



(51) 국제특허분류:

C07K 16/28 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
C07K 14/725 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/010559

(22) 국제출원일: 2018 년 9 월 10 일 (10.09.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보: 10-2017-0115263 2017 년 9 월 8 일 (08.09.2017) KR

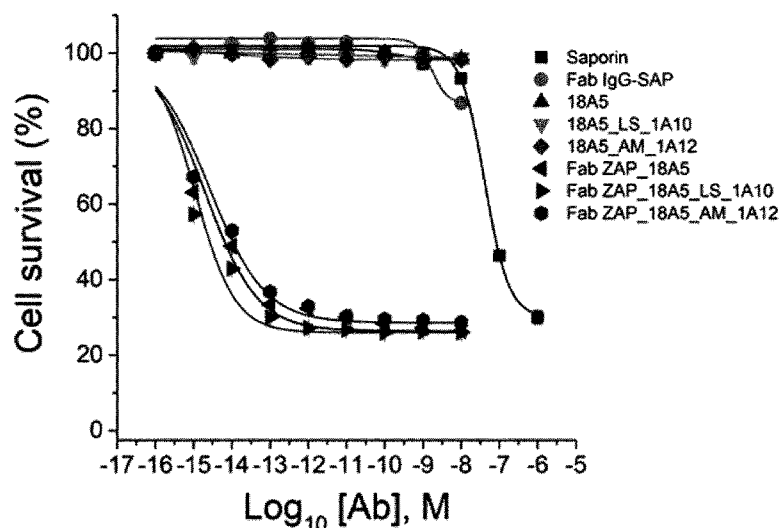
(71) 출원인: 주식회사 와이바이오로직스 (Y-BIOLOGICS INC.) [KR/KR]; 34015 대전시 유성구 테크노4로 29 3층, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 임정채 (LIM, Jung Chae); 34082 대전시 유성구 노은서로210번길 32 405-1905, Daejeon (KR). 신지영 (SHIN, Ji-Young); 34021 대전시 유성구 배울2로 19 905-502, Daejeon (KR). 윤선하 (YOON, Sunha);

35217 대전시 서구 월평동로 45 106-1206, Daejeon (KR). 이상필 (LEE, Sang Pil); 34011 대전시 유성구 구즉로 25 315-1001, Daejeon (KR). 최윤선 (CHOI, Yun-seon); 34140 대전시 유성구 어은로 57 128-1002, Daejeon (KR). 이지수 (LEE, Jisu); 30150 세종시 남세종로 358 211-1501, Sejong (KR). 조영규 (CHO, Young-Gyu); 34032 대전시 유성구 배울2로 114 1102-1004, Daejeon (KR). 유석호 (YOO, Seok Ho); 35235 대전시 서구 둔산남로 30 103-1107, Daejeon (KR). 김웅철 (KIM, Yeungchul); 34319 대전시 대덕구 석봉로58번안길 8, Daejeon (KR). 이시형 (LEE, Si Hyung); 34120 대전시 유성구 가정로 65 110-702, Daejeon (KR). 박재은 (PARK, Jae Eun); 30062 세종시 마운로 221 2015-901, Sejong (KR). 송영자 (SONG, Youngja); 34032 대전시 유성구 배울1로 119 1204-1502, Daejeon (KR). 백기선 (BAEK, Gi Sun); 34014 대전시 유성구 테크노4로 33 518호, Daejeon (KR). 박범찬 (PARK, Bum-chan); 34140 대전시 유성구 어은로 57 118-908, Daejeon (KR). 박영우 (PARK, Young Woo); 34207 대전시 유성구 학하로 33 102-1201, Daejeon (KR).

(54) Title: ANTIBODY AGAINST HUMAN DLK1 AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 인간 DLK1에 대한 항체 및 이의 용도



DLK1	EC ₅₀ (M)	R-Square
Fab ZAP_18A5	1.9828E-15	0.9518
Fab ZAP_18A5_LS_1A10	1.1019E-15	0.9577
Fab ZAP_18A5_AM_1A12	2.5910E-15	0.9658

(57) Abstract: The present invention relates to an antibody against delta-like 1 homolog (*Drosophila*) (DLK1) or an antigen-binding fragment thereof, a nucleic acid encoding the same, a vector comprising the nucleic acid, a cell transformed with the vector, a method for producing the antibody or an antigen-binding fragment thereof, an antibody drug conjugate (ADC) comprising the same, a pharmaceutical composition for treating cancer, a composition for diagnosing cancer, and a chimeric antigen receptor (CAR) and a T-cell engager comprising the same.



(74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06133 서울
시 강남구 테헤란로 123 11층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국
내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,
ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (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, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

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

(57) 요약서: 본 발명은 DLK1(delta-like 1 homolog (Drosophila))에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이를 코딩하는 핵산,
상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 세포, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법, 이를 포함하는
항체-약물 접합체(Antibody drug conjugate: ADC), 암 치료용 약학 조성물, 암 진단용 조성물, 이를 포함하는 키메라 항원
수용체(Chimeric antigen receptor: CAR) 및 T 세포 관여자(T-cell engager)에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 인간 DLK1에 대한 항체 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 DLK1(delta-like 1 homolog (Drosophila))에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 세포, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법, 이를 포함하는 항체-약물 접합체(Antibody drug conjugate: ADC), 암 치료용 약물 조성물, 암 진단용 조성물, 이를 포함하는 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor: CAR) 및 T 세포 관여자(T-cell engager)에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 인간 유래 DLK1(delta-like 1 homolog (Drosophila))은 전장 383개의 아미노산으로 이루어진 1 회 막관통형의 막단백질로, 상기 단백질은 세포 외 영역에 6 개의 EGF-유사 반복(epidermal growth factor-like repeat) 도메인을 가지고 있다. DLK1은 세포 분화 제어 인자인 노취(Notch) 리셉터의 리간드인 델타(Delta)와의 아미노산 배열의 상동성에 의해 DLK1이라는 유전자로 칭해지는 것이 일반적이고, 그 외에 Pref-1, pG2, SCP-1 및 ZOG로 불리기도 한다. DLK1은 막 단백질이기도 하지만, 종양괴사인자 알파 전환 효소(Tumor necrosis factor alpha converting enzyme, TACE)에 의해 세포 외 영역이 세포막에서 떨어져 나와(shedding), 따로 기능을 가지기도 하는 단백질로 잘 알려져 있다.
- [4] DLK1은 미분화로 증식능이 높은 태아 세포에서 높은 발현을 나타낸다. 특히, 태아의 간, 신장, 골격근, 뇌 등에서 높은 발현을 나타내지만, 출생 후는 대부분의 조직에서 발현이 확인되지 않고, 지방 분화 전 세포(preadipocyte), 췌장 섬 세포(pancreatic islet cell), 흉선 체세포(thymic stromal cell), 부신 세포(adrenal gland cell) 등의 특정 세포에서만 발현이 된다.
- [5] DLK1의 기능 연구는 지방세포분화를 억제하는 인자 Pref-1(preadipocyte factor-1)으로 알려져 가장 많은 연구가 되어 있다. 지방세포 분화 억제능력을 제외하고도 DLK1은 혈액 생성 줄기 세포(hematopoietic stem cells)의 분화를 억제하고, 임파선 전구세포(lymphoid progenitor cell)의 분화를 조절하는 역할 및 상처 치유(wound healing)에 관계된 것으로도 알려져 있다.
- [6] 또한, DLK1은 여러 가지 암이나 종양에서도 고빈도로 발현하고 있는 것이 보고되고 있다. 현재까지, 그 발현이 확인되고 있는 암의 종류로서는, 고형암에서는 신경 내분비 종양, 신경아세포종, 신경교종, 1 형 신경 섬유종증, 소세포 폐암, 간암, 신장암, 난소암, 대장암, 유방암 및 췌장암이 알려져 있고, 혈액암에서는 골수 이형성 증후군 및 급성 골수성 백혈병이 알려져 있다. DLK1과 암과의 관련성에 대한 연구로는 뇌암 세포(glioma)에서 DLK1의 발현이

과 발현되어 있으며, DLK1의 cDNA를 뇌암 세포에 과 발현시키면 뇌암 세포의 증식(proliferation)이 증가하여 전이(migration)가 증가한다는 보고가 있었으며, 간암에서 DLK1의 발현이 정상 간세포에 비해 올라가 있으며, siRNA 실험을 통하여 DLK1의 발현을 감소시켰을 때 종양의 크기가 감소한다는 보고가 있었다.

- [7] 한편, 암은 사망 원인의 상위를 차지하는 중요한 질환이기는 하나, 그의 치료에 대한 요구는 아직 충족되지 않고 있다. 최근에는 기존의 화학요법이 정상 세포에도 손상을 주는 문제점을 해결하기 위하여, 암세포에 특이적으로 발현하는 특정 분자를 표적으로 약물을 설계하고 치료하는 분자표적 의약(molecularly targeted drug)에 의한 암치료가 활발히 연구되고 있다.
- [8] 특정 항원을 표적으로 한 분자표적 의약은 항체 의약으로 이미 많이 출시되어 있으며, 대부분은 항체 의존성 세포독성 활성(ADCC, antibody dependent cellular cytotoxicity)을 주요 작용기작으로 하고 있다. 그러나, 그 약효는 반드시 충분한 것이 아니라서, 더 강력한 항암작용을 목표로 하는 기술개발도 동시에 진행되고 있다.
- [9] 항체의 항암작용을 강화하는 효과적인 수단의 하나로서, 항체와 강력한 독성을 갖는 물질(독소)과의 연결을 들 수 있다. 독소는 그것을 홀로 환자에 투여하면 정상 조직에도 손상을 주며, 효과적인 치료 수단이 될 수 없다. 그러나, 암세포 특이적인 항원과 결합하는 항체와 독소를 연결함으로써, 정상적인 조직에 악영향을 미치지 않고 암세포만 살상할 수 있는 능력을 가질 수 있다. 이러한 약제는 항체 약물 접합체(ADC, antibody drug conjugate)라고 부른다. 암세포의 표면에 존재하는 특정 타겟 리셉터에 결합하는 ADC는 엔도사이토시스(endocytosis)에 의해 세포 내에 받아들여진 후, 항체는 리소좀에서 분해되고 독소는 리소좀 밖으로 방출되어 특정 세포 내부에서만 독성이 발현하고 그 효과에 의해 세포는 살상된다.
- [10] ADC용 항체로는 지금까지 제한된 수의 항체들만이 개발되었으며, 그 예로 대표적인 것은 anti-Her2 항체인 허셉틴(Genentech사)이 있으며, 그 외에도 다른 국외 다국적 제약회사의 CD33, CD30, CD22, CD138, PMSA, EphA2 등에 대한 각각의 항체들이 임상시험 단계 또는 신약개발 초기 단계에 있다. 아직까지 국내에서는 ADC용 신규 항체에 대한 개발은 미미한 실정이다.
- [11] 이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 DLK1에 특이적으로 결합하는 항체를 개발하기 위하여 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 DLK1에 우수한 결합력을 나타내는 항-DLK1 항체를 개발함으로써, 목적하는 암의 치료 또는 진단이 가능함을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [12]
- [13] **발명의 요약**
- [14] 본 발명의 목적은 DLK1에 대한 신규 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하는 데 있다.

- [15] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 제공하는 데 있다.
- [16] 본 발명의 다른 목적은 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 세포 및 이의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체를 제공하는 데 있다.
- [18] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.
- [19] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 암 진단용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [20] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor: CAR)를 제공하는 데 있다.
- [21] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 T 세포 관여자(T-cell engager)를 제공하는 데 있다.
- [22] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 다음의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 인간 DLK1 (delta-like 1 homolog (Drosophila))에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다: 서열번호 2, 16, 30, 44, 58, 72 및 86으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 CDR1, 서열번호 4, 18, 32, 46, 60, 74 및 88로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 CDR2, 서열번호 6, 20, 34, 48, 62, 76 및 90으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 9, 23, 37, 51, 65, 79, 93, 115 및 121로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 CDR1, 서열번호 11, 25, 39, 53, 67, 81 및 95로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 13, 27, 41, 55, 69, 83, 97, 116 및 125로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역.
- [23] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 제공한다.
- [24] 본 발명은 또한, 상기 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [25] 본 발명은 또한, 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.
- [26] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공한다: (a) 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 회수하는 단계.
- [27] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 및 약물을 포함하는 항체-약물 접합체(antibody drug conjugate: ADC)를 제공한다.
- [28] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 이중 특이적 항체를 제공한다.
- [29] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편, 상기 항체-약물 접합체 또는 이중 특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학

조성물을 제공한다.

[30] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.

[31] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 항원 결합 도메인으로 포함하는 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor: CAR)를 제공한다.

[32] 본 발명은 또한, 종양세포에서 발현되는 인간 DLK1에 특이적으로 결합하는 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 T 세포 관여자 (T-cell engager)를 제공한다.

[33]

도면의 간단한 설명

[34] 도 1은 본 발명에서 항원으로 사용하기 위해 제작된 6개의 EGF-유사 반복(EGF-like repeat) 도메인을 포함하는 인간 DLK1 단백질의 세포 외 영역 및 인간 항체 Fc(hFc) 영역이 접합된 DLK1-hFc 융합 단백질 모식도(A) 및 상기 DLK1-hFc 융합 단백질의 정제 결과(B)이다. A: 1~6, EGF-유사 반복(EGF-like repeat) 도메인 1~6; JM, 막근접 도메인(juxtamembrane domain). B: Reducing, 환원조건; Non-reducing, 비환원 조건.

[35] 도 2는 DLK1에 대한 다클론 과지 항체에 대한 ELISA를 수행한 결과를 나타내는 그래프이다. #38, 항체 대조군.

[36] 도 3은 DLK1에 대한 단일 scFv를 발현하는 클론들에 대한 ELISA를 수행한 결과이다.

[37] 도 4는 7종의 단일클론 과지 항체들(17B11, 18A5, 20D3, 21D8, 21F9, 27F7, 35E2)을 scFv 형태에서 IgG 형태로 전환하기 위한 발현 벡터의 벡터맵(A) 및 IgG 형태로 전환된 항체의 정제 후 순도를 확인하기 위한 SDS-PAGE 결과(B)이다.

[38] 도 5는 DLK1 항원에 대한 7종의 DLK1 단일클론 인간 항체(17B11, 18A5, 20D3, 21D8, 21F9, 27F7, 35E2)의 결합력을 ELISA를 통해 확인한 결과이다.

[39] 도 6은 hFc 단백질(음성 대조군), 전장 또는 일부 EGF-유사 반복 도메인을 포함하는 DLK1-hFc 융합 단백질(A 및 B)에 대한 7종의 DLK1 단일 인간 항체(17B11, 18A5, 20D3, 21D8, 21F9, 27F7, 35E2)의 결합특이성을 ELISA를 통해 확인한 결과(C)이다.

[40] 도 7은 hFc 단백질(음성 대조군), 인간 DLK1(hDLK1), 마우스 DLK1(mDLK1) 또는 원숭이 DLK1(MDLK1)의 hFc 융합 단백질(A 및 B)에 대한 7종의 DLK1 단일 인간 항체(17B11, 18A5, 20D3, 21D8, 21F9, 27F7, 35E2)의 결합특이성을 ELISA를 통해 확인한 결과(C)이다.

[41] 도 8은 DLK1이 과발현 된 MIA PaCa-2 세포에서 발현되는 DLK1 단백질과 siRNA 처리에 의한 DLK1 단백질 발현 감소를 확인한 결과(A) 및 DLK1 단일클론 인간 항체(17B11, 18A5, 21D8, 27F7)의 세포 표면에 존재하는 DLK1에 대한 결합력을 형광이용세포분류기(FACS)를 통해 확인한 결과(B)이다. scRNA;

scrambled small interfering RNA(siRNA). siDLK1; DLK1-specific siRNA.

