쇄 CDR1, 서열번호 3으로 기재된 중쇄 CDR2 및 서열번호 4로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역; 서열번호 8로 기재된 중쇄 CDR1, 서열번호 9로 기재된 중쇄 CDR2 및 서열번호 10으로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역; 서열번호 14로 기재된 중쇄 CDR1, 서열번호 15로 기재된 중쇄 CDR2 및 서열번호 16으로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역; 서열번호 20으로 기재된 중쇄

CDR1, 서열번호 21로 기재된 중쇄 CDR2 및 서열번호 22로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역; 서열번호 26으로 기재된 중쇄 CDR1, 서열번호 27로 기재된 중쇄 CDR2 및 서열번호 28로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역; 또는 서열번호 32로 기재된 중쇄 CDR1, 서열번호 33으로 기재된 중쇄 CDR2 및 서열번호 34로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 인간 항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편일 수 있다.

- [48] 또한, 경쇄 가변 영역으로서, 서열번호 5로 기재된 경쇄 CDR1, 서열번호 6으로 기재된 경쇄 CDR2 및 서열번호 7로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 서열번호 11로 기재된 경쇄 CDR1, 서열번호 12로 기재된 경쇄 CDR2 및 서열번호 13으로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 서열번호 17로 기재된 경쇄 CDR1, 서열번호 18로 기재된 경쇄 CDR2 및 서열번호 19로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 서열번호 23으로 기재된 경쇄 CDR1, 서열번호 24로 기재된 경쇄 CDR2 및 서열번호 25로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 서열번호 29로 기재된 경쇄 CDR1, 서열번호 30으로 기재된 경쇄 CDR2 및 서열번호 31로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 35로 기재된 경쇄 CDR1, 서열번호 36으로 기재된 경쇄 CDR2 및 서열번호 37로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 인간 항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편일 수 있다.

- [49] 보다 더 바람직하게, 본 발명의 인간 항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편은 중쇄 가변영역 서열로서, 서열번호 38, 서열번호 40, 서열번호 42, 서열번호 44, 서열번호 46 또는 서열번호 48로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 인간 항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편일 수 있고, 경쇄 가변영역 서열로서, 서열번호 39, 서열번호 41, 서열번호 43, 서열번호 45, 서열번호 47 또는 서열번호 49로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 인간 항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편일 수 있다. 또한, 상기 중쇄 및 경쇄는 목적에 따라 각각 또는 함께 사용될 수 있으며, 당업자가 목적하는 바에 의해 통상적인 유전공학적 방법에 따라 다수의 CDR 서열 및 경쇄와 중쇄의 자유로운 조합이 가능하다.

- [50] 본 발명에서 용어, "인간 항체의 항원결합부위를 포함하는 단편"이란 항원(수용성 DLK1)-항체 결합을 달성할 수 있는 본 발명의 인간 항체 분자의 면역학적 활성을 가진 단편으로서 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻한다. 상기 단편의 예는 (i) 경쇄의 가변영역(VL) 및 중쇄의 가변영역(VH)과 경쇄의 불변영역(CL) 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1)으로 이루어진 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iii) 단일클론항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward ES et al., Nature, 341: 544-546, 1989); (v) 분리된 CDR 영역; (vi) 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')<sub>2</sub> 단편; (vii) VH 도메인 및 VL 도메인이 항원 결합 부위를 형성하도록 결합시키는 펩타이드 링커에 의해 결합된 단일쇄 Fv

분자(scFv); (viii) 이특이적인 단일쇄 Fv 이량체(PCT/US92/09965) 및 (ix) 유전자 융합에 의해 제작된 다가 또는 다특이적인 단편인 디아바디(diabody; WO94/13804) 등을 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[51] 본 발명의 인간 항체는 공지의 단일클론항체 제조기술로 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 단일클론항체를 제조하는 방법은 면역된 동물로부터 얻은 B 림프구를 사용하여 하이브리도마를 제조함으로써 수행될 수 있거나, 파지 디스플레이(phage display) 기술을 이용함으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[52] 바람직하게, 본 발명의 인간 항체는 파지 디스플레이로부터 생산된 인간 항체일 수 있다. 파지 디스플레이 기술을 이용한 항체 라이브러리는 하이브리도마를 제작하지 않고 바로 B 림프구로부터 항체 유전자를 얻어 파지(phage) 표면에 항체를 발현시키는 방법이다. 파지 디스플레이 기술을 이용하면 B-세포 불멸화(immortalization)에 의해 단일클론항체를 생성하는데 관련된 기존의 많은 어려움이 극복될 수 있다. 일반적인 항체의 파지 디스플레이 기술은 1) 파지의 외피 단백질(coat protein) p (또는 p) N-말단에 해당하는 유전자 부위에 무작위 서열의 항체가변영역을 포함하는 서열을 삽입하는 단계; 2) 천연형의 외피 단백질 일부와 상기 무작위 서열에 의해 코딩되는 항체가변영역의 융합 단백질을 발현시키는 단계; 3) 상기 항체 융합 단백질 라이브러리와 결합할 수 있는 항원을 처리하는 단계; 4) 항원에 결합된 항체-파지 입자들을 낮은 pH나 결합 경쟁력 있는 분자를 이용하여 용출시키는 단계; 5) 용출된 파지를 숙주 세포 내에서 증폭시키는 단계; 6) 원하는 양을 얻기 위해 상기 방법을 반복하는 단계; 및 7) 폐닝에 의해 선별된 파지 클론들의 DNA 서열로부터 활성이 있는 항체가변 영역의 서열을 결정하는 단계로 구성될 수 있다.

[53] 상기 단계에서 항체 라이브러리를 구축하기 위해 사용될 수 있는 파지는, 예를 들면 필라멘트성 파지(filamentous phage)로 fd, M13, f1, If1, Ike, Zj/Z, Ff, Xf, Pf1 또는 Pf3 파지가 있으나, 상기 예들에 의하여 본 발명에서 사용 가능한 파지의 종류가 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 필라멘트성 파지의 표면에 이중 유전자의 발현을 위해 사용될 수 있는 벡터의 예로는, fUSE5, fAFF1, fd-CAT1 또는 fdtetDOG 등의 파지 벡터 또는 pHEN1, pComb3, pComb8, pKRIBB-Fab 또는 pSEX 등의 파지미드 벡터가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[54] 또한, 증폭을 위한 재조합 파지의 성공적인 재감염을 위해 요구되는 야생형 외피 단백질을 제공하기 위해 사용될 수 있는 헬퍼 파지에는, 예를 들어 M13K07 또는 VSCM13 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[55]

[56] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명에 따른 인간 항체 또는 이의 항원결합부위를 포함하는 단편(이하, 이의 단편)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

- [57] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA(deoxyribonucleic acid) 또는 RNA(ribonucleic acid) 가닥으로서, 본 발명에 따른 인간 항체 또는 이의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드이다. 바람직하게, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 50으로 기재되는 중쇄 가변영역 및 서열번호 51로 기재되는 경쇄 가변영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [58] 본 발명의 인간 항체 또는 이의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 인간 항체 또는 이의 단편을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 인간 항체 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함됨을 당업자는 잘 이해할 수 있을 것이다. 즉, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다.
- [59] 본 발명의 재조합 벡터는 숙주세포에 DNA를 도입하여 본 발명의 인간 항체 또는 이의 단편을 미생물에서 발현시키기 위한 수단으로서, 상기 재조합 벡터의 제작시에는 상기 인간 항체 또는 이의 단편을 생산하고자 하는 숙주세포의 종류에 따라 프로모터(promoter), 종결자(terminator), 인핸서(inhancer) 등과 같은 발현 조절 서열, 막 표적화 또는 분비를 위한 서열 등을 적절히 선택하고 목적에 따라 다양하게 조합할 수 있다.
- [60] 본 발명의 재조합 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 적합한 재조합 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 재조합 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 상기 시그널 서열에는 숙주가 효모(yeast)인 경우에는 MF $\alpha$  시그널 서열, SUC2 시그널 서열 등이, 숙주가 동물세포인 경우에는 인슐린 시그널 서열,  $\alpha$ -인터페론 시그널 서열, 항체 분자 시그널 서열 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 재조합 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함할 수 있고, 복제 가능한 재조합 벡터인 경우 복제 기원을 포함할 수 있다.
- [61] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체 및 (a) 본 발명의 인간 항체 또는 이의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; (b) 상기 재조합

백터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체로 형질전환하는 단계; 및 (c) 상기 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 본 발명에 따른 인간 항체 또는 이의 단편을 제조하는 방법을 제공한다.

[62] 본 발명의 제조합 백터를 적절한 숙주세포, 예를 들어 효모 세포, 동물 세포 등에 형질전환시킨 후 형질전환된 숙주세포를 배양함으로써 본 발명의 인간 항체 또는 이의 단편을 대량 생산할 수 있다.

[63] 본 발명에서 용어, "형질전환"이란 유전자를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 발현시킬 수 있도록 하는 것을 의미하며, 형질전환된 유전자는 숙주세포 내에서 발현될 수 있으면 숙주세포의 염색체 내 삽입 또는 염색체 외에 위치하고 있는 것이든 제한하지 않고 포함된다. 또한, 상기 유전자는 폴리펩티드를 코딩할 수 있는 폴리뉴클레오티드로 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 유전자는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 유전자는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 폴리뉴클레오티드 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 유전자에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결 신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함한다.

[64] 본 발명의 제조합 백터를 숙주세포에 도입하여 형질전환하는 방법은 본 발명의 DNA를 포함하는 제조합 백터를 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적인 형질감염(transient transfection), 미세 주사, 형질 도입(transduction), 세포 융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기 침공법(electroporation) 등의 공지 방법으로 숙주세포에 도입하여 형질전환시킬 수 있다.

[65] 상기 숙주세포는 사카로마이세스 세르비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)와 같은 효모, 곤충 세포, 식물 세포, 동물 세포로부터 유래한 진핵 세포일 수 있으며, 바람직하게 상기 동물 세포는 자가 또는 동종 이계 동물 세포일 수 있다. 자가 또는 동종 이계 동물 세포에 도입하여 제조된 형질전환체는 개체에 투여되어 암을 치료하는 세포치료 등에 이용될 수도 있다.

[66] 본 발명의 형질전환체를 배양하는 방법은 본 발명의 인간 항체 또는 이의 단편을 생산하기 위하여 당업계에 공지된 임의의 방법을 적절하게 선택하여 이용할 수 있다.

[67]

[68] 또한, 본 발명의 결합 억제용 조성물은 상기에서 설명한 바와 같은 암, 대사질환, 면역계 질환 또는 간 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다.

[69] 또한, 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명에 따른 결합 억제용 조성물을 상기 질환이 발병한 또는 발병 가능성이 있는 개체에게 투여하는

단계를 포함하는 질병의 치료방법을 제공한다.

- [70] 본 발명에서 용어, "예방"이란 본 발명의 약학적 조성물의 투여에 의해 암을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, 용어 "치료"란 본 발명의 약학적 조성물의 투여에 의해 암에 의한 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [71] 본 발명에서 용어, "개체"란 암이 발병하였거나 발명할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다.
- [72] 바람직하게, 본 발명의 약학적 조성물은 암 전이 또는 침윤 억제 활성을 통하여 암에 의한 증세를 호전시키거나 이롭게 변경할 수 있다.
- [73] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직 또는 세포에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 바에 따라 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 경구 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여, 세포 내 직간접 투여될 수 있다. 이를 위하여 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [74] 본 발명의 약학적 조성물은 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [75] 본 발명의 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [76] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및

배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[77] 본 발명의 약학적 조성물은 암의 치료를 위하여 단독으로, 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[78] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 DLK1(delta-like 1 homolog)의 세포 외 수용성 도메인, DLK1의 세포 외 수용성 도메인의 단편, DLK1의 세포 외 수용성 도메인의 변이체(mutant) 또는 상기 변이체의 단편을 포함하는 단편을 포함하는, 암, 대사질환, 면역계 질환 또는 간 질환 진단 키트를 제공한다.

[79] 본 발명에서 상기 키트는 효소면역분석(ELISA) 키트 또는 샌드위치 ELISA 키트를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

### 발명의 효과

[80] 본 발명의 DLK1(delta-like 1 homolog)의 세포 외 수용성 도메인, DLK1의 세포 외 수용성 도메인의 단편, DLK1의 세포 외 수용성 도메인의 변이체(mutant) 또는 상기 변이체의 단편은 액티빈 수용체 타입 2B에 결합하는 리간드들과 액티빈 수용체 타입 2B에 경쟁적으로 결합함으로써, 리간드가 상기 수용체에 결합하는 것을 억제하며, 리간드들과 관련된 단백질 신호전달을 억제한다.

### 도면의 간단한 설명

[81] 도 1은 수용성 DLK1에 의한 췌장암 세포주(MIA-PaCa-2)에서의 전이 저해 효과를 보인 사진 및 그래프이다.

[82] 도 2는 수용성 DLK1에 의한 자궁암 세포주(HeLa)에서의 전이 저해 효과를 보인 사진 및 그래프이다.

[83] 도 3은 수용성 DLK1에 의한 췌장암 세포주(MIA-PaCa-2)에서의 부착 독립성 성장 저해 효과를 보인 사진 및 그래프이다.

[84] 도 4는 수용성 DLK1에 의한 자궁암 세포주(HeLa)에서의 부착 독립성 성장 저해 효과를 보인 사진 및 그래프이다.

[85] 도 5는 수용성 DLK1에 의한 췌장암 세포주(MIA-PaCa-2) 및 신장암 세포주(786-O)에서의 상처치유 저해 효과를 보인 사진이다.

[86] 도 6은 수용성 DLK1이 실제 세포의 신호전달에 미치는 영향을 알아보기 위한 웨스턴 블랏 결과를 보인 사진이다.

[87] 도 7은 수용성 DLK1을 과발현하는 세포주에서 수용성 DLK1이 과발현되었음을 보이는 웨스턴 블랏 사진 및 RT-PCR 사진이다.

[88] 도 8은 수용성 DLK1을 과발현하는 세포주를 이용하여 수용성 DLK1에 의한 전이, 침윤, 부착 독립성 성장 및 상처 치유 저해 효과를 보인 사진이다.

[89] 도 9는 수용성 DLK1의 수용체가 액티빈 수용체 타입 2B임을 보이는 공동 면역침강법에 의한 결과를 나타낸다

[90] 도 10은 수용성 DLK1이 액티빈 수용체 타입 2B와 특이적으로 결합함을 보이는

효소 면역 측정법에 의한 결과를 나타낸다.

- [91] 도 11는 수용성 DLK1이 액티빈 A와는 결합하지 않음을 보이는 효소 면역 측정법에 의한 결과를 나타낸다.
- [92] 도 12는 수용성 DLK1이 액티빈과 경쟁적으로 액티빈 수용체 타입 2B와 결합함을 보이는 경쟁 효소 면역 측정법에 의한 결과를 나타낸다.
- [93] 도 13은 수용성 DLK1이 다양한 액티빈 수용체 패밀리 중 액티빈 수용체 타입 2B와 특이적으로 결합함을 보이는 표면 플라즈몬 공명법에 의한 결과를 나타낸다.
- [94] 도 14는 유세포 분석기 이동 분석에서 사용한 세포들의 액티빈 수용체 타입 2B 발현양상을 보인 웨스턴 블랏 사진이다.
- [95] 도 15는 수용성 DLK1과 액티빈 수용체 타입 2B간의 결합이 실제 세포상에서 일어나고 있음을 보이는 유세포 분석기 이동 분석 결과를 나타낸다.
- [96] 도 16은 수용성 DLK1에 대한 다클론 파지 항체의 효소 면역 측정법 결과를 나타낸다.
- [97] 도 17은 수용성 DLK1에 대한 단일파지클론 항체의 다양성을 핑거프린팅을 통해 확인한 결과를 나타낸다.
- [98] 도 18은 수용성 DLK1에 대한 단일파지클론 항체의 CDR에서 폴리펩티드를 분석한 결과를 나타낸다.
- [99] 도 19는 pNATAB H 벡터의 개열지도를 나타낸다.
- [100] 도 20은 pNATAB L 벡터의 개열지도를 나타낸다.
- [101] 도 21은 B09 항체가 DLK1의 수용성 부분에 특이적으로 결합하고 있음을 보이는 유세포 이동 분석 결과(상단) 및 형광면역염색 결과(하단)를 나타낸다.
- [102] 도 22는 표면 플라즈몬 공명 방법에 의한 수용성 DLK1과 B09 항체간의 결합력 측정 결과를 나타낸다.
- [103] 도 23은 표면 플라즈몬 공명 방법에 의한 액티빈 A와 액티빈 수용체 타입 2B간의 결합력 측정 결과를 나타낸다.
- [104] 도 24는 표면 플라즈몬 공명 방법에 의한 수용성 DLK1과 액티빈 수용체 타입 2B간의 결합력 측정 결과를 나타낸다.
- [105] 도 25는 표면 플라즈몬 공명 방법에 의한 B09 항체와 수용성 DLK1을 함께 처리한 경우의 수용성 DLK1과 액티빈 수용체 타입 2B간의 결합력 측정 결과를 나타낸다.
- [106] 도 26은 수용성 DLK1과 액티빈 수용체 타입 2B간의 결합력에 미치는 B09 항체의 영향을 나타낸 모식도이다.
- [107] 도 27은 수용성 DLK1과 액티빈 수용체 타입 2B간의 결합에 미치는 항체의 영향을 보이는 경쟁 효소 면역 측정법에 의한 결과를 나타낸다.
- [108] 도 28은 액티빈 A와 액티빈 수용체 타입 2B간의 결합에 미치는 항체의 영향을 보이는 경쟁 효소 면역 측정법에 의한 결과를 나타낸다.
- [109] 도 29는 액티빈 A와 액티빈 수용체 타입 2B간의 결합에 미치는 수용성 DLK1,

DLK1 항체 및 액티빈 수용체 타입 2B 항체의 영향을 보이는 경쟁 효소 면역 측정법에 의한 결과를 나타낸다.

[110] 도 30은 액티빈 신호전달에 미치는 수용성 DLK1의 영향을 보이는 웨스턴 블랏 사진이다.

[111] 도 31은 Smad 신호전달에 미치는 수용성 DLK1의 영향을 보이는 SEAP 리포터 분석 결과를 나타낸다.

[112] 도 32는 Smad 신호전달에 미치는 B09 항체의 영향을 보이는 SEAP 리포터 분석 결과를 나타낸다.

[113] 도 33은 DLK1 항체의 저산소증 신호전달 저해 효과를 보이는 HRE(hypoxia response element) 리포터 에세이 결과를 나타낸다.

[114] 도 34는 액티빈 수용체 타입 2B 항체와 DLK1 항체의 전이 저해 효과를 나타낸다.

[115] 도 35는 수용성 DLK1의 전이 저해 효과에 미치는 액티빈 수용체 타입 2B 항체와 DLK1 항체의 영향을 나타낸다.

[116] 도 36은 췌장암 동소 이식 전이 동물모델 실험에서 DLK1-Fc 처리군의 종양 발생률을 나타낸다.

[117] 도 37은 췌장암 동소 이식 전이 동물모델 실험에서 DLK1-Fc 처리군의 탈장 형성률을 나타낸다.

[118] 도 38은 췌장암 동소 이식 전이 동물모델 실험에서 DLK1-Fc 처리군에서 암 세포의 증식이 감소하였음을 나타낸다.

[119] 도 39는 췌장암 동소 이식 전이 동물모델 실험에서 DLK1-Fc 처리군의 췌장, 위의 무게 및 크기를 나타낸다.

[120] 도 40은 췌장암 동소 이식 전이 동물모델 실험에서 DLK1-Fc 처리군의 비장비대 현상이 감소하였음을 나타낸다.

[121] 도 41은 췌장암 동소 이식 전이 동물모델의 생체 내 이미지를 나타낸다.

### **발명의 실시를 위한 최선의 형태**

[122] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[123]

#### **참고예 1: 수용성 DLK1 및 DLK1-Fc 융합 단백질의 제조**

[124] 본 명세서의 실시예에서 사용한 DLK1의 세포 외 영역 수용성 도메인(이하, 수용성 DLK1) 및 수용성 DLK1과 인간항체 Fc 영역이 접합된 DLK1-Fc 융합 단백질(이하, DLK1-Fc)은 대한민국등록특허 제10-0982170호에 개시된 방법에 따라 제조하였다.

[126]

#### **실시예 1: 수용성 DLK1의 암 전이 저해 효과 확인**

[128] 수용성 DLK1에 의한 암 세포주에 미치는 영향을 알아보기 위하여

참고문헌(Chen HC, Methods in molecular biology. 294:15-22, 2005)의 방법을 사용하여 암 세포주의 이동 분석(migration assay)을 실시하였다. 먼저, 세포(MIA-PaCa-2, HeLa 세포주)가 50% 정도 수준일 때 무혈청 배지로 갈아 주고, 24시간 후에 세포를 트립신 처리를 통하여 떼어낸 후에 세포 수를 측정하였다. 세포, 무혈청 배지 및 처리하고자 하는 각각의 단백질을 합하여 100  $\mu$ l를 만든 후 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 24-웰 플레이트에 1 ml의 화학 유인 물질(chemo-attractant)로서 5~10% FBS를 넣어주고 그 위에 8.0  $\mu$ m 크기의 포어를 가진 트랜스웰(Corning #3422)을 올린 후 그 안에 1시간 동안 전배양한 세포 및 세포, 단백질 혼합액 100  $\mu$ l를 넣은 후 37°C 이산화탄소 배양기에서 24시간 내지 48시간 동안 배양하였다. 배양 후, 트랜스웰의 배지를 제거하고, Diff Quick 용액(Sysmex, Japan)을 이용하여 세포를 염색한 후 트랜스웰을 통과하지 못한 세포들을 면봉을 이용하여 완전히 제거해 주었다. 이후, 트랜스웰을 완전히 말린 후 트랜스웰을 통과한 세포들을 400배의 배율로 관찰한 다음 사진을 촬영하여, 도 1 및 2에 나타내었다.

- [129] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 췌장암 세포주인 MIA-PaCa-2 세포주에 DLK1-Fc를 처리한 경우 양-의존적으로 세포의 이동(전이)이 저해됨을 알 수 있었다(도 1). 또한, 도 2에 나타난 바와 같이 자궁암 세포주인 HeLa 세포주에 DLK1-Fc를 처리한 경우 양-의존적으로 세포의 이동(전이)이 저해됨을 알 수 있었다(도 2).

[130]

[131] **실시예 2 : 암 세포주의 부착 독립성 성장에 미치는 수용성 DLK1의 영향 확인**

- [132] 부착 독립성 성장(anchorage independence growth)에 미치는 수용성 DLK1의 영향을 알아보기 위해 소프트 아가 에세이(Soft agar assay)를 수행하였다. 먼저, 10% FBS가 들어 있는 RPMI 배지와 1% 아가(agar)를 1:1로 섞어 0.5% 아가 조성이 되게 60 mm 배양접시에 깔아 준 후,  $6 \times 10^3$  개의 세포(MIA-PaCa-2, HeLa 세포주)를 5  $\mu$ g/ml의 DLK1-Fc 또는 Fc와 함께 섞은 후, 10% FBS가 들어 있는 RPMI 배지와 1% 아가를 섞어 준 후 최종 아가의 농도를 0.3%가 되도록 한 후 0.5% 아가 위에 깔아 주었다. 3주간 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였으며, 아가가 마르는 것을 방지하기 위해 3일마다 5  $\mu$ g/ml의 DLK1-Fc 또는 Fc가 포함된 배지를 첨가해 주었다. 콜로니가 생성된 후에 사진을 찍고, 0.05% 크리스탈 바이올렛 염색약으로 생성된 콜로니를 염색해 준 후 콜로니를 세어 정량화하여, 도 3 및 4에 나타내었다.

- [133] 그 결과, 췌장암 세포주인 MIA-PaCa-2 세포주에 DLK1-Fc를 처리한 경우 대조군인 Fc만 처리한 세포에 비해 부착 독립성 성장이 저해됨을 알 수 있었다(도 3). 또한, 자궁암 세포주인 HeLa 세포주에 DLK1-Fc를 처리한 경우 대조군인 Fc만 처리한 세포에 비해 부착 독립성 성장이 저해됨을 알 수 있었다(도 4).

[134]

[135] 실시예 3 : 수용성 DLK1이 암 세포주의 상처 치료에 미치는 영향 확인

[136] 췌장암 세포주인 MIA-PaCa-2나 신장암 세포주인 786-O를 6-웰 플레이트에서 키운 후 90% 정도 세포가 성장하였을 때 16 시간 동안 무혈청 배지로 갈아 주었다. 이후, 세포에 5~25  $\mu\text{g/ml}$  농도의 DLK1-Fc 또는 Fc를 1시간 동안 처리해 준 후 세포를 긁어 상처(scratch)를 낸 후 5% FBS를 첨가하고 786-O 세포주는 16시간 동안, MIA-PaCa-2 세포주는 48시간 동안 배양한 후 상처가 매워지는 양상을 관찰하여, 도 5에 나타내었다.

[137] 그 결과, 췌장암 세포주(MIA-PaCa-2) 및 신장암 세포주(786-O)에 DLK1-Fc를 처리한 경우 대조군인 Fc만 처리한 세포에 비해 상처 치료가 저해됨을 알 수 있었다(도 5).

[138]

[139] 실시예 4 : 수용성 DLK1에 의한 신호전달 검증

[140] 수용성 DLK1이 실제 세포의 신호전달에 미치는 영향을 알아보기 위하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 이를 위하여, 배양용기에서 췌장암 세포주인 MIA-PaCa-2가 70% 정도 자랐을 때, 무혈청 배지로 교환해 주고 16시간 동안 배양하였다. DLK1-Fc 처리군에는 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 DLK1-Fc를 처리해 준 후 10% FBS를 첨가하고 10분 후 수확하였다. 수확한 세포는 RIPA 버퍼(50 mM TrisHCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40)에 프로테아제 억제제(protease inhibitor; Roche), 포스포타제 억제제 콕테일 I, II(phosphatase inhibitor cocktail I, II; Sigma)를 첨가한 버퍼를 이용하여 세포를 용해시킨 후, BCA 정량 키트(Thermo)를 이용하여 용해된 세포 용해액의 농도를 결정하였다. SDS-PAGE에 30  $\mu\text{g}$ 의 용해액을 5X 샘플 버퍼를 이용하여 변성시키고 전기영동을 실시한 후 NC 막(Watman)에 트랜스퍼 하였다. 만들어진 블랏으로 p-FAK, FAK, p-AKT, AKT, p-eNOS, eNOS, p-ERK1/2 및 ERK1/2 항체(Cell signaling)를 이용하여 웨스턴 블랏을 실시하였다. 이때, beta-actin 항체(Sigma)를 로딩 컨트롤로 사용하였다. 4°C에서 하룻밤 동안 반응을 시킨 후에 TBST(Tween 20 0.05%)로 워싱을 3번 실시한 후 rabbit-HRP 항체 및 mouse-HRP 항체(Santa Cruz)를 이용하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 TBST(Tween 20 0.05%)로 워싱을 3번 실시하였다. 이후, 블랏을 ECL 용액(Intron)을 이용하여 형광 발색하여 필름을 현상하여, 도 6에 나타내었다.

[141] 그 결과, p-FAK, p-AKT, p-eNOS가 현저히 감소하였음을 알 수 있었으며, p-ERK1/2의 레벨도 약간 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 6). 이러한 결과 중, p-FAK, p-AKT 및 p-eNOS의 감소는 도 1 내지 5의 효과를 뒷받침하는 것이며, p-ERK1/2의 감소는 도 3 및 4의 부착 독립성 성장 저해 효과를 뒷받침하는 것이다.

[142]

[143] 실시예 5 : 수용성 DLK1을 안정적으로 발현하는 세포주 구축

[144] 외부에서 처리해 준 수용성 DLK1의 효과를 재확인하기 위하여, 췌장암

세포주인 MIA-PaCa-2 세포주를 이용하여 수용성 DLK1을 과발현하는 세포주를 구축하였다. 상기 세포주는 DLK1의 세포 외 도메인(extracellular domain) 지역을 코딩하는 DNA 단편을 pcDNA 3.1 벡터에 넣어 줌으로써 구축하였다. 세포주는 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418(Geneticin, GIBCO/BRL)에서 스크리닝하고, 세포주가 잘 구축되었는지 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였으며, 세포주를 키운 배양액을 Centricon 15(Millipore)를 이용하여 10배 농축한 후 웨스턴 블랏을 통하여 수용성 DLK1이 잘 발현되었는지 확인하였다. 웨스턴 블랏에는 DLK1 단클론 항체(R&D) 제품을 사용하였다. 비교군으로는 인서트가 없는 벡터만을 트랜스펙션하여 사용하였다.

[145] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 상기 세포주에서 수용성 DLK1이 안정적으로 발현되고 있음을 확인할 수 있었다(도 7).