- [42] 도 9는 SK-N-F1 세포에서 내생적으로(endogenously) 발현되는 DLK1 단백질과 siRNA 처리에 의한 DLK1 단백질 발현 감소를 확인한 결과(A) 및 DLK1 단일클론 인간 항체(17B11, 18A5, 21D8, 27F7)의 세포 표면에 존재하는 DLK1에 대한 결합력을 형광이용세포분류기(FACS)를 통해 확인한 결과(B)이다.
- [43] 도 10은 DLK1이 과발현 된 MIA PaCa-2 세포에서 DLK1 단일클론 인간 항체(18A5, 27F7)의 세포 표면 특이적 결합을 면역형광염색법(Immunofluorescence)을 통해 확인한 결과이다.
- [44] 도 11은 DLK1이 과발현 된 MIA PaCa-2 세포에서 DLK1 단일클론 인간 항체(18A5)가 시간별로 세포 내 각기 다른 엔도솜 마커와 공위치함을 형광염색법을 통해 확인한 결과이다. EEA: 초기 엔도솜 마커, TfR: 초기/리사이클 엔도솜 마커, LAMP1: 말기 엔도솜 마커.
- [45] 도 12는 DLK1이 과발현 된 MIA PaCa-2 세포에서 DLK1 단일클론 인간 항체(27F7)가 시간별로 세포 내 각기 다른 엔도솜 마커와 공위치함을 그래프를 통해 확인한 결과이다.
- [46] 도 13은 DLK1이 과발현 된 MIA PaCa-2 세포에서 단일클론 인간 항체(18A5, 27F7)의 세포내 유입 후 시간별로 세포막에 남아있는 항체의 양을 형광이용세포분류기(FACS)를 통해 평균형광강도(MFI: Mean Fluorescence Intensity)에 의해 정량화 한 결과이다.
- [47] 도 14는 DLK1이 과발현 된 MIA PaCa-2 세포에서 단일클론 인간 항체(18A5, 27F7)의 독소에 의한 세포사멸 효과를 확인한 결과(A 및 B)이다.
- [48] 도 15는 인간 DLK1에 대한 18A5 항체 변이체로 단일 scFv를 발현하는 파아지 클론들이 항원과 결합하는지 확인하기 위해 ELISA를 수행한 결과이다.
- [49] 도 16은 18A5 항체변이체들 중 선별된 두 항체의 scFv를 IgG 형태로 전환하여 발현 정제 후 환원적 혹은 비환원적 조건에서 SDS-PAGE에 의해 분석한 순도를 나타낸 결과이다.
- [50] 도 17은 DLK1 단일 인간 항체 변이체 항체인 18A5_LS_1A10, 18A5_AM_1A12의 인간 DLK1(hDLK1), 마우스 DLK1(mDLK1) 또는 원숭이 DLK1(MDLK1)의 hFc 융합 단백질에 대한 교차반응성을 ELISA를 통해 확인한 결과이다.
- [51] 도 18은 hFc 단백질(음성 대조군), 전장 또는 일부 EGF-유사 반복 도메인을 포함하는 DLK1-hFc 융합 단백질에 대한 2종의 DLK1 단일 인간 항체 변이체 항체인 18A5_LS_1A10, 18A5_AM_1A12의 결합특이성을 ELISA를 통해 확인한 결과이다.
- [52] 도 19는 DLK1 항원에 대한 DLK1 단일 인간 항체 변이체 항체인 18A5_LS_1A10, 18A5_AM_1A12의 결합친화성과 키네틱 상수를 ELISA를 통해 확인한 결과이다.
- [53] 도 20은 DLK1 단일 인간 항체 변이체 항체인 18A5_LS_1A10,

18A5_AM_1A12가 DLK1이 과발현 된 MIA PaCa-2 세포에 농도의존적으로 결합력을 갖는지 형광이용세포분류기(FACS)를 통해 확인한 결과이다.

- [54] 도 21은 DLK1이 과발현 된 MIA PaCa-2 세포에 siRNA를 처리(A)하거나 내생적으로(endogenously) DLK1을 발현하는 SK-N-F1 세포에 shRNA을 처리(B)하여 DLK1 단백질 발현 감소를 확인하고, DLK1 단일 인간 항체 변이체 항체인 18A5_LS_1A10, 18A5_AM_1A12의 항원 결합 특이성을 형광이용세포분류기(FACS)를 통해 확인한 결과이다. scRNA, scrambled small interfering RNA(siRNA); siDLK1, DLK1-specific siRNA; shCon, control short hairpin RNA (shRNA); shDLK1, DLK1-specific shRNA.
- [55] 도 22는 DLK1이 과발현 된 MIA PaCa-2 세포, 내생적으로 발현되는 SK-N-F1 또는 HepG2 세포에 DLK1 단일 인간 항체 변이체 항체인 18A5_LS_1A10, 18A5_AM_1A12를 처리한 후, 시간에 따른 세포내 항체의 유입량(A)과 24시간 동안 세포내에 축적된 정도(B)를 IncuCyte ZOOM HD/2CLR System을 통해 확인한 결과이다.
- [56] 도 23은 DLK1이 과발현 된 MIA PaCa-2 세포에서 DLK1 단일 인간 항체 변이체 항체인 18A5_LS_1A10, 18A5_AM_1A12의 독소에 의한 세포사멸 효과를 확인한 결과이다.
- [57]
- [58] **발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예**
- [59] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [60] 본 발명은 일 관점에서, 다음의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 DLK1(delta-like 1 homolog (Drosophila))에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다:
- [61] 서열번호 2, 16, 30, 44, 58, 72 및 86으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 CDR1, 서열번호 4, 18, 32, 46, 60, 74 및 88로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 CDR2, 서열번호 6, 20, 34, 48, 62, 76 및 90으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역; 및
- [62] 서열번호 9, 23, 37, 51, 65, 79, 93, 115 및 121로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 CDR1, 서열번호 11, 25, 39, 53, 67, 81 및 95로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 13, 27, 41, 55, 69, 83, 97, 116 및 125로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역.
- [63] 본 발명에 따른 항체는 예를 들어, 인간 DLK1의 세포 외 도메인에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [64] 본 출원의 발명자들은 파지 디스플레이 방법을 이용하여 인간 DLK1 단백질의 세포외 도메인에 높은 친화력을 갖는 7종의 신규 DLK1 단일클론 인간 항체를

스크리닝하여, 친화력, 결합부위 결정, 중간 항원의 대한 교차결합, 세포표면의 DLK1에 특이적 결합 등과 같은 항체 특성분석을 통해 2 종의 DLK1 항체(18A5, 27F7)를 선별하였고, 두 항체 모두 항원과 결합 후 세포내로 유입되었으며, Fab ZAP 어세이를 통해 세포 사멸효과를 확인하였다.

[65] 또한 친화도 성숙 (affinity maturation)과 위의 기술된 항체의 특성분석을 통해 18A5 항체 변이체 2종 (18A5_LS_1A10, 18A5_AM_1A12)을 추가로 선별하였다.

[66] 상기 선별된 DLK1 단일클론 인간항체가 항체-약물 접합체(ADC, Antibody Drug Conjugate)로서 사용이 가능하다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[67] 본 명세서에서 사용된 용어, "항체(antibody)"는 DLK1, 특히 인간 DLK1 단백질의 세포외 도메인에 특이적으로 결합하는 항-DLK1 항체를 의미한다. 본 발명의 범위에는 DLK1에 특이적으로 결합하는 완전한 항체 형태뿐 아니라, 상기 항체 분자의 항원 결합 단편도 포함된다.

[68] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 텔타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.

[69] 항체의 항원 결합 단편 또는 항체 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge

[70] region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 다이설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 PCT 국제 공개특허출원 WO88/10649, WO88/106630, WO88/07085, WO88/07086 및 WO88/09344에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv, scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 경쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다имер과 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수도 있다.

[71] 하나의 실시예에서, 본 발명에 따른 항체는 Fv 형태(예컨대, scFv)이거나, 완전한 항체 형태이다. 또한, 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 텔타(δ) 또는 엡실론(ϵ) 중의 어느 한 이소타입으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어,

불변영역은 감마1(IgG1), 감마 3(IgG3) 또는 감마 4(IgG4)이다. 경쇄 불변영역은 카파 또는 람다 형일 수 있다.

- [72] 본 명세서에서 사용되는 용어, "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VH 및 3 개의 불변영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어, "경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VL 및 불변영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.
- [73] 본 발명의 항체는 단일클론 항체, 다특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fvs(scFV), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 다이설파이드-결합 Fvs(sdFV) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 또는 상기 항체들의 에피토프-결합 단편 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [74] 상기 단일클론 항체는 실질적으로 동질적 항체 집단으로부터 수득한 항체, 즉 집단을 차지하고 있는 개개의 항체가 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생적 돌연변이를 제외하고는 동일한 것을 지칭한다. 단일클론 항체는 고도로 특이적이어서, 단일 항원 부위에 대항하여 유도된다. 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 통상의 (폴리클로날) 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 단일클론 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다.
- [75] 예를 들어, 본 발명에서 유용한 단일클론 항체는 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 박테리아, 진핵 동물 또는 식물 세포에서 재조합 DNA 방법을 사용하여 제조할 수 있다(미국 특허 4,816,567 참조). 또한, 단일클론 항체는 파지항체 라이브러리로부터 단리할 수 있다.
- [76] 본 발명의 일 실시예에서는 파지 디스플레이 방법으로 천연 인간 scFv 라이브러리(native human single chain Fv library)를 패닝하여 DLK1에 특이적으로 결합하는 7종의 단일클론 인간 항체를 제조하였다.
- [77] "파지 디스플레이"는 변이체 폴리펩티드를 파지, 예를 들어 섬유상 파지 입자의 표면 상에 외피 단백질의 적어도 일부와의 융합 단백질로서 디스플레이하는 기술이다. 파지 디스플레이의 유용성은 무작위화 단백질 변이체의 큰 라이브러리를 대상으로 하여, 표적 항원과 고 친화도로 결합하는 서열을 신속하고도 효율적으로 분류할 수 있다는 사실에 있다. 펩티드 및 단백질 라이브러리를 파지 상에 디스플레이하는 것은 특이적 결합 특성을 지닌 폴리펩티드를 알아보기 위해 수 백만개의 폴리펩티드를 스크리닝하는데 사용되어 왔다.
- [78] 파지 디스플레이 기술은 특정 리간드(예: 항원)와 결합하는 신규 단백질을 생성 및 선별하기 위한 강력한 도구를 제공하였다. 파지 디스플레이 기술을 사용하여, 단백질 변이체의 큰 라이브러리를 생성시키고, 표적 항원과 고

친화성으로 결합하는 서열을 신속하게 분류할 수 있다. 변이체 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 바이러스성 외피 단백질, 예를 들어 유전자 III 단백질 또는 유전자 VIII 단백질을 암호화하는 핵산 서열과 융합시킨다. 단백질 또는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 유전자 III 단백질의 일부를 암호화하는 핵산 서열과 융합시킨 1가 파지 디스플레이 시스템이 개발되었다. 1가 파지 디스플레이 시스템에서는, 유전자 융합물이 저 수준으로 발현되고 야생형 유전자 III 단백질이 또한 발현되어 입자 감염성이 유지된다.

- [79] 섬유상 파지 표면 상에서의 펩티드의 발현과 *E. coli*의 주변세포질에서의 기능성 항체 단편의 발현을 입증하는 것이 항체 파지 디스플레이 라이브러리를 개발하는 데에 있어 중요하다. 항체 또는 항원 결합성 폴리펩티드의 라이브러리는 수 많은 방식, 예를 들어 무작위 DNA 서열을 삽입함으로써 단일 유전자를 변경시키는 방법 또는 관련 유전자 계열을 클로닝하는 방법으로 제조하였다. 라이브러리를 대상으로 하여, 목적하는 특징을 수반한 항체 또는 항원 결합성 단백질의 발현에 관하여 스크리닝할 수 있다.
- [80] 파지 디스플레이 기술은 목적하는 특징을 지닌 항체를 제조하기 위한 통상적인 하이브리도마 및 재조합 방법에 비해 몇 가지 이점을 지니고 있다. 이러한 기술은 동물을 사용하지 않고서도 짧은 시간에 다양한 서열을 지닌 큰 항체 라이브러리를 생성시킬 수 있도록 한다. 하이브리도마의 제조나 인간화 항체의 제조는 수 개월의 제조기간을 필요로 할 수 있다. 또한, 면역이 전혀 요구되지 않기 때문에, 파지 항체 라이브러리는 독성이거나 항원성이 낮은 항원에 대해서도 항체를 생성시킬 수 있다. 파지 항체 라이브러리를 또한 사용하여 신규한 치료적 항체를 생성 및 확인할 수 있다.
- [81] 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 면역시킨, 비-면역시킨 인간, 생식세포계 서열, 또는 미감작 B 세포 Ig 레퍼토리 (repertory)로부터 인간 항체를 생성시키는 기술을 사용할 수 있다. 각종 림프계 조직을 사용하여, 미감작 또는 비면역 항원 결합성 라이브러리를 제조할 수 있다.
- [82] 파지 디스플레이 라이브러리로부터 고친화성 항체를 확인 및 분리할 수 있는 기술은 치료용 신규 항체 분리에 중요하다. 라이브러리로부터 고친화성 항체를 분리하는 것은 라이브러리의 크기, 세균성 세포 중에서의 생산 효율 및 라이브러리의 다양성에 좌우될 수 있다. 라이브러리의 크기는 항체 또는 항원 결합성 단백질의 부적절한 폴딩과 정지 코돈의 존재로 인한 비효율적 생산에 의해 감소된다. 세균성 세포에서의 발현은 항체 또는 항원 결합성 도메인이 적절하게 폴딩되지 않는 경우에는 억제될 수 있다. 발현은 가변/불변 계면의 표면이나 선별된 CDR 잔기에서의 잔기를 교대로 돌연변이시킴으로써 개선시킬 수 있다. 골격 영역의 서열은 세균성 세포에서 항체 파지 라이브러리를 생성시키는 경우에 적절한 폴딩을 제공하기 위한 하나의 요소이다.
- [83] 고 친화성 항체 분리에서 항체 또는 항원 결합성 단백질의 다양한 라이브러리를 생성시키는 것이 중요하다. CDR3 영역은 이들이 종종 항원

결합에 참여하는 것으로 밝혀졌다. 중쇄 상의 CDR3 영역은 크기, 서열 및 구조적 입체 형태 면에서 상당히 다양하므로, 이를 이용하여 다양한 라이브러리를 제조할 수 있다.

- [84] 또한, 각 위치에서 20개 아미노산 모두를 사용하여 가변 중쇄 및 경쇄의 CDR 영역을 무작위화함으로써 다양성을 발생시킬 수 있다. 20개의 모든 아미노산을 사용하면 다양성이 큰 변이체 항체 서열이 생성되고 신규한 항체를 확인할 기회가 증가할 수 있다.
- [85] "에피토프"은 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정부위 (determinant)를 의미한다. 에피토프는 통상 화학적으로 활성인 표면 분자군, 예를 들어 아미노산 또는 당 측쇄로 구성되며, 일반적으로 특정한 3차원의 구조적 특징뿐만 아니라 특정한 전하 특성을 갖는다. 입체적 에피토프 및 비입체적 에피토프는 변성 용매의 존재하에서 전자에 대한 결합은 소실되지만 후자에 대해서는 소실되지 않는다는 점에서 구별된다.
- [86] 상기 "인간화" 형태의 비-인간 (예: 무린) 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 추가변 영역으로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 종 (공여자 항체), 예를 들어 마우스, 랫트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 추가변 영역로부터의 잔기로 대체시킨 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다.
- [87] 상기 "인간 항체"는 인간 면역글로불린으로부터 유래하는 분자로서 상보성 결정영역, 구조 영역을 포함한 항체를 구성하는 모든 아미노산 서열 전체가 인간의 면역글로불린으로 구성되어 있는 것을 의미한다.
- [88] 중쇄 및/또는 경쇄 일부가 특별한 종으로부터 유래되거나 특별한 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 나머지 쇄(들)는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 "키메라" 항체 (면역글로불린) 뿐 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 상기 항체의 단편이 포함된다.
- [89] 본원에 사용된 바와 같은 "항체 가변 도메인"은 상보성 결정 영역 (CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3), 및 골격 영역 (FR)의 아미노산 서열을 포함하는 항체 분자의 경쇄 및 중쇄 부분을 지칭한다. VH는 중쇄의 가변 도메인을 지칭한다. VL은 경쇄의 가변 도메인을 지칭한다.
- [90] "상보성 결정 영역" (CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3)은 항원 결합을 위해 필요한 존재인 항체 가변 도메인의 아미노산 잔기를 지칭한다. 각 가변 도메인은 전형적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 확인된 3개의 CDR 영역을 갖는다.
- [91] 본 발명에 있어, 상기 DLK1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 구체적으로, 다음의 표 1에 기재된 CDR 서열을 포함할 수 있다. 이 중, 2종 (18A5, 27F7)과 또 다른 2종의 18A5 변이 항체 (18A5_LS_1A10, 18A5_AM_1A12)의

항-DLK1 항체는 DLK1이 과발현된 세포에 결합 가능하고, 암세포 표면에 발현하는 DLK1을 타겟으로 하여 암세포를 사멸시킬 수 있는 항-DLK1 항체-약물접합체로서 개발이 가능함을 확인하였다 (실시예 3, 4, 8 및 9).