[146]

[147] **실시예 6 : 수용성 DLK1을 안정적으로 발현하는 세포주에서의 수용성 DLK1에 의한 암 전이, 침윤, 부착 독립성 성장 및 상처 치유 저해 효과 검증**

[148] 상기 실시예 5에서 구축된 세포주를 이용하여 전이, 침윤 기작에 대한 분석을 시행하였다. 먼저, 세포가 50% 정도 수준일 때 무혈청 배지로 갈아 주고, 24시간 후에 세포를 트립신 처리를 통하여 떼어낸 후 세포 수를 측정하였다. 24-웰 플레이트에 1 ml의 화학 유인 물질(chemo-attractant)로 5~10% FBS를 넣어주고 그 위에 8.0  $\mu\text{m}$  크기의 포어를 가진 트랜스웰(Corning #3422)을 올린 후 그 안에  $5 \times 10^4$ 개의 세포를 넣어준 후 37°C 이산화탄소 배양기에서 24시간 내지 48시간 동안 배양하였다. 배양 후, 트랜스웰의 배지를 제거하고, Diff Quick 용액(Sysmex, Japan)을 이용하여 세포를 염색한 후 트랜스웰을 통과하지 못한 세포들을 면봉을 이용하여 완전히 제거해 주었다. 이후, 트랜스웰을 완전히 말린 후 트랜스웰을 통과한 세포들을 400배의 배율로 관찰하고, 사진을 촬영하였다.

[149] 침윤 현상을 관찰하기 위해서는 1 mg/ml 농도의 Matrigel(BD Science) 100  $\mu\text{l}$ 를 트랜스웰 아래쪽 면에 코팅한 후에 실험을 실시하였다.

[150] 부착 독립성 성장을 관찰하기 위해서는 10% FBS가 들어 있는 RPMI 배지와 1% 아가를 1:1로 섞어 0.5% 아가 조성이 되게 60 mm 배양접시에 깔아 준 후,  $6 \times 10^3$  개의 세포를 10% FBS가 들어 있는 RPMI 배지와 1% 아가를 섞어 준 후 최후 아가의 농도를 0.3%가 되도록 한 후 0.5% 아가 위에 깔아 주었다. 3주간 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였으며, 아가가 마르는 것을 방지하기 위해 3일마다 배지를 첨가해 주었다. 콜로니가 생성된 후에 사진을 찍어 결과를 관찰하였다.

[151] 상처 치유 분석은 세포주를 6-웰 플레이트에서 키운 후 90% 정도 세포가 성장하였을 때 무혈청 배지로 갈아주었다. 16시간 동안 무혈청 배지에서 배양한 후 세포를 긁어 상처를 내고 5% FBS를 첨가하여 48시간 동안 배양한 후 상처가 매워지는 양상을 관찰하였다.

[152] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 세포에 외부 유래의 DLK1-Fc를 처리한 경우와 마찬가지로, 상기 세포주에서 발현된 수용성 DLK1에 의하여 전이, 침윤,

부착 독립성 성장 및 상처 치유가 억제됨을 재확인할 수 있었다(도 8).

[153]

[154] 실시예 7 : 수용성 DLK1의 수용체 확인

[155] 수용성 DLK1의 수용체를 확인하기 위하여 공동 면역 침강법을 수행하였다. 이를 위하여, 먼저 수용성 DLK1과 ACVR2B를 293E 세포에 PEI(Polyscience) 방법을 이용하여 트랜스펙션하여 과발현시켰다. 세포는 차가운 DPBS로 3번 씻어 준 후 변형된 RIPA 버퍼(50 mM TrisHCl pH7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40)에서 용해시켰다. 이 용해물은 사람 IgG(Jackson Lab)와 단백질 G 비드(GE)를 이용하여 pre-clearing 하였다. 실험실에서 직접 제작한 사람 항체와 단백질 G 비드를 이용하여 각각 면역 침강을 수행하였으며, SDS-PAGE에 샘플을 분리시킨 후 웨스턴 블랏을 수행하여 도 9에 나타내었다. 웨스턴 블랏에서는 DLK1 단클론 항체(R&D)와 ACVR2B affinity purified 다클론 항체(R&D)를 사용하였으며, 비교군으로 Lamin B 항체(Santa Cruz)와  $\alpha$ -tubulin 항체(Santa Cruz)를 이용하였다.

[156] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 수용성 DLK1이 액티빈 신호 전달에 관여하는 액티빈 수용체 타입 2B(ACVR2B)에 결합하는 것을 확인할 수 있었다(도 9).

[157]

[158] 실시예 8 : 수용성 DLK1과 ACVR2B간의 결합 확인

[159] 효소 면역 측정법(ELISA)을 통하여 ACVR2B와 수용성 DLK1간의 결합을 확인하였다. 이를 위하여, 1  $\mu$ g/ml의 FLAG이 태깅된 수용성 DLK1을 면역플레이트(Nunc)에 4°C에서 16시간 동안 코팅하였다. 이때, 비특이적 결합을 측정하기 위한 대조군으로 BSA를 사용하였다. 코팅된 플레이트는 PBST(0.05% Tween 20)를 이용하여 3번 씻어 준 후 5% 탈지유 PBST를 이용하여 블락킹 하였다. ACVR2B의 세포 밖 부분에 Fc를 붙인 ACVR2B-Fc를 계열 희석(serial dilution)을 수행한 후 1시간 동안 상온에서 반응시켜 주었다. 반응 후 PBST(0.05% Tween 20)를 이용하여 3번 씻고 결합도를 측정하기 위하여 사람 IgG-HRP(1:5000)를 1시간 동안 배양해 주었다. 반응 후 PBST(0.05% Tween 20)를 이용하여 3번 씻고, TMB(Sigma)를 이용하여 발색반응을 수행하고, 2.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 반응을 종료해 준 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 수용성 DLK1이 ACVR2B와 결합하나, BSA에는 결합하지 않음을 확인할 수 있었다(도 10).

[160] 또한, 수용성 DLK1과 ACVR2B의 리간드인 액티빈 A와의 관계를 살펴보기 위하여 액티빈 A를 코팅한 후 DLK1-Fc와의 결합도를 측정하였다. 그 결과, 수용성 DLK1은 ACVR2B의 리간드인 액티빈 A와는 결합하지 않음을 알 수 있었다(도 11).

[161]

[162] 실시예 9 : ACVR2B에 대한 수용성 DLK1의 액티빈 A와 경쟁적 결합 확인

- [163] 수용성 DLK1이 액티빈 A와 경쟁적으로 ACVR2B 수용체에 결합하는지 알아보기 위하여 경쟁 효소 면역 측정법을 수행하였다. 50 ng/ml의 액티빈 A를 코팅한 후 ACVR2B-Fc와 FLAG-DLK1을 같이 반응시켜 주어 측정하였다. 이때, ACVR2B는 2 nM 농도로 고정하고 FLAG-DLK1을 1에서 16 nM 까지의 농도로 처리하여 준 후 경쟁 결합 정도를 측정하였다. 대조군으로는 액티빈 A와 결합하지 않는 Fc와 ACVR1A-Fc를 사용하였다.
- [164] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, 수용성 DLK1의 첨가 농도가 높아질수록 액티빈 A와 ACVR2B의 결합이 점차 감소함을 알 수 있었다(도 12). 이러한 결과는 수용성 DLK1이 액티빈 A와 경쟁적으로 ACVR2B에 결합하여 액티빈 신호전달을 차단할 수 있음을 나타낸다.
- [165]
- [166] **실시예 10 : ACVR2B에 대한 수용성 DLK1의 특이적 결합 확인**
- [167] ACVR2B에 대한 수용성 DLK1의 특이적 결합을 확인하기 위하여 Bio-Rad사의 ProteOn XPR36를 사용하여 표면 플라즈몬 공명을 수행하였으며, 그 방법을 요약하면 다음과 같다. 0.1 M EDC와 0.025 M sulfo-NHS를 60초간 흘려주어 센서 칩을 활성화시키고, 코팅할 단백질을 10 mM 아세트산나트륨(pH 5.0)에 넣어 240초간 30  $\mu$ l/분의 속도로 흘려 주어 칩에 부착반응을 실시하였다. 채널을 1 M 에탄올아민-HCl(pH 8.5)으로 200초간 블락시킨 후, DPBST(PBS with 0.005% tween 20)로 워싱하였다. 결합력을 알아보기 위하여 2배씩 계열 희석한 후 30  $\mu$ l/분의 속도로 120초간 흘려주어 결합력을 측정하였다. 분리력을 알아보기 위해서는 240초간 분리 단계(dissociation phase)를 가져왔다.
- [168] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, 수용성 DLK1이 다양한 액티빈 수용체 패밀리 중에서 ACVR2B에 특이적으로 결합하는 것을 확인할 수 있었다(도 13).
- [169]
- [170] **실시예 11 : 실제 세포상에서 수용성 DLK1과 ACVR2B간의 결합 확인**
- [171] 실제 세포상에서 수용성 DLK1과 ACVR2B간의 결합이 일어나는지 확인하기 위하여 유세포 분석기를 이용하여 실험하였다. BD사의 CantoII 제품을 이용하여 수행하였으며 실험 방법을 요약하면 다음과 같다. 293E 세포에 ACVR2B 전체 유전자가 들어가 있는 pcDNA 벡터를 이용하여 PEI(Polyscience) 방법을 이용하여 트랜스펙션 시키고 ACVR2B를 과발현시킨 세포를 준비하였다. 트랜스펙션 이틀 후 트랜스펙션 시키지 않은 293E 세포와 함께 수확하였다. 또한, ACVR2B가 수용성 DLK1의 결합에 의미가 있는지 재확인하기 위하여 ACVR2B의 발현을 억제하는 siRNA(Invitrogen)을 처리하여 ACVR2B의 발현을 억제시킨 후 세포를 수확하였으며, siRNA에 대한 대조군으로 control siRNA(Invitrogen)을 처리한 293E도 준비하였다. 수확한 세포는 차가운 DPBS를 이용하여 2번 워싱을 해 주고 DLK1-Fc-FITC를 1  $\mu$ g 첨가하여 4°C에서 2시간 동안 반응시켜 주었다. 반응에 사용한 DLK1-Fc-FITC는 Pierce 사의 단백질 FITC 라벨링 키트를 이용하여 제작하였다. 반응 후 1% PBA(1% BSA in DPBS) 버퍼를

이용하여 위상을 수행하고 유세포 분석기를 통하여 결합 정도를 결정하여, 도 15에 나타내었다. 또한, 위에 사용된 세포들은 웨스턴 블랏을 통하여 ACVR2B의 발현 양상을 확인하였다(도 14).

- [172] 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이, ACVR2B를 과발현시킨 세포주에서 수용성 DLK1에 의한 결합 이동이 현저하게 증가하였으나, siRNA를 처리하여 ACVR2B의 발현을 억제시킨 세포주에서는 이동이 감소하였음을 알 수 있었다(도 15).

[173]

- [174] 실시예 12 : DLK1의 수용성 부분에 특이적으로 결합하는 인간 항체의 제작 및 검증

[175]

- [176] 12-1. DLK1의 수용성 부분에 특이적으로 결합하는 인간 항체의 제작

- [177] <12-1-1> 라이브러리 파지의 제조

- [178] 다양성을 가진 인간 유래 scFv 라이브러리 세포  $2.7 \times 10^{10}$ 를 2×YTCM [Tryptone (CONDA, 1612.00) 17 g, Yeast extract (CONDA, 1702.00) 10 g, NaCl (sigma, S7653-5 kg) 5 g, chloramphenicol (sigma, C0857)  $34 \mu\text{g/ml}$ ], 2% 글루코즈 (sigma, G5400) 및 5 mM  $\text{MgCl}_2$  (sigma, M2393)를 포함하는 배지 (3 ℓ)에서 37°C의 온도로 2 내지 3시간 동안 배양한 후 ( $\text{OD}_{600}=0.5\sim0.7$ ), 헬퍼 파지 (helper phage)를 감염시켜 2×YTCMK [2×YT CM, Kanamycin (sigma, K1876)  $70 \mu\text{g/ml}$ , 1 mM IPTG (ELPISBIO, IPTG025)] 배지에서 30°C의 온도로 16시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 원심분리 (4500 rpm, 15분, 4°C)한 후, 상등액에 4% PEG (Fluka, 81253) 6000과 3% NaCl (sigma, S7653)을 첨가하여 잘 녹인 다음 얼음에서 1시간 동안 반응하였다. 다시 원심분리 (8000 rpm, 20분, 4°C)한 후, 펠렛에 PBS를 첨가하여 녹인 다음 원심분리 (12000 rpm, 10분, 4°C)하여 라이브러리 파지를 포함하는 상등액을 새 튜브에 넣어 4°C에서 보관하였다.

[179]

- [180] <12-1-2> 단일클론항체의 제조

- [181] (1) 패닝(Panning) 과정

- [182] 상기 실시예 1에서 수득한 정제된 DLK1-Fc  $30 \mu\text{g}$ 을 Immunosorb 튜브 (Nunc 470319)에 4 ml의 코팅 완충용액 [coating buffer;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (sigma, S7795) 1.59 g,  $\text{NaHCO}_3$  (sigma, S8875) 2.93 g,  $\text{NaN}_3$ (sigma, S2002), 0.2 g]으로 4°C에서 16시간 정도 회전기(rotator)로 코팅한 후, 실온에서 2시간 동안 PBS에 녹여 탈지유 [(BD,232100)-4% in 1XPBS]를 사용하여 면역튜브(immunotube)에서 차단하였다. 제조한 라이브러리 파지 2 ml을 면역튜브에 첨가하여 실온에서 2시간 동안 반응시키고, PBST (0.05%)로 5회, PBS로 2회 세척하였다. 세척 후 특이적으로 결합한 scFv-파지들만 100 mM TEA (Sigma T-0886)로 용리하여, 용출된 파지들을 대장균 (XL1-Blue, stratagene, 200249)에 감염시켜 증폭하였다. 첫 번째 패닝에서 증폭된 파지를 PBST 세척 횟수만 늘려서 (2차: 13번, 3차: 23번) 동일한

방법으로 2차, 3차 패닝을 수행하였다.

[183] 그 결과, 패닝을 통한 항체의 역가 상승은 표 1에 나타난 바와 같았다.

[184]

[185] 표 1

[Table 1]

| 표적항원    | 패닝횟수 | 초기 파아지수               | 결합한 파아지수           |
|---------|------|-----------------------|--------------------|
| DLK1-Fc | 1st  | $4.6 \times 10^{13}$  | $6 \times 10^7$    |
|         | 2nd  | $2 \times 10^{12}$    | $1.4 \times 10^6$  |
|         | 3rd  | $1.49 \times 10^{14}$ | $6.93 \times 10^9$ |

[186]

[187] (2) 파지 효소 면역 측정법(ELISA)에 의한 파지 항체 탐색

[188] ① 패닝 결과 확인

[189] 1차부터 3차까지 패닝하여 얼려두었던 세포 저장물(stock)을 5 ml의 2×YTCM, 2% 글루코즈, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 배지에 OD600=0.1이 되게 넣어준 다음, 37°C에서 2 내지 3시간 동안 (OD600=0.5~0.7) 배양하였다. 이후, M1 헬퍼 파지를 감염시키고 2×YTCMK, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM IPTG 배지에서 30°C의 온도로 16시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 원심분리한 후 (4500 rpm, 15 분, 4°C) 상등액 (패닝된 poly scFv-파지)을 새 튜브로 옮겼다. 96-웰 면역 플레이트 (NUNC 439454)에 항원을 웰 당 100 ng씩 4°C에서 16시간 정도 코팅 완충용액으로 처리하여 코팅한 후, PBS에 녹인 탈지유 (4 %)를 사용하여 각 웰을 차단하였다. 각 웰마다 PBS-tween20 (0.05%) 0.2 ml로 씻어준 다음 패닝된 poly scFV-파지를 원액 및 5, 25, 125, 625, 3125배 희석한 용액을 각 웰에 100 μl씩 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 각 웰마다 PBS-tween20 (0.05%) 0.2 ml을 사용하여 4번 세척한 후 이차 항체인 항-M13-HRP (Amersham 27-9421-01)를 1:2000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응하였다. PBS-tween20 (0.05%) 0.2 ml로 세척한 후에 OPD 정제 (Sigma 8787-TAB)를 PC 완충용액 [C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O (sigma, C0706) 5.1 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (sigma, S7907) 7.3 g]에 녹인 기질 용액을 만들어 웰당 100 μl씩 넣어 10분 동안 발색시킨 후 490 nm에서 흡광도를 분광광도계 (MolecularDevice, 미국)로 측정하였다.

[190] 그 결과, 도 16에 나타난 바와 같이, 항원에 대한 결합능이 각각 2차 다클론 scFv-파지 풀(pools)부터 증강하기 시작하여 3차에 결합능이 포화상태에 이르렀음을 확인할 수 있었다(도 16).

[191]

[192] ② 단일클론항체 선별

[193] 상기 결합능이 큰 다클론 파지 항체군에서 얻은 콜로니를 2×YTCM, 2% 글루코즈, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 배지 1 ml이 포함된 96-deep 웰 플레이트 (바이오니아

90030)에서 37°C의 온도로 16시간 동안 배양하였다. 배양한 세포의 OD600 값이 0.1이 되도록 100~200  $\mu$ l를 취해 1 ml의 2×YTCM, 2% 글루코즈, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 배지에 희석한 다음, 96-deep 웰 플레이트에서 37°C의 온도로 OD600 값이 0.5~0.7 되도록 2 내지 3시간 동안 배양하였다. M1 헬퍼 파지를 MOI값이 1:20이 되도록 감염시킨 후, 2×YTCMK, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM IPTG 배지에서 30°C의 온도로 16시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 원심분리 (4500 rpm, 15 분, 4°C)한 후, 상등액을 취해 4% PEG 6000과 3% NaCl을 첨가하여 잘 녹인 후 얼음에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 원심분리 (8000 rpm, 20분, 4°C)한 후 펠렛에 PBS를 첨가하여 녹인 다음 원심분리 (12000 rpm, 10분, 4°C)하여 상등액을 취해 새 튜브에 옮겨 4°C에서 보관하였다. 이후, 96웰 면역 플레이트에 항원을 웰당 100 ng씩을 넣어 4°C에서 16시간 동안 코팅한 후 PBS에 녹인 탈지유 (4%)를 사용하여 각 웰을 차단하였다. 각 웰마다 PBS-tween20 (0.05%) 0.2 ml를 사용하여 세척한 다음 상기 방법으로 수득한 단일클론 scFv-파지 (each 100 scFv-phage)를 각 웰에 100  $\mu$ l씩 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 각 웰마다 PBS-tween20 (0.05%) 0.2 ml를 사용하여 4번 씻어준 후 2차 항체인 anti-M13-HRP를 1/2000로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응하였다. PBS-tween20 (0.05%) 0.2 ml로 세척한 후 발색하여 흡광도 490 nm에서 측정하였다. 그 결과, 하기 표 2에 나타난 바와 같이 항원에 대한 결합능이 2 이상인 27개의 단일파지클론들을 선별하였다.

[194]

[195]      표 2

[Table 2]

| DLK<br>1 | 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         | 11         | 12         |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| A        | 0.112<br>9 | 0.071<br>6 | 0.048<br>2 | 3.115<br>2 | 2.985<br>9 | 0.454<br>9 | 0.361<br>2 | 2.92       | 0.046<br>9 | 2.829<br>5 | 0.217<br>5 | 1.002<br>6 |
| B        | 0.885<br>8 | 0.855<br>3 | 2.091<br>4 | 0.788      | 2.762      | 2.635<br>1 | 2.883<br>7 | 0.134<br>2 | 2.325<br>9 | 0.139<br>6 | 2.501<br>8 | 0.501      |
| C        | 0.497<br>6 | 0.285<br>2 | 2.466      | 0.223<br>9 | 0.112<br>8 | 1.241<br>3 | 2.925<br>5 | 2.154<br>8 | 0.216<br>9 | 0.060<br>8 | 0.213<br>2 | 0.159<br>1 |
| D        | 0.202<br>5 | 0.188<br>2 | 0.110<br>9 | 0.058<br>6 | 0.886<br>5 | 0.074<br>9 | 0.084<br>9 | 0.114<br>5 | 0.851<br>4 | 0.057<br>2 | 0.165<br>3 | 2.475<br>1 |
| E        | 0.090<br>7 | 0.100<br>1 | 0.041<br>8 | 0.047      | 2.232<br>9 | 2.347<br>6 | 2.377<br>8 | 0.716<br>5 | 0.091<br>9 | 0.752<br>7 | 0.173<br>7 | 0.223<br>3 |
| F        | 0.165<br>9 | 0.232<br>4 | 0.405<br>5 | 2.915<br>2 | 0.240<br>5 | 0.933      | 0.368<br>2 | 0.160<br>8 | 0.225<br>8 | 0.166<br>8 | 2.894<br>4 | 2.968<br>1 |
| G        | 0.043<br>3 | 0.381<br>5 | 0.224<br>5 | 2.835<br>5 | 2.581<br>4 | 3.021<br>6 | 0.752      | 0.345<br>5 | 0.060<br>9 | 0.436<br>3 | 0.196<br>4 | 0.050<br>4 |
| H        | 0.104<br>4 | 2.842<br>7 | 2.708<br>5 | 0.296      | 0.240<br>3 | 2.130<br>6 | 2.880<br>3 | 1.638<br>9 | 3.033      | 0.500<br>9 | 2.779<br>3 | 3.199<br>4 |
| MY<br>C  | 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         | 11         | 12         |
| A        | 0.200<br>3 | 0.047<br>4 | 0.048<br>7 | 0.506<br>8 | 0.783<br>8 | 1.492<br>2 | 0.449<br>2 | 0.553<br>8 | 0.055<br>7 | 1.282<br>3 | 0.152<br>3 | 0.243<br>2 |
| B        | 1.357      | 0.766<br>7 | 1.403<br>8 | 1.197<br>3 | 0.593<br>2 | 0.847<br>8 | 0.512<br>9 | 0.119<br>1 | 0.091<br>8 | 0.768<br>8 | 0.316      | 0.052<br>6 |
| C        | 0.296<br>6 | 0.074<br>1 | 0.287<br>1 | 0.153<br>8 | 0.068<br>3 | 0.635<br>3 | 0.593<br>8 | 0.359<br>5 | 0.669<br>2 | 0.100<br>9 | 0.120<br>6 | 0.220<br>6 |
| D        | 0.163<br>1 | 0.430<br>8 | 0.078      | 0.045      | 0.578<br>3 | 0.063<br>2 | 0.053<br>8 | 0.052      | 2.144<br>3 | 0.051<br>1 | 0.106      | 0.088<br>9 |
| E        | 0.085<br>6 | 0.607<br>3 | 0.046<br>5 | 0.043<br>5 | 0.172<br>2 | 0.188<br>3 | 0.469<br>4 | 0.086<br>7 | 0.063<br>9 | 0.272      | 0.311<br>2 | 0.156<br>6 |
| F        | 0.128<br>5 | 0.405<br>7 | 0.142<br>1 | 1.063<br>7 | 0.111<br>5 | 1.119<br>3 | 0.089<br>8 | 1.079<br>7 | 0.175<br>1 | 0.140<br>1 | 0.441<br>9 | 0.524      |
| G        | 0.066      | 0.339      | 0.084      | 0.997      | 2.997      | 0.673      | 0.608      | 0.227      | 0.049      | 0.519      | 0.056      | 0.055      |

|    |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|    | 2          | 6          | 4          | 4          | 4          | 2          | 3          | 8          | 6          | 8          | 1          | 1          |
| H  | 0.047<br>9 | 0.565<br>4 | 1.120<br>4 | 0.463<br>4 | 0.066      | 0.863<br>2 | 1.021<br>3 | 0.657<br>4 | 0.856<br>2 | 0.114<br>6 | 0.967<br>7 | 0.674<br>1 |
| FC | 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         | 11         | 12         |
| A  | 0.053<br>5 | 0.072<br>6 | 0.073<br>1 | 0.079<br>1 | 0.070<br>4 | 0.111<br>1 | 0.074<br>8 | 0.070<br>9 | 0.053<br>5 | 0.082<br>8 | 0.059<br>1 | 0.255<br>8 |
| B  | 0.137<br>5 | 0.406<br>5 | 0.085<br>1 | 0.070<br>2 | 0.057<br>5 | 0.047<br>2 | 2.829<br>1 | 0.071<br>7 | 0.078<br>6 | 0.074<br>3 | 0.054<br>8 | 0.045<br>1 |
| C  | 0.052<br>4 | 0.055<br>5 | 0.052<br>1 | 0.074<br>5 | 0.045<br>5 | 0.082<br>5 | 2.882<br>4 | 0.055<br>9 | 0.077<br>2 | 0.048<br>5 | 0.066<br>3 | 0.061      |
| D  | 0.051<br>9 | 0.068<br>6 | 0.044<br>7 | 0.072<br>2 | 0.043<br>1 | 0.045<br>5 | 0.048<br>2 | 0.052<br>8 | 0.049<br>8 | 0.114<br>1 | 0.065<br>1 | 0.083<br>1 |
| E  | 0.049<br>6 | 0.054<br>3 | 0.041<br>9 | 0.058<br>7 | 0.047<br>2 | 0.048<br>1 | 0.055<br>8 | 0.267<br>3 | 0.049<br>2 | 0.150<br>8 | 0.060<br>1 | 0.057<br>7 |
| F  | 0.061<br>4 | 0.058<br>4 | 0.052<br>8 | 0.087<br>9 | 0.055<br>3 | 0.122<br>3 | 0.079<br>2 | 0.075<br>6 | 0.066<br>1 | 0.092<br>2 | 0.065<br>8 | 0.075<br>7 |
| G  | 0.045<br>6 | 0.068<br>7 | 0.052<br>1 | 0.117<br>1 | 2.079      | 0.068<br>9 | 0.547      | 0.099<br>1 | 0.087<br>4 | 0.225<br>5 | 0.189<br>4 | 0.045<br>7 |
| H  | 0.059<br>4 | 0.064<br>2 | 0.049      | 0.070<br>5 | 0.060<br>8 | 0.076<br>6 | 0.110<br>7 | 0.081<br>9 | 0.070<br>1 | 0.120<br>4 | 0.059<br>2 | 0.053<br>9 |

[196]

[197] 3) 단일클론파지 분류 및 검사

[198] ① 핑거 프린팅에 의한 검증

[199] 1차 선별된 DLK1-Fc에 대한 27개 단일클론세포 1  $\mu\text{l}$ 와 Taq.DNA 폴리머라제 (젠닥스 5 U/ $\mu\text{l}$ ) 0.2  $\mu\text{l}$ , 50 p/ $\mu\text{l}$ 의 정방향 프라이머 (서열번호 52 :

'-CTAGATAACGAGGGCAAATCATG-3') 및 역방향 프라이머(서열번호 53 :

'-CGTCACCAATGAAACCATC-3') 0.2  $\mu\text{l}$ , 10X완충용액 3  $\mu\text{l}$ , 10 mM dNTP mix0.6  $\mu\text{l}$  및 증류수 24.8  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 콜로니 PCR (iCycler iQ, BIO-RAD)을

수행하였다. PCR 프로그램의 조건은 하기 표 3에 나타내었다.

[200]

[201] 표 3

[Table 3]

| 온도   | 시간     | 사이클(cycle) |
|------|--------|------------|
| 95°C | 5 min  | 30 사이클     |
| 95°C | 30 sec |            |
| 56°C | 30 sec |            |
| 72°C | 1 min  |            |
| 72°C | 10 min |            |
| 4°C  |        |            |

[202] 상기 콜로니 PCR 산물은 1% 아가로스 겔 (Seakem LE, CAMERES 50004)에서 확인하였고, BstNI (Roche11288075001, 10 U/ $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l를 가하여 37°C에서 2 내지 3시간 동안 반응하였다. 반응 조건은 하기 표 4에 나타내었다. 상기 절단된 산물을 8% DNA 폴리아크릴 아미드 겔에서 확인하였다.

[203]

[204] 표 4

[Table 4]

|                       |              |
|-----------------------|--------------|
| 10X Buffer            | 3 $\mu$ l    |
| 콜로니 PCR 산물            | 10 $\mu$ l   |
| BstNI (10 U/ $\mu$ l) | 0.2 $\mu$ l  |
| 증류수                   | 16.8 $\mu$ l |

[205]

[206] 그 결과, 도 17에 나타난 바와 같이, BstNI에 의해 잘려진 단일클론파지 항체들의 단편들에 대해 다양성이 확인되었고, 6종의 서로 다른 항체가 선별된 것을 유추하였다.

[207]

[208] ② 염기서열 분석에 의한 검증

[209] 수용성 DLK1에 대한 6 종류의 단일클론파지를 2×YTCM, 2% 글루코즈, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 배지 (5 ml)에서 37°C의 온도로 16시간 동안 배양하였다. 배양한 단일클론으로부터 DNA 정제 키트 (Nuclogen 5112)를 이용하여 DNA를 수득한 후, 서열번호 52의 프라이머를 이용한 서열 분석을 의뢰하였다 (솔젠트, 한국). 그 결과, 표 5와 도 18에 나타난 바와 같이 선별된 항체의 VH와 VL의 CDR 영역을 확인하였다.