[92]

[93] [표1]

DLK1 단일 클론과 선별된 18A5 항체 변이체의 중쇄 및 경쇄 가변영역

클론	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	서열 번호
17B11-HC	QVQLVES GGTLVQP GGSLRLS CAAS	GFTFSS HA	MSWVRQ TPGKGLE WVSS	ITKSGS GT	YSADSVKGRF TISRDN SKNTL YLQMNSLRA EDTAVYYC	TREGLG YYYGM DV	WGQGT TVTVSS	99
서열 번호	1	2	3	4	5	6	7	
17B11-LC	QLVLTQP PSVSGAP GQRVIIS CTGS	SSNIGA GYD	VHWHYQQ LPGTAPR LLIY	GST	NRPSGVPDRF SGSKSGTSAS LAITGLQAED EADYYC	QSYDNS LSAHYV	FGTGTK VTVL	100
서열 번호	8	9	10	11	12	13	14	
18A5-HC	QVQLVQ SGGAVV QPGHSLR LSCEAS	GFKFK DYG	MHWVRQ APGKGLE WLAV	ISHDGR NK	NYADSVKGRF TISRDN SKNT LSFQMNSLRA EDTAVYYC	VRDWSY AFDI	WGQGT LVTVSS	101
서열 번호	15	16	17	18	19	20	21	
18A5-LC	DIQMTQS PSFLSAS VGDRVNI TCRAS	QDISRR	LAWYQQ KPGKAPK LLIY	GAA	SLQSAVASRFS GSGSGTEFTLT ISSLPEDFAN YYC	QQIYTTT LT	FGGGTK VEIK	102
서열 번호	22	23	24	25	26	27	28	
20D3-HC	QMQLVQ SGGGLV QPGRSLR LSCAAS	GFTFD DYA	MHWVRQ APGKGLE WVSG	ISWNS GSI	GYADSVKGRF TISRDN AKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC	TKGPGL ATGKVY FNS	WGQGT QVTVSS	103
서열 번호	29	30	31	32	33	34	35	
20D3-LC	DIQMTQS PSSVSAS VGDRVTI TCRAS	QRISS W	LAWYQQ KPGRAPK LLIH	SAS	TLHNGVPSRF SGSASGTDFT LTISSLQPEDF AIYYC	QQGHSF PYT	FGQGTK LDIK	104

[94]

서열 번호	36	37	38	39	40	41	42	
21D8-HC	QVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAAS	GFTFSS YW	MNWVRQ APGKGLV WVSR	ISPDGS ST	TYADSVKGRF TISRDNKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYC	ARGYSP KYPTVG LDV	WGQGT TITVSS	105
서열 번호	43	44	45	46	47	48	49	
21D8-LC	DIVMTQS PLSSPVT LGQPASI SCRSS	ESLLHS NGNTY	LTWLQQR PGQPPRL LIH	KIS	NRFSGVPDRF SGSGAGTDFT LQITRVETED VGYYC	VQTTQW PWT	FGQGTK VEIK	106
서열 번호	50	51	52	53	54	55	56	
21F9-HC	QVQLVQ SGAEVK KPGASVR VSCKVS	GYSL EFP	IHWVRQA PRMGLE WMGG	SYPED GET	LYAQKFQGRV TMTEDTSTD AYMELSSLRS EDTAVYYC	ARLNYF ESTDYW VDAFDI	WGQGT MVTVSS	107
서열 번호	57	58	59	60	61	62	63	
21F9-LC	QLVLTQP YSVSESP GKTITISC TRS	SGSIAS NF	VQWYQQ RPGSAPT PVIY	EDN	QRPSGVPDRF SGSIDSSNSA SLTISGVMTE DEADYYC	QSYDSG SSWV	FGGGTK LTVL	108
서열 번호	64	65	66	67	68	69	70	
27F7-HC	QMQLVE SGGGLV KPGGSLT LSCDAT	GFNFG SY	MNWVRQ APGKGLE WLAH	ISSTGR TI	YYADSVKGRF TISRDNKSSL DLQMNSLRA EDTAVYYC	ARDQGY PFGMDV	WGHGT TVTVSS	109
서열 번호	71	72	73	74	75	76	77	
27F7-LC	QLVLTQP SSVSGAP GQRTVIS CTGS	SSNIGA GYD	VDWYQQ LPGTAPK LLIY	GNT	NRPSGVPDRF SGSKSGTSAS LAITGLQAED DSDYYC	QSYDSS LSAWV	FGGGTK LTVL	110

[95]

서열 번호	78	79	80	81	82	83	84	
35E2-HC	QVQLVES GGGVVQ PGRSLRL SCAAS	GFTFSS YA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	IYSGGS T	YYADSVKGRF TISRDNKNTL YLQMNSLRA EDTAVYYC	AREGSY DVMTYT RIGGYF DY	WGQGA LTVSS	111
서열 번호	85	86	87	88	89	90	91	
35E2-LC	DIQMTQS PSSVSAS VGDRVITI TCRAS	QGISD W	VAWYQQ KPGKAPK LLIY	AAS	SLQSGVPSRFS GSGSGTEFSLT ISNLQPEDFAT YYC	QQANSF PLT	FGPGTK VEIK	112
서열 번호	92	93	94	95	96	97	98	
18A5 LS_1A10 -HC	QVQLVQ SGGAVV QPGHSLR LSCEAS	GFKFK DYG	MHWVRQ APGKGLE WLAV	ISHDGR NK	NYADSVKGR LTISRDNKSN TLSFQMNSLR AEDTAVYYC	VRDWSY AFDI	WGQGT LTVSS	101
서열 번호	15	16	17	18	19	20	21	
18A5 LS_1A10- LC	DIQMTQS PSSLSAS LGDRVITI TCRAS	QGISSA	LAWYQQ KPGKAPK LLIY	AAS	SLQSGVPSRFS GSGSGTDFTL TINSLQPEDFA TYC	QQSYTT PLT	FGGGTK VEIK	126
서열 번호	117	115	24	95	118	116	28	
18A5 AM_1A12 -HC	QVQLVQ SGGGVV QPGGSLR LSCAAS	GFKFK DYG	MHWVRQ APGKGLE WLAV	ISHDGR NK	NYADSVKGR LTISRDNKSN TLSFQMNSLR AEDTAVYYC	VRDWSY AFDI	WGQGT LTVSS	127
서열 번호	119	16	17	18	19	20	21	
18A5 AM_1A12 -LC	DIQMTQS PSFLSAS VGDRVITI TCRAS	HDISSS	LAWYQQ KSGKAPK LLIY	SAS	NLKSGVPSRF SGSGSGTDFS LTISLQPEDF ATYYC	QQSYTT VLT	FGGGTK LEIK	128
서열 번호	120	121	122	39	123	124	125	

[96]

[97] "골격 영역" (FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각 가변 도메인은 전형적으로, FR1, FR2, FR3 및 FR4로서 확인된 4개의 FR을 가진다.

[98] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 1, 15, 29, 43, 57, 71, 85 및 119로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 FR1, 서열번호 3, 17, 31, 45, 59, 73 및 87로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 FR2, 서열번호 5, 19, 33, 47, 61, 75 및 89로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 FR3, 서열번호 7, 21, 35, 49, 63, 77 및 91로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 FR4, 서열번호 8, 22, 36, 50, 64, 78, 92, 117 및 120로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 FR1, 서열번호 10, 24, 38, 52, 66, 80, 94 및 122로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 FR2, 서열번호 12, 26, 40, 54, 68, 82, 96, 118 및 123으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 FR3, 또는 서열번호 14, 28, 42, 56, 70, 84, 98 및 125로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 FR4를 포함할 수 있다.

[99] "Fv" 단편은 완전한 항체 인식 및 결합 부위를 함유하는 항체 단편이다. 이러한 영역은 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인이, 예를 들어 scFv로

단단하게 사실상 공유적으로 연합된 이량체로 이루어진다.

- [100] "Fab" 단편은 경쇄의 가변 및 불변 도메인과, 중쇄의 가변 및 제1 불변 도메인(CH1)을 함유한다. F(ab')₂ 항체 단편은 일반적으로 그들 사이에 힌지 시스테인에 의해 그들의 카복시 말단 근처에 공유적으로 연결되는 한 쌍의 Fab 단편을 포함한다.
- [101] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는데, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇄 내에 존재한다. Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함할 수 있다.
- [102] 본 발명에 따른 항체는 1가 또는 2가이고, 단쇄 또는 이중 쇄를 포함한다. 기능적으로, 항체의 DLK1의 세포외 도메인에 대한 결합 친화도는 10⁻⁵M 내지 10⁻¹² M 범위 내에 있다. 예를 들어, 결합 친화성은 10⁻⁶ M 내지 10⁻¹² M, 10⁻⁷ M 내지 10⁻¹² M, 10⁻⁸ M 내지 10⁻¹² M, 10⁻⁹ M 내지 10⁻¹² M, 10⁻⁵ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻⁶ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻⁷ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻⁸ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻⁹ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻¹⁰ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻⁵ M 내지 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁶ M 내지 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁷ M 내지 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M 내지 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁹ M 내지 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁵ M 내지 10⁻⁹ M, 10⁻⁶ M 내지 10⁻⁹ M, 10⁻⁷ M 내지 10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M 내지 10⁻⁹ M, 10⁻⁵ M 내지 10⁻⁸ M, 10⁻⁶ M 내지 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M 내지 10⁻⁸ M, 10⁻⁵ M 내지 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M 내지 10⁻⁷ M 또는 10⁻⁵ M 내지 10⁻⁶ M이다.
- [103] 또한, 본 발명에 따른 항체는 항원에 대한 친화도(affinity)가 증가된 항체이다. 용어 "친화도"는 항원의 특정부위를 특이적으로 인식하고 결합하는 능력으로, 항체의 항원에 대한 특이성과 함께 고도의 친화도는 면역 반응에서 중요한 요소이다. 당업계에서 공지된 임의의 다양한 분석, 예를 들어 방사면역분석법(RIA) 및 ELISA를 사용하여 친화도를 결정할 수고, 다양한 정량적 값으로 표현될 수 있다. 항체의 항원에 대한 친화도는 일반적으로 특정 항체-항원 상호작용의 해리 상수(dissociation constant, K_d)에 의해 나타낼 수 있다. K_d 값이 낮으면 낮을수록 항체의 항원에 대한 친화력이 높음을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 항체의 K_d 값은 18A5 항체가 0.52이며, 27F7 항체가 0.22이므로 인간 DLK1에 특이적으로 결합하는 고친화도 항체임을 알 수 있다.
- [104] 상기 DLK1의 세포외 도메인에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111 및 127로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 DLK1의 세포외 도메인에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111 및 127로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다.
- [105] 또한, 상기 DLK1의 세포외 도메인에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 126 및 128로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 상기 DLK1의 세포외 도메인에 결합하는 항체

또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 126 및 128로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

- [106] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 DLK1의 세포외 도메인을 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 본 발명의 항-DLK1 항체의 서열뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물도 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

- [107] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 항체 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열번호에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)은 NCBI 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

- [108] 이에 기초하여, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 명세서에 기재된 명시된 서열 또는 전체와 비교하여 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상의 상동성을 가질 수 있다. 이러한 상동성은 당업계에 공지된 방법에 의한 서열 비교 및/또는 정렬에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 서열 비교 알고리즘(즉, BLAST 또는 BLAST 2.0), 수동 정렬, 육안 검사를 이용하여 본 발명의 핵산 또는 단백질의 퍼센트 서열 상동성을 결정할 수 있다.

- [109] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산에 관한 것이다.

- [110] 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 분리하여 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 재조합적으로 생산할 수 있다. 핵산을 분리하고, 이를 복제 가능한 벡터 내로 삽입하여 추가로 클로닝하거나 (DNA의 증폭) 또는 추가로 발현시킨다. 이를 바탕으로, 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [111] "핵산"은 DNA(gDNA 및 cDNA) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다. 본 발명의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산의 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.
- [112] 상기 항체를 암호화하는 DNA는 통상적인 과정을 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄와 경쇄를 암호화하는 DNA와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리 또는 합성한다. 많은 벡터가 입수 가능하다. 벡터 성분에는 일반적으로, 다음 중의 하나 이상이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 증강인자 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.
- [113] 본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터; 코즈미드 벡터; 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다. 상기 벡터에서 항체를 코딩하는 핵산은 프로모터와 작동적으로 연결되어 있다.
- [114] "작동적으로 연결"은 핵산 발현조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [115] 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pLλ 프로모터, pRλ프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 또한, 예를 들어, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터, β-액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터엡스타인바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스

사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

- [116] 경우에 따라서, 벡터는 그로부터 발현되는 항체의 정제를 용이하게 하기 위하여 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은, 예컨대 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(ABI, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다.
- [117] 상기 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [118] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 언급된 벡터로 형질전환된 세포에 관한 것이다. 본 발명의 항체를 생성시키기 위해 사용된 세포는 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [119] 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*)(예를 들면, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)), 프로테우스미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 및 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)(예를 들면, 스태필로코쿠스 카르노수스(*Staphylococcus carnosus*))와 같은 원핵 숙주세포를 이용할 수 있다.
- [120] 다만, 동물 세포에 대한 관심이 가장 크며, 유용한 숙주 세포주의 예는 COS-7, BHK, CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U20S, 또는 HT1080일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [121] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법에 관한 것이다.
- [122] 상기 세포는 각종 배지에서 배양할 수 있다. 시판용 배지 중 제한없이 배양 배지로서 사용할 수 있다. 당업자에게 공지되어 있는 기타 모든 필수 보충물이 적당한 농도로 포함될 수도 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등이 발현을 위해 선별된 숙주 세포와 함께 이미 사용되고 있고, 이는 당업자에게 명백할 것이다.
- [123] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 회수는 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 불순물을 제거하고, 그 결과물을 예를 들어 친화 크로마토그래피 등을 이용하여 정제할 수 있다. 추가의 기타 정제 기술 예를 들어 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피 등이 사용될 수 있다.
- [124] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합단편 및 약물을

포함하는 항체-약물 접합체에 관한 것이다.

- [125] 항체-약물 접합체는 타겟 암세포로 항암 약물을 전달하기 전까지 항암 약물이 항체에 안정적으로 결합되어 있어야 한다. 타겟으로 전달된 약물은 항체로부터 유리되어 타겟 세포의 사멸을 유도해야 한다. 이를 위해서는 약물이 항체에 안정적으로 결합함과 동시에 타겟 세포에서 유리될 때는 타겟 세포의 사멸을 유도할 충분한 세포독성을 가져야 한다. 본 발명에 따르면, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편과 약물을 접합시킨 경우 인간 DLK1 발현 세포에 특이적으로 결합함으로써 약물을 효과적이면서도 특이적 및 선택적으로 전달할 수 있다.
- [126] 상기 약물은 약리학적 효과를 나타내는 제제로 본 발명의 DLK1에 특이적인 항체 또는 이의 절편에 결합될 수 있고, 산성조건에 의하여 상기 항체 또는 이의 절편과 분리될 수 있으며, 표적 세포에 대한 치료 효과를 나타내는 화합물을 의미하는데, 상기 약물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 세포독소(cytotoxin), 방사성 동위원소, 항증식제, 아포토시스 촉진제(pro-apoptotic agent), 화학요법제 및 치료용 핵산이 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [127] 상기 항체-약물 접합체는 DLK1 발현 세포로 내재화될 수 있으며 항체 의존성 세포독성을 매개할 수 있다.
- [128] 용어 "세포독성 활성"은 항체-약물 접합체 또는 항체-약물 접합체의 세포 내 대사물질의 세포-사멸, 세포증식 억제 또는 성장 억제 효과를 의미한다. 세포독성 활성은 1/2의 세포가 생존하는 단위 부피당 농도(몰 또는 질량)인 IC50 값으로서 표현될 수 있다.
- [129] 세포독소란 용어는 일반적으로 세포의 기능을 억제하거나 방지하고/하거나 세포를 파괴하는 제제를 말한다. 대표적인 세포독소에는 항생제, 튜불린 중합 억제제, DNA에 결합하여 이를 파괴하는 알킬화제, 및 단백질 키나제, 포스파타제, 토포아이스오머라제, 효소 및 사이클린과 같은 필수적인 세포 단백질의 기능 또는 단백질 합성을 파괴하는 제제가 포함된다. 세포독소의 예는 택솔, 사이토칼라신 B(cytochalasin B), 그라미시딘 D(gramicidin D), 에티뒀 브로마이드(ethidium bromide), 에메틴(emetine), 미토마이신(mitomycin), 에토포시드(etoposide), 테노포시드(tenoposide), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 콜히친(colchicin), 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 디하이드록시아트라신디온(dihydroxy anthracin dione), 미톡산트론(mitoxantrone), 미트라마이신(mithramycin), 악티노마이신 D(actinomycin D), 1-디하이드로테스토스테론(1-dehydrotestosterone), 글루코코르티코이드(glucocorticoids), 프로카인(procaine), 테트라카인(tetracaine), 리도카인(lidocaine), 프로프라놀롤(propranolol), 및 퓨로마이신(puromycin) 및 이들의 유사체 또는 동족체가 포함되지만 이에 제한되지 않는다.
- [130] 방사선요법 적용을 위해, 본 발명의 항-DLK1 항체는 고 에너지 방사성 동위원소를 포함할 수 있다. 당해 동위원소는 예를 들면, 항체 내에 존재하는 시스테인 잔기에서 항체에 직접적으로 결합될 수 있거나, 또는 킬레이트를

사용하여 항체와 방사성 동위원소의 결합을 매개할 수 있다. 방사선요법에 적합한 방사성 동위원소에는, α -방출기, β -방출기 및 오제 전자(auger electron)가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 진단상 적용에 유용한 방사성 동위원소에는 양전자방출기 및 γ -방출기가 포함된다.