[210]

[211] 표 5

[Table 5]

| Clone Name | VH     | Identities     | CDR3 -a.a. seq        | VL    | Identities     | CDR3 -a.a. seq | Group | DLK1   | a-myc  | Fc     | Ratio       |
|------------|--------|----------------|-----------------------|-------|----------------|----------------|-------|--------|--------|--------|-------------|
| DLK1 A04   | VH1-3  | 263/294(89.5%) | SVSA YG---SNY FDP     | L8    | 268/286(93.7%) | QQL NS-Y PL    | 1     | 3.1152 | 0.5068 | 0.0791 | 6.146803473 |
| DLK1 A05   | VH3-9  | 277/290(95.5%) | SGG YGG N--T NWY FDL  | V1-13 | 276/295(93.6%) | QSY DSRL GV    | 2     | 2.9859 | 0.7838 | 0.0704 | 3.809517734 |
| DLK1 A10   | VH3-9  | 287/292(98.3%) | GPG LAT G---K GYA DY  | L5    | 268/284(94.4%) | QQG HS-F PY    | 3     | 2.8295 | 1.2823 | 0.0828 | 2.206581923 |
| DLK1 B09   | VH3-23 | 266/294(90.5%) | GESC SGG-ACS DFD Y    | V1-4  | 263/285(92.3%) | GSY AGS YTY    | 4     | 2.3259 | 0.0918 | 0.0786 | 25.33660131 |
| DLK1 H06   | VH3-23 | 267/293(91.1%) | S----- --TA YLF DY    | A27   | 257/272(94.5%) | QHY GS-P LH    | 5     | 2.1306 | 0.8632 | 0.0766 | 2.468257646 |
| DLK1 H12   | VH3-11 | 279/294(94.9%) | LQG HCS GGA CSN WFD A | O12   | 272/284(95.8%) | QQG YG-T PY    | 6     | 3.1994 | 0.6741 | 0.0539 | 4.746180092 |

[212]

[213] 이들 항체와 생식세포 계열(germ line) 항체군의 유사성을 NCBI의 Ig BLAST

프로그램 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/))을 이용하여 조사한 결과 수용성 DLK1에 특이적인 파지 항체 6종을 얻었다. 이때, 중쇄의 경우 VH3-9와 VH3-23이 2종, VH3-11, VH1-3이 각각 1종씩 포함되어 있었다. 항체의 중쇄 및 경쇄의 CDR3에서 사용되고 있는 아미노산 서열을 분석하였으며, 서로 다른 서열을 갖는 것을 확인하였다(도 18).

[214]

[215] (4) 수용성 DLK1에 대한 인간항체의 특성 분석

[216] ① 전체 IgG 변환 분석

[217] 수용성 DLK1에 대한 단일클론파지 항체들을 파지에서 IgG 전체 벡터로 전환하기 위해 중쇄는 단일 클론 DNA 1  $\mu$ l, 표 6의 중쇄 정방향 및 역방향 프라이머 10 pmole/ $\mu$ l, 10X버퍼 5  $\mu$ l, 10 mM dNTP mix 1  $\mu$ l, pfu DNA 중합효소 (솔젠트, 2.5 U/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l 및 증류수를 혼합하여 콜로니 PCR (iCycler iQ, BIO-RAD)을 수행하였다. 경쇄도 표 6의 경쇄 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 동일한 방법으로 콜로니 PCR을 수행하였다.

[218]

[219] 표 6

[Table 6]

| 클론명    | HC       |        |           |        |
|--------|----------|--------|-----------|--------|
|        | 정방향 프라이머 |        | 역방향 프라이머  |        |
| A04 HC | NATVH3-2 | 서열번호 5 | NATJH-ALL | 서열번호 8 |
| A05 HC | NATVH7-1 | 서열번호 6 |           |        |
| A10 HC | NATVH3-2 | 서열번호 5 |           |        |
| B09 HC | NATVH7-1 | 서열번호 6 |           |        |
| H06 HC | NATVH1-1 | 서열번호 7 |           |        |
| H12 HC |          |        |           |        |
| 클론명    | LC       |        |           |        |
|        | 정방향 프라이머 |        | 역방향 프라이머  |        |
| A04 HC | NATVK6   | 서열번호9  | NATJK-R7  | 서열번호12 |
| A05 HC | NATVL13  | 서열번호10 | NATJL2-R  | 서열번호13 |
| A10 HC | NATVK6   | 서열번호9  | NATJK-R5  | 서열번호14 |
| B09 HC | NATVL10  | 서열번호11 | NATJL1-R  | 서열번호15 |
| H06 HC | NATVK6   | 서열번호9  | NATJK-R4  | 서열번호16 |
| H12 HC |          |        | NATJK-R7  | 서열번호12 |

[220]

[221] PCR에 의하여 수득한 증쇄 유전자를 DNA-겔 추출 키트 (Qiagen)로 정제한 후, pNATAB H 벡터(도 19) 1  $\mu$ l (10 ng), 증쇄 (100~200 ng) 15  $\mu$ l, 10X버퍼 2  $\mu$ l, 리가아제 (1 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l 및 증류수를 혼합하여 실온에서 1 내지 2시간 동안 방치하여 상기 벡터와 연결하였다. 상기 벡터를 형질전환용 세포 (XL1-blue)와 함께 얼음에 30분간 방치한 후, 42°C에서 90초간 열충격을 주어 형질도입하였다. 다시 얼음에 5분간 방치한 후, LB 배지 1 ml을 주입하고 1시간 동안 37°C에서 배양하였다. 이후, LB Amp 고체배지에 도말한 후, 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 단일 콜로니를 LB Amp 액체배지 5 ml에 접종하고 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 상기 배양액으로부터 DNA-prep. 키트 (Nuclogen)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 또한, 경쇄는 pNATAB L 벡터(도 20)를 사용하여 상기와 같은 방법으로 DNA를 추출하였다.

[222] 상기 수득한 DNA에 대하여 CMV-proF 프라이머(서열번호 54: AAA TGG GCG GTA GGC GTG)를 이용한 염기서열 분석을 의뢰하였다(솔젠트). 그 결과, 전체 IgG로 전환한 DLK1-Fc에 대한 6개의 클론파지의 증쇄와 경쇄의 서열이 파지 항체의 서열과 일치됨을 확인하였다.

[223]

[224] **12-2. DLK1의 수용성 부분에 특이적으로 결합하는 인간 항체의 검증**

[225] 상기 실시예 12-1에서 제작한 DLK1의 수용성 부분에 특이적으로 결합하는 인간 항체의 결합력을 확인하기 위하여, 6종의 인간 항체 중 대표적으로 B09 항체를 사용하여 DLK1을 발현하고 있는 293E 세포를 이용하여 유세포 분석기 이동 분석을 수행하여, 도 21에 나타내었다. 이때, R&D에서 구매한 DLK1 단클론 항체와 ACVR2B 항체의 결합력을 측정하였다.

[226] 그 결과, 도 21에 나타난 바와 같이, B09 항체가 DLK1의 수용성 부분에 특이적으로 결합하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한, R&D에서 구매한 DLK1 단클론 항체와 ACVR2B 항체 역시 각각 DLK1 및 ACVR2B에 결합하고 있음을 확인할 수 있었다(도 21).

[227]

[228] **실시예 13 : 표면 플라즈몬 공명 방법에 의한 결합력 측정**

[229] 결합력을 측정하기 위하여 Bio-Rad사의 ProteOn XPR36를 사용하여 표면 플라즈몬 공명 방법을 수행하였으며, 그 방법을 요약하면 다음과 같다. 0.1 M EDC와 0.025 M sulfo-NHS를 60초간 흘려주어 센서 칩을 활성화시키고, 코팅할 단백질을 10 mM 아세트산나트륨(pH 5.0)에 넣어 240초간 30  $\mu$ l/분의 속도로 흘려 주어 칩에 부착반응을 실시하였다. 채널을 1 M 에탄올아민-HCl(pH 8.5)으로 200초간 블락시킨 후, DPBST(PBS with 0.005% tween 20)로 워싱하였다. 결합력을 알아보기 위하여 2배씩 계열 희석한 후 30  $\mu$ l/분의 속도로 120초간 흘려주어 결합력을 측정하였다. 분리력을 알아보기 위해서는 240초간 분리 단계(dissociation phase)를 가져갔다.

- [230] 도 22에 나타난 바와 같이, 수용성 DLK1에 대한 B09 항체의 결합력이  $K_d$  값  $1.90E-11$ 로 측정되었다(도 22). 또한, ACVR2B에 대한 액티빈 A의 결합력은  $K_d$  값  $1.96E-09$ 로 측정되었으며(도 23), ACVR2B에 대한 수용성 DLK1의 결합력은  $K_d$  값  $1.31E-09$ 로 측정되었다(도 24).
- [231] 또한, 수용성 DLK1이 액티빈 A와 ACVR2B간의 결합에 미치는 영향을 정량적으로 분석하기 위하여 각각에 대한 결합력을 측정하였다. 그 결과, 수용성 DLK1과 ACVR2B간의 결합시 B09 항체를 처리한 경우 결합력이 증가하여  $4.07E-10$ 으로 측정되었다(도 25).
- [232] 상기 결과를 종합하여 도 26에 나타내었으며, 이러한 결과는 DLK1의 수용성 부분에 특이적으로 결합하는 B09 항체가 상승작용을 하는 아고니스트 항체(agonistic antibody)이며, 결합상수와 분리상수를 비교해 보았을 시 수용성 DLK1과 ACVR2B가 결합할 때 더욱 안정한 구조를 형성하게 하여 분리 속도를 떨어뜨려 주는 것임을 시사한다.
- [233]
- [234] **실시예 14 : 경쟁 효소 면역 측정법(ELISA)**
- [235] 수용성 DLK1과 ACVR2B간의 결합 또는 액티빈 A와 ACVR2B간의 결합에 미치는 항체의 영향을 알아보기 위하여 경쟁 효소 면역 측정법을 수행하였다. 50 ng/ml의 ACVR2B-Fc 또는 200 ng/ml의 액티빈 A를 코팅한 후 FLAG-DLK1, ACVR2B-Fc 또는 DLK1-Fc를 반응시켰으며 이에 각각의 항체를 첨가해 주어 경쟁 결합 반응을 관찰 하였다.
- [236] 먼저, ACVR2B를 코팅하고 이에 수용성 DLK1을 결합시키면서 각각의 항체를 처리함으로써 수용성 DLK1과 ACVR2B간의 결합에 미치는 항체의 영향을 살펴 본 결과, B09 항체는 ACVR2B에 대한 수용성 DLK1의 결합력을 기하급수적으로 상승시켰으며, 액티빈 A와 ACVR2B간의 결합에 대한 중화 효과(neutralizing effect)를 가지고 있는 것으로 보고된 R&D AF339 항체의 처리에 따라 수용성 DLK1과 ACVR2B간의 결합이 약간 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 27). 이러한 결과는 수용성 DLK1과 ACVR2B간의 결합을 B09 항체가 현저히 상승시킬 수 있음을 나타내며, 또한 AF339 항체에 의해서 결합이 감소하는 것을 보아 액티빈 A와 ACVR2B간의 결합에 관여하는 부분과 수용성 DLK1과 ACVR2B간의 결합에 관여하는 부분이 일부 중복되고 있음을 짐작할 수 있게 해 준다.
- [237] 다음으로, 액티빈 A를 코팅하고 이에 ACVR2B-Fc를 결합시키면서 각각의 항체를 처리함으로써 액티빈 A와 ACVR2B간의 결합에 미치는 영향을 살펴 본 결과, R&D AF339 항체의 처리에 따라 액티빈 A와 ACVR2B간의 결합이 감소하였으며, DLK1 항체들은 액티빈 A와 ACVR2B간의 결합에 직접적으로 관련이 없는 것을 확인할 수 있었다(도 28).
- [238] 또한, 액티빈 A를 코팅하고 이에 ACVR2B-Fc를 결합시키면서 수용성 DLK1 및 각각의 항체를 처리함으로써 액티빈 A와 ACVR2B간의 결합에 수용성 DLK1,

DLK1 항체 및 ACVR2B 항체가 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과, 수용성 DLK1은 농도가 증가할수록 액티빈 A와 ACVR2B간의 결합력을 감소시켰으며, B09 항체와 함께 처리한 경우에는 액티빈 A와 ACVR2B간의 결합력을 현저하게 감소시킴을 확인할 수 있었다. 또한, R&D AF339 항체의 처리에 따라 수용성 DLK1에 의한 액티빈 A와 ACVR2B간의 결합저해 효과가 더 상승하였음을 알 수 있었다(도 29). 이러한 결과는 액티빈 신호전달을 저해하기 위하여 수용성 DLK1과 상승작용을 하는 B09 항체 또는 ACVR2B와 액티빈 A간의 결합을 방해하는 항체를 함께 처리하여 주었을 때 가장 좋은 효과를 얻을 수 있음을 나타낸다.

[239]

[240] 실시예 15 : 액티빈 신호전달에 대한 수용성 DLK1의 영향 검증을 위한 웨스턴 블랏

[241] 배양용기에서 채장암 세포주인 MIA-PaCa-2가 70% 정도 자랐을 때, 무혈청 배지로 교환해 주고 16시간 동안 배양하였다. DLK1-Fc 처리군에 10  $\mu\text{g/ml}$  의 DLK1-Fc를 처리해 주고, 0.5 nM 액티빈 A를 첨가하고 30분 후 수확하였다. 수확한 세포는 RIPA 버퍼(50 mM TrisHCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40)에 프로테아제 억제제(Roche) 포스포타제 억제제 각테일 I, II(Sigma)를 첨가한 버퍼를 이용하여 세포를 용해시킨 후, BCA 정량 키트(Thermo)를 이용하여 용해된 세포 용해액의 농도를 결정하였다. SDS-PAGE에 30  $\mu\text{g}$ 의 용해액을 5X 샘플 버퍼를 이용하여 변성시키고 전기영동을 실시한 후 PVDF 막(GE)에 트랜스퍼 하였다. 만들어진 블랏으로 psamd2/3, Smad2/3, Smad4(Cell signaling), Smad7(Milipore)를 이용하여 웨스턴 블랏을 실시하였다. 이때, beta-actin 항체(Sigma)를 로딩 컨트롤로 사용하였다. 4°C에서 하룻밤 동안 반응을 시킨 후에 TBST(Tween 20 0.05%)로 워싱을 3번 실시한 후 rabbit-HRP 항체와 mouse-HRP 항체(Santa Cruz)를 이용하여 1시간 동안 상온에서 반응시키고, 다시 TBST(Tween 20 0.05%)로 워싱을 3번 실시하였다. 이후, 블랏을 ECL 용액(Intron)을 이용하여 형광 발색하여 필름을 현상하였다.

[242] 그 결과, 도 30에 나타난 바와 같이, pSmad2/3의 감소에 의하여 액티빈 신호전달이 일어나지 않았으며, 또한 액티빈 신호전달을 감소시키는 Smad7이 증가하였음을 알 수 있었다(도 30).

[243]

[244] 실시예 16 : Smad 신호전달에 미치는 수용성 DLK1의 영향

[245] 수용성 DLK1이 Smad 신호전달에 미치는 영향을 알아보기 위하여 SEAP 리포터 분석을 수행하였다. SEAP 리포터 분석에 사용한 벡터는 SEAP 유전자 앞에 액티빈 신호전달에 의해서 증가하는 Smad 결합 부위(Smad binding element, SBE)를 가지고 있어서 세포 내에서 Smad에 의한 전사 조절이 이루어질 때 리포터 유전자가 발현되는 시스템을 가지고 있다. MIA-PaCa-2 세포주에 전기천공법으로 벡터를 도입하였다. 다음날 트랜스펙션된 세포주를 96-웰

플레이트로 옮겨주고 24시간 배양한 후 무혈청 배지로 16시간 동안 추가 배양하였다. 세포에 Fc 또는 DLK1-Fc를 1시간 동안 전처리해 주고, 0.5 nM의 액티빈 A을 처리하고 48시간 배양한 후 세포 배양액을 수거하여 리포터 분석을 수행하였다. 분석은 ABI사의 Phospha-Light 시스템을 이용하였다. 또한, B09 항체를 이용하여 동일한 실험을 수행하였다.

[246] 그 결과, DLK1-Fc의 처리에 따라 리포터 시스템의 시그널이 감소하였으며(도 31), B09 항체의 투여 양에 따라 액티빈 신호전달이 감소하였음을 알 수 있었다(도 32).

[247]

[248] 실시예 17 : 저산소증 신호전달에 미치는 B09 항체의 영향

[249] DLK1의 수용성 부분에 특이적으로 결합하는 B09 항체가 DLK1이 과발현되는 저산소증 조건에서의 신호 전달에 미치는 영향을 알아보기 위하여 리포터 분석을 수행하였다. 리포터 분석에 사용한 벡터는 루시퍼라제 유전자 앞에 저산소증 반응 부위(hypoxia response element, HRE)를 가지고 있어 세포 내에서 저산소증에 의한 전사 조절이 이루어질 때 리포터 유전자가 발현되는 시스템을 가지고 있다. MIA-PaCa-2 세포주에 전기천공법(Invitrogen)으로 벡터를 도입하였다. 다음날 트랜스펙션된 세포주를 96-웰 플레이트로 옮기고 24시간 배양한 후 무혈청 배지로 16시간 동안 추가 배양하였다. 무혈청 배지로 배양하는 동안 100 nM의 CoCl<sub>2</sub>(Sigma)를 처리해 주어 인위적인 저산소증을 유발시켰다. 세포에 DLK1 항체를 1시간 동안 전처리해 주고 리포터 분석을 수행하였다. 분석은 ABI사의 Phospha-Light 시스템을 이용하여 수행하였다.

[250] 그 결과, 도 33에 나타난 바와 같이, B09 항체가 저산소증 신호전달을 저해할 수 있음을 알 수 있었다(도 33).

[251]

[252] 실시예 18 : DLK1 항체의 암 전이 저해 효과 및 수용성 DLK1의 암 전이 저해 효과에 미치는 ACVR2B 항체와 DLK1 항체의 영향 확인

[253] DLK1 항체의 암 전이 저해 효과 및 ACVR2B 항체와 DLK1 항체가 수용성 DLK1의 암 전이 저해 효과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MIA-PaCa-2 세포주를 이용하여 전이 실험을 진행하였다. 먼저, 세포가 70% 정도 수준일 때 무혈청 배지로 갈아 주고 24시간 후에 세포를 트립신 처리를 통하여 떼어낸 후 세포 수를 측정하였다. 세포, 무혈청 배지 및 처리하고자 하는 각각의 단백질을 합하여 100  $\mu$ l를 만들고 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 24-웰 플레이트에 1 ml의 화학 유인 물질(chemo-attractant)로 5~10% FBS를 넣어주고 그 위에 8.0  $\mu$ m 크기의 포어를 가진 트랜스웰 (Corning #3422)을 올리고 그 안에 1시간 동안 DLK1과 항체를 전배양한 세포 및 세포, 단백질 혼합액 100  $\mu$ l와 함께 넣은 후 37°C 이산화탄소 배양기에서 24시간 내지 48시간 동안 배양하였다. 배양한 후, 트랜스웰의 배지를 제거하고, Diff Quick 용액(Sysmex, Japan)을 이용하여 세포를 염색한 후 트랜스웰을 통과하지 못한 세포들을 면봉을 이용하여 완전히 제거해

주었다. 이후, 트랜스웰을 완전히 말린 후 트랜스웰을 통과한 세포들을 400배의 배율로 관찰하고, 사진을 촬영하였다.

- [254] 그 결과, ACVR2B 항체의 전이 억제능 보다 DLK1 항체의 전이 억제 능력이 보다 우수함을 확인할 수 있었다(도 34). 또한, 수용성 DLK1과 함께 처리할 때 전이에 미치는 영향을 알아본 결과 mab1144 항체는 수용성 DLK1과 함께 처리한 경우에 전이 저해에 미치는 영향이 크지 않았으나, B09 항체는 단독으로 처리했을 때는 물론 수용성 DLK1과 함께 처리한 경우에도 매우 좋은 전이 저해 능력을 보였다. AF339 항체 처리시에는 오히려 수용성 DLK1에 의한 전이 억제 효과가 감소하였음을 확인할 수 있었다(도 35).

[255]

- [256] **실시예 19 : MIA-Paca-2 췌장암의 동소 이식 동물 모델(orthotopic animal model)**

- [257] DLK1-Fc의 암의 전이 및 암세포의 증식 억제능을 확인하기 위하여 MIA-Paca-2 췌장암의 동소 이식 동물 모델 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 누드마우스는 Can Cg-Foxnl-nu/CrljBgi으로 6주령 암컷을 (주)오리엔트에서 구매하였다. 1주 정도 마우스를 적응시킨 후 췌장암 세포주인 MIA-Paca-2 세포주 5x10<sup>6</sup>개를 췌장으로 동소 이식하였다. 두 그룹으로 나누어 한 그룹은 DLK1-Fc를 5 mpk로 주입하고, 다른 한 그룹은 15 mpk로 주입하였으며, PBS를 대조군으로 이용하였다. 단백질은 복강 주사를 통하여 1주일에 2회 주사하여 주입하였다. 동소 이식 후 5주가 지난 후 해부를 통하여 결과를 관찰하였다.

- [258] 해부 전에 종양 발생율을 검사한 결과 DLK1-Fc 처리군에서 종양 발생율이 현저히 감소하였음을 알 수 있었으며(도 36), 해부 소견으로의 탈장 형성율을 조사한 결과 DLK1-Fc 처리군에서 탈장 형성율이 현저히 감소하였음을 확인할 수 있었다(도 37).

- [259] 또한, DLK1-Fc 처리군에서 간, 폐 및 횡경막 등으로의 전이가 현저히 감소하여 암세포의 증식이 감소하였음을 알 수 있었으며(도 38), 해부 후 췌장 및 위의 크기 및 무게를 결정하여 분석한 결과 DLK1-Fc 처리군에서 현저하게 암의 형성이 억제되었음을 확인할 수 있었다(도 39). 또한, 종양에 의한 비장 비대 현상을 측정한 결과 마찬가지로 대조군에 비해 DLK1-Fc 처리군에서 비장 비대 현상이 현저히 감소하였음을 확인할 수 있었다(도 40).

[260]

- [261] **실시예 20 : 생체 내 이미징(Small Animal In Vivo Imaging; SAIVI)**

- [262] 주입한 DLK1-Fc의 실제 마우스에서의 분포를 알아보기 위하여 DLK1-Fc에 형광을 띠는 양자점(Quantum Dots)을 붙인 후 생체 내 이미징(Small Animal In Vivo Imaging; SAIVI) 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 누드마우스는 Can Cg-Foxnl-nu/CrljBgi으로 6주령 암컷을 (주)오리엔트에서 구매하였다. 표지한 양자점은 QDs 800(Invitrogen)을, 대조군으로는 QDs 800만을 사용하였다. 먼저, 마우스에 췌장암세포주인 MIA-Paca-2 세포주 5x10<sup>6</sup>개를 췌장으로 동소

이식하였다. 암조직이 형성된 후 양자점을 정맥주사를 통하여 주사 한 후 형광을 관찰함으로써 생체 내 이미징을 수행하였다. 이미징에는 마에스트로 인 비보 이미징 시스템(Maestro in vivo imaging system; CRi, Inc.)을 사용하였다.

- [263] 그 결과, 처리한 DLK1-Fc가 암세포가 위치한 곳으로 모이는 것을 확인할 수 있었다(도 41). 이러한 결과는 일반 조직의 세포보다 암세포에서 ACVR2B가 과발현되어 있기 때문으로 사료된다.

### 산업상 이용가능성

- [264] 리간드들과 관련된 단백질 신호전달을 억제함에 따라 관련 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

### 서열목록 Free Text

- [265] SEQ. ID. NO. 1(extracellular water-soluble domain of DLK1): ECFPACNPQN  
GFCEDDNVCR CQPGWQG PLC DQCVTSPGCL HGLCGEPGQC ICTDGWDGEL  
CDRDVRACSS APCANNGTCV SLDDGLYECS CAPGYSGKDC QKKDGPCVIN  
GSPCQHGGTC VDDEGRASHA SCLCPPGFSG NFCEIVANSC TPNPCENDGV  
CTDIGGDFRC RCPAGFIDKT CSRPVTNCAS SPCQNGGTCL QHTQVSYECL  
CKPEFTGLTC VKKRALSPQQ VTRLPSGYGL AYRLTPGVHE LPVQQPEHRI  
LKVSMKELNK KTPLLTEG
- [266] SEQ. ID. NO. 2(CDR1 of heavy chain): SYAMN
- [267] SEQ. ID. NO. 3(CDR2 of heavy chain): TITATSGKTY YADSVKG
- [268] SEQ. ID. NO. 4(CDR3 of heavy chain): GESCSGGACS DFDY
- [269] SEQ. ID. NO. 5(CDR1 of light chain): TGTSSDIGRY NRVS
- [270] SEQ. ID. NO. 6(CDR2 of light chain): DVTTRPS
- [271] SEQ. ID. NO. 7(CDR3 of light chain): GSYAGSYTY
- [272] SEQ. ID. NO. 8(CDR1 of heavy chain): DYAIH
- [273] SEQ. ID. NO. 9(CDR2 of heavy chain): WINPGSGNTK YSHNFEG
- [274] SEQ. ID. NO. 10(CDR3 of heavy chain): SVSAYGSNYF DP
- [275] SEQ. ID. NO. 11(CDR1 of light chain): QASQDISNYL N
- [276] SEQ. ID. NO. 12(CDR2 of light chain): STSNLQS
- [277] SEQ. ID. NO. 13(CDR3 of light chain): QQLNSYPL
- [278] SEQ. ID. NO. 14(CDR1 of heavy chain): EHAMH
- [279] SEQ. ID. NO. 15(CDR2 of heavy chain): GINWNSGKTG YADSVKG
- [280] SEQ. ID. NO. 16(CDR3 of heavy chain): SGGYGGNTNW YFDL
- [281] SEQ. ID. NO. 17(CDR1 of light chain): IGTSSNIGVG YDVH
- [282] SEQ. ID. NO. 18(CDR2 of light chain): GNNNRPS
- [283] SEQ. ID. NO. 19(CDR3 of light chain): QSYDSRLGV
- [284] SEQ. ID. NO. 20(CDR1 of heavy chain): DYAMH
- [285] SEQ. ID. NO. 21(CDR2 of heavy chain): GISWNSGSIG YADSVKG

- [286] SEQ. ID. NO. 22(CDR3 of heavy chain): GPGLATGKGY ADY
- [287] SEQ. ID. NO. 23(CDR1 of light chain): RASQRISWL A
- [288] SEQ. ID. NO. 24(CDR2 of light chain): SASTLHN
- [289] SEQ. ID. NO. 25(CDR3 of light chain): QQGHSPY
- [290] SEQ. ID. NO. 26(CDR1 of heavy chain): LYGMS
- [291] SEQ. ID. NO. 27(CDR2 of heavy chain): SIPGSGTRTH YADSVKG
- [292] SEQ. ID. NO. 28(CDR3 of heavy chain): STAYLFDY
- [293] SEQ. ID. NO. 29(CDR1 of light chain): RASQSIRHYL A
- [294] SEQ. ID. NO. 30(CDR2 of light chain): GASSRAT
- [295] SEQ. ID. NO. 31(CDR3 of light chain): QHYGSPLH
- [296] SEQ. ID. NO. 32(CDR1 of heavy chain): DYYMS
- [297] SEQ. ID. NO. 33(CDR2 of heavy chain): YISGSGITTY YADSVKG
- [298] SEQ. ID. NO. 34(CDR3 of heavy chain): LQGHCSGGAC SNWFDA
- [299] SEQ. ID. NO. 35(CDR1 of light chain): RASQSILTYL N
- [300] SEQ. ID. NO. 36(CDR2 of light chain): AASSLQR
- [301] SEQ. ID. NO. 37(CDR3 of light chain): QQGYGTPY
- [302] SEQ. ID. NO. 38(heavy chain VR of B09): QMQLVESGGR LVRPGGSLRL  
SCAASGFPFT SYAMNWRQT PGKGLEWVST ITATSGKTTY ADSVKGRFTI  
SRDNSRNTLF LQMNSLRAED TAVYYCVRGE SCSGGACSDY DWGQALVT  
VSS
- [303] SEQ. ID. NO. 39(light chain VR of B09): QLVLTQPASV SGSPGQSVTI  
SCTGTSSDIG RYNRVSWYQH HPGKAPKLIL NDVTTRPSGF SNRFSGSKSG  
NTASLTISGL QAEDEADYSC GSYAGSYTYV FGTGKVTVL GGG
- [304] SEQ. ID. NO. 40(heavy chain VR of A04): QVQLVESGAE VKKPGASVKV  
SCKASGYTFK DYAIHWVRQA PGQRLEWMGW INPGSGNTKY SHNFEGRVIL  
TRDASANTAY LELPSLRSED TAVYYCARSV SAYGSNYFDP WGQGLTIVS S
- [305] SEQ. ID. NO. 41(light chain VR of A04): DIQMTQSPSS LSASVGDRVT  
ITCQASQDIS NYLNWYQQKPKAPKLLIYS TSNLQSGVPS RFSGSGSGTD  
FTLTISLQPEDFATYYCQQ LNSYPLTFGG GTKVDIKRGG
- [306] SEQ. ID. NO. 42(heavy chain VR of A05): QMQLVESGGG LVQPGRSLRL  
SCAASGFTFD EHAMHWVRQA PGKGLEWVSG INWNSGKTGY ADSVKGRFTI  
SRDNGKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAKSG GYGGNTNWYF  
DLWGRGTLVT VSS
- [307] SEQ. ID. NO. 43(light chain VR of A05): QFVLTQPPSV SGAPGQNVTI  
SCIGTSSNIG VGYDVHWYQQ VPGTAPKLLV YGNNNRPSGV PDRFSGSKSG  
TSASLAITGL QAEDEADYYC QSYDSRLGVV FGGGTKLTVL GGG
- [308] SEQ. ID. NO. 44(heavy chain VR of A10): QVQLVESGGG LVQPGRSLRL  
SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI

SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARGP GLATGKGYAD  
YWGQGLTVTV SS

- [309] SEQ. ID. NO. 45(light chain VR of A10): DIQMTQSPSS VSASVGDRVT  
ITCRASQRIS SWLAWYQQKP GRAPKLLIHS ASTLHNGVPS RFSGSASGTD  
FTLTISLQP EDYAIYYCQQ GHSFPYTFGQ GTKLEIKRGG
- [310] SEQ. ID. NO. 46(heavy chain VR of H06): QVQLVQSGGG LIQPGGSLRL  
SCAASGFTFS LYGMSWVRQA PGKGLEWVSS IPGSGTRTHY ADSVKGRFTI  
SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCAKST AYLFDYWGPG TLTVTVSS
- [311] SEQ. ID. NO. 47(light chain VR of H06): DIQMTQSPAT LSLSPGERAT  
LSCRASQSIR HYLAWYQQKP GQAPRLLIHG ASSRATGIPD RFSGSGSGTD  
FTLTISRLEP EDFAVYYCQH YGSPLHSFGP GTKVEIKRGG
- [312] SEQ. ID. NO. 48(heavy chain VR of H12): QVQLVQSGGG LVKPGGSLRL  
SCAASEFTFS DYYMSWVRQA PGKGLEWLSY ISGSGITTY ADSVKGRFTI  
SRDNGKKS LY LEMNSLRAED TAVYYCARLQ GHCSGGACSN  
WFDAWGQGL ITVSS
- [313] SEQ. ID. NO. 49(light chain VR of H12): DIQMTQSPSS LSASVGDRLT  
ITCRASQSIL TYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQRGVPS RFSGSGSGTD  
FTLTISGLQP EDFATYYCQQ GYGTPYTFGQ GTKVDIKRGG
- [314] SEQ. ID. NO. 50(polynucleotide sequence coding heavy chain of B09 antibody):  
atgggatgga gctatatcat cctcttttg gtggccacag cggccgatgt ccaactgcag atgcagctgg  
tggagtctgg gggacgctta gtgcggcctg gggggtcct gagactctcc tgtgcagcct ctggaatccc  
ctttaccagt tatgcatga actgggtccg ccagactcca gggaaggggc tggaaatgggt ctctactatc  
actgctacta gtggaagac atactacgca gactccgtga agggccggt caccatctcc agagacaact  
ccaggaacac gctgtttctg caaatgaaca gtctgagagc cgaggacacg gccgtgtatt actgtgtgag  
aggggagtct ttagtggtg gtgcctgtc agatttgac tactggggcc agggagccct ggtcaccgtc  
tctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc tccccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca  
cagcggccct gggtgcctg gtcaaggact actccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc  
cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccgc tgcctacag tctcaggac tctactccct cagcagcgtg  
gtgaccgtgc cctccagcag ctggggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca  
ccaaggtgga caagagagtt gagcccaaat ctgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc  
tgaactctg gggggaccgt cagtcttct cttccccca aaacccaagg acacctcat gatctcccg  
accctgagg tcacatgctg ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg  
tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgag ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt  
ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac  
aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gcccggagaa ccacaggtgt  
acacctgcc cccatcccg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaagctt  
ctatccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccagcct  
cccgtgctgg actccgacgg ctctcttctc ctctacagca agtcaccgt ggacaagagc aggtggcagc

aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc  
cctgtctccg ggtaaa

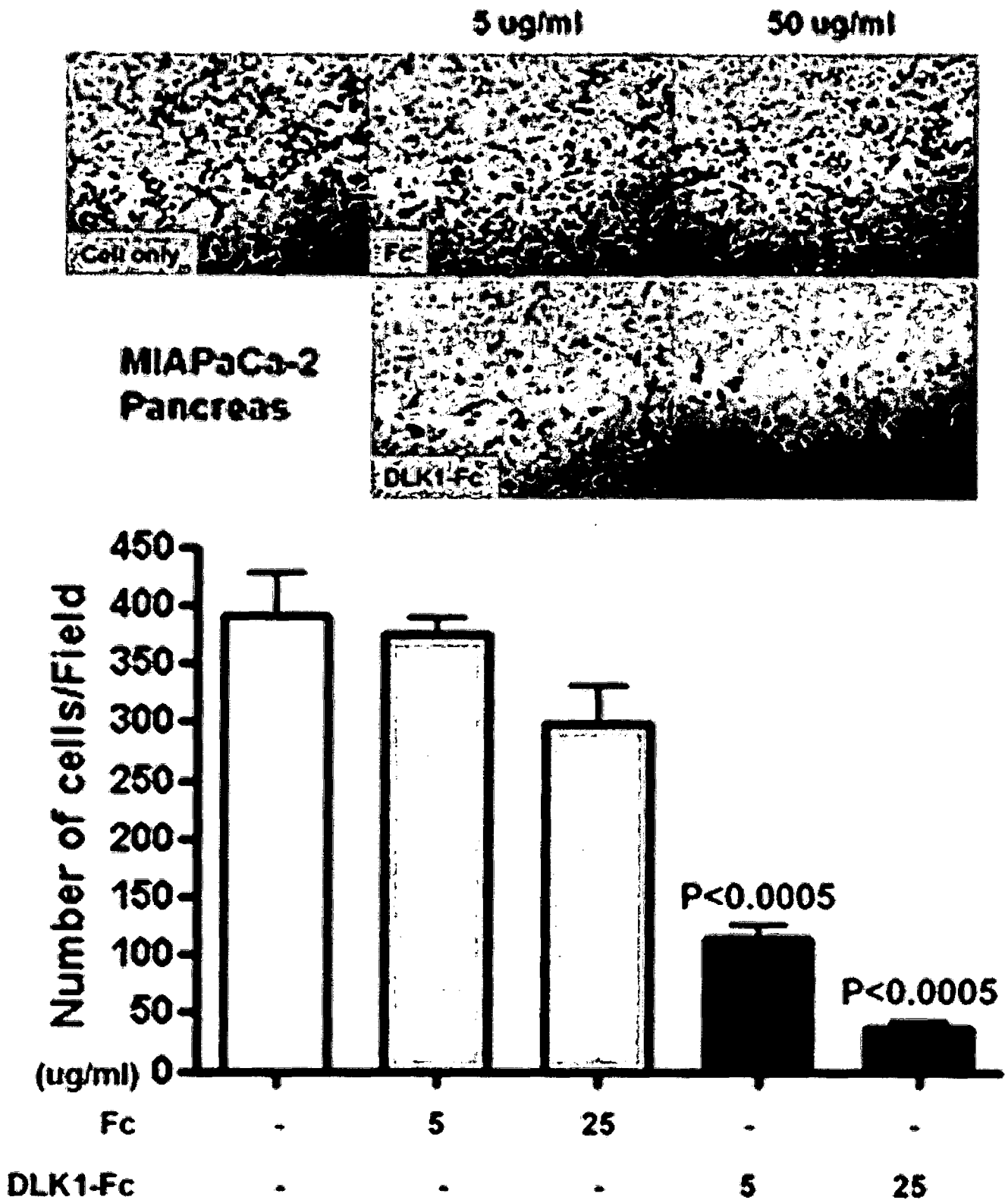
- [315] SEQ. ID. NO. 51(polynucleotide sequence coding light chain of B09 antibody):  
atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtggccacag cggccgatgt ccaactgcag ctcgtgtga ctcagcctgc  
ctccgtgtct ggggtctcctg gacagtcggt caccatctcc tgcactggaa ccagcagtga cattggctgt tataaccgtg  
tctctggta ccaacaccac cccggcaagg ccccaaaact cattttaat gatgtcacta ctcggccctc agggttttct  
aatcgtttct ctggtccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccatctc tgggtccag gctgaggatg  
aggctgatta ttctgcggc tcatatgcag gcagctacac ttatgtcttc ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggt  
ggaggaagat ctgtggtgc accatctgtc ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt  
tgtgtgctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgccctccaa  
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcaccc  
tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa gtcaccatc agggcctgag  
ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt
- [316] SEQ. ID. NO. 52(forward primer): ctagataacg agggcaaate atg
- [317] SEQ. ID. NO. 53(reverse primer): cgtcaccaat gaaaccatc
- [318] SEQ. ID. NO. 54(CMV-proF primer): aaatgggcgg taggcgtg
- [319] SEQ. ID. NO. 55(NATVH3-2 primer): ttggtggcca cagcggccga tgtccactcg caggtgcage  
tggtggagtc
- [320] SEQ. ID. NO. 56(NATVH7-1 primer): ttggtggcca cagcggccga tgtccactcg cagatgcage  
tggtggagtc
- [321] SEQ. ID. NO. 57(NATVH7-1 primer): ttggtggcca cagcggccga tgtccactcg caggtgcage  
tggtgcagtc
- [322] SEQ. ID. NO. 58(NATJH-ALL primer): gaggaggcta gctgaggaga cggtga
- [323] SEQ. ID. NO. 59(NATVK6 primer): ttggtggcca cagcggccga tgtccactcg gacatccaga  
tgaccagtc tcc
- [324] SEQ. ID. NO. 60(NATVL13 primer): ttggtggcca cagcggccga tgtccactcg cagttcgtgc  
tgactcagcc
- [325] SEQ. ID. NO. 61(NATVL10 primer): ttggtggcca cagcggccga tgtccactcg cagctcgtgc  
tgactcagcc
- [326] SEQ. ID. NO. 62(NATJK-R7 primer): gaggagagat cttttgatat ccaccttggt
- [327] SEQ. ID. NO. 63(NATJL2-R primer): gaggagagat cttaggacgg tcagcttggt ccc
- [328] SEQ. ID. NO. 64(NATJK-R5 primer): gaggagagat cttttgattt ccagcttggt
- [329] SEQ. ID. NO. 65(NATJL1-R primer): gaggagagat cttaggacgg tgaccttggt ccc
- [330] SEQ. ID. NO. 66(NATJK-R4 primer): gaggagagat cttttgattt ccaccttggt

## 청구범위

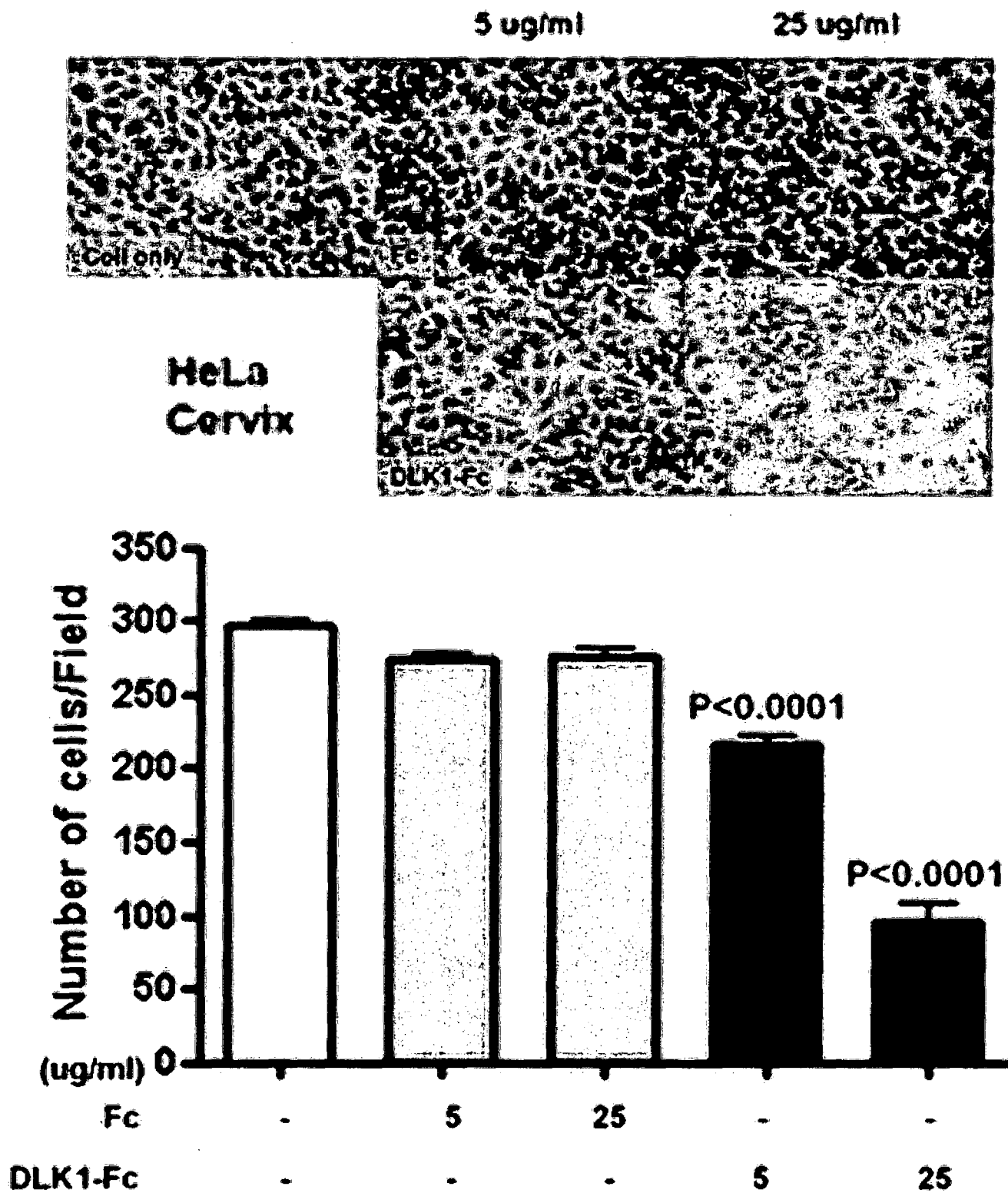
- [청구항 1] DLK1(delta-like 1 homolog)의 세포 외 수용성 도메인, DLK1의 세포 외 수용성 도메인의 단편, DLK1의 세포 외 수용성 도메인의 변이체(mutant) 또는 상기 변이체의 단편을 유효성분으로 포함하는, 액티빈 수용체 타입 2B(activin receptor type II B, ACVR2B)와 ACVR2B를 수용체로 가지는 리간드의 결합 억제용 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 DLK1의 세포외 영역 수용성 도메인은 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 것인, 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 ACVR2B를 수용체로 가지는 리간드는 액티빈(activin), 노달(Nodal), BMP6(Bone morphogenetic protein 6), BMP7(Bone morphogenetic protein 7), GDF5(Growth/differentiation factor 5) 및 GDF11(Growth/differentiation factor 11)로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 DLK1(delta-like 1 homolog)의 세포 외 수용성 도메인, DLK1의 세포 외 수용성 도메인의 단편, DLK1의 세포 외 수용성 도메인의 변이체(mutant) 또는 상기 변이체의 단편은 ACVR2B를 수용체로 가지는 리간드와 경쟁적으로 ACVR2B에 결합하는 것인, 조성물.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 조성물은 DLK1 세포 외 수용성 도메인에 특이적으로 결합하는 인간 항체 또는 이의 항원 결합부위를 포함하는 단편을 추가로 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 6] DLK1(delta-like 1 homolog)의 세포 외 수용성 도메인 또는 이의 단편과 인간 항체 Fc 영역이 접합된 DLK1-Fc 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 액티빈 수용체 타입 2B(activin receptor type II B, ACVR2B)와 ACVR2B를 수용체로 가지는 리간드의 결합 억제용 조성물.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서, 상기 ACVR2B를 수용체로 가지는 리간드는 액티빈(activin), 노달(Nodal), BMP6(Bone morphogenetic protein 6), BMP7(Bone morphogenetic protein 7), GDF5(Growth/differentiation factor 5) 및 GDF11(Growth/differentiation factor 11)로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

- [청구항 8] 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 암, 대사질환, 면역계 질환 및 간 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서,  
상기 DLK1의 세포 외 영역 수용성 도메인은 액티빈(activin)과 경쟁적으로 액티빈 수용체 타입 2B(activin receptor type II B)에 결합하는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제 8항에 있어서,  
상기 조성물은 암 전이 또는 침윤 억제 활성을 갖는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제 8항에 있어서,  
상기 암은 피부암, 유방암, 자궁암, 대장암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 췌장암 및 위암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 암인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제 8항에 있어서,  
상기 대사질환은 당뇨병 또는 비만인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제 8항에 있어서,  
상기 면역계 질환은 자가면역 질환 또는 류머티즘 관절염인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 14] 제 8항에 있어서,  
상기 간 질환은 만성 간염, 알코올성 간경변, 급성 간부전, 간암 및 지방간으로 이루어진 군에서 선택되는 질환인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 15] 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 암, 대사질환, 면역계 질환 또는 간 질환 진단 키트.
- [청구항 16] 제 15항에 있어서,  
상기 키트는 효소면역분석(ELISA) 키트 또는 샌드위치 ELISA 키트인 것을 특징으로 하는, 진단 키트.

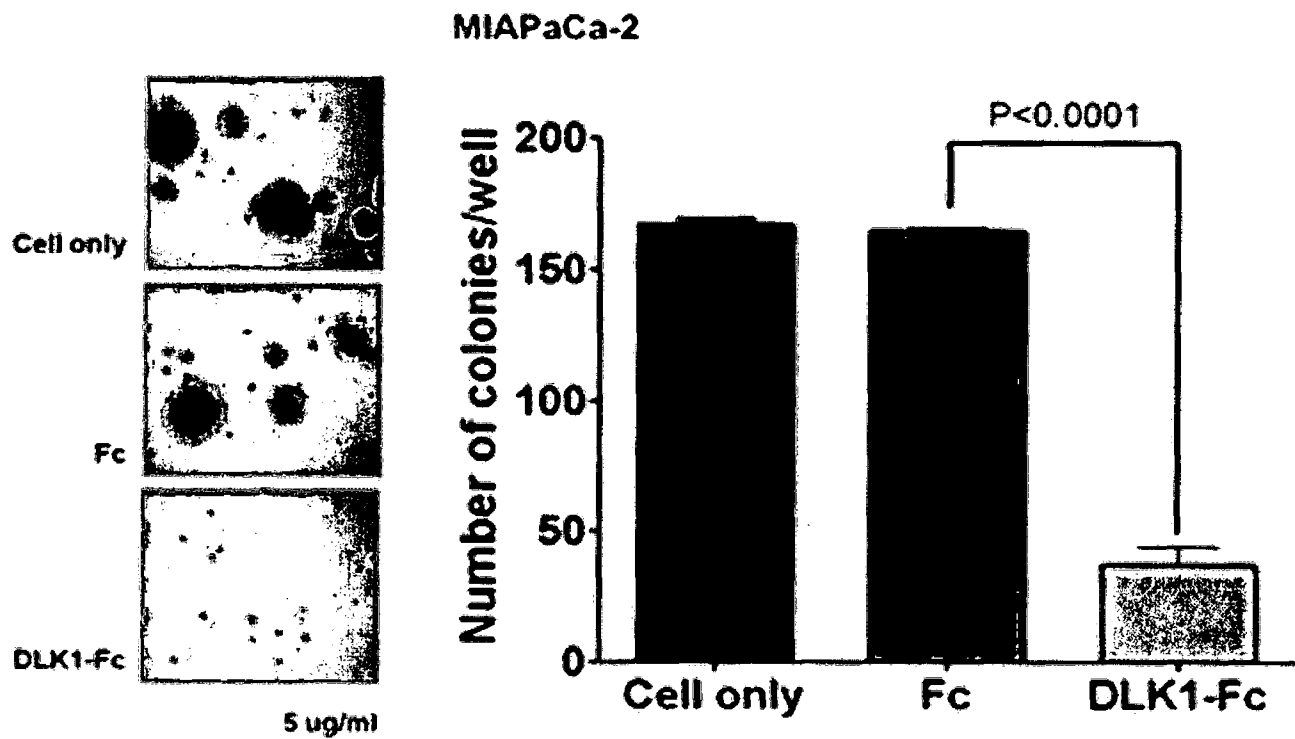
[Fig. 1]



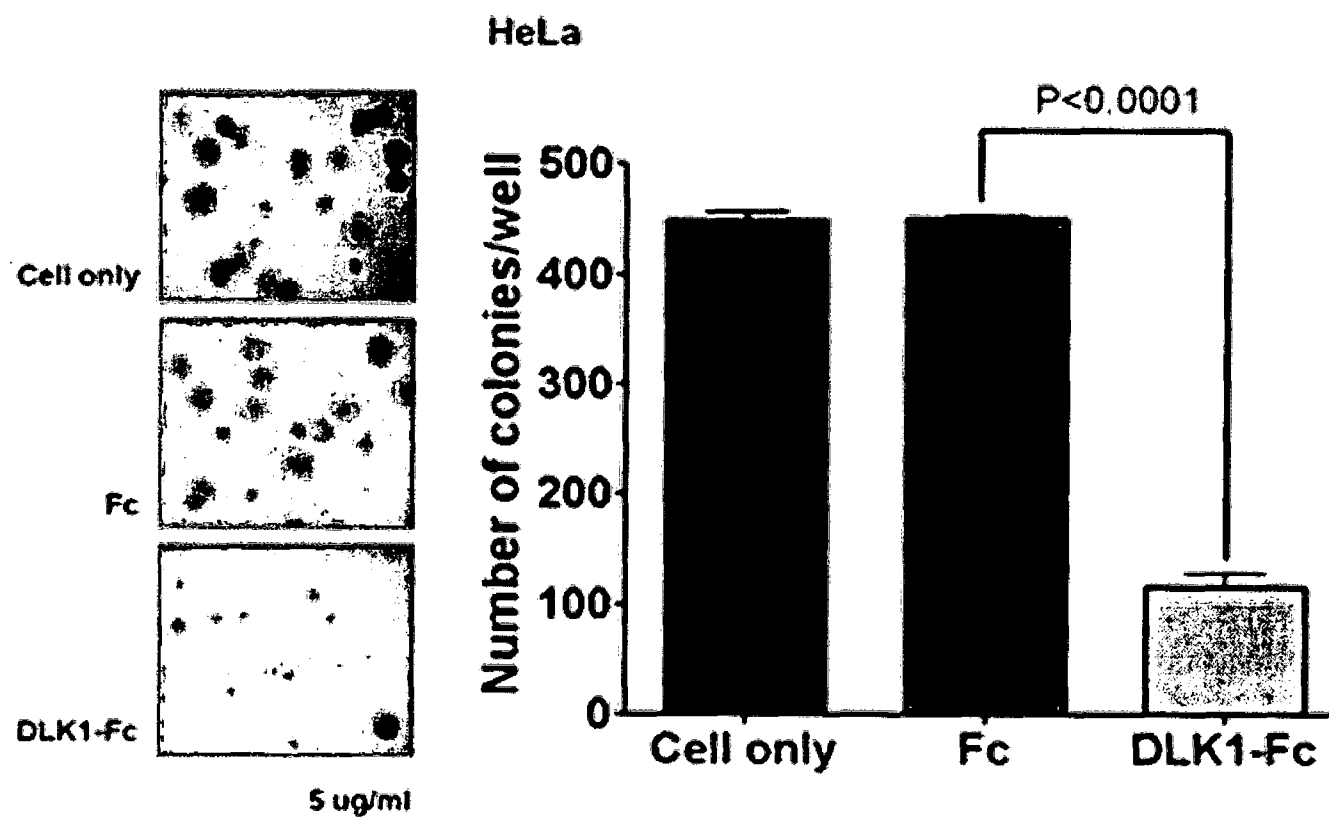
[Fig. 2]



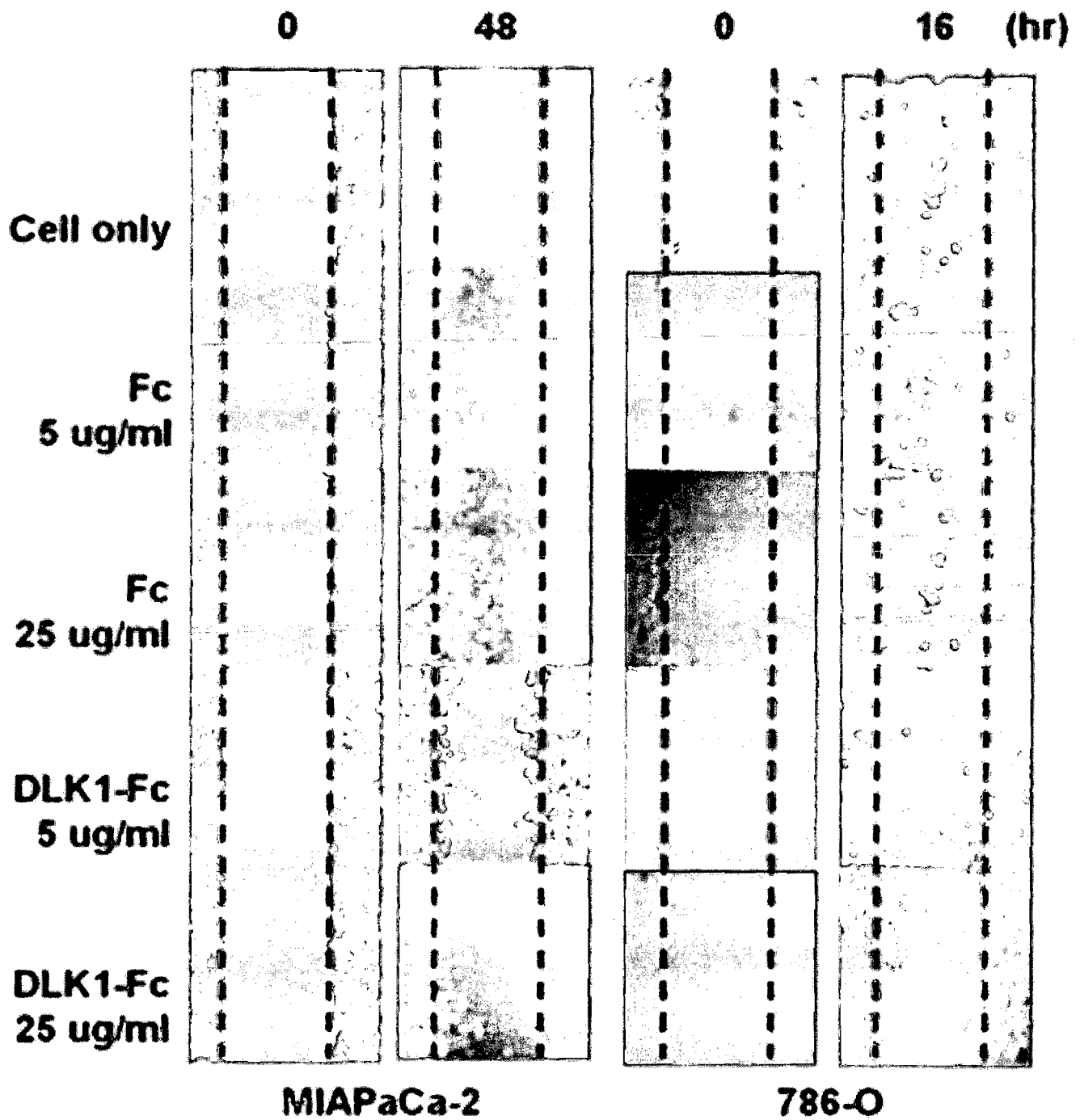
[Fig. 3]