- [131] 항증식제 및 아폽토시스 촉진제에는 PPAR-감마(예를 들면, 사이클로펜테논 프로스타글란딘(cyPGs)), 레티노이드, 트리테르페노이드(예를 들면, 사이클로아르탄, 루판, 우르산, 올레아난, 프리에텔란, 담마란, 쿠쿠르비타신 및 리모노이드 트리테르페노이드), EGF 수용체의 억제제(예를 들면, HER4), 라파마이신, CALCITRIOL (1,25-디하이드록시콜레칼시페롤(비타민 D)), 아로마타제 억제제(FEMARA (레트로존)), 텔로머라제 억제제, 철킬레이트제(예를 들면, 3-아미노피리딘-2-카복스알데하이드 티오세미카르바존(트리아핀)), 아폽틴(바이러스 단백질 3-닭 빈혈 바이러스로부터의 VP3), Bcl-2 및 Bcl-X(L)의 억제제, TNF-알파, FAS 리간드, TNF-관련 아폽토시스-유도 리간드(TRAIL/Apo2L), TNF-알파/FAS 리간드/TNF-관련 아폽토시스-유도 리간드(TRAIL/Apo2L) 신호전달의 활성화제, 및 PI3K-Akt 생존 경로 신호전달의 억제제(예를 들면, UCN-01 및 겔다나마이신)가 포함된다.

- [132] "화학요법제"는 작용의 메커니즘과는 관계없이, 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 부류는 알킬화제, 대사길항물질, 방추체 독성 식물 알칼로이드, 세포독성/항종양 항생제, 국소이성화효소 억제물질, 항체, 감광제, 그리고 키나아제 억제물질을 포함하지만 이들에 제한되지 않는다. 화학요법제는 "표적화된 요법" 및 전통적인 화학요법에 이용되는 화합물을 포함한다.

- [133] 항-DLK1 항체를 사용한 진단 방법을 위해, 약물은 시험관 내 또는 생체 내에서 DLK1-발현 세포의 존재를 검출하는데 사용되는 검출가능한 표지를 포함할 수 있다. 섬광조영술, 자기 공명 영상 또는 초음파를 사용하여 검출할 수 있는 표지와 같이, 생체내에서 검출할 수 있는 방사성 동위원소를 임상 진단 적용을 위해 사용할 수 있다. 유용한 섬광조영술 표지에는 양전자 방출기 및 γ -방출기가 포함된다. 마그네틱 공급원 영상화용으로 대표적인 조영제로는 상자성 또는 초상자성 이온(예를 들면, 철, 구리, 망간, 크롬, 에르븀, 유로퓸, 디스프로슘, 홀뮴 및 가돌리늄), 산화철 입자 및 수용성 조영제가 있다. 초음파 검출을 위해, 가스 또는 액체를 마이크로버블(microbubble) 조영제로서 방출되는 다공성 무기 입자속 안에 포획시킬 수 있다. 시험관내 검출에 유용한 검출 가능한 표지에는 형광발색단, 검출가능한 에피토프 또는 결합제 및 방사성 표지가 포함된다.

- [134] 상기 접합체는 약물을 항체 또는 기능적 균등물을 결합하여 공지된 방법으로 작제할 수 있다. 항체와 약물은 그들 자신이 가진 연결기 등을 통해 직접 결합할 수도 있고 또는 링커나 다른 물질을 통해 간접적으로 결합할 수 있다. 약물이 항체로부터 절단되도록 하는 주요 기전에는 리소좀(히드라존, 아세탈 및

시스-아코니테이트-유사 아미드)의 산성 pH에서의 가수분해, 리소좀 효소(카텝신 및 기타 리소좀 효소)에 의한 펩타이드 절단 및 디설파이드의 환원이 포함된다. 이러한 다양한 절단 기전의 결과로서, 약물을 항체에 연결시키는 기전은 매우 다양하며 어떠한 적합한 링커라도 사용될 수 있다.

[135] 항체와 약물이 결합하기 위한 적절한 연결기는 당해 분야에 널리 공지되며 예로써, 이황화 기, 티오에테르 기, 산분해성 기, 광분해성 기, 펩티다제 분해성 기 및 에스테라아제 분해성 기를 포함한다.

[136] 약물이 직접 결합될 경우 연결기(linking group)는 예로서는, SH기를 이용한 이황화결합이나 말레이미드를 매개로 하는 결합을 들 수 있다. 예를 들면, 항체 Fc영역의 분자 내 이황화결합과 약물의 이황화결합을 환원하여, 양자를 이황화결합으로 연결한다. 또한, 말레이미드를 통하는 방법 및 항체 내에 시스테인을 유전공학적으로 도입하는 방법도 있다.

[137] 항체와 약물을 다른 물질(링커)을 통해 간접적으로 결합할 수도 있다. 링커로는 항체, 약물 또는 모두와 반응하는 작용기를 1 또는 2종류 이상 가지는 것이 바람직하다. 작용기의 예로는 아미노기, 카르복실기, 머캡토기, 말레이미드기, 피리디닐기 등을 들 수 있다.

[138] 본 발명은 다른 관점에서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이다. 이중특이적 항체는 서로 다른 두 종류의 항원(표적 단백질)에 결합할 수 있는 항체를 의미하고, 유전공학 또는 임의의 방법에 의해 제조된 형태이다.

[139] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 항체-약물 접합체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[140] 본 발명은 예를 들어, (a) 본 발명에 따른 DLK1에 특이적으로 결합하는 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물일 수 있다. 본 발명은 또한, 환자에게 필요한 유효량으로 본 발명에 따른 DLK1에 특이적으로 결합하는 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

[141] 상기 조성물은 상술한 본 발명의 항-DLK1 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 기재 생략한다.

[142] "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 암 또는 감염 질환을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 암의 발전의 억제, 암의 경감 또는 암의 제거, 또는 감염질환의 억제, 감염질환의 경감 또는 감염질환의 제거를 의미한다.

[143] 용어 "암" 및 "암성(cancerous)"은 세포의 집단이 조절되지 않는 세포 성장으로 특징지어지는 포유류에서의 생리학적 조건을 가리키거나 기술한다.

[144] "종양"은 전-암성(pre-cancerous) 병변을 비롯하여 양성(비-암성) 또는

악성(암성)인 과도한 세포 성장 또는 증식으로 야기된 임의의 조직 덩어리를 가리킨다.

- [145] 용어 "암 세포", "종양 세포" 및 문법적 등가어는 종양 세포 집단의 대부분(bulk)을 포함하는 비-종양원성 세포, 그리고 종양원성 줄기 세포(암 줄기 세포)를 모두 포함하는, 종양 또는 전-암성 병변에서 유래된 세포의 총 집단을 가리킨다.
- [146] 본 발명의 항체는 DLK1-발현 세포와 관련된 적용의 경우에 시험관 내 및 생체 내 모두에서 유용하게 이용될 수 있다. 상기 단일클론 항체 또는 이의 절편; 또는 항체-약물 접합체에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [147] 본 발명에서 "암"은 DLK1이 발현되는 암이라면 그 종류에 제한없이 포함한다. 상기 DLK1이 발현되는 암은 피부암, 유방암, 자궁암, 대장암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 췌장암, 위암, 육종, 신경아세포종 및 재발암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [148] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 DLK1에 특이적인 단일클론 항체 또는 이의 절편; 또는 상기 항체-약물 접합체를 함유할 수 있으며, 상기 성분에 본 발명의 약학적 조성물의 투여를 위하여 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 약학적으로 허용가능한 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 완충식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [149] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 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. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 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 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[150] 또한, 본 발명은 다른 관점에서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 항체-약물 접합체를 접촉시키는 것을 포함하는, DLK1-발현 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다.

[151] 상기 종양 세포는 DLK1을 발현하는 종양 세포이면, 그 종류에 제한없이 포함한다. 바람직하게는 상기 DLK1이 발현되는 종양 세포는 피부암, 유방암, 자궁암, 대장암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 췌장암, 위암, 육종, 신경아세포종 또는 재발암 세포일 수 있으나 이에 한정하지 않는다.

[152] 종양 세포 성장을 억제하는 방법의 한 구체예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 약물, 예를 들면, 세포독소, 방사능동위원소 또는 화학요법제와 같은, 치료제에 접합된다. 다른 구체예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 하나 이상의 추가적인 항-종양제와 조합하여 투여된다. 항체는 수술 및/또는 방사선과 같은 다른 암 치료법, 및/또는 상기에서 논의되고 설명된 다른 항-신생물 제제와 함께 사용될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[153] 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 항체-약물 접합체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법을 제공한다.

[154] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 항체-약물 접합체를 이용한 치료 방법은 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 항체-약물 접합체를 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다. 또한, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[155] 본 발명의 상기 조성물을 투여하는 개체는 인간을 포함한 포유동물을 제한 없이 포함한다.

[156] 본 발명의 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경우 또는 비경로의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[157] 본 발명은 다른 관점에서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다. 본 발명의 DLK1에 특이적인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 진단용 조성물을 사용하여 DLK1의 발현 여부와 발현 정도와 관련된 질환, 예컨대 암을 진단할 수 있다.

- [158] 또한, 본 발명은 상기 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.
- [159] 상기 조성물 및 암에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다. 또한, 상기 암 진단용 키트는 분석방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분을 가진 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다.
- [160] 일 실시예에서 상기 키트는 병, 바이알, 백, 주사기 또는 시린지를 포함할 수 있다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리, 플라스틱, 또는 금속으로부터 형성될 수 있다. 상기 용기에 포함된 라벨은 사용 지침을 나타낼 수 있다. 추가로 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질, 예컨대 기타 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 시린지 등을 포함할 수 있다.
- [161] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 DLK1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편을 항원 결합 도메인으로 포함하는 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor: CAR)에 관한 것이다.
- [162] CAR는 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 세포내 신호화 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함할 수 있다. 세포외 도메인은 링커에 의해 막관통 도메인에 연결될 수 있다. 세포외 도메인은 또한 신호 펩티드를 포함할 수 있다.
- [163] CAR는 T-세포 신호화 분자의 세포질 도메인에 경첩 및 막관통 영역을 통해 커플링되는 종양 연계 항원 (TAA)에 특이적인 항체의 단쇄 단편 가변부 (scFv)를 포함한다. 대부분의 통상적인 림프구 활성화 모이어티는 T-세포 촉발 (예를 들어 CD3 ζ) 모이어티를 갖는 텐덤 (tandem)에서 T-세포 공자극 (예를 들어 CD28, CD137, OX40, ICOS, 및 CD27) 도메인을 포함한다. CAR-매개 입양 면역요법은 CAR-이식된 세포가 비-HLA-제한 방식으로 표적 종양 세포 상의 TAA를 직접 인식하게 한다.
- [164] 본 발명은 상기 CAR를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포를 포함한다. 상기 세포는 면역 세포, 바람직하게는 T 세포 또는 NK 세포일 수 있다.
- [165] 본 발명은 또 다른 관점에서, 종양세포에서 발현되는 DLK1에 특이적으로 결합하는 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 T 세포 관여자 (T-cell engager)에 관한 것이다.
- [166] 상기 T 세포 관여자는 예를 들어, 이중-특이적 T-세포 관여자 (BiTE®)일 수 있다. 상기 BiTE는 인공 이중특이적 모노클로날 항체의 부류로, 약 55 킬로달톤의 단일 펩티드 사슬 상에 4 개의 상이한 유전자로부터 아미노산 서열 또는 상이한 항체의 2 개의 단쇄 가변부 단편 (scFv) 으로 구성되는 융합 단백질이다. scFv 중 하나는 CD3 수용체를 통해 T 세포에 결합하고, 다른 하나는 종양 특이적인 분자를 통해 종양 세포에 결합한다. 다른 이중특이적 항체와 유사하게, 그리고 보통의 모노클로날 항체와는 달리, BiTE®는 T 세포와 종양 세포 사이에서 연결을 형성한다. 이는 퍼포린 및 그랜자임과 같은 단백질을 생산함으로써 MHC I 또는 공자극 분자의 존재와는 독립적으로 T 세포가 종양 세포 상에서 세포독성 활성을 발휘하게 한다. 이들 단백질은 종양 세포로 진입하고 세포의 세포사멸을 개시한다.

[167]

[168] 실시예

[169] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[170]

[171] 실시예 1. 항원(DLK1) 제작과 정제

[172] DLK1의 클로닝은 인간 태반으로부터 만들어진 cDNA 라이브러리를 가지고 DLK1의 세포 외 영역을 얻기 위해 5'과 3'에 제한효소 SfiI 사이트가 포함된 프라이머(표 2)를 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)에 의해 증폭시켰고, 증폭된 PCR 산물은 pYK-602 벡터를 이용하여 카복시-말단에 인간 Fc를 융합시켜 제작되었다(도 1A).

[173]

[174] [표2]

DLK1 클로닝을 위한 PCR 프라이머

프라이머 명칭	서열정보(5'→3')
DLK1 정방향	AGGGGGCCGTGGGGGCCGCTGAATGCTTCCCGGCCTGC (서열번호 113)
DLK1 역방향	TAGCGGCCGACGCGGCCAACTGGCCCTCGGTGAGGAGAGG (서열번호 114)

[175]

[176] pYK602 벡터에 클로닝된 DLK1 플라스미드는 PEI(polyethylenimine)를 이용하여 HEK293E 세포(Invitrogen, 미국)에 형질감염(transfection) 시킨 후, 무혈청 배지(serum-free medium)에서 배양하였다. 배양 7일째 되는 날, 세포배양 배지를 수거, 원심분리(6,000rpm, 30분, 44°C)와 0.22 μ m Top-필터(Millipore, 미국)를 통해 세포와 부유물질을 제거한 후, 상층액을 모아 단백질 A 비드(protein A bead)(GE healthcare, 영국)로 정제하였다. 얻어진 단백질의 순도는 비환원(Non-reducing) 및 환원(Reducing) 조건의 SDS-PAGE gel을 이용하여 분석하였다(도 1B).

[177]

[178] 실시예 2. DLK1 단일 인간 항체 스크리닝 및 제조

[179] 실시예 2-1. 파지 디스플레이(phage display)를 통한 패닝

[180] 인간 항체 라이브러리 파지는 2.7×10^{10} 의 다양성을 가진 인간 scFv 파지 디스플레이 라이브러리(human scFv display library)를 박테리아에 감염시킨 후 박테리아를 30°C에 16시간 배양한 다음, 원심분리(5,000rpm, 10분, 4°C)하여 상층액을 PEG(Polyethylene glycol)로 농축하고, 이를 PBS 완충용액에 녹여 인간

scFv 파지 디스플레이 라이브러리를 준비하였다.

- [181] 코팅버퍼(15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, 3mM Sodium azide, pH 9.6)에 들어있는 DLK1-hFc(100 µg/3 ml)를 밤새 4°C에서 면역흡착튜브(immunosorb tube, Nunc, 미국) 표면에 고정시킨 후, PBS에 4%로 용해된 탈지분유(skim milk, BD Biosciences, 미국)로 실온에서 2시간 동안 블로킹하였다. 한편 2.7x10¹⁰의 다양성을 가진 인간 scFv 파지 디스플레이 라이브러리를 파지에 감염시킨 후 라이브러리 파지를 면역흡착튜브에 넣은 후, 2시간 동안 상온에서 반응시킨 다음, PBS-T(0.05% Tween-20 in PBS) 5ml로 20번 세척하고 항원에 특이적으로 결합한 scFv 파지만 100mM 트리에틸아민(triethylamine)으로 용출하였다. 용출된 파지는 다시 대장균에 감염시켜 증폭한 후, 비슷한 방법으로 2~3차 패닝을 수행하였고, 3차 패닝 후 항원에 대한 파지의 콜로니 수는 표 3과 같이 1, 2차 패닝 결과와 비교해서 100배 이상 증폭(enrichment)되었으며, 항원에 대한 결합능도 증가하였다(도 2).

[182]

[183] [표3]

패닝에 따른 항체의 역가비교

패닝횟수	파지의 유입수	파지의 결합수
1회	2.1X10 ¹³	3.6X10 ⁷
2회	1.2X10 ¹³	7.3X10 ⁷
3회	2.5X10 ¹³	2.2X10 ⁹

[184]

[185] 실시예 2-2. 단일 클론 선별

- [186] 결합능이 큰 3차 패닝으로부터 얻어진 파지들을 대장균에 감염시킨 후, 각각의 단일 클론을 96-딥 웰 플레이트(96-deep well plate, 바이오니아)에 배양한 다음, 상층액에 존재하는 단일 scFv 파지에 대해 파지-ELISA를 수행하여 선별하였다. 우선 코팅버퍼를 사용하여 한 웰 당 100ng의 DLK1 단백질을 면역-96 마이크로웰 플레이트(immuno-96 microwell plate)에 분주하고 4°C에서 밤새 표면 고정시킨 후, 200µl의 4% 탈지분유가 포함된 PBS-T를 모든 웰에 넣어 37°C에서 1시간 동안 반응시킴으로 비특이적인 단백질 결합을 차단하였다. 이후 각각의 배양된 200µl의 단일 scFv 파지를 넣고 37°C에서 2시간 반응시킨 후, 200µl의 PBS-T로 3번 세척한 뒤에 HRP(horseradish peroxidase)가 결합되어 있는 마우스 항 M13 항체(mouse anti-M13-HPR antibody, GE healthcare, 영국)를 1:2,000으로 희석하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. PBS-T로 다시 3번 세척 후, 10ml의 PC 완충용액(0.1M Na₂HPO₄, 0.005M Na-Citrate, pH 5.0)에 4mg OPD(o-phenylenediamine dihydrochloride, Sigma, 미국) 1정, 30% 과산화수소(H₂O₂) 10µl를 넣어 빛이 없는 조건에서 10분간 반응시킨 후, 50µl의 2.5M 황산(H₂SO₄)

)으로 반응을 중단시킨 다음, 분광광도계(spectraMax M5 spectrophotometer, Molecular Devices, 미국)를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

[187] 그 결과, DLK1 단백질에 대해 결합능이 강한 수 십종의 단일 파지 클론을 선별하였고, 도 3은 여러 단일 파지 클론 중 대표클론을 도식화한 그림이다.

[188] 상기 선별된 단일 클론에 대해 DNA 정제 키트(Qiagen, 독일)를 사용하여 파지미드(phagemid) DNA를 분리하여 DNA 염기서열 분석 하였고, 중쇄와 경쇄의 CDR3 부위 서열을 NCBI의 웹페이지 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>의 Ig BLAST 프로그램을 이용하여 분석한 결과, 7종(17B11, 18A5, 20D3, 21D8, 21F9, 27F7, 35E2)의 서로 다른 클론으로 확인되었다(표 4). 7종의 클론에 대한 서열은 표 5에 기재된 바와 같다.

[189]

[190] [표4]

7종의 DLK1 특이적 단일 클론의 특성

클론	VH (Germ line)	유사도	VL (Germ line)	유사도	그룹
17B11	IGHV3-23	85.7%	IGLV1-40	91.9%	1
18A5	IGHV3-30	82.7%	IGKV1-39	84.2%	2
20D3	IGHV3-9	92.9%	IGKV1-12	87.4%	3
21D8	IGHV3-74	93.9%	IGKV2-24	87.0%	4
21F9	IGHV1-24	86.7%	IGLV6-57	87.8%	5
27F7	IGHV3-11	82.7%	IGLV1-40	91.9%	6
35E2	IGHV3-66	90.7%	IGKV1-12	93.7%	7

[191]

[192] [표5]

7종의 DLK1 특이적 단일 클론 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역

클론	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	서열 번호
17B11- HC	QVQLVE SGGTLV QPGGSL RLSCAA S	GFTFSS HA	MSWVR QTPGKG LEWVSS	ITKSG SGT	YSADSVKGRFTI SRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTA VYYC	TREGLGY YYGMDV	WGQGT VTVSS	99
서열 번호	1	2	3	4	5	6	7	
17B11- LC	QLVLTQ PPSVSG APGQRV IISCTGS	SSNIGA GYD	VHWYQ QLPGTAP RLLIY	GST	NRPSGVPDRFSG SKSGTSASLAIT GLQAEDEADYY C	QSYDNSL SAHYV	FGTGTK VTVL	100
서열 번호	8	9	10	11	12	13	14	
18A5- HC	QVQLVQ SGGAVV QPGHSL RLSCEA S	GFKFKD YG	MHWVR QAPGKG LEWLAV	ISHDG RNK	NYADSVKGRITI SRDNSKNTLSFQ MNSLRAEDTAV YYC	VRDWSYA FDI	WGQGT VTVSS	101
서열 번호	15	16	17	18	19	20	21	
18A5- LC	DIQMTQ SPSFLSA SVGDRV NITCRAS	QDISRR	LAWYQQ KPGKAP KLLIY	GAA	SLQSAVASRFSG SGSGTEFTLTIS LQPEDFANYC	QQIYTTPL T	FGGGTK VEIK	102
서열 번호	22	23	24	25	26	27	28	
20D3- HC	QMQLVQ SGGGLV QPGSL RLSCAA S	GFTFDD YA	MHWVR QAPGKG LEWVSG	ISWNS GSI	GYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTA VYYC	TKGPGLA TGKVYFN S	WGQGT QVTVSS	103

[193]

서열 번호	29	30	31	32	33	34	35	
20D3- LC	DIQMTQ SPSSVSA SVGDRV TITCRAS	QRISSW	LAWYQQ KPGRAP KLLIH	SAS	TLHNGVPSRFSG SASGTDFTLTIS LQPEDFAIYYC	QQGHSFP YT	FGQGTK LDIK	104
서열 번호	36	37	38	39	40	41	42	
21D8- HC	QVQLVE SGGGLV QPGGSL RLSCAA S	GFTFSS YW	MNWVR QAPGKG LVWVSR	ISPDG SST	TYADSVKGRFTI SRDNAKNTLYL QMNSLRAEDTA VYYC	ARGYSPK YPTVGLD V	WGQGT ITVSS	105
서열 번호	43	44	45	46	47	48	49	
21D8- LC	DIVMTQ SPLSSPV TLGQPA SISCRSS	ESLLHS NGNTY	LTWLQQ RPGQPP LLIH	KIS	NRFGVDPDRFSG SGAGTDFTLQIT RVETEDVGVYY C	VQTTQWP WT	FGQGTK VEIK	106
서열 번호	50	51	52	53	54	55	56	
21F9- HC	QVQLVQ SGAEVK KPGASV RVSCKV S	GYSLSE FP	IHWVRQ APRMGL EWMGG	SYPED GET	LYAQKFQGRVT MTEDTSTDYAY MELSSLRSED TA VYYC	ARLNIFE STDYWVD AFDI	WGQGT MVTVSS	107
서열 번호	57	58	59	60	61	62	63	
21F9- LC	QLVLTQ PYSVSES PGKITI SCTRS	SGSIAS NF	VQWYQ QRPQSA PTPVIY	EDN	QRPSGVDPDRFSG SIDSSNSASLT SGVMTEDEADY YC	QSYDSSGS SWV	FGGGTK LTVL	108
서열 번호	64	65	66	67	68	69	70	
27F7- HC	QMQLVE SGGGLV KPGGSL TLSCDA T	GFNFGS YY	MNWVR QAPGKG LEWLAH	ISSTG RTI	YYADSVKGRFTI SRDNAKSSLDL QMNSLRAEDTA VYYC	ARDQGY FGMDV	WGHGTT VTVSS	109

[194]

서열 번호	71	72	73	74	75	76	77	
27F7- LC	QLVLTQ PSSVSG APGQRV TISCTGS	SSNIGA GYD	VDWYQ QLPGTAP KLLIY	GNT	NRPSGVDPDRFSG SKSGTSASLAIT GLQAEDDSY YC	QSYDSSLS AWV	FGGGTK LTVL	110
서열 번호	78	79	80	81	82	83	84	
35E2- HC	QVQLVE SGGGVV QPGRSL RLSCAA S	GFTFSS YA	MHWVR QAPGKG LEWVAV	IYSGG ST	YYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTA VYYC	AREGSYD VMTYTRI GGYFDY	WGQGT VTVSS	111
서열 번호	85	86	87	88	89	90	91	
35E2- LC	DIQMTQ SPSSVSA SVGDRV TITCRAS	QGISDW	VAWYQQ KPGKAP KLLIY	AAS	SLQSGVPSRFSG SGSGTEFSLTISN LQPEDFATYYC	QQANSFP LT	FGPGTK VEIK	112
서열 번호	92	93	94	95	96	97	98	

[195]

[196] 실시예 2-3. scFv 형태를 IgG 형태로 전환(conversion)

[197] 선별된 7종의 단일클론 파지 항체들을 scFv 형태에서 IgG 형태로 전환하기

위해 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 염기서열을 각각 제한효소 SfiI/NheI 사이트를 이용하여 pNATVH에 클로닝하고, 제한 효소 SfiI/BglII 사이트를 이용하여 pNATVL에 클로닝하였다(도 4A).

- [198] 클로닝된 pNATVH와 pNATVL 벡터는 6:4의 비율로 HEK293E 세포에 동시 형질감염(co-transfection)하여 7일차 상층액을 수거하여 원심분리와 0.22 μ m Top-필터를 통해 세포와 부유물질을 제거한 후, 상층액을 모아 단백질 A 비드(protein A bead)로 정제하고 정제된 항체의 순도는 비환원 및 환원 조건의 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였다(도 4B).

[199]

- [200] 실시예 3. DLK1 단일클론 항체의 특성

- [201] 실시예 3-1. DLK1 항원에 대한 친화도(affinity) 결정

- [202] 7종의 DLK1 단일 인간 항체의 항원에 대한 결합력은 ELISA 방법으로 측정하였다. 상기 실시예 2-2에서 기술한 파지-ELISA 방법과 동일하며, 파지 대신 7종의 DLK1 단일 인간 항체를 100nM에서 0.046nM까지 1/3씩 단계 희석(serial dilution)하여 각 웰의 컬럼에 순차적으로 100 μ l씩 넣어 수행하였고, 측정된 결과는 GraphPad Prism 6 software(<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>)를 이용하여 분석하였다. DLK1 단일 인간 항체 17B11, 18A5, 20D3, 21D8, 21F19, 27F7 및 35E2의 항원에 대한 친화도 해리상수(Kd)는 각각 7.19, 0.52, 53.95, 8.40, 0.53, 0.22 및 0.33nM이었다(도 5).

[203]

- [204] 실시예 3-2. DLK1 항원에 대한 결합부위(epitope) 결정

- [205] DLK1 단일 인간 항체의 항원에 대한 결합부위를 알아보기 위해 도 6A에서와 같이 4종의 인간 유래 DLK1 재조합 단백질 및 hFc 재조합 단백질을 상기 실시예 1에서 기술한 방법과 동일한 방법으로 제작, 생산, 정제하였다(도 6B). 이때, 정제된 DLK1 재조합 단백질의 순도는 모두 95% 이상이었고 7종의 DLK1 인간 항체에 대해 ELISA를 수행하였다(도 6C).

- [206] 그 결과 항-DLK1 항체 17B11, 20D3, 21D8, 27F7은 인간 유래 EGF-유사 반복 도메인 1 및 EGF-유사 반복 도메인 2에, 항-DLK1 항체 18A5, 21F9, 35E2는 EGF-유사 반복 도메인 6 및 막근접 도메인에 결합부위를 갖는다는 것을 확인하였다(도 6C).

[207]

- [208] 실시예 3-3. 다른 종의 DLK에 대한 교차반응성(cross-reactivity) 결정

- [209] DLK1 단일 인간 항체의 다른 종(species)에서 발견되는 DLK1 오쏘로그(orthologue)에 대한 교차 반응성(cross-reactivity)을 알아보기 위해 도 7A에서와 같이 마우스 DLK1 및 원숭이 DLK1을 상기 실시예 1에서 기술한 동일한 방법으로 제작, 생산, 정제하였다(도 7B). 이 때, 정제된 DLK1 재조합 단백질의 순도는 도 7B와 같이 모두 95% 이상이었고, 이들 단백질을 가지고

7종의 DLK1 인간 항체의 결합력을 ELISA 방법을 통해 알아보았다(도 7C).

[210] 그 결과, 항-DLK1 항체 21F9은 인간 DLK1에만 결합하였고, 항-DLK1 항체 17B11, 20D3, 21D8, 27F7는 인간 DLK1 및 원숭이 DLK1에 결합하였으며, 항-DLK1 항체 18A5, 35E2는 인간 DLK1, 쥐 DLK1 및 원숭이 DLK1에 결합함을 확인하였다(7C).

[211] 따라서, 상기 실시예 3-1과 3-3의 결과에 근거하여, DLK1 단일 인간 항체의 인간 DLK1에 대한 결합력이 낮은 20D3과 원숭이 DLK1에 결합력이 낮은 21F9과 35E2는 특성분석을 통한 DLK1 인간 항체 선별과정에서 제외하였다.

[212]

[213] 실시예 3-4. FACS 분석을 통한 세포 표면에 존재하는 DLK1에 대한 결합력 확인

[214] 본 발명의 인간 항체의 세포 표면에 존재하는 DLK1에 대한 특이적 결합력은 항원을 지속적으로 발현할 수 있도록 형질전환된(DLK1이 과발현 된) 인간 췌장암 세포주인 MIA PaCa-2와 DLK1을 내생적으로 발현하고 있는 신경 모세포주인 SK-N-F1 세포를 사용하였고, DLK1에 대한 siRNA(Dharmacon, 미국)를 20nM 처리하여 DLK1의 발현을 감소시킴으로써 세포 표면의 항원 발현 정도에 따른 항체의 항원 결합력을 FACS 분석을 통해 수행되었다. 각각의 세포를 5×10^5 세포로 준비하고, 1차 항체로 $2 \mu\text{g/ml}$ 농도의 DLK1 단일 인간 항체인 17B11, 18A5, 21D8, 27F7을 4°C 에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, 세포는 차가운 PBS로 수세한 후, FITC(fluorescein isothiocyanate; Vector, 미국) 형광이 결합된 항-인간 IgG 2차 항체(Vector, 미국)를 사용하여 4°C 에서 1시간 동안 암배양하였다. 형광 염색된 세포는 2% FBS(fetal bovine serum)가 포함된 $500 \mu\text{l}$ 의 PBS로 현탁시킨 후, 유세포분석기인 FACSCanto™II flow cytometer(BD Biosciences, 미국)를 사용하여 분석하였다.

[215] DLK1이 과발현 한 MIA PaCa-2 세포에 대한 DLK1 siRNA에 의한 DLK1 발현을 감소는 웨스턴 블롯에 의해 확인하였다(도 8A). 17B11, 18A5, 27F7의 DLK1 단일 인간 항체는 DLK1이 과발현 된 MIA PaCa-2 세포에 결합하였고, DLK1 siRNA에 의해 DLK1의 발현량이 감소한 경우에 그 결합력은 없어지는 것으로 확인되었다(도 8B). 하지만, DLK1 단일 인간 항체 21D8은 DLK1이 과발현 된 MIA PaCa-2 세포에서 조차 결합하지 못하였다.

[216] 또한 DLK1을 내생적으로 발현하고 있는 SK-N-F1 세포와 이 세포에 DLK1 siRNA를 이용하여 DLK1 발현을 감소시킨 세포에서(도 9A), 18A5, 27F7의 DLK1 단일 인간 항체는 DLK1이 내생적으로 발현되는 SK-N-F1세포에 결합하였고, DLK1 siRNA에 의해 DLK1의 발현량이 감소한 경우에 그 결합력은 없어지는 것으로 확인되었다(도 9B). 하지만, 17B11, 21D8의 DLK1 단일 인간 항체는 DLK1을 내생적으로 발현하는 SK-N-F1 세포에서 조차 결합하지 못했다.

[217] 따라서 상기 실시예 3-4를 통해 DLK1 단일 인간 항체 17B11과 21D8은 특성분석을 통한 DLK1 인간 항체 선별과정에서 제외하였다.

[218]

[219] 실시예 3-5. 면역세포화학(Immunocytochemistry) 분석을 통한 세포 표면 특이적 결합력 확인

[220] 8-웰 챔버 슬라이드(8-well chamber slide; Nunc, 미국)에 DLK1이 과발현된 MIA PaCa-2 세포를 웰 당 2×10^4 세포로 시딩(seeding)하고, 10% FBS가 포함된 DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium; GE Healthcare, 미국) 완전배지에서 이틀 동안 키웠다. 다음 날 배지를 제거하고, $10 \mu\text{g/ml}$ 의 음성대조군 항-인간 IgG, 항-DLK1 항체 18A5 또는 항-DLK1 항체 27F7이 포함된 차가운 DMEM 배지를 첨가하여 항체가 세포 표면에 결합하도록 4°C 에서 1시간 동안 반응시켰다. 세포에 결합하지 않은 항체는 PBS로 3번 수세하여 제거하고 난 후, 세포에 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)가 포함된 PBS를 첨가하고 상온에서 10분간 반응시킴으로써 세포가 고정되도록 하였다. 고정된 세포는 10% FBS가 포함된 PBS로 수세한 후, FITC-항-인간 IgG(Vector, 미국) 2차 항체가 1:200으로 포함된 PBS를 첨가하여 상온에서 1시간 동안 암배양하였다. 형광염색된 세포는 PBST로 3분 간격으로 세 번 수세한 후, DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole; Vector, 미국)가 포함된 마운팅(mounting) 용액(Vector, 미국)을 슬라이드에 떨어뜨리고, 기포가 생기지 않도록 커버글라스로 덮어 봉쇄한 후, 공초점 레이저 현미경(Confocal laser scanning microscope; LSM510META, ZEISS, 독일)을 사용하여 이미징하였다.