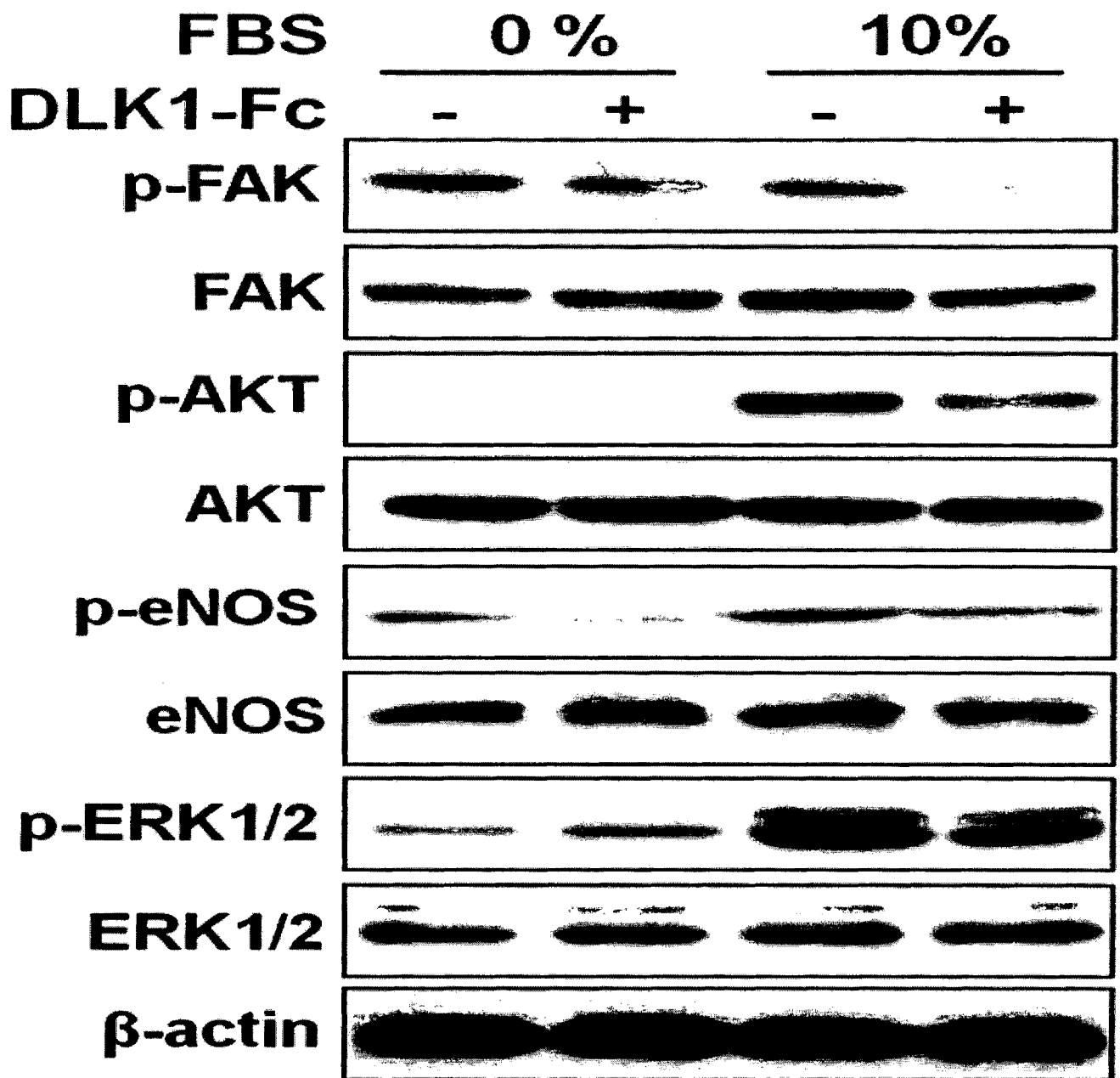
[Fig. 4]



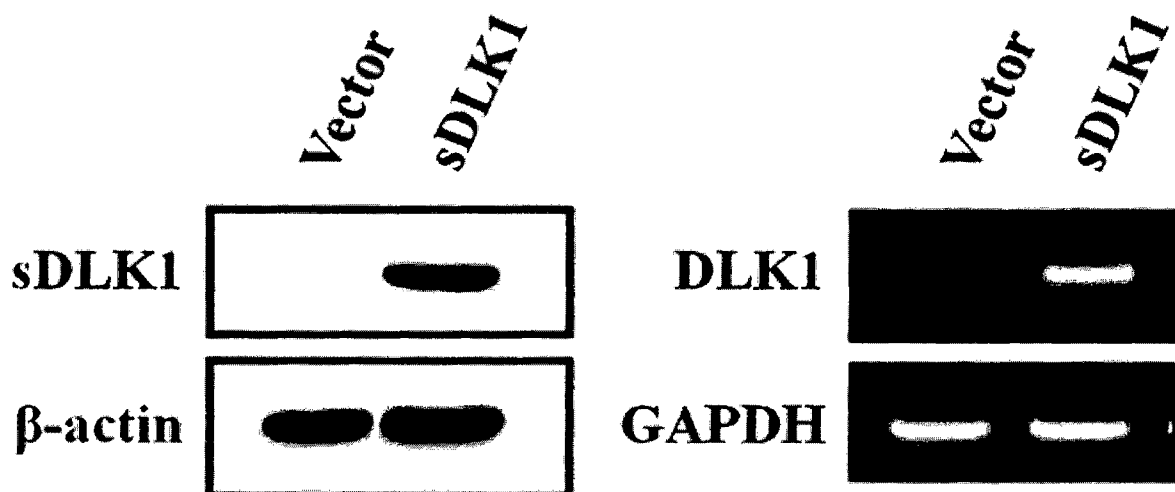
[Fig. 5]



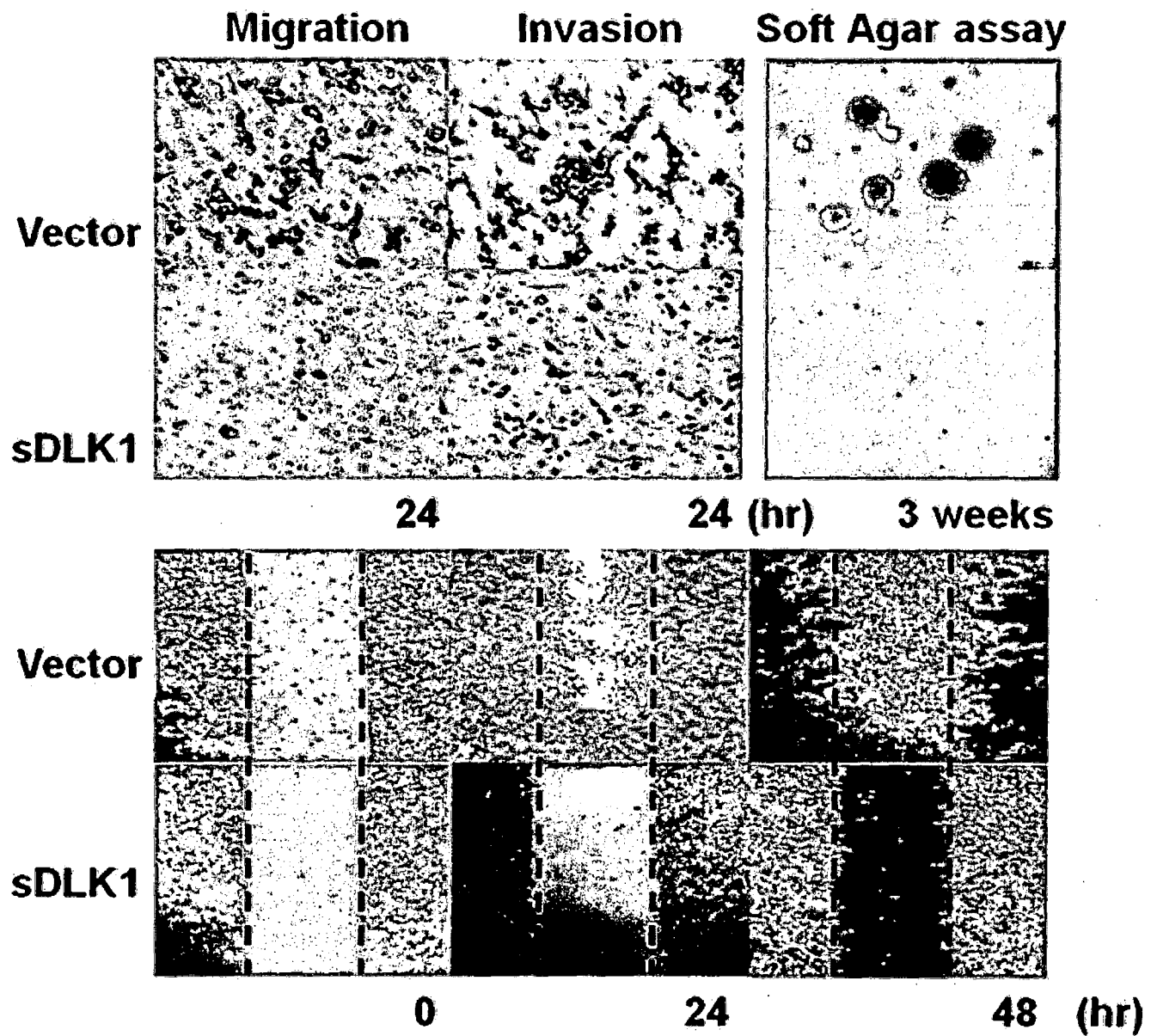
[Fig. 6]



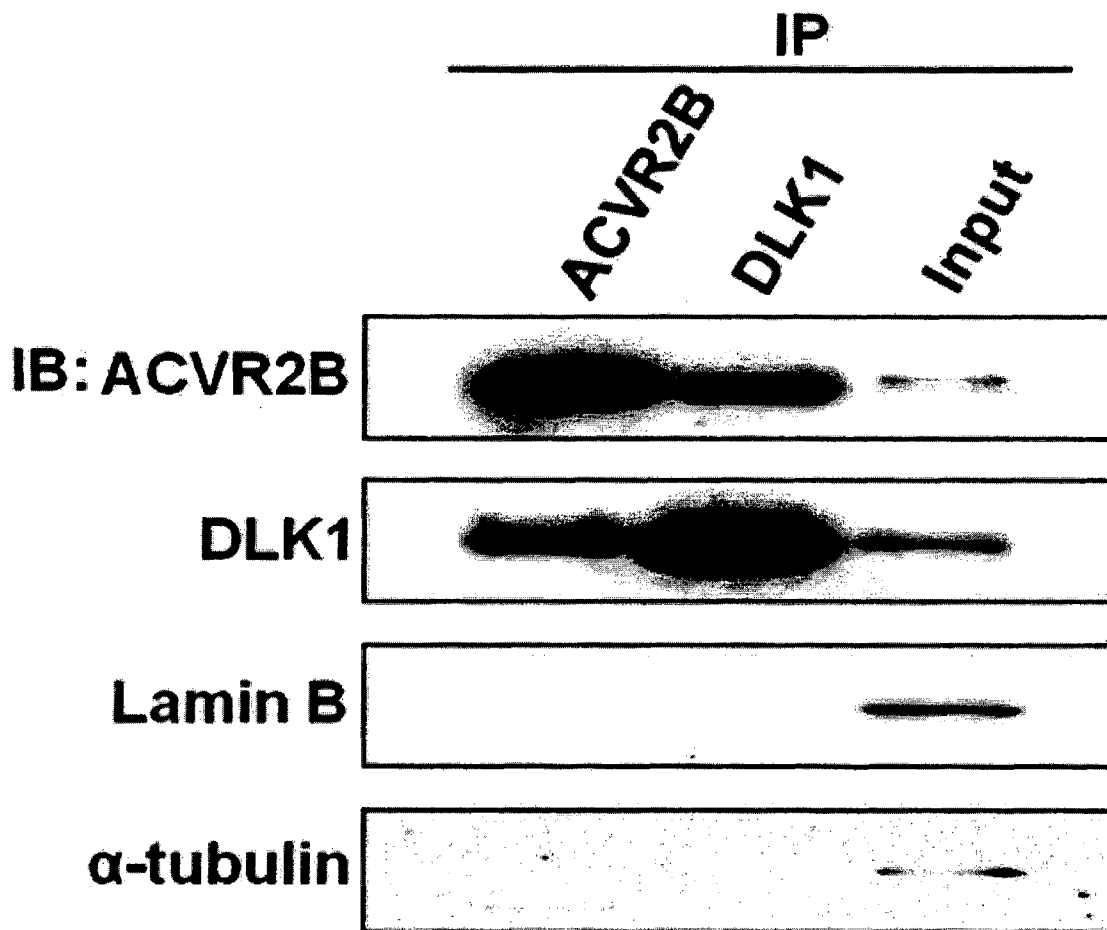
[Fig. 7]



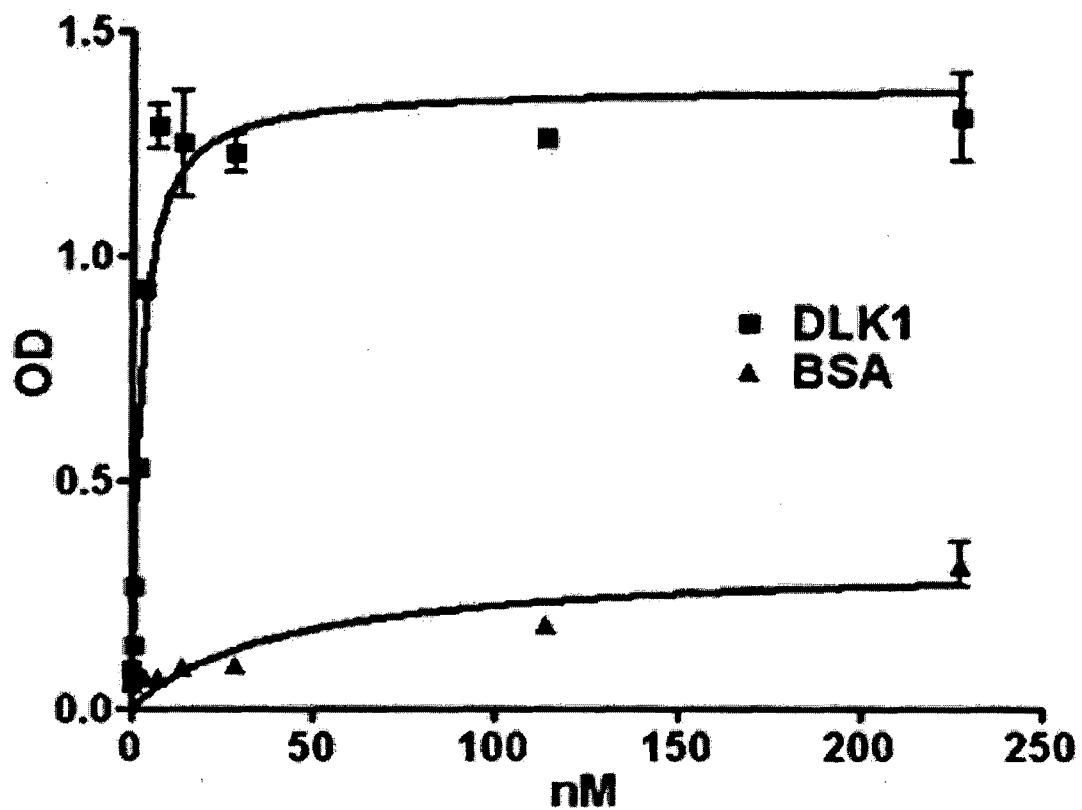
[Fig. 8]



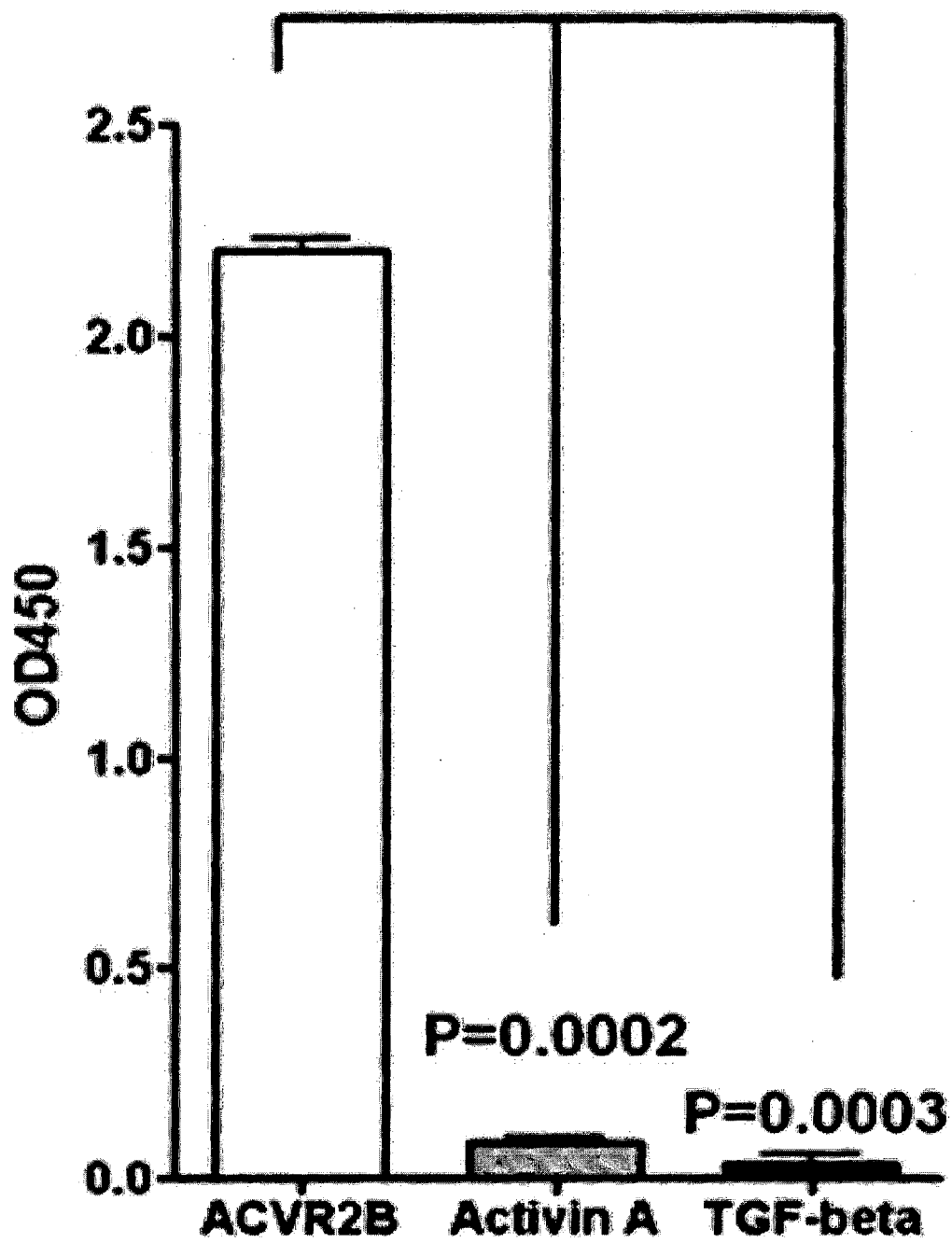
[Fig 9]



[Fig. 10]

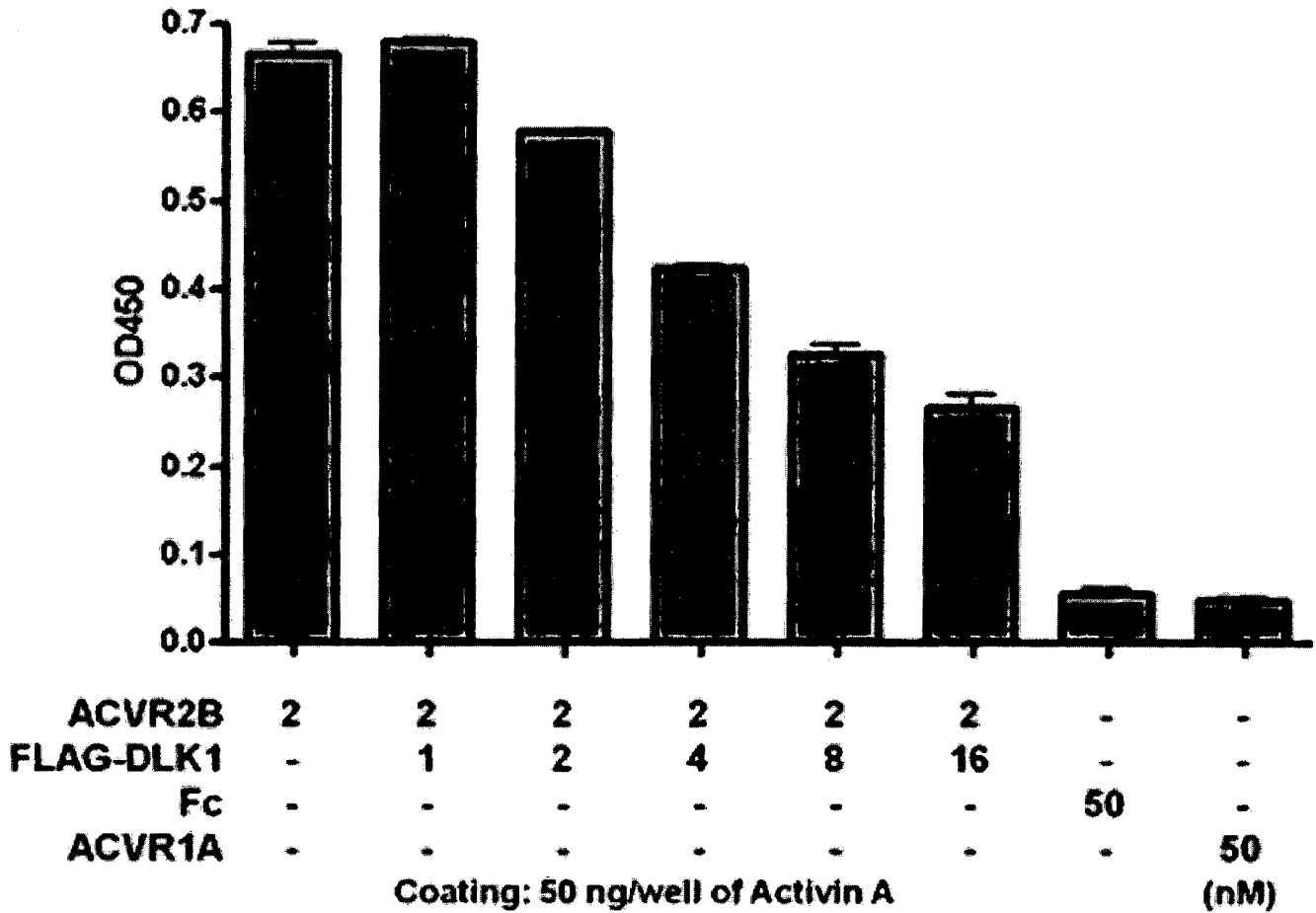


[Fig. 11]

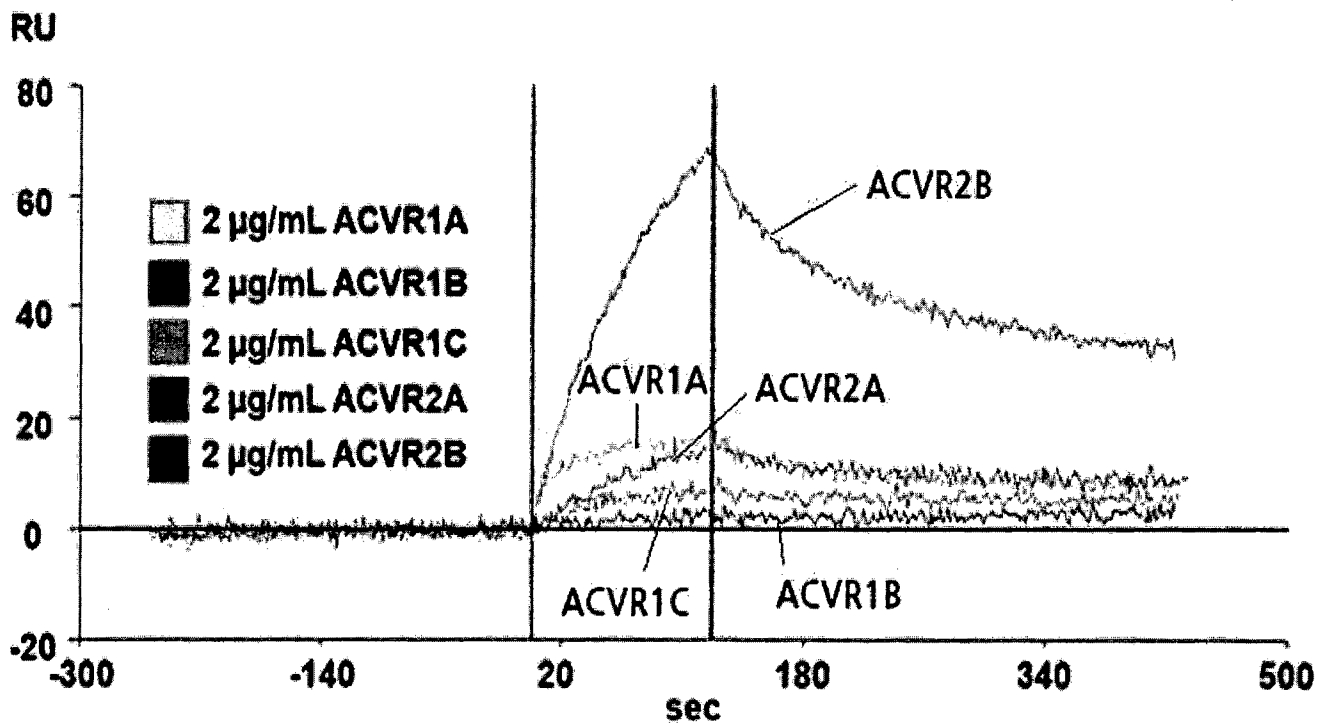


9/28

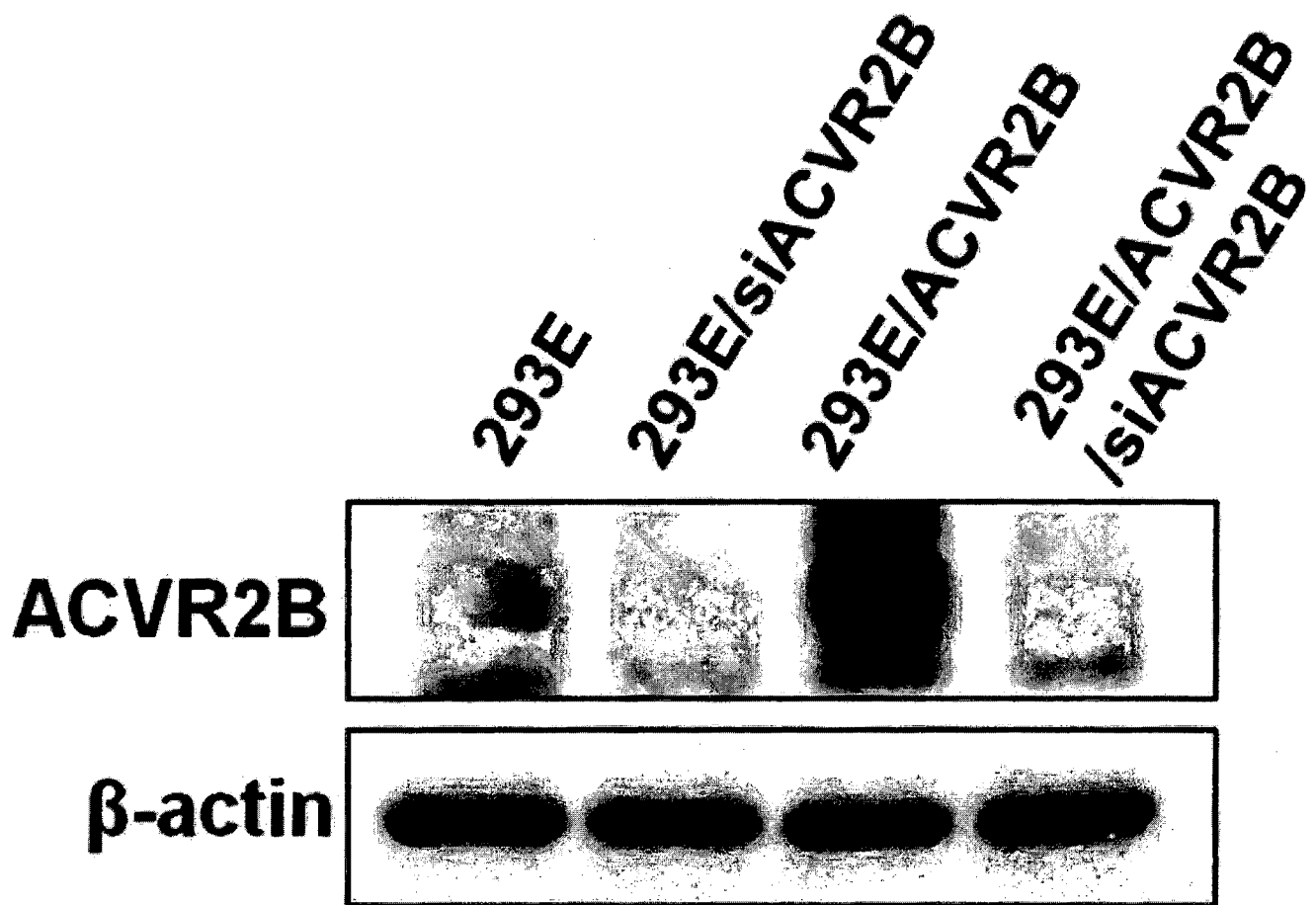
[Fig. 12]