[221] 그 결과 도 10에서와 같이, 2종(18A5, 27F7)의 DLK1 단일 인간 항체 모두 DLK1이 과발현된 MIA PaCa-2의 세포막에 결합함을 확인하였다. 반면에 음성대조군으로 사용한 항-인간 IgG는 세포막에 결합하지 않았다.

[222]

[223] 실시예 3-6. 인간 췌장암 세포에서 항-DLK1 항체의 세포 내 유입 검증

[224] 항-DLK1 항체 18A5와 27F7이 세포 표면에 존재하는 항원과 결합한 후, 세포 내로 들어갈 수 있는지 확인하기 위하여 DLK1이 과발현된 MIA PaCa-2 세포에서 엔도사이토시스(endocytosis) 시험법을 수행하였고, 항체의 세포 내 위치를 확인하기 위하여 면역세포화학적 염색을 실시하였다. 8-웰 챔버 슬라이드에 웰 당 2×10^4 로 시딩(seeding)된 세포에 $10 \mu\text{g/ml}$ 의 항-DLK1 항체 18A5와 27F7를 각각 처리하여 4°C 에서 1시간 동안 세포 표면에 존재하는 항원에 항체가 결합하도록 반응시켰다. 이후 세포를 차가운 PBS로 수세하고, 항체의 세포 내 유입을 유도하기 위해 37°C 에 미리 데운 완전배지로 교체하여, 37°C , 5% CO_2 조건에서 0.1, 0.5, 1, 2 또는 4시간 동안 배양하였다. 계획된 배양 시간이 끝난 후, 세포를 PBS로 3회 수세하여 배지를 제거하고, 4% 파라포름알데하이드로 고정하였다. 고정된 세포는 PBS로 3회 수세한 후, 0.2% 사포닌(saponin)과 10% FBS가 포함된 PBS에 희석한 각각의 엔도솜(endosome) 표지 항체와 함께 상온에서 1시간 동안 반응되었다. 엔도솜 표지는 후기 엔도솜(late endosome)/라이소솜(lysosome) 표지항체로 항-토끼 LAMP1(Abcam, 미국)을,

초기 엔도솜(early endosome) 표지항체로 항-마우스 EEA1(BD Biosciences, 미국)을, 초기/리사이클링 엔도솜(early/recycling endosome) 표지항체로 항-마우스 트랜스페린 수용체(transferrin receptor(TfR); BD Biosciences, 미국)를 사용하였다. 표지항체 결합 후 세포는 10% FBS가 포함된 PBS로 3분 간격으로 3회 수세한 후, 항-DLK1 항체에 대한 2차 항체인 FITC가 결합된 항-인간 IgG(Vector, 미국), 항-토끼 LAMP1에 대한 2차 항체인 Cy3가 결합된 항-토끼 IgG(Jackson ImmunoResearch, 미국), 그리고 항-마우스 EEA1 또는 항-마우스 TfR에 대한 2차 항체인 Cy3가 결합된 항-마우스 IgG(Jackson ImmunoResearch, 미국)를 0.2% 사포닌(saponin)과 10% FBS가 포함된 PBS에 각각 1:200으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 암배양하였다. 형광염색된 세포는 PBS로 3분 간격으로 3회 수세한 후, DAPI가 포함된 마운팅 용액(Vector, 미국)을 슬라이드에 떨어뜨리고, 기포가 생기지 않도록 커버글라스 덮어 봉쇄한 후, 공초점 레이저 현미경(Confocal laser scanning microscope; LSM510META, ZEISS, 독일)을 사용하여 이미징하였다.

- [225] 그 결과 2종의 DLK1 단일 인간 항체는 엔도사이토시스 유도 후 0.1시간부터 이미 세포 내로 유입됨을 확인하였다(도 11 및 도 12). 한편 유입된 항-DLK1 항체는 초기에는 초기 엔도솜 및 리사이클링 엔도솜의 표지 항체인 항-EEA1 항체 또는 항-TfR 항체와 공-위치(colocalization)되는 빈도가 높았으나, 이 빈도는 시간이 갈수록 낮아지고 후기 엔도솜/리소솜 표지항체인 항-LAMP1 항체와의 공-위치되는 빈도가 높아짐으로써 항-DLK1 항체가 리소솜으로 전달됨을 확인할 수 있었다. 따라서 DLK1이 과발현된 MIA PaCa-2 세포에서 DLK1 단일 인간 항체 18A5와 27F7 모두 세포 독성 물질을 세포 내로 전달하기 위한 ADC(Antibody Drug Conjugate, 항체-약물 접합체)용으로 적합한 항체임을 확인하였다.

[226]

[227] 실시예 3-7. FACs 분석을 통한 항-DLK1 항체의 세포내 유입 정량화

[228] 항-DLK1 항체 18A5와 27F7을 DLK1이 과발현된 MIA PaCa-2 세포 표면에 결합 및 세포유입을 유도한 뒤, 시간별로 세포 표면에 남아있는 항체의 양을 측정하기 위해 형광이용세포분류기를 통해 정량화를 실시하였다. 6-웰 plate에 웰당 5x10⁵ 세포로 시딩(seeding)된 세포에 10 µg/ml의 항-DLK1 항체 18A5와 27F7을 각각 처리하여 4°C에서 1시간 동안 세포 표면에 존재하는 항원에 항체가 결합하도록 반응시켰다. 이후 세포를 차가운 PBS로 수세하고, 항체의 세포 내 유입을 유도하기 위해 37°C에 미리 데운 완전배지로 교체하여, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 0, 0.5, 2 또는 4시간동안 배양하였다. 각 시간별로 세포는 차가운 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 포함된 PBS로 수세하고 세포를 scraper로 긁어 모으고 원심분리 한 후, FITC 형광이 결합된 항-인간 IgG 2차 항체(Vector, 미국)를 사용하여 4°C에서 0.5시간 동안 암배양하였다. 형광 염색된 세포는 10% FBS가 포함된 500µl의 PBS로 현탁시킨 후, 유세포분석기인 FACSCanto™II flow

cytometer(BD Bioscience, 미국)를 사용하여 분석하였다. 항체의 내면화의 동역학 비교는 세포 표면에 남아있는 항-DLK1 항체를 평균형광강도(Mean Fluorescence Intensity, MFI)에 의해 정량화하였다. 세포내 유입비율은 하기와 같이 계산하였다.

[229]

[230] 세포내 유입(%) = $(1 - \text{MFI}_{37^{\circ}\text{C}} / \text{MFI}_{4^{\circ}\text{C}}) \times 100$

[231]

[232] 그 결과 2종의 항-DLK1 단일 인간 항체는 시간의존적으로 빠르게 세포내로 유입됨을 확인하였다(도 13). 세포내 유입을 유도한지 0.5시간에 이미 18A5는 33.2%, 27F7은 45.8%가 세포내로 유입되었고, 4시간 후 18A5는 77.1%, 27F7은 88.2%로 높은 비율로 빠르게 세포내로 유입되었다. 따라서 상기 개시된 공초점 현미경 검사에 의해 평가되는 바와 같이 DLK1이 과발현된 MIA PaCa-2 세포에서 DLK1 단일 인간 항체 18A5와 27F7 모두 세포 독성 물질을 세포내로 전달하기 위한 ADC(Antibody Drug Conjugate, 항체-약물 접합체)용으로 적합한 항체임을 확인하였다.

[233]

[234] 실시예 4. DLK1 발현 암세포에서의 효능 시험

[235] 항-DLK1 항체에 대한 항-DLK1 항체-약물접합체(Antibody-Drug Conjugation)로서의 개발 가능성을 확인하기 위해 DLK1이 과발현된 MIA PaCa-2 세포에 ZAP Antibody Internalization kit(Advance Targeting System, USA)을 사용하여 DLK1 단일 인간 항체 18A5와 27F7에 대한 세포 독성 실험을 수행하였다. 96-well plate(Nunc, USA)에 웰당 세포를 2.5×10^3 으로 분주하고 24시간 부착시킨 후, 18A5, 18A5-Fab ZAP 혹은 27F7, 27F7-Fab ZAP을 1fM~10nM까지의 범위 안에서 도 14와 같이 다른 농도별로 조제하여 세포 배양액에 처리되었고, 양성 대조 약물인 사포린(Saporin)은 1fM~1μM까지, IgG-SAP은 1fM~100nM까지의 범위 안에서 세포 배양액에 처리되었다. 이후 DLK1이 과발현된 MIA PaCa-2 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 배양시킨 후, 50μl XTT/PMS 용액을 가하고 2시간 더 배양하였고, ELISA reader(Spectra Max5; Molecular Device, USA)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 세포 독성을 비교 검토하기 위하여 최대 효과의 50%에 이르도록 하는데 필요한 시료의 양(EC₅₀)을 측정하였다.

[236]

[237] 그 결과 18A5 혹은 27F7을 처리하거나 음성 대조 약물 IgG-SAP을 처리하였을 때, 어떤 농도에서도 DLK1이 과발현된 MIA PaCa-2세포에서 암세포의 사멸이 일어나지 않은 반면, 18A5- 혹은 27F7-Fab ZAP의 암세포에 대한 독성은 항체의 농도가 증가함에 따라 증가 하였고, 10pM의 농도에서 약 80%의 세포독성 효과를 나타냈다(도 14). 이때 EC50값은 각각 2.5, 30.1fM이었다. 반면에 양성 대조 약물인 사포린은 100nM 이상의 높은 농도에서 비특이적인 세포유입으로

인한 세포독성을 일으켰다.

- [238] 상기 실시예 4의 결과는 2종(18A5, 27F7)의 항-DLK1 단일 인간 항체는 암세포 표면에 발현하는 DLK1을 타겟으로 하여 암세포를 사멸시킬 수 있는 항-DLK1 항체-약물접합체로서 개발이 가능하다는 것을 시사한다.
- [239]
- [240] 실시예 5. DLK1 항체 18A5에 대한 항체 최적화
- [241] 실시예 5-1. DLK1-18A5 항체의 최적화를 위한 라이브러리 제작
- [242] 항체 최적화는 heavy chain은 고정하고 와이바이오로직스에서 보유하고 있는 10^5 - 10^6 light chain (LC) pool을 넣어 새로운 LC shuffling library를 제작 LC shuffling (LS), heavy chain의 hydrophobic core, exposed residue, charge cluster, salt bridge등과 같이 구조적으로 중요한 부위의 residue들과 비교분석을 하여 conserved residue로 mutation 한 뒤 LC shuffling 진행하는 core packing + LC shuffling (FR), antibody variable region의 DNA는 *in vivo* affinity maturation 과정에서 빈번하게 mutation이 될 수 있는 mutational hot spot을 random하게 mutation 한 뒤 LC shuffling 진행하는 CDR hotspot + LC shuffling (AM)등 3가지 방법으로 진행을 하였다.
- [243] LC shuffling 라이브러리 제작을 위해 18A5 항체의 LC 유전자를 BstX I으로 절단 한 다음 벡터로 사용하고, 본사에서 보유하고 있는 라이브러리 풀(library pool)을 BstX I으로 절단하여 인서트로 사용하였다. 리가제로 라이게이션 후, 전기천공 형질전환용 세포를 이용하여 형질 전환을 수행 하였다. 사각 접시 (square plate)에 형질 전환 된 세포를 모아 항체 라이브러리를 제조한 결과 약 1.5×10^7 의 다양한 라이브러리를 얻었고 염기 서열 분석 결과 HC의 서열은 모두 같으며 LC의 서열이 서로 다른 것을 확인 하였다.
- [244] Core packing + LC shuffling 라이브러리를 제작하기 위해 18A5 항체의 frame work (FR) 부분을 conserved 된 아미노산 서열로 치환한 뒤 LC 유전자를 BstX I으로 절단 한 다음 벡터로 사용하고, 본사에서 보유하고 있는 라이브러리 풀을 BstX I으로 절단하여 인서트로 사용하였다. 리가제로 라이게이션 후, 전기천공 형질전환용 세포를 이용하여 형질 전환을 수행 하였다. 사각 접시 (square plate)에 형질 전환 된 세포를 모아 항체 라이브러리를 제조한 결과 약 8.4×10^6 의 다양한 라이브러리를 얻었고 염기 서열 분석 결과 HC의 FR 부위가 conserved 된 아미노산 서열로 치환되었고 LC의 서열이 서로 다른 것을 확인 하였다.
- [245] CDR hotspot + LC shuffling 라이브러리를 제작하기 위해 18A5 항체의 frame work (FR) 부분을 conserved 된 아미노산 서열로 치환한 뒤 CDR의 hotspot 라이브러리를 Sfi I으로 절단 한 다음 인서트로 사용하고, 본사에서 보유하고 있는 라이브러리 풀을 Sfi I으로 절단하여 vector로 사용하였다. 리가제로 라이게이션 후, 전기천공 형질전환용 세포를 이용하여 형질 전환을 수행 하였다. 사각 접시 (square plate)에 형질 전환 된 세포를 모아 항체 라이브러리를 제조한 결과 약 5.6×10^6 의 다양한 라이브러리를 얻었고 염기 서열 분석 결과 HC의 FR

부위가 conserved 된 아마노산 서열로 치환되었고 CDR의 hotspot 서열의 아마노산이 random하게 mutation 되었고 LC의 서열이 서로 다른 것을 확인하였다.

[246]

[247] 실시예 6. DLK1 인간 항체 변이체의 선별

[248] 실시예 6-1. 바이오 패닝(Bio-panning)

[249] DLK1-18A5 항체의 최적화를 위해 제작한 라이브러리 파아지를 박테리아에 감염시킨 후 박테리아를 30°C에 16 시간 배양하였다. 배양 후 원심 분리하여 상층액을 PEG로 농축한 다음, 이를 PBS 완충용액에 녹여 인간항체 라이브러리를 준비하였다. 인간 DLK1-hFc 단백질 항원이 코팅된 면역 튜브에 라이브러리 파아지를 넣은 후, 실온에서 2시간 반응한 다음, 1XPBS/T와 1XPBS로 수세 후 항원에 특이적으로 결합한 scFv-파아지들만 추출하였다.

[250] 추출된 파아지를 다시 대장균에 감염시켜 증폭시키는 패닝과정을 통해 양성 파아지의 풀을 얻었고, 항체 최적화를 위한 패닝은 첫 번째 라운드만 진행하였다. 그 결과 표 6과 같이 2라운드 패닝에서 항원에 결합한 파아지 수가 input 대비 output 이 다소 증가하였음을 확인하였다.

[251]

[252] [표6]

패닝에 따른 항체의 역가비교

	패닝 횟수	파지의 유입수	파지의 결합수
DLK1-18A5-LS	1회	1.3×10^{13}	1.8×10^5
	2회	1.1×10^{13}	4.3×10^8
DLK1-18A5-FR	1회	1.1×10^{13}	3.6×10^6
	2회	1.3×10^{13}	2.8×10^8
DLK1-18A5-AM	1회	1.1×10^{13}	7.1×10^6
	2회	1.1×10^{13}	4.5×10^8

[253]

[254] 실시예 6-2. 양성 파아지 선별

[255] 패닝에서 얻은 콜로니는 2xYTCM, 2% glucose, 5 mM MgCl₂ 배지에 1 ml 96-딥 웰 플레이트를 사용하여 37°C에서 16시간 배양 하였다. 배양 세포는 OD₆₀₀에서 값이 0.1이 되도록 100~200 μ l 를 취해 1 ml의 2xYTCM, 2% glucose, 5 mM MgCl₂ 배지를 96-딥 웰 플레이트에 넣은 다음, 37°C에서 OD₆₀₀ 값이 0.5~0.7 되도록 2~3 시간 배양 하였다. M1 헬퍼 파지(helper phage)를 MOI값이 1:20 되도록 감염시켜 2xYTCMK, 5 mM MgCl₂ 1 mM IPTG 배지에 30°C에서 16시간 배양 하였다.