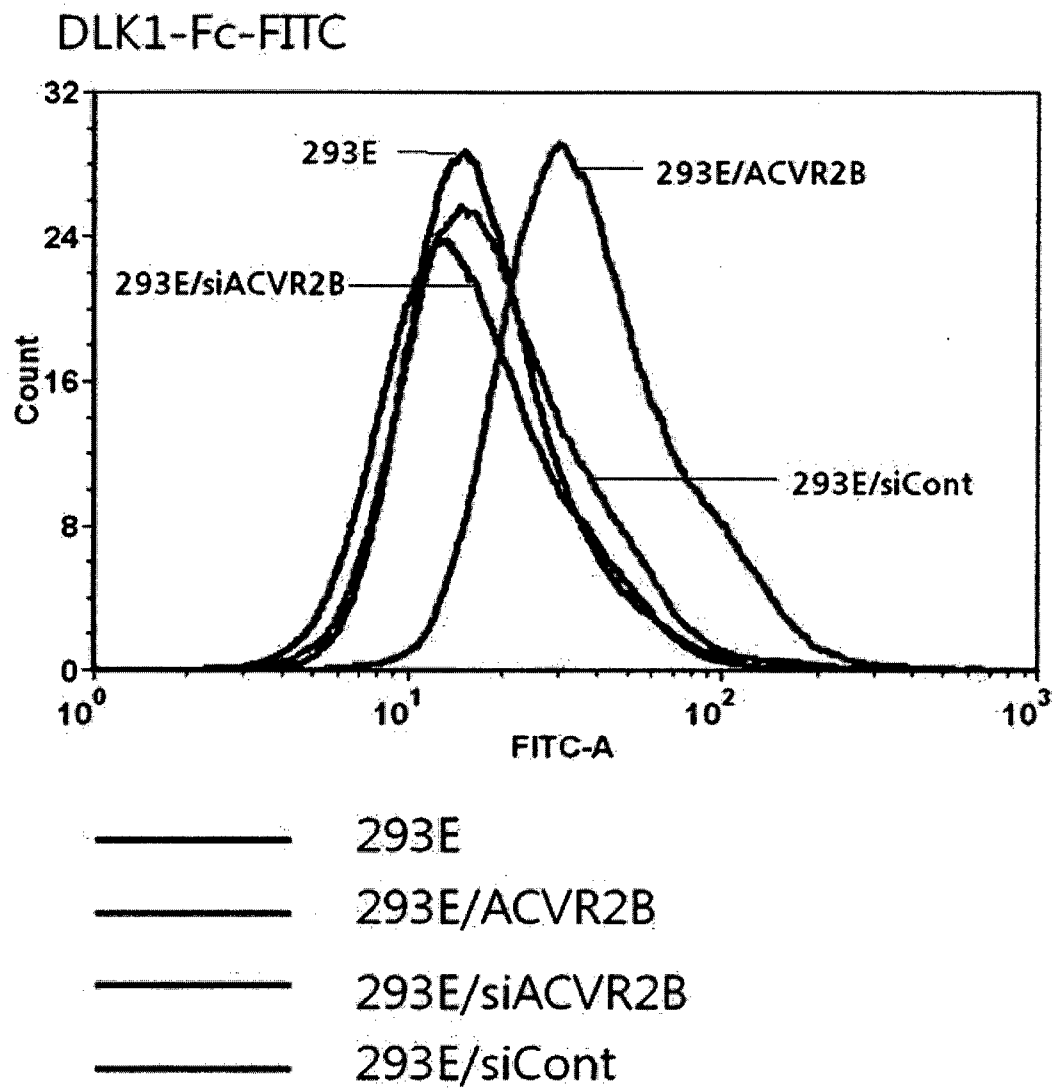
[Fig. 13]



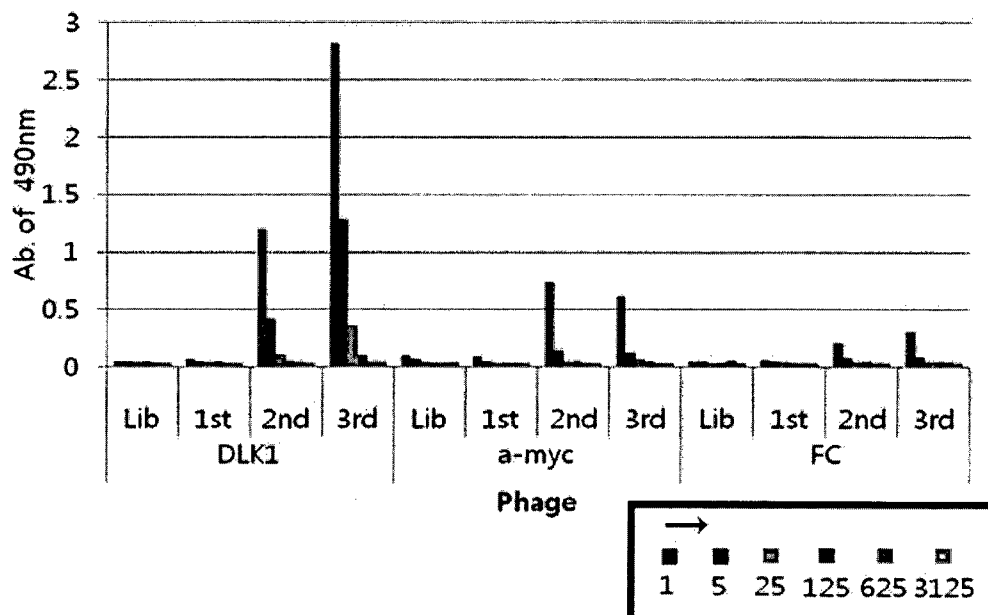
[Fig. 14]



[Fig. 15]

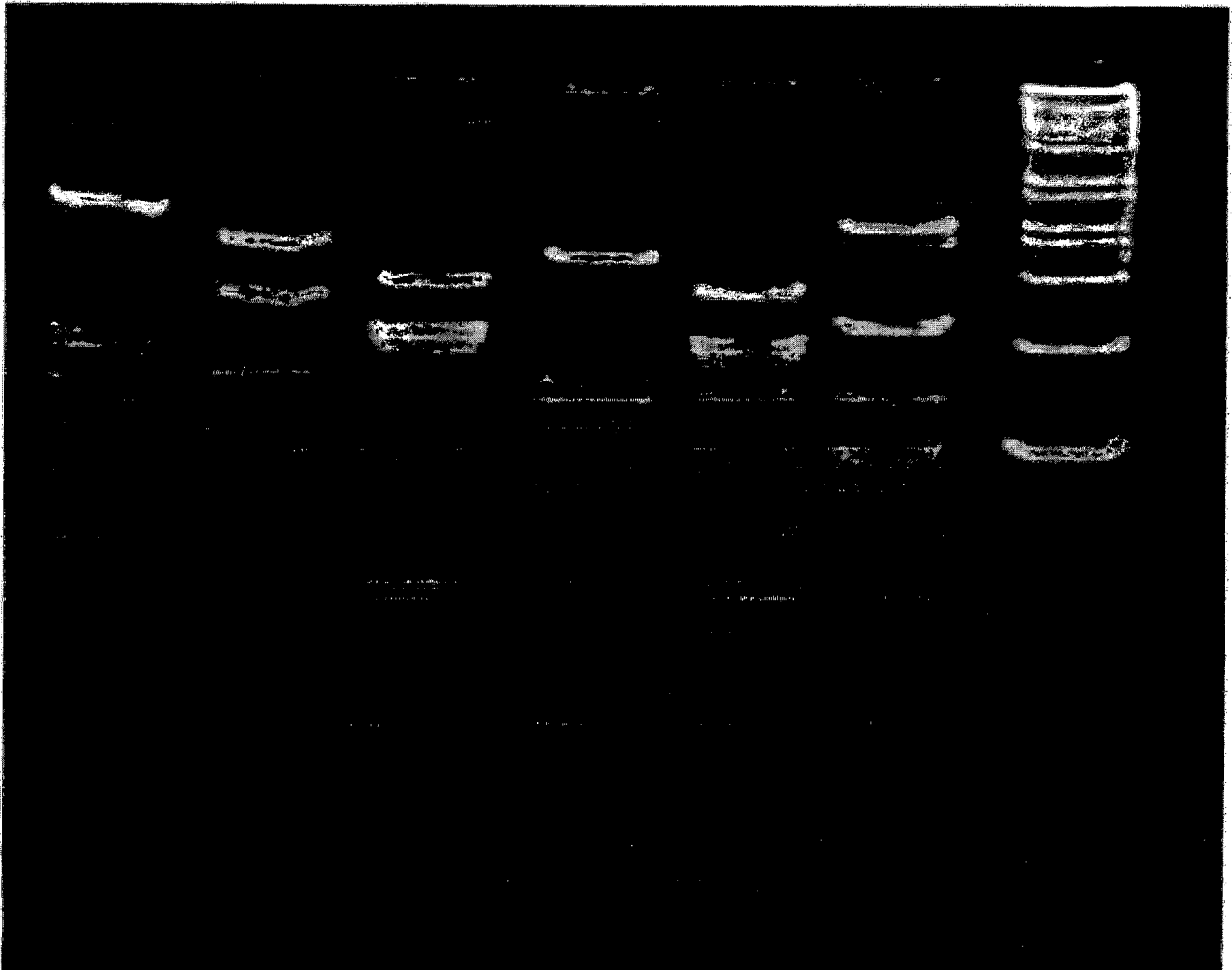


[Fig. 16]



12/28

[Fig. 17]

**A04 A05 A10 B09 H06 H12 S****S: size marker**

[Fig. 18]

|             | FR1                             | CDR1  | FR2            | CDR2              |
|-------------|---------------------------------|-------|----------------|-------------------|
| DLK1 A04 HC | QVQLVESGAEVKKPGASVKVCKASGYTFK   | DYAIH | WVRQAPGQRLWNG  | WINPGSGNTKYSHNFEG |
| DLK1 A05 HC | QMQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGFTFD | EHAMH | WVRQAPGKGLEWVS | GINWNSGKTGYADSVKG |
| DLK1 A10 HC | QVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGFTFD | DYAMH | WVRQAPGKGLEWVS | GISWNSGSIGYADSVKG |
| DLK1 B09 HC | QMQLVESGGRLVRPGGSLRLSCAASGFPT   | SYAMN | WVRQTPGKGLEWVS | TITATSGKTTYADSVKG |
| DLK1 H06 HC | QVQLVQSGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFS  | LYGMS | WVRQAPGKGLEWVS | SIPGSGTRTHYADSVKG |
| DLK1 H12 HC | QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASEFTFS  | DYYMS | WVRQAPGKGLEWLS | YISGSGITTYADSVKG  |

|             | FR3                              | CDR3              | FR4          |                                    |
|-------------|----------------------------------|-------------------|--------------|------------------------------------|
| DLK1 A04 HC | RVILTRDASANTAYLELPSLRSEDVAVYYCAR | SVSAYG---SNYFDP   | WGQGTLLITVSS | A04 HC 89.5(263/294) <u>VH1-3</u>  |
| DLK1 A05 HC | RFTISRDNKGNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK | SGGYGGN---TNWYFDL | WGRGTLVTVSS  | A05 HC 95.5(277/290) <u>VH3-9</u>  |
| DLK1 A10 HC | RFTISRDNAGNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR | GPGLATG---KGYADY  | WGQGTLLITVSS | A10 HC 98.3(287/292) <u>VH3-9</u>  |
| DLK1 B09 HC | RFTISRDNSENTEFLQMNSLRAEDTAVYYCVR | GESCSGG---ACSDFDY | WGQGTLLITVSS | B09 HC 90.5(266/294) <u>VH3-23</u> |
| DLK1 H06 HC | RFTISRDNKNTLEFLQMNSLRAEDTAVYYCAK | S-----TAYLFDY     | WGPGLVTVSS   | H06 HC 91.1(267/293) <u>VH3-23</u> |
| DLK1 H12 HC | RFTISRDNKGKSLYLEMNSLRAEDTAVYYCAR | LQGHCSGGACSNWEDA  | WGQGTLLITVSS | H12 HC 94.9(279/294) <u>VH3-11</u> |

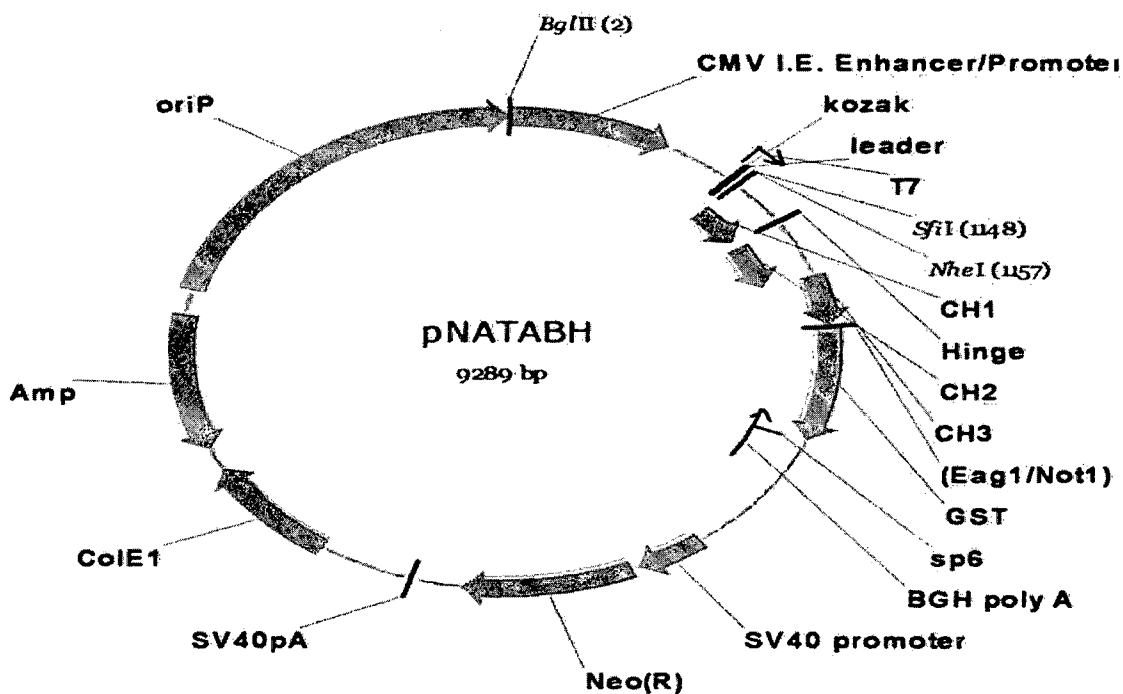
  

|             | FR1                     | CDR1           | FR2             | CDR2    |
|-------------|-------------------------|----------------|-----------------|---------|
| DLK1 A04 LC | DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC  | QASQD---ISNYLN | WYQQKPGKAPKLLIY | STSNLQS |
| DLK1 A05 LC | QFVLTQ-PPSVSGAPQNVITISC | IGTSSNIGVGVDVH | WYQQVPGTAPKLLVY | GNNNRPS |
| DLK1 A10 LC | DIQMTQSPSSVSASVGDRTTTC  | RASQR---ISSWLA | WYQQKPGKAPKLLIH | SASTLHN |
| DLK1 B09 LC | QLVLTQ-PASVSGSPGQSVTISC | TGTSSDIGRYNRVS | WYQHHPGKAPKLLIN | DVTTRPS |
| DLK1 H06 LC | DIQMTQSPATLSLSPGERATLSC | RASQS---IRHYLA | WYQQKPGQAPRLIH  | GASSRAT |
| DLK1 H12 LC | DIQMTQSPSSLSASVGDRLTITC | RASQS---ILTYLN | WYQQKPGKAPKLLIY | AASSLQR |

|             | FR3                              | CDR3      | FR4            |                                   |
|-------------|----------------------------------|-----------|----------------|-----------------------------------|
| DLK1 A04 LC | GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC  | QQINS-YPL | TFGGGTQVDIKRGG | A04 LC 93.7(268/286) <u>L8</u>    |
| DLK1 A05 LC | GVPDFRFGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC | QSYDSRLGV | VFGGGLTLTVLGGG | A05 LC 93.6(276/295) <u>V1-13</u> |
| DLK1 A10 LC | GVPSRFGSGASGTDFTLTISSLQPEDYAIYYC | QQGHS-FPY | TFGQGTLEIKRGG  | A10 LC 94.4(268/284) <u>L5</u>    |
| DLK1 B09 LC | GFSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYSC | GSYAGSYTY | VFGTGTQVTVLGGG | B09 LC 92.3(263/285) <u>V1-4</u>  |
| DLK1 H06 LC | GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC | QHYGS-PLH | SFGPGTKVEIKRGG | H06 LC 94.5(257/272) <u>A27</u>   |
| DLK1 H12 LC | GVPSRFGSGSGTDFTLTISGLQPEDFATYYC  | QQGYG-TFY | TFGQGTQVDIKRGG | H12 LC 95.8(272/284) <u>O12</u>   |

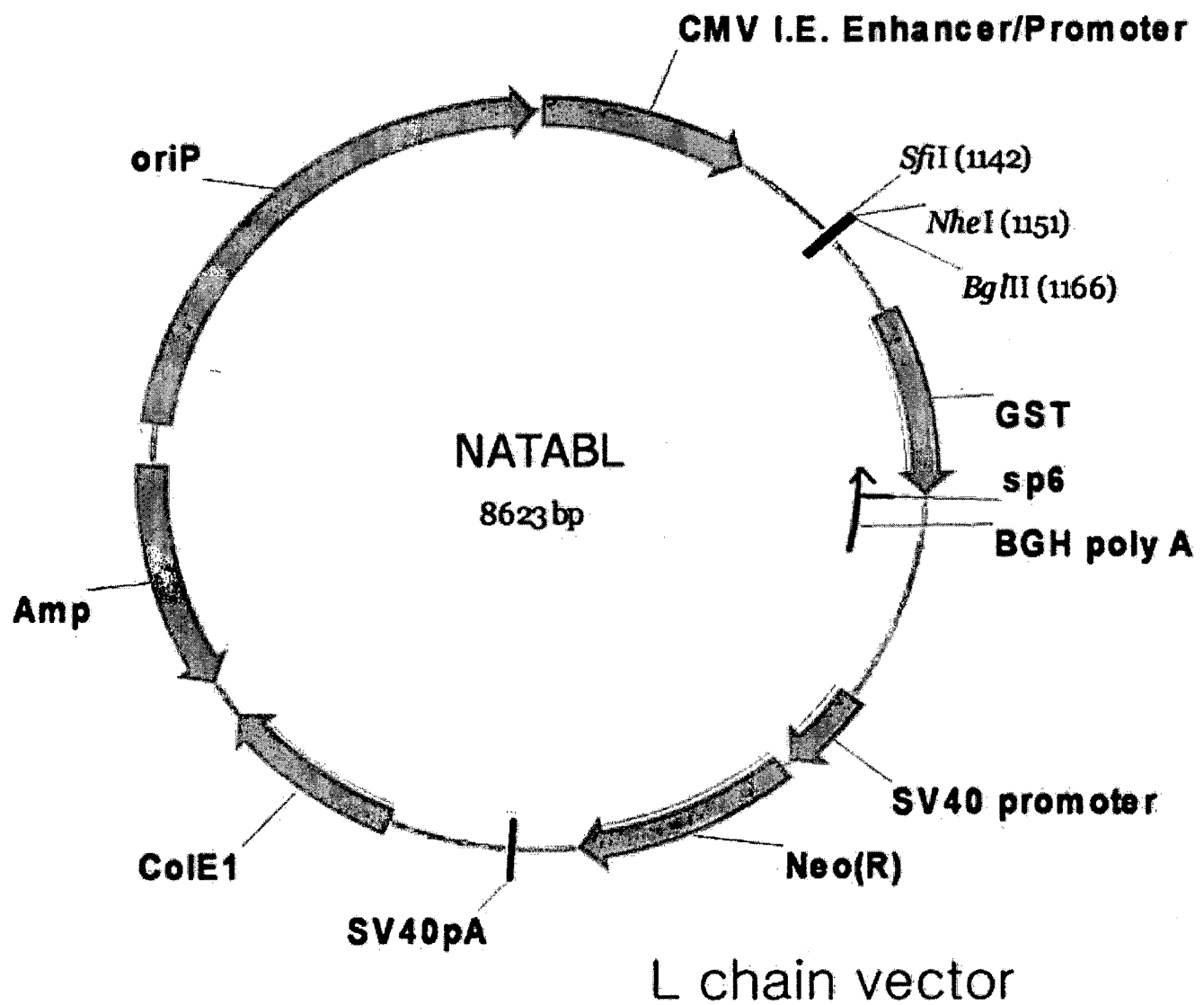
[Fig. 19]



H chain vector

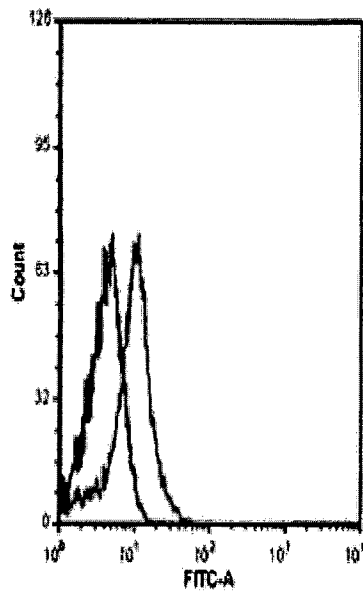
정정용지 (규칙 제91조) ISA/KR

[Fig. 20]

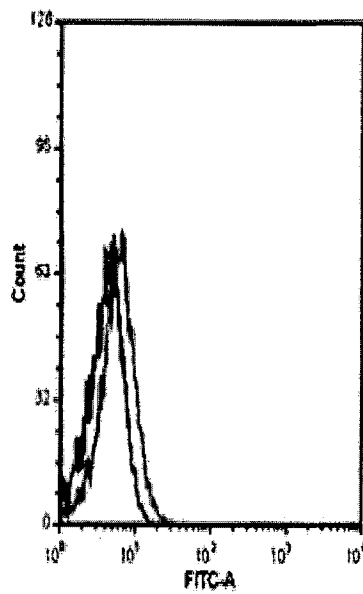


[Fig. 21]

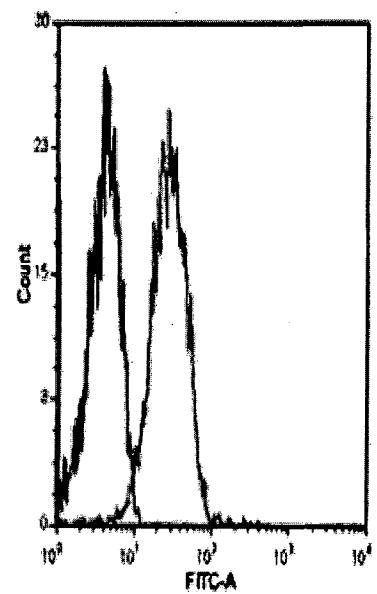
Cell: 293E



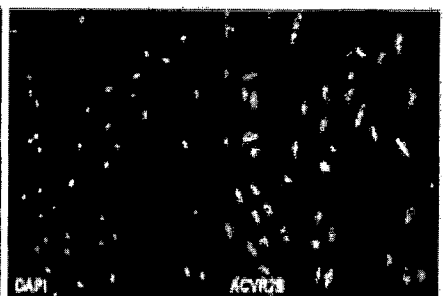
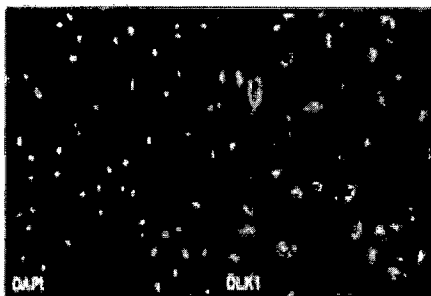
B09



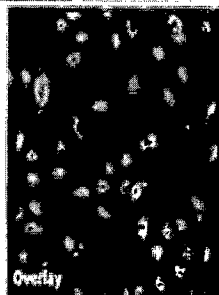
α-DLK1  
R&D mAb  
mAb1144



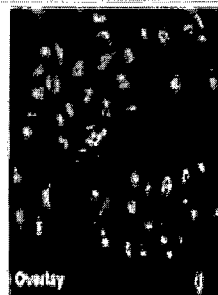
α-ACVR2B  
R&D mAb  
AF339



α-DLK1  
B09



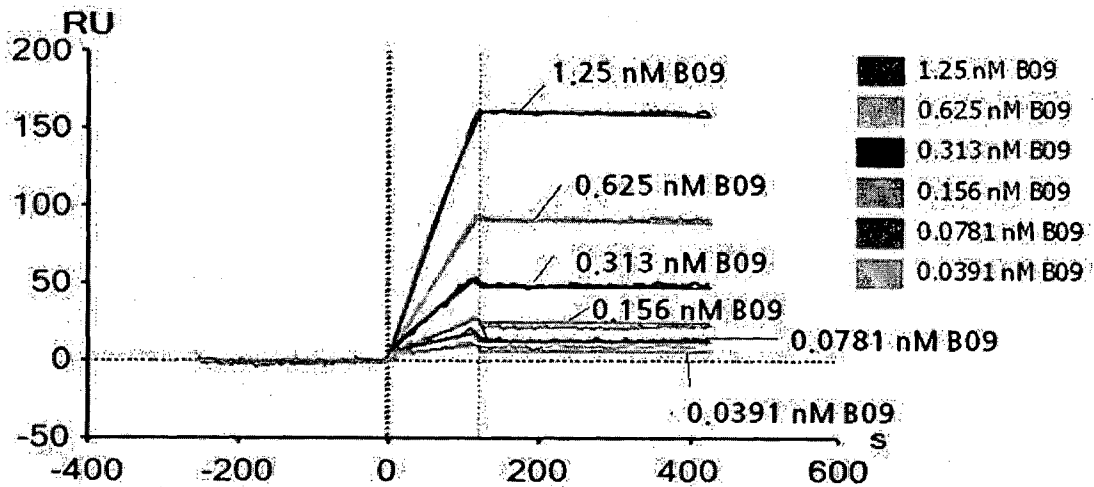
α-DLK1  
R&D mAb  
mAb1144



α-ACVR2B  
R&D mAb  
AF339

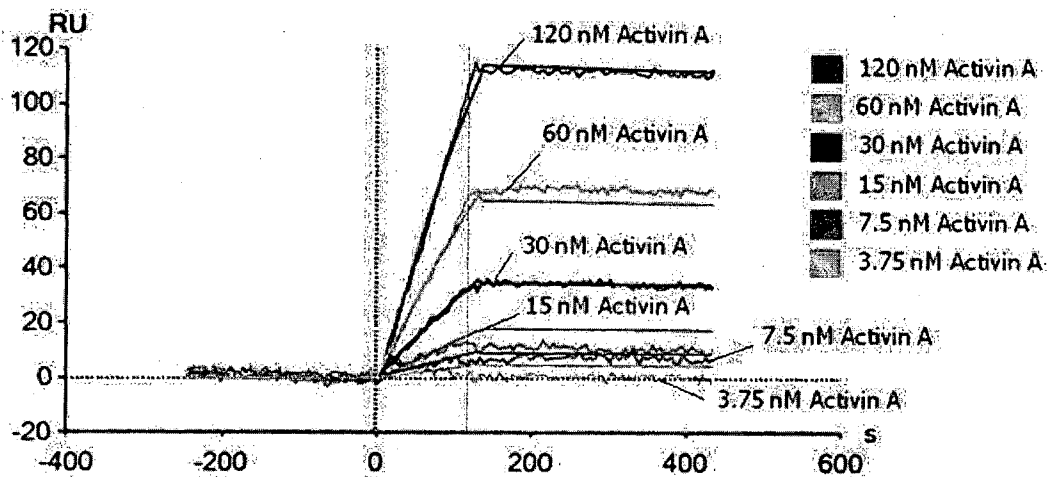


[Fig. 22]