- [256] 면역-96 마이크로웰 플레이트(immuno-96 microwell plate)에 항원 DLK1을 웰당 100 ng씩을 4 °C에서 16시간 코팅한 후 PBS에 녹인 4% 탈지분유를 사용하여 각 웰을 블로킹하고 PBS/T로 수세 후, 16시간 동안 배양한 단일클론 scFv-phage (each 100 scFv-phage)를 각 웰에 1 µl씩 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 각 웰을 PBS/T로 4번 수세 후 2차 항체인 마우스 항-M13 항체(mouse anti-M13-HRP antibody, 영국)를 1/2000로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시키고 PBS/T 수세 후 발색하여 흡광도 490 nm에서 측정하였다.
- [257] 위와 같이 DLK1 항원에 결합하는 단일 파아지 클론들을 선별하기 위해 약 500여개의 항체 클론들을 분석하였으며, 결과로 모항체(parent)인 DLK1-18A5와 비교하여 결합능이 강하거나 유사한 단일 파아지 클론을 확인 할 수 있었다. 예로 38종의 단일 파아지 클론 분석 결과를 도 15에 나타냈다.
- [258]
- [259] 실시예 6-3. 양성 파아지 항체의 염기서열 분석
- [260] 선별된 단일 클론에 대해 DNA 정제 키트 (Qiagen, 독일)를 이용하여 DNA-prep을 수행하여 DNA를 얻어 서열 분석을 의뢰하였다 (솔젠트). 서열 분석 결과를 보고, 선별된 항체의 V_H와 V_L의 CDR region을 확인하였고 이들 항체와 germ line 항체군의 유사성을 NCBI의 웹사이트 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>의 Ig BLAST 프로그램을 이용하여 조사하였다. 그 결과 모항체(DLK1-18A5)와 비교하여 항원 결합력이 높거나 유사한 44종 (LS: 19종, FR: 8종, AM: 17종)의 특이적인 파아지 항체를 얻었고, 아래 기술한 실시예와 같이, 다른 중간 교차반응성(cross-reactivity), 항원 결합 부위(epitope), 친화도(affinity), 세포 결합능, 세포내 유입력, 암세포 사멸 효능 등의 분석을 통해 18A5_LS_1A10과 18A5_AM_1A12 항체 2종을 선별하였으며, 선별한 2종의 단일 클론 특성은 표 7에 정리하여 제시하였다.
- [261]
- [262] [표7]

최적화 과정을 통해 선별된 DLK1 인간항체 변이체의 단일 클론 특성

클론	VH (Germ line)	유사도	VL (Germ line)	유사도	그룹
18A5	IGHV3-30	82.7%	IGKV1-39	84.2%	1
18A5_LS_1A10	IGHV3-30	82.7%	IGKV1-39	92.6%	2
18A5_AM_1A12	IGHV3-30	84.7%	IGKV1-39	86.3%	3

- [263]
- [264] 선별된 2종 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR, FR 서열 및 이를 포함하는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 항체는 다음 표 8과 같다.
- [265]

[266] [표8]

선별된 DLK1 인간항체 변이체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역

클론	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	서열 번호
18A5_ LS_1A10 -HC	QVQLVQSGG AVVQPGHSLR LSCEAS	GFKFK DYG	MHWV RQAP GKGL EWLA V	ISHDGR NK	NYADSVKGR LTISRDN SKN TLSFQMNSLR AEDTAVYYC	VRDWS YAFDI	WGQG TLVTV SS	101
서열 번호	15	16	17	18	19	20	21	
18A5_ LS_1A10 -LC	DIQMTQSPSS LSASLGDRVT ITCRAS	QGISS A	LAWY QQKP GKAP KLLIY	AAS	SLQSGVPSRF SGSGSGTDFT LTINSLQPED FATYYC	QQSYT TPLT	FGGGT KVEIK	126
서열 번호	117	115	24	95	118	116	28	
18A5_ AM_1A12 -HC	QVQLVQSGG GVVQPGGSLR LSCAAS	GFKFK DYG	MHWV RQAP GKGL EWLA V	ISHDGR NK	NYADSVKGR LTISRDN SKN TLSFQMNSLR AEDTAVYYC	VRDWS YAFDI	WGQG TLVTV SS	127
서열 번호	119	16	17	18	19	20	21	
18A5_ AM_1A12 -LC	DIQMTQSPSF LSASVGDRVT ITCRAS	HDISSS	LAWY QQKS GKAP KLLIY	SAS	NLKSGVPSRF SGSGSGTDFS LTISSLQPEDF ATYYC	QQSYT TVLT	FGGGT KLEIK	128
서열 번호	120	121	122	39	123	124	125	

[267]

[268] 실시예 7. DLK1 인간항체 변이체의 생산

[269] 선별된 18A5 항체 변이체 2종의 항체들 생산은 실시예 2-3에 기술한 동일한 과정으로 수행되었다. 클로닝된 중쇄와 경쇄를 포함하는 각각의 벡터는 동물 임시발현 세포 HEK-293E에 동시 형질감염하여 발현 시킨 후, 단백질을 친화성 크로마토그래피로 정제하여 생산량을 확인하고, 환원, 비-환원 조건에서 SDS-PAGE 분석을 통해 단백질 순도 및 이동도 상태를 확인하였다.

[270] 그 결과, 도 16과 같이 DLK1-18A5 인간항체 변이체 LS_1A10과 AM_1A12은 비환원 조건에서는 모두 150 kDa 이상의 크기에서 검출되었고, 순도는 95% 이상이였으며, 생산량은 각각 127.4 mg/L, 168.5 mg/L로 확인되었다.

[271]

[272] 실시예 8. DLK1 단일 인간 항체 변이체의 특성

[273] 실시예 8-1. 선별된 DLK1 인간 단일 항체 변이체들의 교차반응성(cross-reactivity) 결정

[274] DLK1 단일 인간 항체 변이체의 다른 종(species)에서 발견되는 DLK1 오조로그(orthologue)에 대한 교차 반응성(cross-reactivity)을 알아보기 위해 도 7에서 사용한 동일한 마우스 DLK1 및 원숭이 DLK1을 단백질을 가지고 DLK1

인간 항체의 결합력을 ELISA 방법을 통해 알아보았다.

- [275] 그 결과, 항-DLK1 항체 변이체 18A5_LS_1A10과 18A5_AM_1A12는 모항체 18A5와 동일한 인간 DLK1, 쥐 DLK1 및 원숭이 DLK1에 결합함을 확인하였다(도 17).
- [276] 실시예 8-2. 선별된 DLK1 인간 단일 항체 변이체들의 DLK1 항원에 대한 결합 부위(epitope) 결정
- [277] DLK1 단일 인간 항체 변이체의 항원에 대한 결합부위를 알아보기 위해 도 6에서와 동일한 4종의 인간 유래 DLK1 제조합 단백질 및 hFc 제조합 단백질을 가지고 DLK1 인간 항체 변이체에 대해 ELISA를 수행하였다.
- [278] 그 결과 항-DLK1 항체 변이체 18A5_LS_1A10과 18A5_AM_1A12는 모항체 18A5와 동일한 EGF-유사 반복 도메인 6 및 막근접 도메인에 결합부위를 갖는다는 것을 확인하였다(도 18).
- [279] 실시예 8-3. 선별된 DLK1 인간 단일 항체 변이체들의 항원에 대한 친화도(affinity) 결정
- [280] 선별된 DLK1 단일 인간 항체 변이체의 항원에 대한 결합력은 ELISA 방법으로 측정하였다. 상기 실시예 2-2에서 기술한 파지-ELISA 방법과 동일하며, 파지 대신 선별된 DLK1 단일 인간 항체 변이체를 100 nM에서 0.046 nM 까지 1/3씩 단계 희석(serial dilution)하여 각 웰의 컬럼에 순차적으로 100 μ l씩 넣어 수행하였고, 측정한 결과는 GraphPad Prism 6 software (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>)를 이용하여 분석하였다. DLK1 단일 인간 항체 18A5_LS_1A10, 18A5_AM_1A12의 항원에 대한 친화도 해리상수(Kd)는 각각 0.047, 0.013 nM이었다(도 19).
- [281]
- [282] 실시예 8-4. FACs 분석을 통한 세포 표면에 존재하는 DLK1에 대한 결합력 확인
- [283] 항-DLK1 항체 18A5와 DLK1 인간 항체 변이체 항체인 18A5_LS_1A10, 18A5_AM_1A12의 DLK1이 과발현시킨 인간 췌장암 세포주인 MIA PaCa-2 세포 표면에 결합력을 비교하기 위하여 FACS 분석을 통해 수행하였다. 세포를 5×10^5 세포로 준비하고, 1차 항체로 항-DLK1 항체 18A5와 DLK1 인간 항체 변이체 항체인 18A5_LS_1A10, 18A5_AM_1A12을 10 μ g/ml 농도를 시작으로 1/3 계단 희석하여 4°C에서 1시간 동안 세포 결합시켰다. 그 후, 세포는 차가운 PBS로 수세한 후, FITC(fluorescein isothiocyanate; Vector, 미국) 형광이 결합된 항-인간 IgG 2차 항체(Vector, 미국)를 사용하여 4°C에서 1시간 동안 암배양하였다. 형광 염색된 세포는 2% FBS(fetal bovine serum)가 포함된 500 μ l의 PBS로 현탁시킨 후, 유세포분석기인 FACSCanto™II flow cytometer(BD Biosciences, 미국)를 사용하여 분석하였고, 최대 효과의 50%에 이르도록 하는데 필요한 항체의 양(EC₅₀)을 측정하였다.
- [284] 결과로 DLK1이 과발현된 MIA PaCa-2에 항-DLK1 항체 18A5와 DLK1 인간 항체 변이체 항체인 18A5_LS_1A10, 18A5_AM_1A12의 결합하는 EC₅₀ 항체의

양은 18A5가 130.7 ng/ml, 18A5_LS_1A10은 120 ng/ml, 18A5_AM_1A12은 90.3 ng/ml로 모두 유사한 결합력을 나타내었다 (도 20).

[285]

[286] 실시예 8-5. 선별된 DLK1 인간 단일 항체 변이체들의 세포 표면에 존재하는 DLK1 항원에 대한 특이적 결합력 확인

[287] DLK1-18A5 단일 인간 항체 변이체들의 항원에 대한 결합 특이성은 세포 표면에 DLK1이 과발현된 MIA PaCa-2 세포와 내생적으로 DLK1을 발현하고 있는 SK-N-F1 세포에 각각 20 nM의 DLK1 siRNA (siDLK1, Dharmacon, 미국) 또는 shRNA (shDLK1, Sigma, 미국)을 처리하여 DLK1의 발현을 감소시킨 후, 항체의 세포 결합력 차이를 통해 확인하였다. 항체의 세포 결합력은 FACS 분석을 통해 확인하였다. 각각의 세포를 5×10^5 세포로 준비하고, DLK1 단일 인간 항체 변이체 18A5_LS_1A10과 18A5_AM_1A12를 2 μ g/ml 농도로 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, 세포는 차가운 PBS로 수세한 후, FITC(fluorescein isothiocyanate; Vector, 미국) 형광이 결합된 항-인간 IgG 항체(Vector, 미국)를 4°C에서 1시간 동안 암배양하였다. 형광 염색된 세포는 2% FBS(fetal bovine serum)가 포함된 500 μ l의 PBS로 현탁시킨 후, 유세포분석기인 FACSCantoTMII flow cytometer(BD Biosciences, 미국)를 사용하여 분석하였다.

[288] 그 결과, DLK1 siRNA 또는 shRNA을 DLK1이 과발현 된 MIA PaCa-2 세포(도 21A)와 내생적으로 DLK1을 발현하고 있는 SK-N-F1 세포(도 21B)에 처리하였을 때, 웨스턴 블롯 상에서 각각 대조군 (scRNA 또는 shCon)에 비교하여 모두 95% 이상 DLK1 발현이 감소하였고, 이때 DLK1 단일 인간 항체 변이체 18A5_LS_1A10과 18A5_AM_1A12의 세포 결합력 또한 FACS 분석결과에서 감소하는 것을 확인하였다. 이 결과는 18A5_LS_1A10과 18A5_AM_1A12 항체들이 DLK1 항원에 특이적으로 결합함을 시사한다.

[289]

[290] 실시예 9. 선별된 DLK1 인간 항체 변이체의 활성 평가

[291] 실시예 9-1. IncuCyte 분석을 통한 선별된 DLK1 인간 항체 변이체의 세포내 유입 확인

[292] 항-DLK1 항체 18A5와 그 변이체 항체인 18A5_LS_1A10과 18A5_AM_1A12의 세포내 유입력은 각각 항체를 Incucyte® FabFluor human red fluorescent reagent (Essen Bioscience, 미국)와 접합시킨 후, DLK1의 발현을 높은 DLK1 과발현 MIA PaCa-2 세포와 발현율이 보통인 SK-N-F1 세포, 그리고 발현율이 낮은 HepG2 세포에 처리하고 시간에 따라 세포내로 유입되는 항체의량을 모니터링하여 확인하였다. 96-well plate(Nunc, 미국)에 웰당 1×10^4 개의 DLK1 과발현 MIA PaCa-2 세포와 4×10^4 개의 SK-N-F1 또는 HepG2 세포를 분주하여 24시간 부착시키고, 각각 4 μ g/ml의 항체를 동량의 Incucyte® FabFluor red antibody labeling reagent와 혼합하여 37°C에서 15분동안 암반응시킨 후, 세포에 처리하였다. 항체의 세포내 유입량은 시간에 따라 세포의 라이소솜에 축적되는

항체의 양을 IncuCyte ZOOM HD/2CLR System (Essen Biosciences, 미국)를 통해 15분 간격으로 24시간 동안 확인하고 정량화를 실시하였다.

- [293] 그 결과, 세포 표면에 결합한 항-DLK1 항체 18A5와 DLK1 인간 항체 변이체 항체인 18A5_LS_1A10, 18A5_AM_1A12는 DLK1 과발현 MIA PaCa-2 세포에서는 1시간 이내, SK-N-F1과 HepG2 세포에서는 3시간 이내에 항체의 50%가 세포내로 유입되는 것을 확인하였다(도 22A). 항체들은 세포 표면의 DLK1 발현량에 따라 세포내 유입 정도에 차이를 보였다. 또한, 24시간 후 세포내 유입된 항체의 축적량은 동일 세포에 대해서는 모두 유사하였다(도 22B).

- [294] 상기 결과는 항-DLK1 항체 18A5와 마찬가지로 18A5_LS_1A10 과 18A5_LS_1A12 항체는 모두 세포내로 약물을 전달할 수 있는 항체로 평가되며, 항-DLK1 항체-약물접합체로서 개발이 가능하다는 것을 시사한다.

[295]

- [296] 실시예 9-2. 선별된 DLK1 인간 항체 변이체의 암세포 사멸 효능 시험

- [297] DLK1-18A5 단일 인간 항체 변이체인 18A5_LS_1A10와 18A5_AM_1A12 항체의 ADC (Antibody-Drug Conjugation) 개발 가능성 확인은 실시예 4와 같이 DLK1 과발현 MIA PaCa-2 세포와 ZAP Antibody Internalization kit(Advance Targeting System, 미국)을 사용하여 동일한 방법으로 세포 독성 실험을 수행하고, 18A5 항체와 비교 확인하였다.

- [298] 그 결과, 18A5, 18A5_LS_1A10 혹은 18A5_AM_1A12 항체를 처리하거나 음성 대조 약물 IgG-SAP을 처리하였을 때, 어떤 농도에서도 DLK1이 과발현된 MIA PaCa-2세포에서 암세포의 사멸이 일어나지 않은 반면, 18A5-, 18A5_LS_1A10- 혹은 18A5_AM_1A12-Fab ZAP의 암세포에 대한 독성은 항체의 농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 세포 독성 효과를 나타냈다(도 23). 이때 EC₅₀값은 각각 2.0, 1.1, 2.6fM이었으며, 이중 18A5_LS_1A10-Fab ZAP이 다소 우월한 효능을 보였다. 양성 대조 약물인 사포린(Saporin)은 100 nM 이상의 높은 농도에서 비특이적인 세포유입으로 인한 세포독성을 일으켰다.

- [299] 상기 실시예 도 23의 결과는 항-DLK1 단일 인간 항체 18A5를 포함하여 18A5_LS_1A10 과 18A5_AM_1A12 항체 모두 암세포 표면에 발현하는 DLK1을 타겟으로 하여 암세포를 사멸시킬 수 있는 항-DLK1 항체-약물접합체로서 개발이 가능하다는 것을 시사한다.