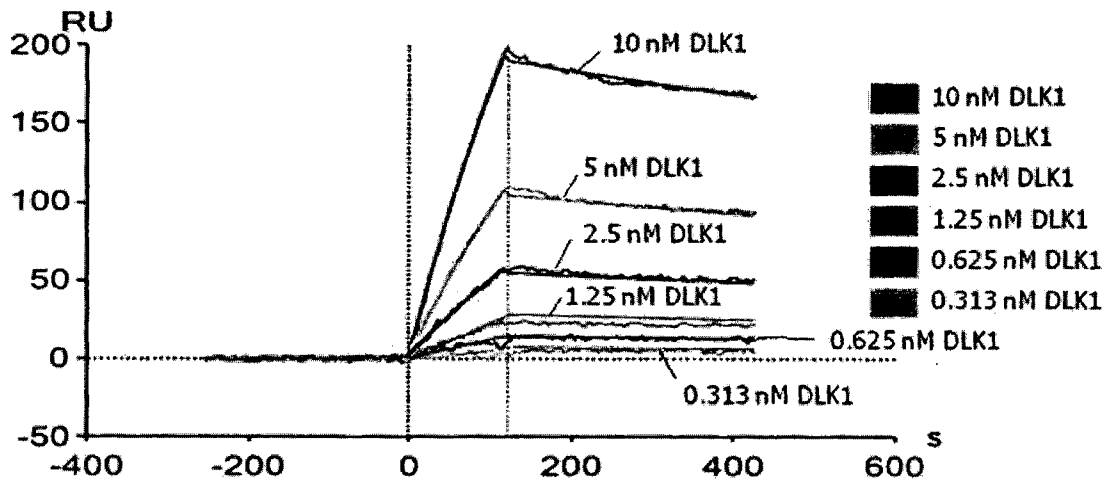
| Parameter          | $k_a$    | $k_d$    | $K_D$        | $R_{max}$ | Concentration | $t_0$ Association | $t_0$ Dissociation | RI     | Chi2 |
|--------------------|----------|----------|--------------|-----------|---------------|-------------------|--------------------|--------|------|
| Units              | 1/Ms     | 1/s      |              | RU        | M             | s                 | s                  | RU     | RU   |
| Scope              | Grouped  | Grouped  | Auto Defined | Grouped   | Local         | Local             | Local              | Local  |      |
| Type               | Fitted   | Fitted   | Fitted       | Fitted    | Constant      | Constant          | Constant           | Fitted | N/A  |
| Kinetic - Langmuir |          |          |              |           |               |                   |                    |        |      |
| □-L5-33_B09        | 3.41E+06 | 6.49E-05 | 1.90E-11     | 407       |               |                   |                    |        | 2.98 |
| -A1 33_B09         |          |          |              |           | 1.25E-09      | 0                 | 120                | -3.32  |      |
| -A2 33_B09         |          |          |              |           | 6.25E-10      | 0                 | 120                | 1.86   |      |
| -A3 33_B09         |          |          |              |           | 3.13E-10      | 0                 | 120                | 6.36   |      |
| -A4 33_B09         |          |          |              |           | 1.56E-10      | 0                 | 120                | 3.1    |      |
| -A5 33_B09         |          |          |              |           | 7.81E-11      | 0                 | 120                | 5.75   |      |
| -A6 33_B09         |          |          |              |           | 3.91E-11      | 0                 | 120                | 4.07   |      |

[Fig. 23]



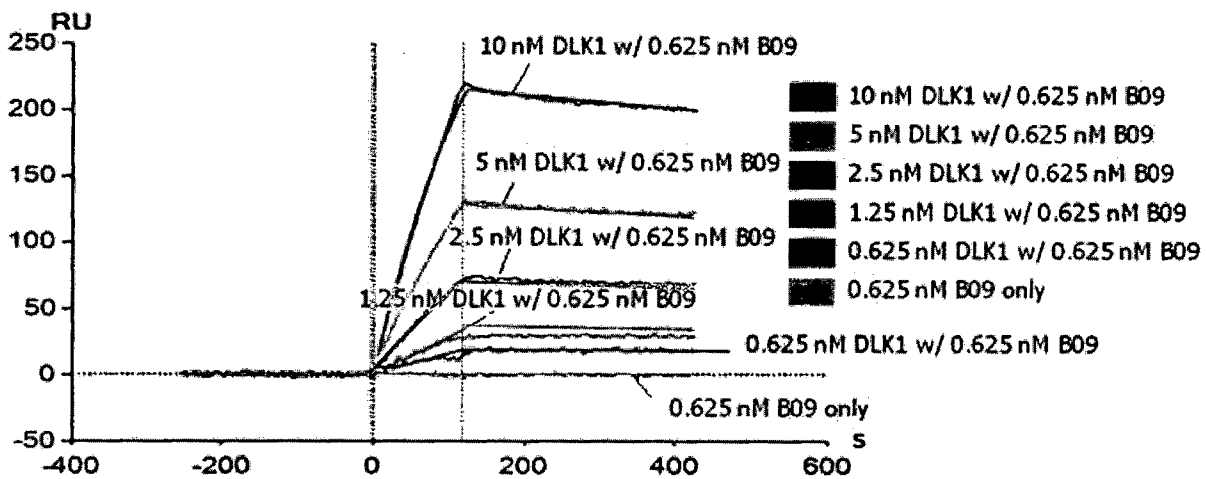
| Parameter            | $k_a$    | $k_d$    | $K_D$        | $R_{max}$ | Concentration | $t_0$ Association | $t_0$ Dissociation | RI        | Chi2 |
|----------------------|----------|----------|--------------|-----------|---------------|-------------------|--------------------|-----------|------|
| Units                | 1/Ms     | 1/s      |              | RU        | M             | s                 | s                  | RU        | RU   |
| Scope                | Grouped  | Grouped  | Auto Defined | Grouped   | Local         | Local             | Local              | Local     |      |
| Type                 | Fitted   | Fitted   | Fitted       | Fitted    | Constant      | Constant          | Constant           | Fitted    | N/A  |
| Kinetic - Langmuir.1 |          |          |              |           |               |                   |                    |           |      |
| □-L6-19_activin      | 3.60E+04 | 7.08E-05 | 1.96E-09     | 271       |               |                   |                    |           | 12.8 |
| -A1                  |          |          |              |           | 1.20E-07      | 5.32              | 132                | -4.64     |      |
| -A2                  |          |          |              |           | 6.00E-08      | 5.32              | 132                | 2.48      |      |
| -A3                  |          |          |              |           | 3.00E-08      | 5.32              | 132                | 1.49      |      |
| -A4                  |          |          |              |           | 1.50E-08      | 5.32              | 132                | -4.49E-01 |      |
| -A5                  |          |          |              |           | 7.50E-09      | 5.32              | 132                | 6.16E-01  |      |
| -A6                  |          |          |              |           | 3.75E-09      | 5.32              | 132                | 2.10E-01  |      |

[Fig. 24]



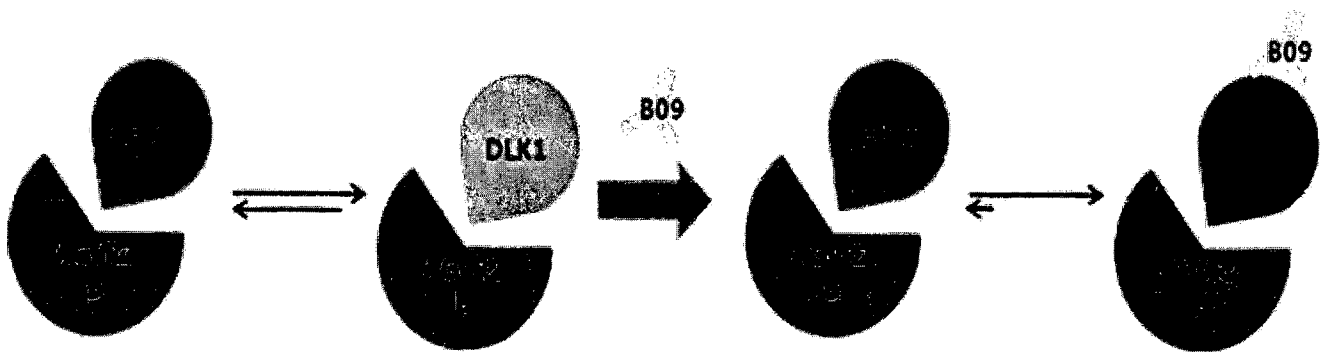
| Parameter          | $k_a$    | $k_d$    | $K_D$        | $R_{max}$ | Concentration | $t_0$ Association | $t_0$ Dissociation | $R_I$     | $\chi^2$ |
|--------------------|----------|----------|--------------|-----------|---------------|-------------------|--------------------|-----------|----------|
| Units              | 1/Ms     | 1/s      |              | RU        | M             | s                 | s                  | RU        | RU       |
| Scope              | Grouped  | Grouped  | Auto Defined | Grouped   | Local         | Local             | Local              | Local     |          |
| Type               | Fitted   | Fitted   | Fitted       | Fitted    | Constant      | Constant          | Constant           | Fitted    | N/A      |
| Kinetic - Langmuir |          |          |              |           |               |                   |                    |           |          |
| L6 - "40_DLK1-Fc"  | 3.31E+05 | 4.34E-04 | 1.31E-09     | 603       |               |                   |                    |           | 5.26     |
| A1 40_DLK1-Fc      |          |          |              |           | 1.00E-08      | 3.00E-02          | 118                | 5.66      |          |
| A2 40_DLK1-Fc      |          |          |              |           | 5.00E-09      | 3.00E-02          | 118                | 5.47      |          |
| A3 40_DLK1-Fc      |          |          |              |           | 2.50E-09      | 3.00E-02          | 118                | 3.68      |          |
| A4 40_DLK1-Fc      |          |          |              |           | 1.25E-09      | 3.00E-02          | 118                | -1.35     |          |
| A5 40_DLK1-Fc      |          |          |              |           | 6.25E-10      | 3.00E-02          | 118                | -9.35E-02 |          |
| A6 40_DLK1-Fc      |          |          |              |           | 3.13E-10      | 3.00E-02          | 118                | -1.38     |          |

[Fig. 25]

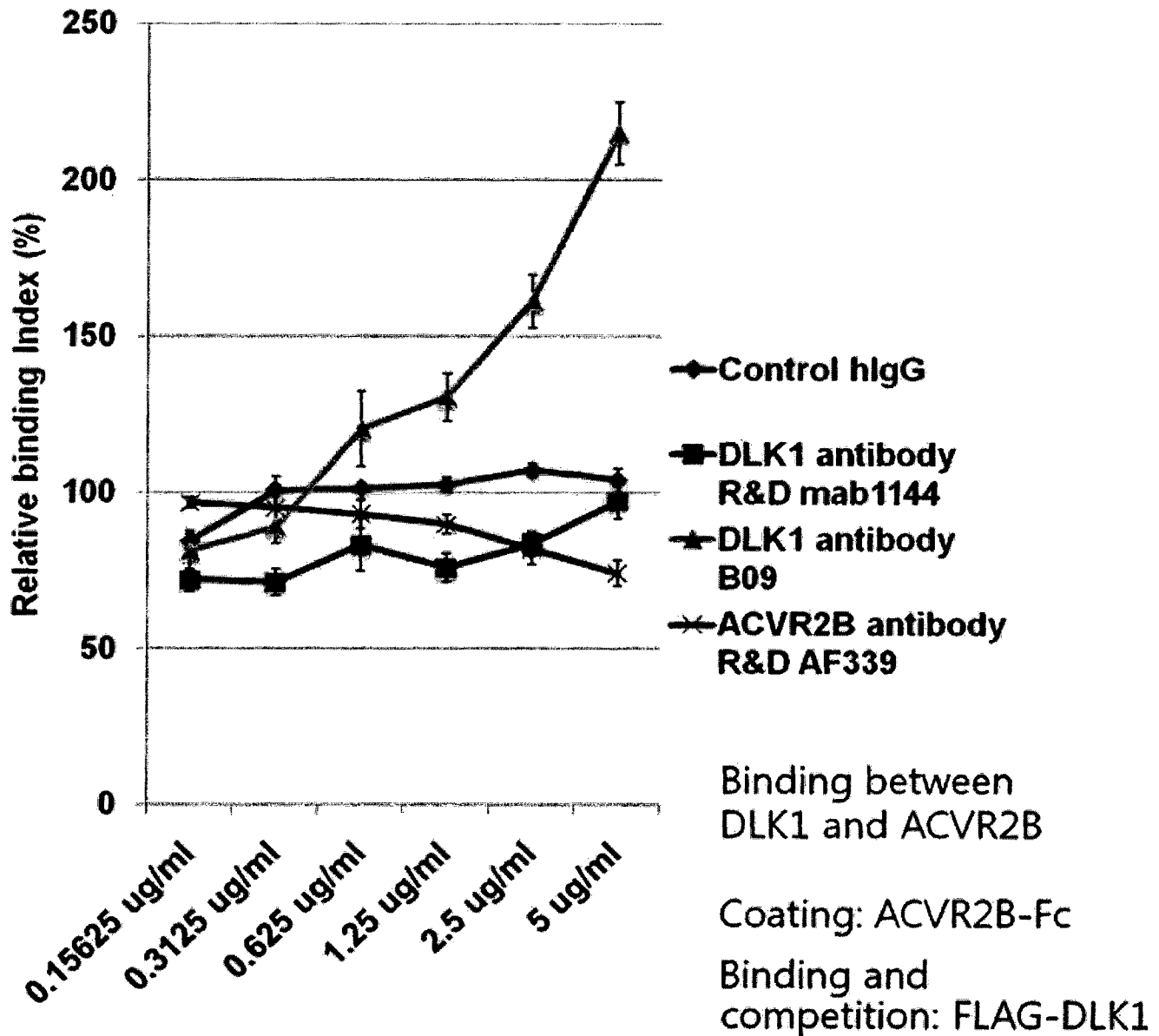


| Parameter             | $k_a$    | $k_d$    | $K_D$        | $R_{max}$ | Concentration | $t_0$ Association | $t_0$ Dissociation | $R_I$     | $\chi^2$ |
|-----------------------|----------|----------|--------------|-----------|---------------|-------------------|--------------------|-----------|----------|
| Units                 | 1/Ms     | 1/s      |              | RU        | M             | s                 | s                  | RU        | RU       |
| Scope                 | Grouped  | Grouped  | Auto Defined | Grouped   | Local         | Local             | Local              | Local     |          |
| Type                  | Fitted   | Fitted   | Fitted       | Fitted    | Constant      | Constant          | Constant           | Fitted    | N/A      |
| Kinetic - Langmuir    |          |          |              |           |               |                   |                    |           |          |
| L6 - "46_DLK1-Fc/B09" | 6.26E+05 | 2.55E-04 | 4.07E-10     | 409       |               |                   |                    |           | 8.74     |
| A1 46_DLK1-Fc/B09     |          |          |              |           | 1.00E-08      | 0                 | 122                | -1.06     |          |
| A2 46_DLK1-Fc/B09     |          |          |              |           | 5.00E-09      | 0                 | 122                | 4.28      |          |
| A3 46_DLK1-Fc/B09     |          |          |              |           | 2.50E-09      | 0                 | 122                | 3.13      |          |
| A4 46_DLK1-Fc/B09     |          |          |              |           | 1.25E-09      | 0                 | 122                | -2.24     |          |
| A5 46_DLK1-Fc/B09     |          |          |              |           | 6.25E-10      | 0                 | 122                | -7.91E-02 |          |
| A6 46_DLK1-Fc/B09     |          |          |              |           | 0             | 0                 | 122                | -2.14E-01 |          |

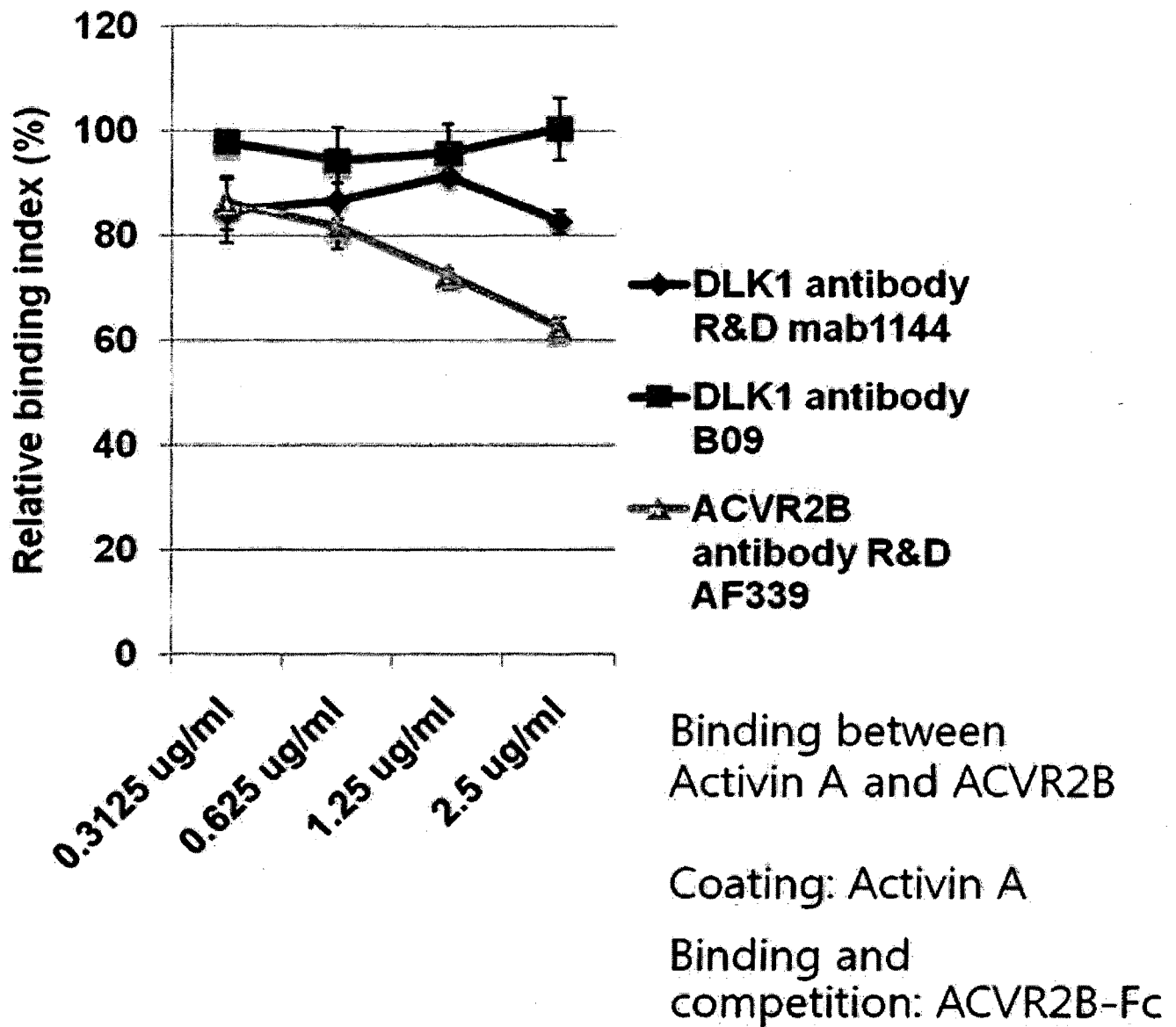
[Fig. 26]



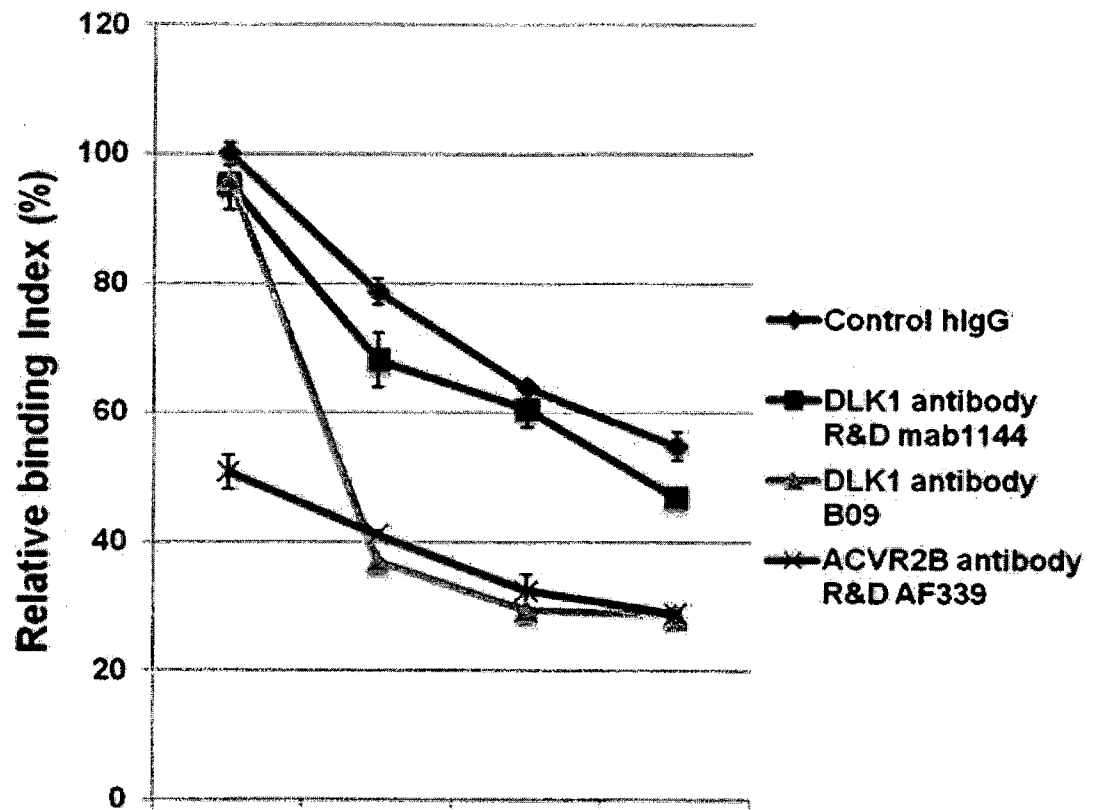
[Fig. 27]



[Fig. 28]

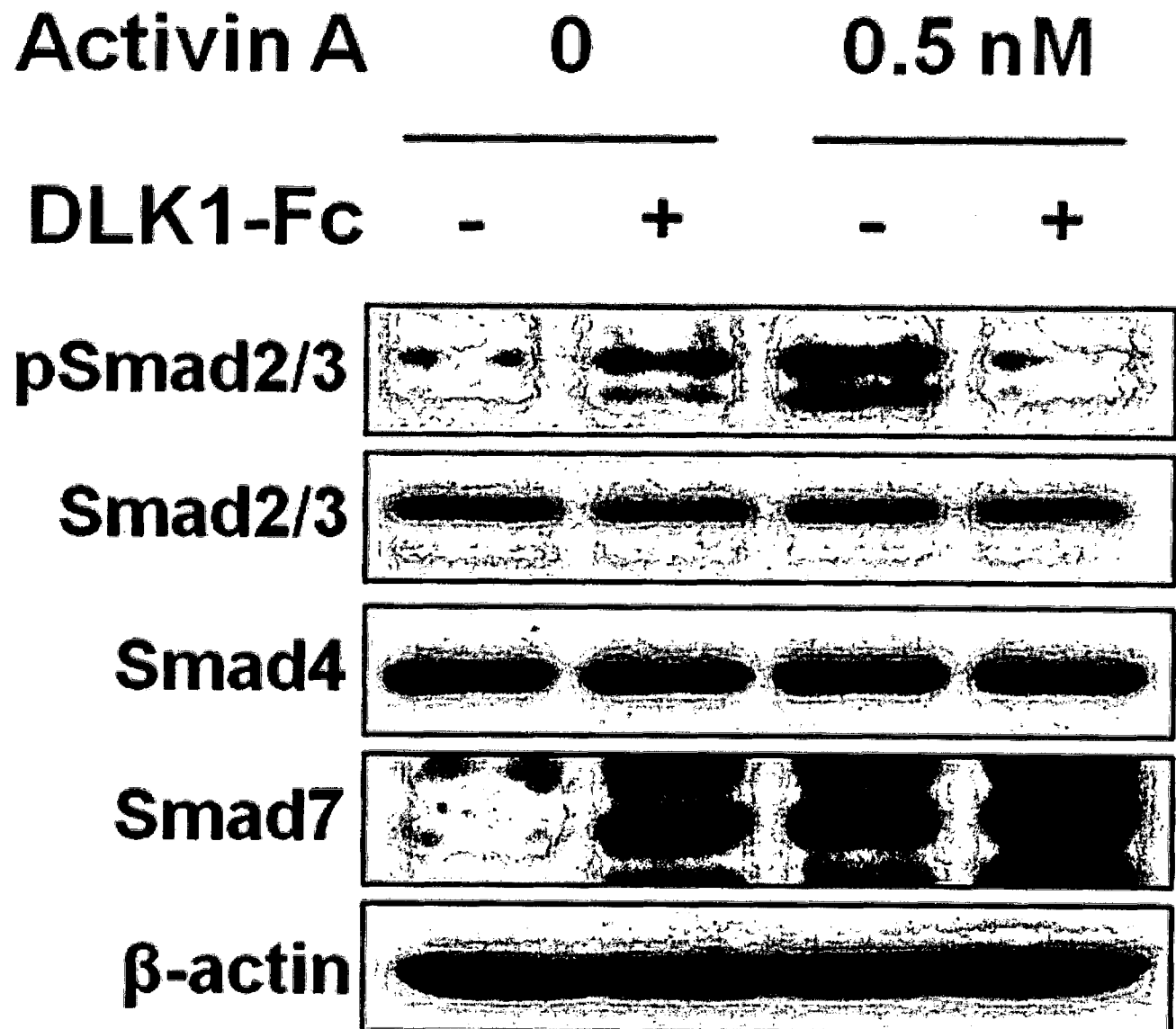


[Fig. 29]



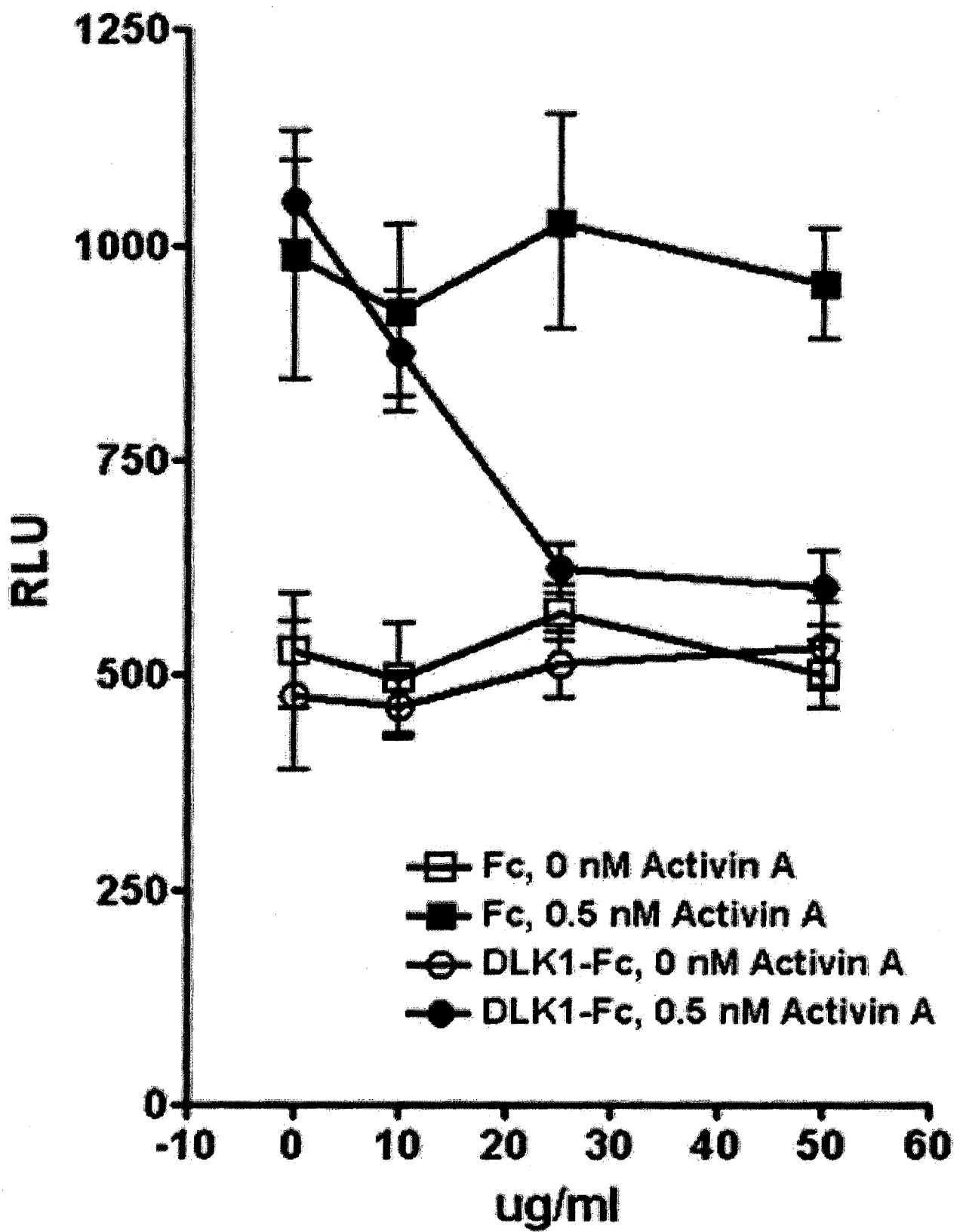
|                    |     |      |     |             |
|--------------------|-----|------|-----|-------------|
| Coating: Activin A | 200 | 200  | 200 | 200 (ng/ml) |
| Binding: ACVR2B-Fc | 100 | 100  | 100 | 100 (ng/ml) |
| Binding: Antibody  | 1   | 1    | 1   | 1 (ug/ml)   |
| Binding: DLK1-Fc   | 0   | 1.25 | 2.5 | 5 (ug/ml)   |

[Fig. 30]

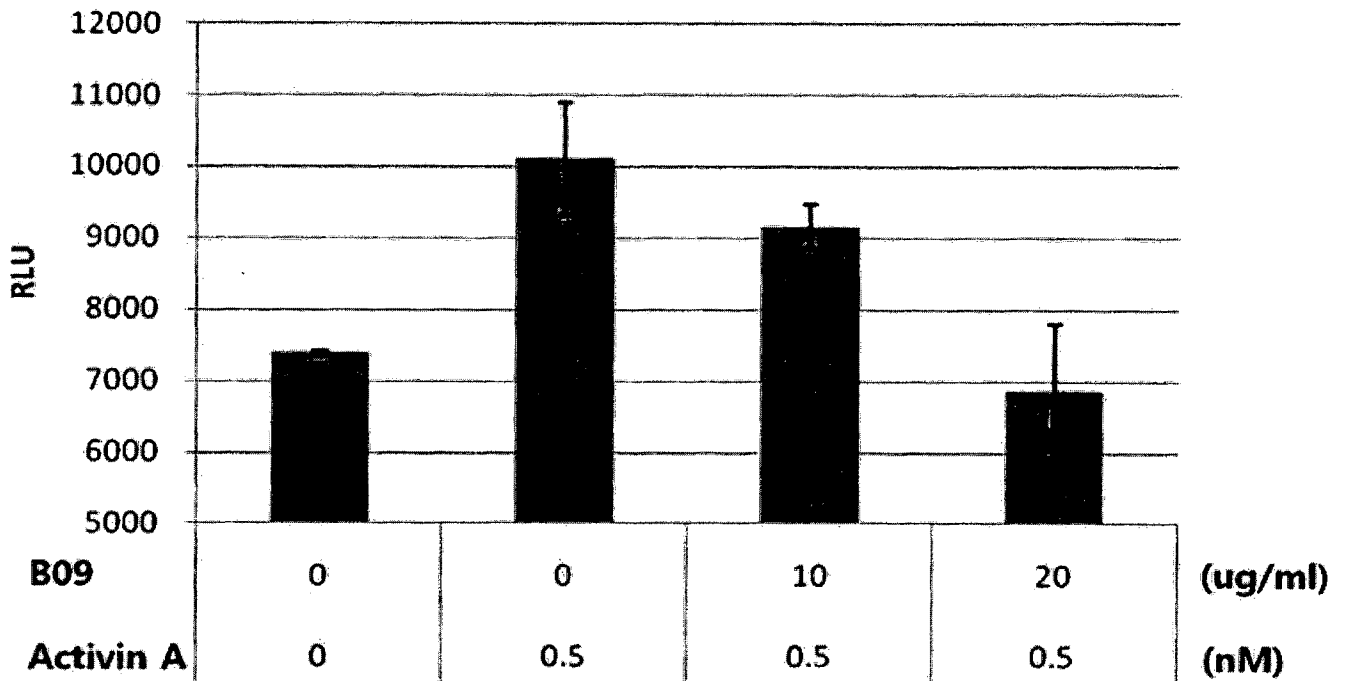


22/28

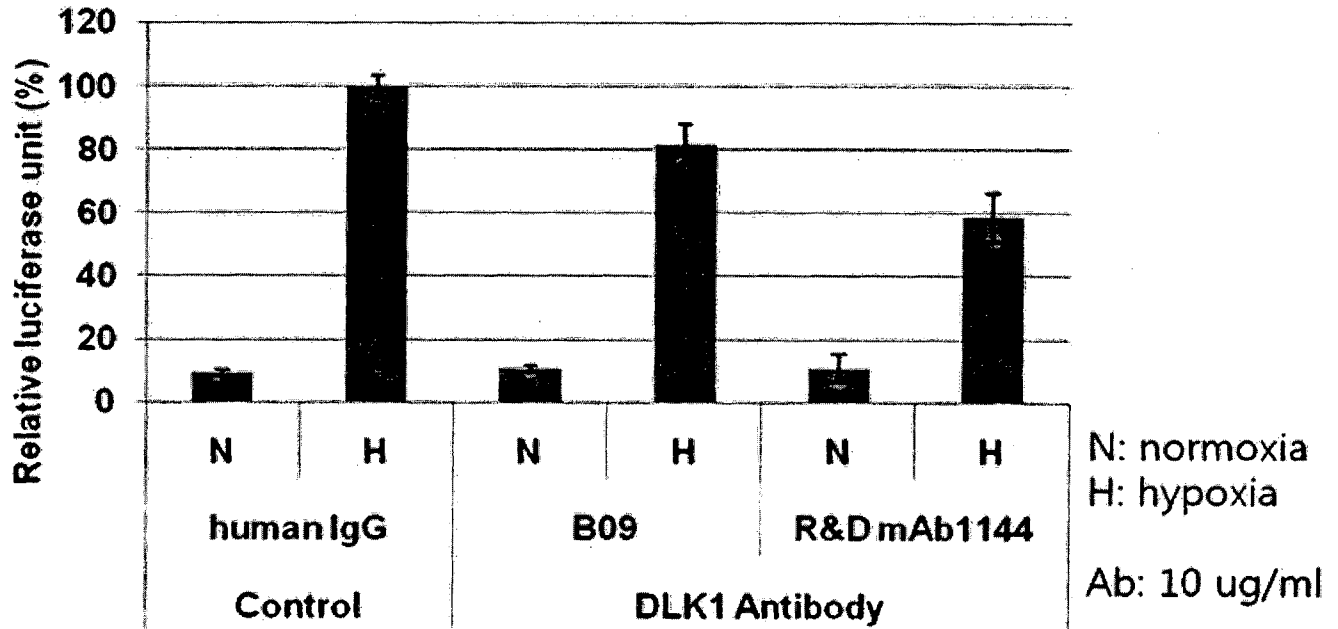
[Fig. 31]



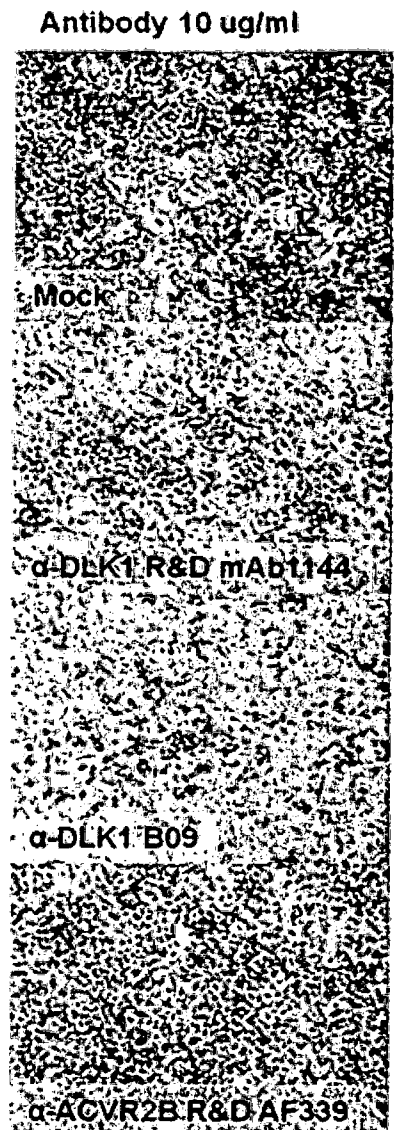
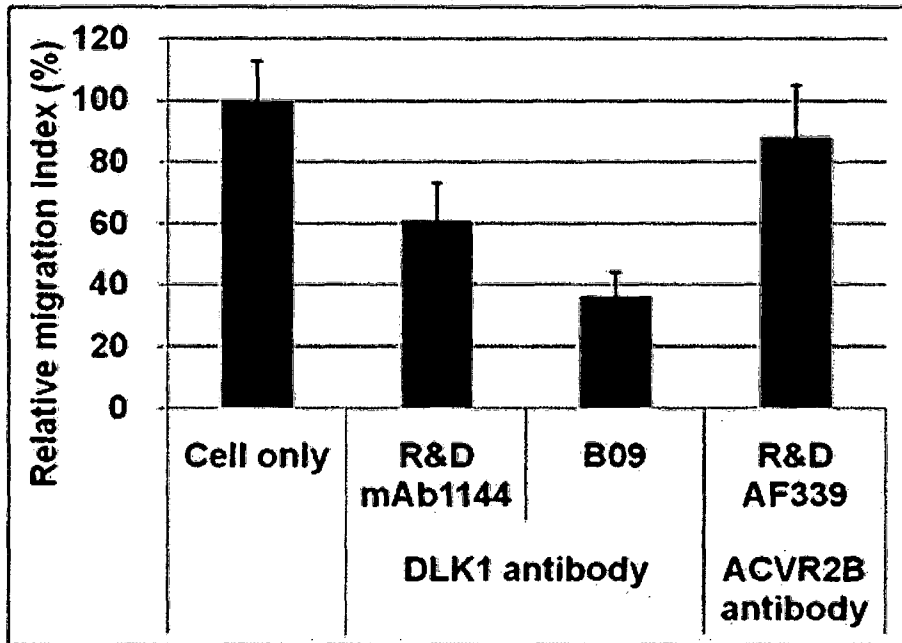
[Fig. 32]

**SBE reporter assay: MIA-PaCa2**

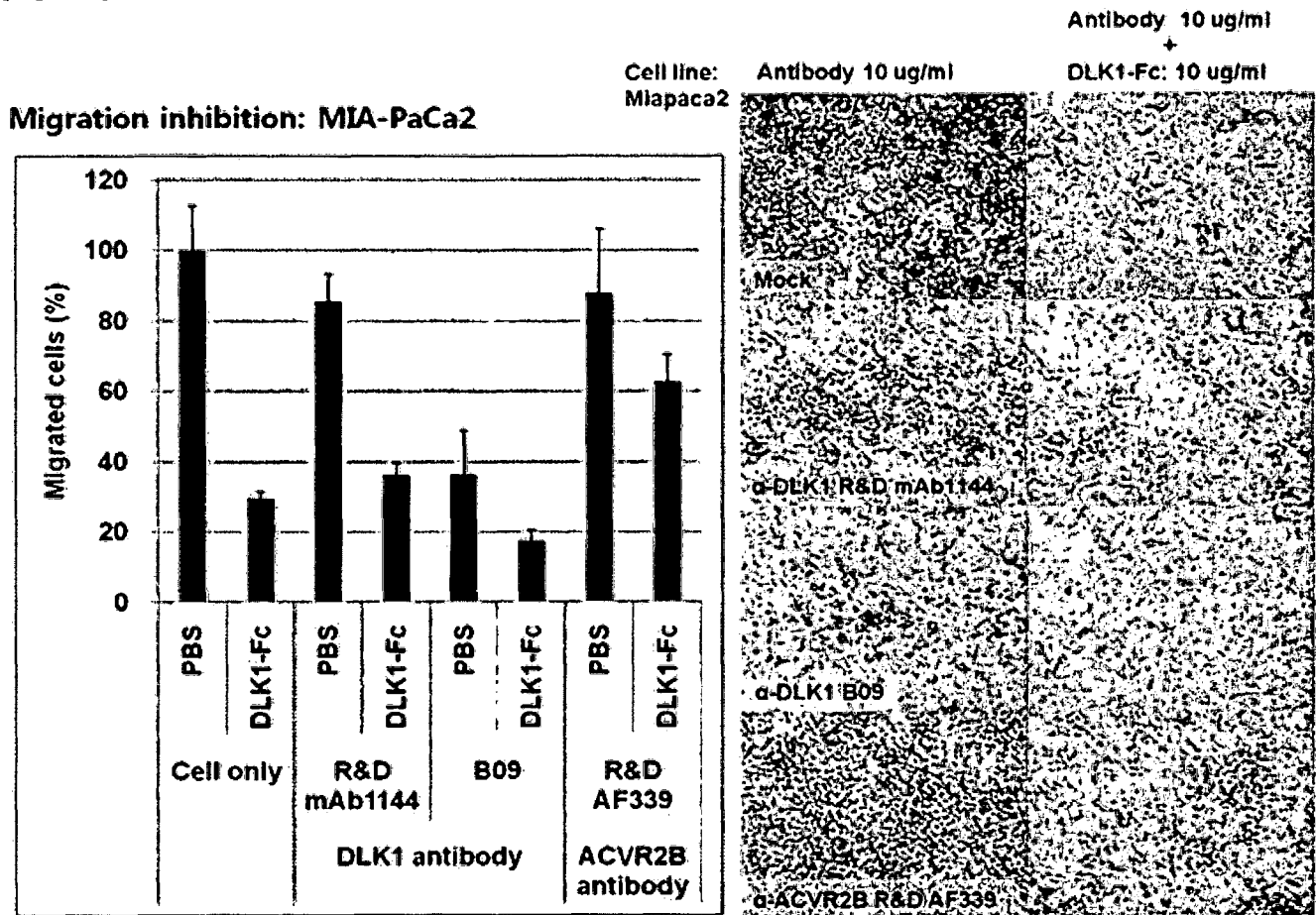
[Fig. 33]

**HRE reporter assay: MIA-PaCa2**

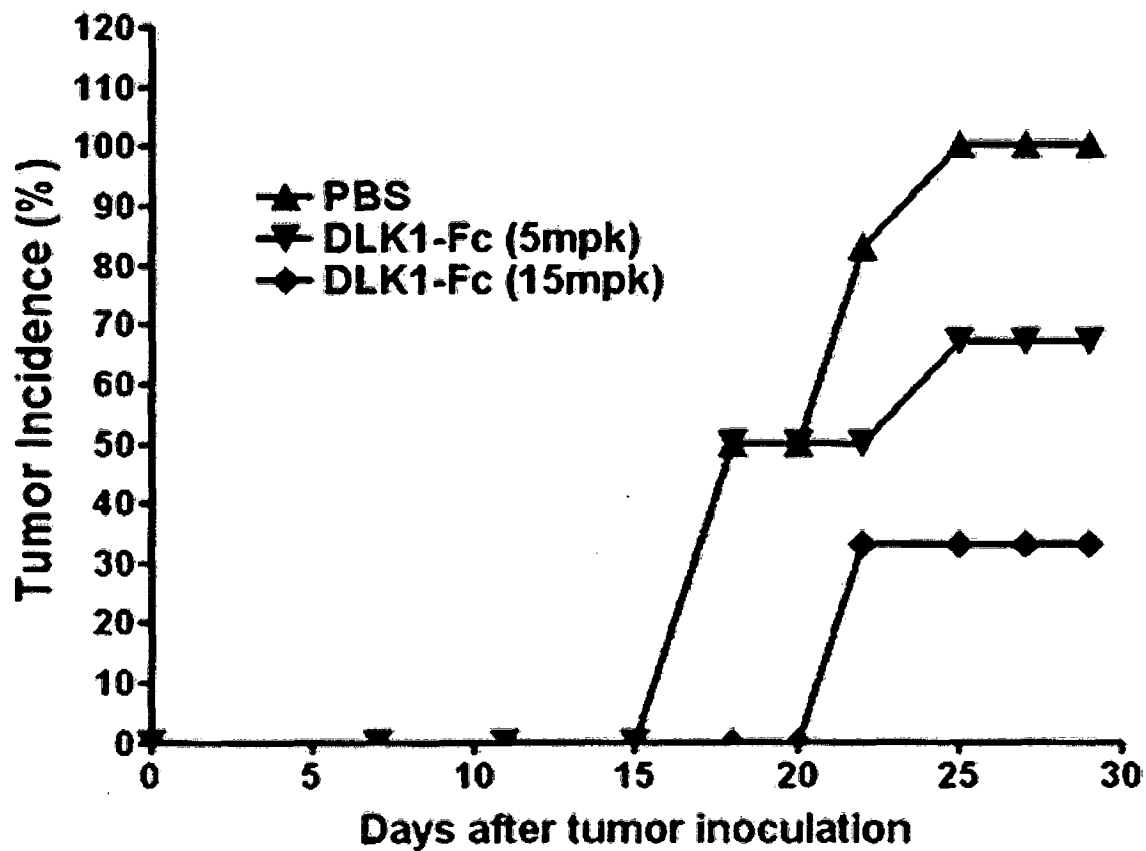
[Fig. 34]

Cell line:  
Miapaca2**Migration inhibition: MIA-PaCa2**

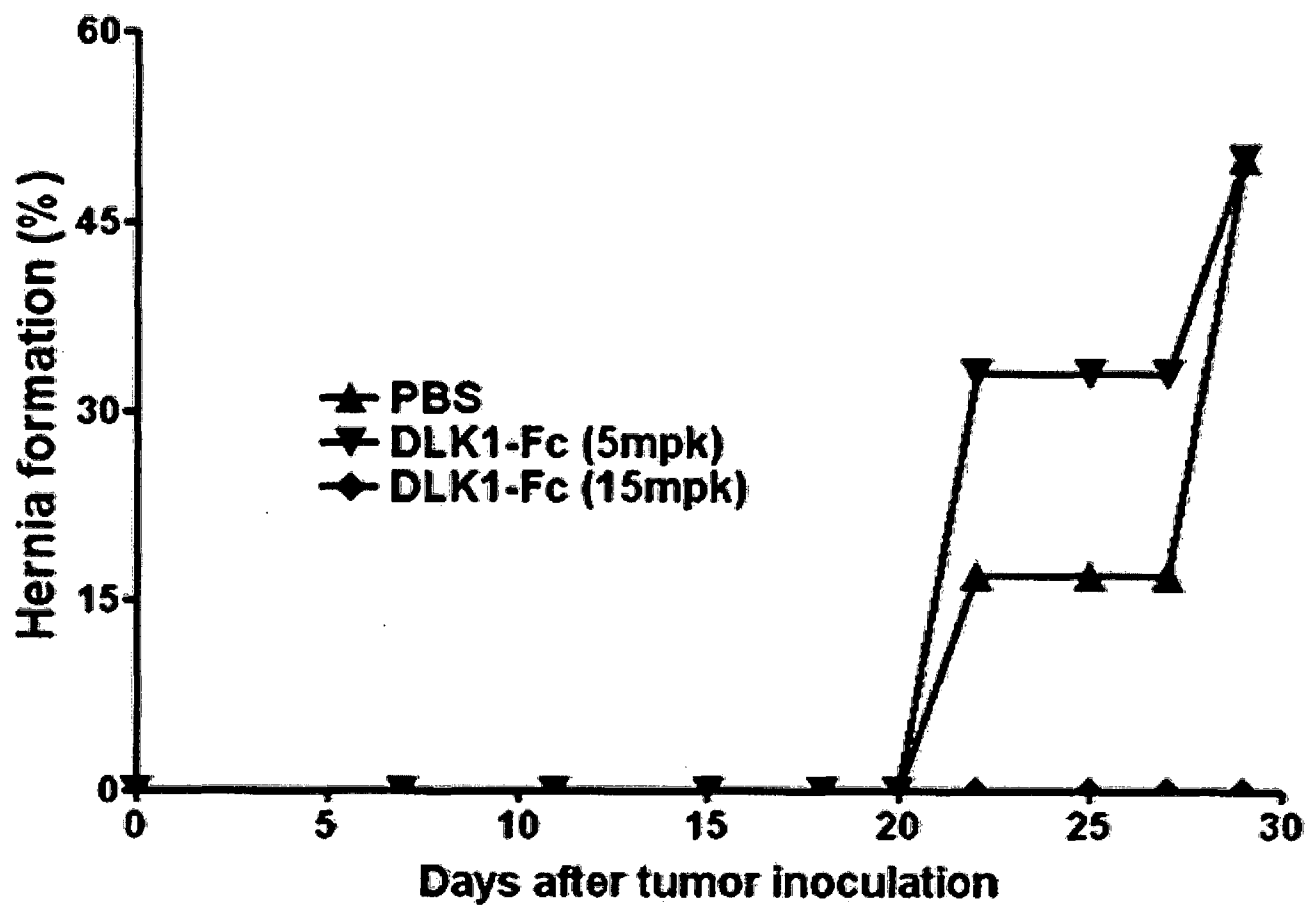
[Fig. 35]



[Fig. 36]



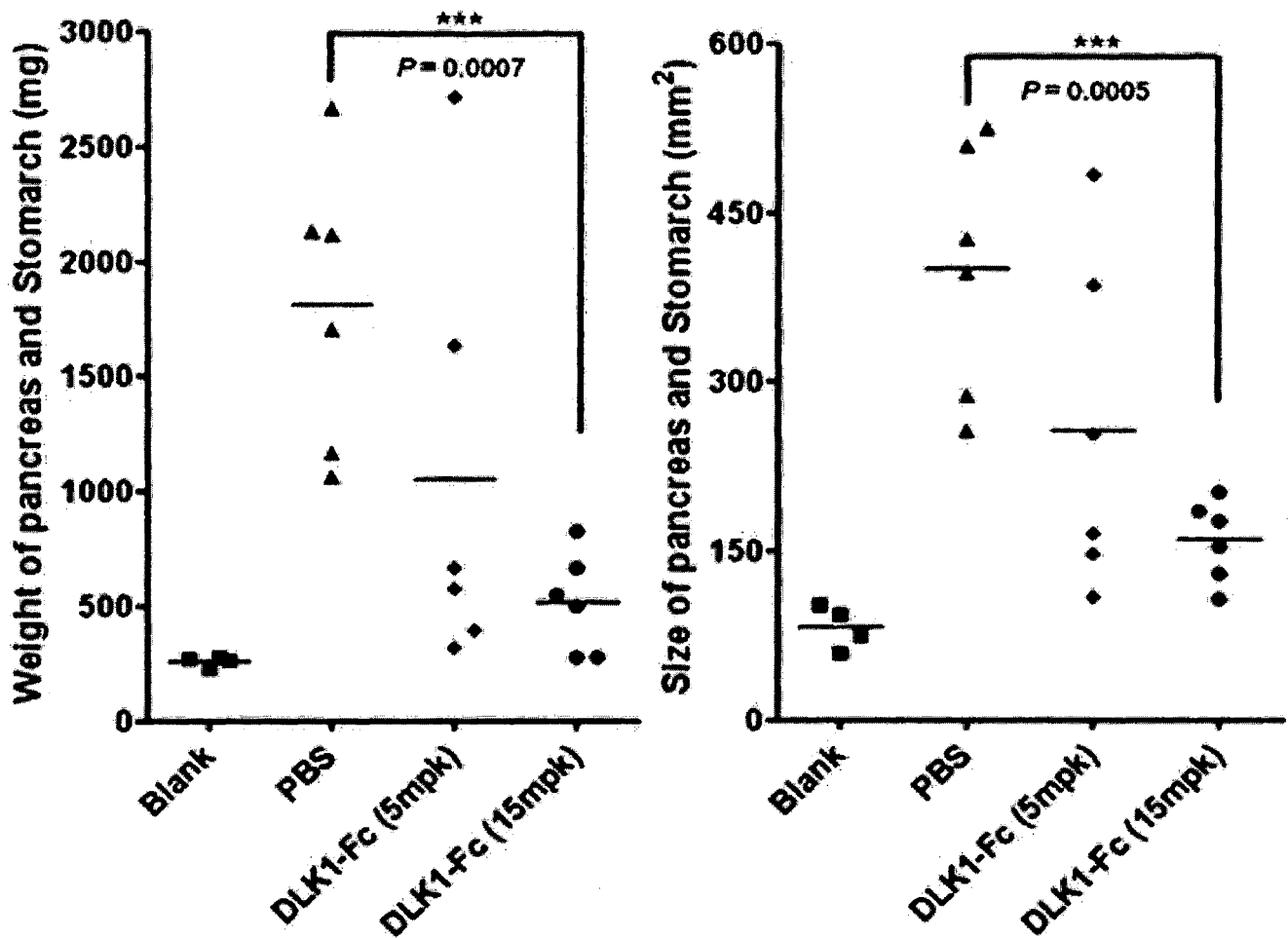
[Fig. 37]



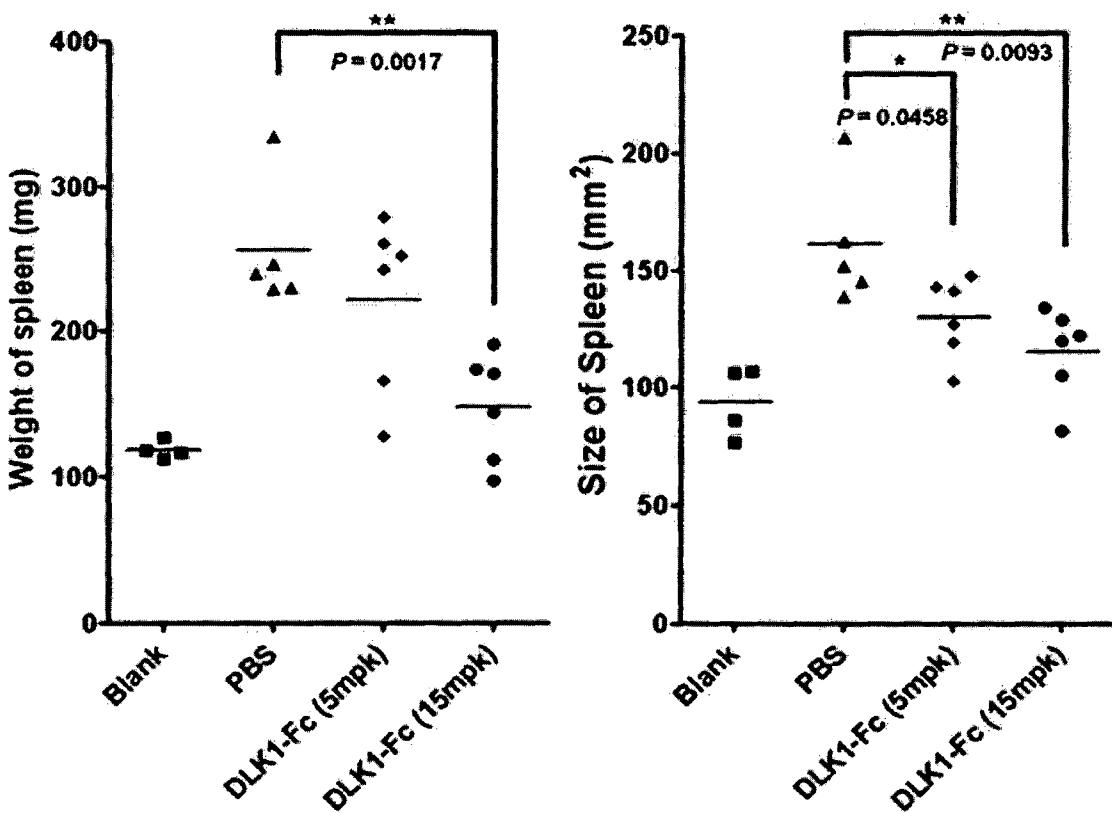
[Fig. 38]

| Group                  | No. | Pancreas+Stomach |       | Spleen       |              |       | Liver        | Lung         | Diaphragm tumor nodule | Hernia |
|------------------------|-----|------------------|-------|--------------|--------------|-------|--------------|--------------|------------------------|--------|
|                        |     | Solid tumor      | Size  | Splenomegaly | Tumor nodule | Size  | Tumor nodule | Tumor nodule |                        |        |
| G4<br>PBS              | 1   | O                | 396.9 | +            | X            | 129.3 | X            | X            | X                      | O      |
|                        | 2   | O                | 256.8 | ++           | O            | 162.1 | X            | X            | X                      | X      |
|                        | 3   | O                | 287.5 | +++          | X            | 206.5 | X            | X            | X                      | X      |
|                        | 4   | O                | 427.4 | ++           | X            | 151.6 | O            | X            | X                      | X      |
|                        | 5   | O                | 508.9 | +            | O            | 145.3 | O            | X            | O                      | O      |
|                        | 6   | O                | 524.8 | +            | O            | 138.6 | O            | X            | X                      | O      |
| G1<br>DLK-1<br>(5mpk)  | 1   | O                | 385.2 | +            | X            | 142.8 | O            | X            | O                      | O      |
|                        | 2   | O                | 166.0 | +            | X            | 119.2 | X            | X            | X                      | O      |
|                        | 3   | O                | 483.2 | +            | X            | 126.8 | O            | X            | O                      | O      |
|                        | 4   | X                | 108.2 | +            | O            | 102.8 | X            | X            | X                      | X      |
|                        | 5   | O                | 253.7 | ++           | O            | 159.6 | X            | X            | X                      | X      |
|                        | 6   | O                | 146.8 | +            | X            | 147.2 | X            | X            | X                      | X      |
| G2<br>DLK-1<br>(15mpk) | 1   | X                | 130.1 | -            | X            | 81.5  | X            | X            | X                      | X      |
|                        | 2   | X                | 108.1 | +            | X            | 104.9 | X            | X            | X                      | X      |
|                        | 3   | O                | 154.0 | +            | X            | 133.7 | X            | X            | X                      | X      |
|                        | 4   | O                | 176.6 | +            | X            | 121.8 | X            | X            | X                      | X      |
|                        | 5   | O                | 194.9 | +            | X            | 128.6 | X            | X            | X                      | X      |
|                        | 6   | O                | 202.7 | +            | X            | 119.8 | X            | X            | X                      | X      |

[Fig. 39]



[Fig. 40]



[Fig. 41]