[300]

산업상 이용가능성

- [301] 본 발명의 항-DLK1 항체 또는 이의 항원 결합단편은 DLK1에 대한 우수한 결합력을 나타내며, 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 이를 포함하는 항체-약물 접합체는 DLK1을 발현하는 암세포에 대하여 강력한 세포독성 활성을 나타내며, 본 발명에 따른 항-DLK1 항체 또는 이의 항원 결합단편은 ADC용 항체로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[302]

[303] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[304]

서열목록 Free Text

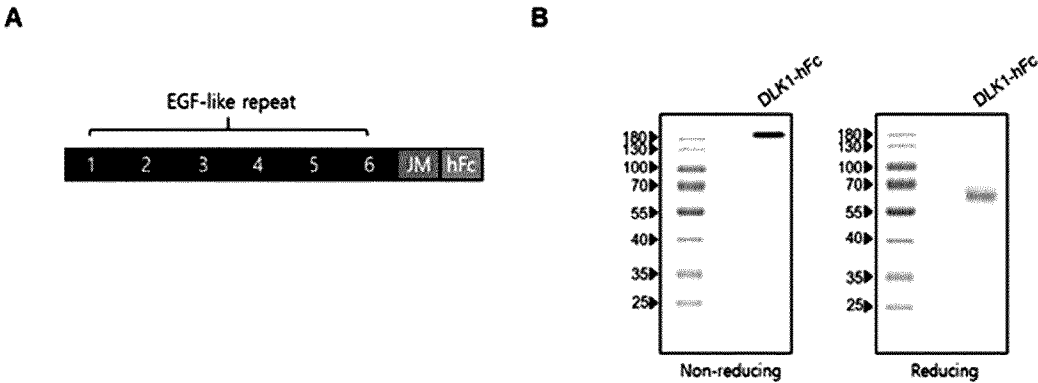
[305] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

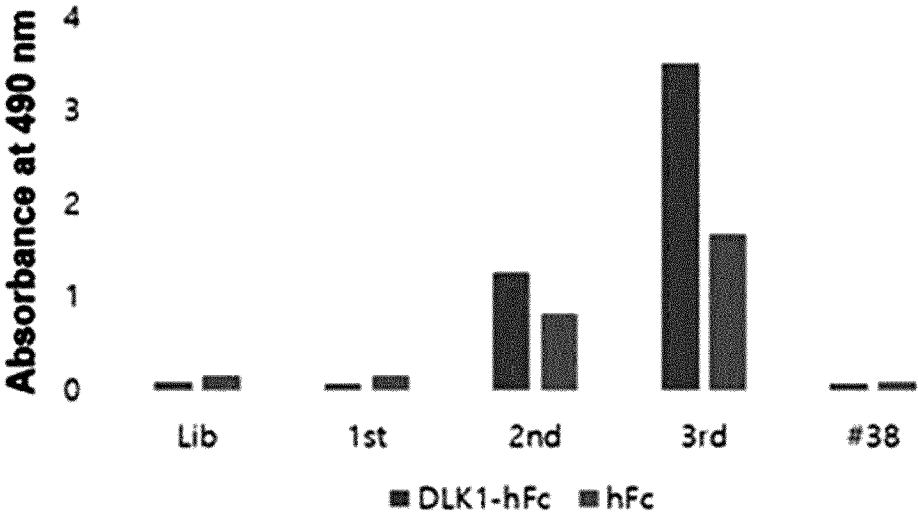
- [청구항 1] 다음의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 DLK1 (delta-like 1 homolog (Drosophila))에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:
 서열번호 2, 16, 30, 44, 58, 72 및 86으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 CDR1,
 서열번호 4, 18, 32, 46, 60, 74 및 88로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 CDR2,
 서열번호 6, 20, 34, 48, 62, 76 및 90으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역; 및
 서열번호 9, 23, 37, 51, 65, 79, 93, 115 및 121로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 CDR1,
 서열번호 11, 25, 39, 53, 67, 81 및 95로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 CDR2, 및
 서열번호 13, 27, 41, 55, 69, 83, 97, 116 및 125로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 서열번호 1, 15, 29, 43, 57, 71, 85 및 119로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 FR1,
 서열번호 3, 17, 31, 45, 59, 73 및 87로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 FR2,
 서열번호 5, 19, 33, 47, 61, 75 및 89로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 FR3,
 서열번호 7, 21, 35, 49, 63, 77 및 91로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 FR4,
 서열번호 8, 22, 36, 50, 64, 78, 92, 117 및 120로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 FR1,
 서열번호 10, 24, 38, 52, 66, 80, 94 및 122로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 FR2,
 서열번호 12, 26, 40, 54, 68, 82, 96, 118 및 123으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 FR3, 또는
 서열번호 14, 28, 42, 56, 70, 84, 98 및 125로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 FR4를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 서열번호 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111 및 127로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 서열번호 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 126 및 128로 구성된 군에서 선택되는 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는

- 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합단편을 코딩하는 핵산.
- [청구항 6] 제5항의 핵산을 포함하는 발현벡터.
- [청구항 7] 제6항의 발현벡터로 형질전환된 세포.
- [청구항 8] 다음 단계를 포함하는 DLK1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법:
 (a) 제7항의 세포를 배양하는 단계; 및
 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 회수하는 단계.
- [청구항 9] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합단편 및 약물을 포함하는 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate, ADC).
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 약물은 세포독소(cytotoxin), 방사성 동위원소, 항증식제, 아포토시스 촉진제(pro-apoptotic agent), 화학요법제 및 치료용 핵산으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항체-약물 접합체.
- [청구항 11] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 이중 특이적 항체.
- [청구항 12] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합단편, 제9항의 항체-약물 접합체 또는 제11항의 이중 특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 암은 피부암, 유방암, 자궁암, 대장암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 췌장암, 위암, 육종, 신경아세포종 및 재발암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 암인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 14] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 암 진단용 조성물.
- [청구항 15] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합단편을 항원 결합 도메인으로 포함하는 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor: CAR).
- [청구항 16] 종양세포에서 발현되는 DLK1에 특이적으로 결합하는 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 T 세포 관여자(T-cell engager).

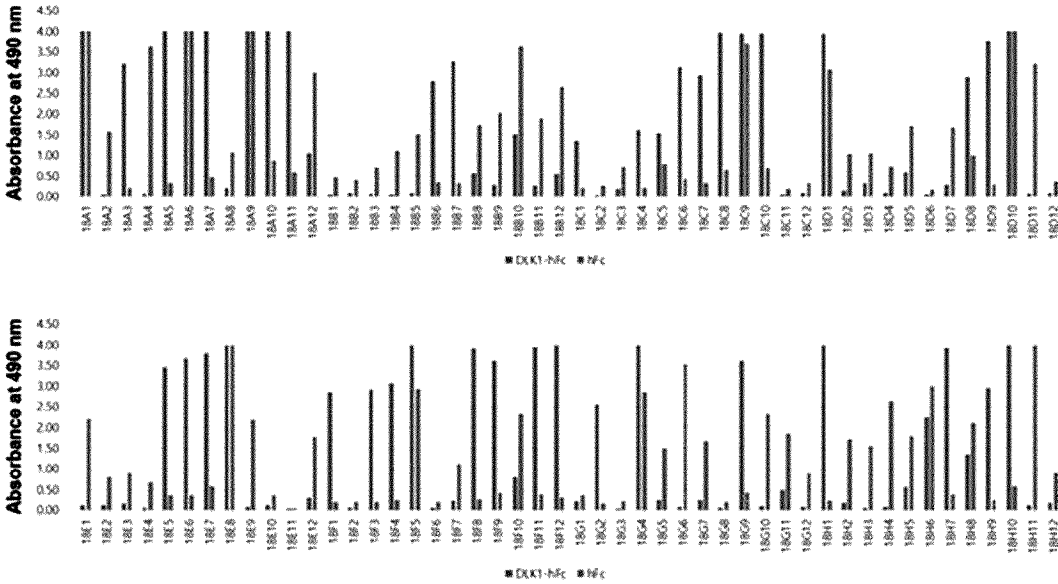
[도1]



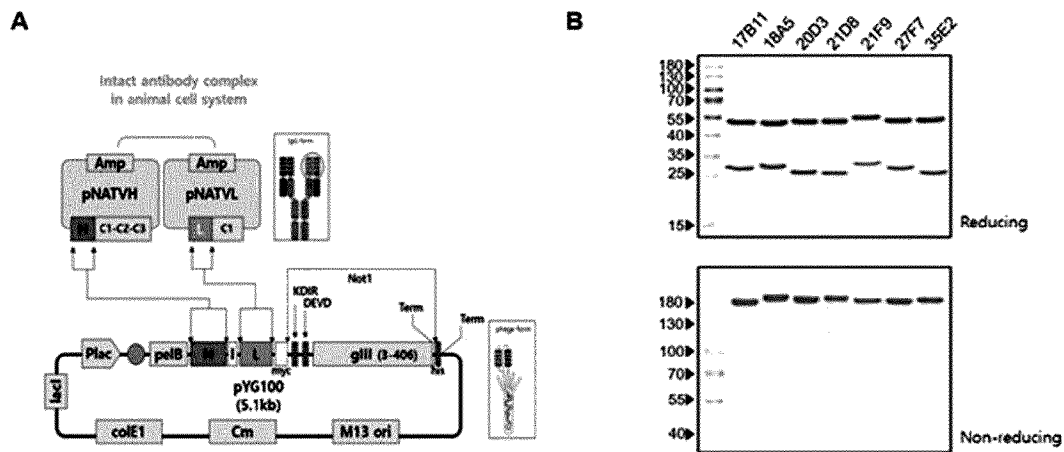
[도2]



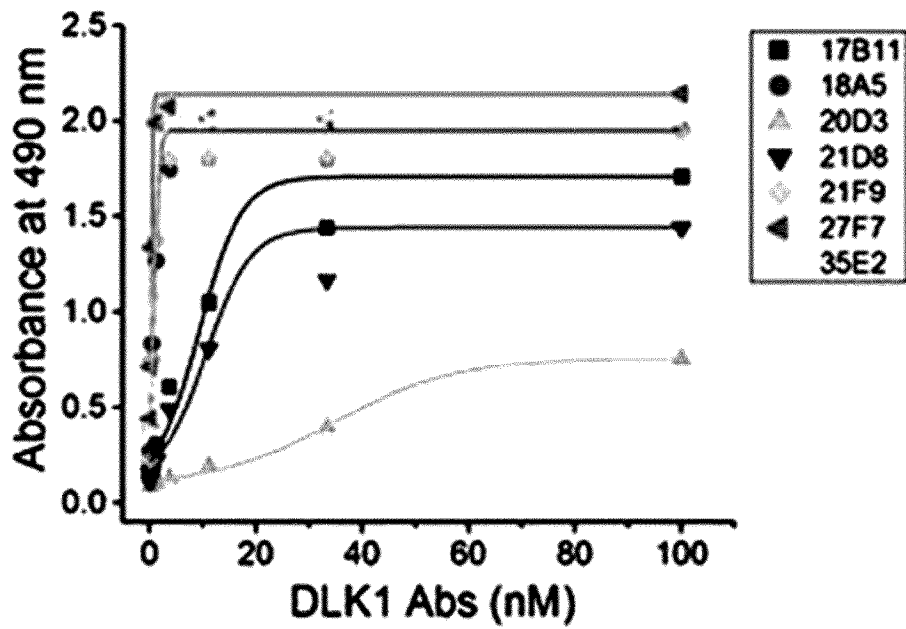
[도3]



[도4]

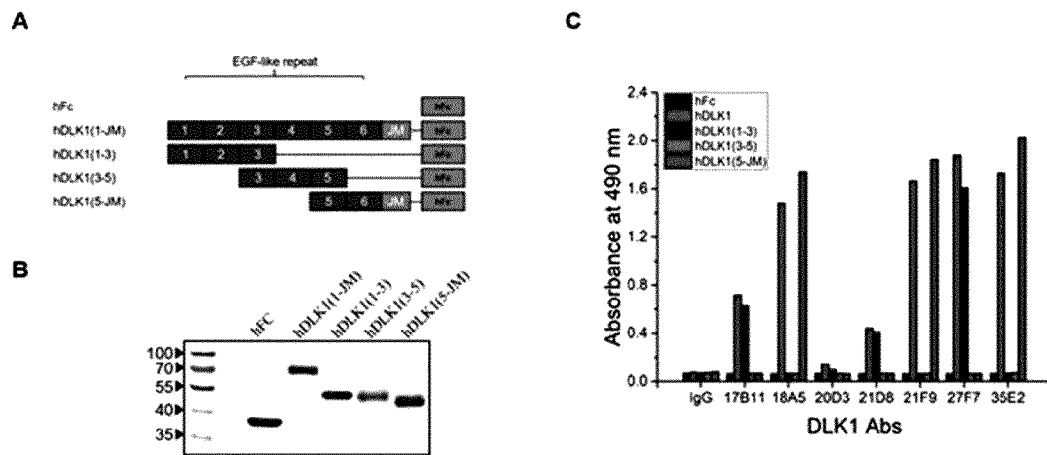


[도5]

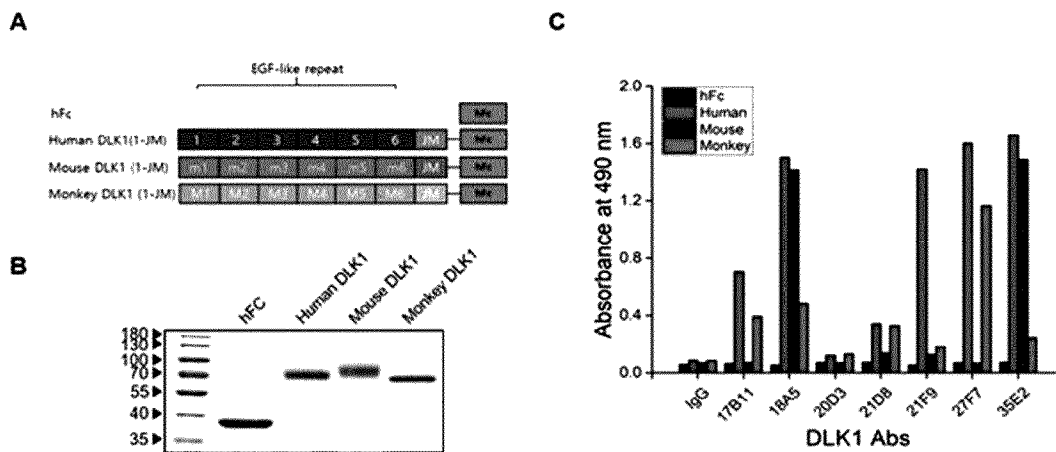


mAb	17B11	18A5	20D3	21D8	21F9	27F7	35E2
Kd (nM)	7.188	0.5239	53.95	8.403	0.5306	0.2202	0.3271
R square	0.983	0.9893	0.8803	0.974	0.9896	0.977	0.9892

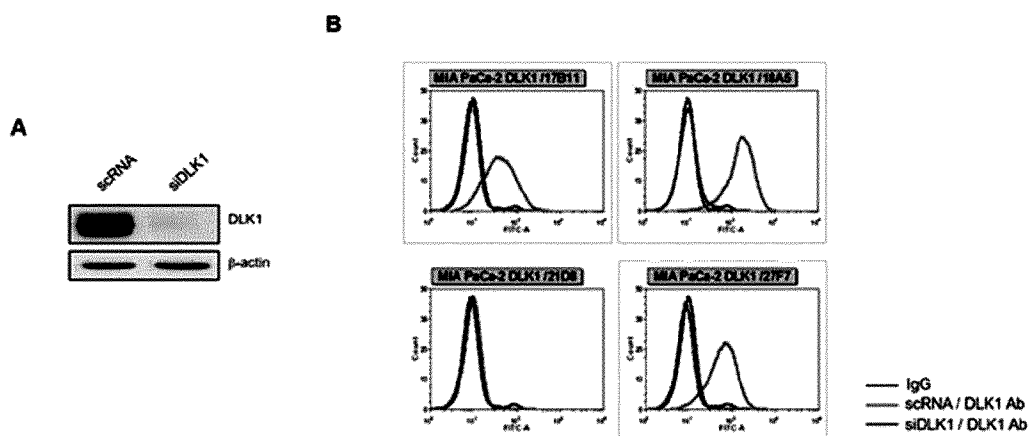
[도6]



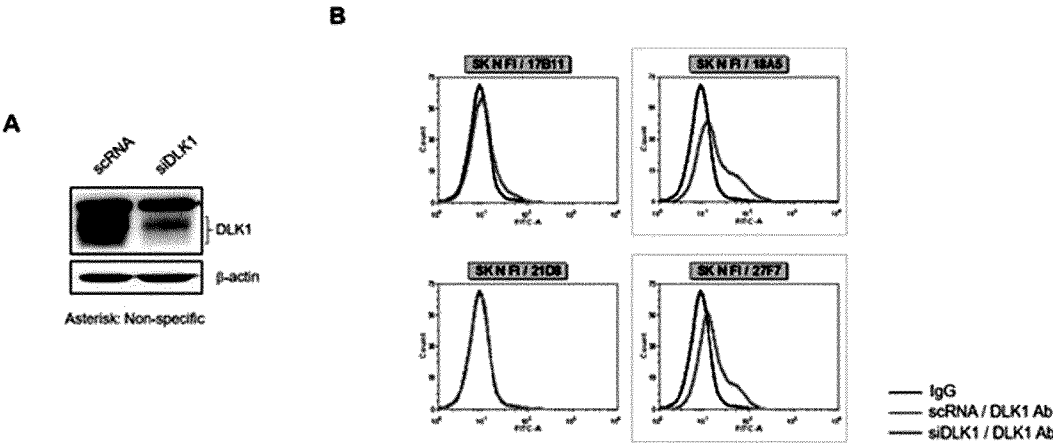
[도7]



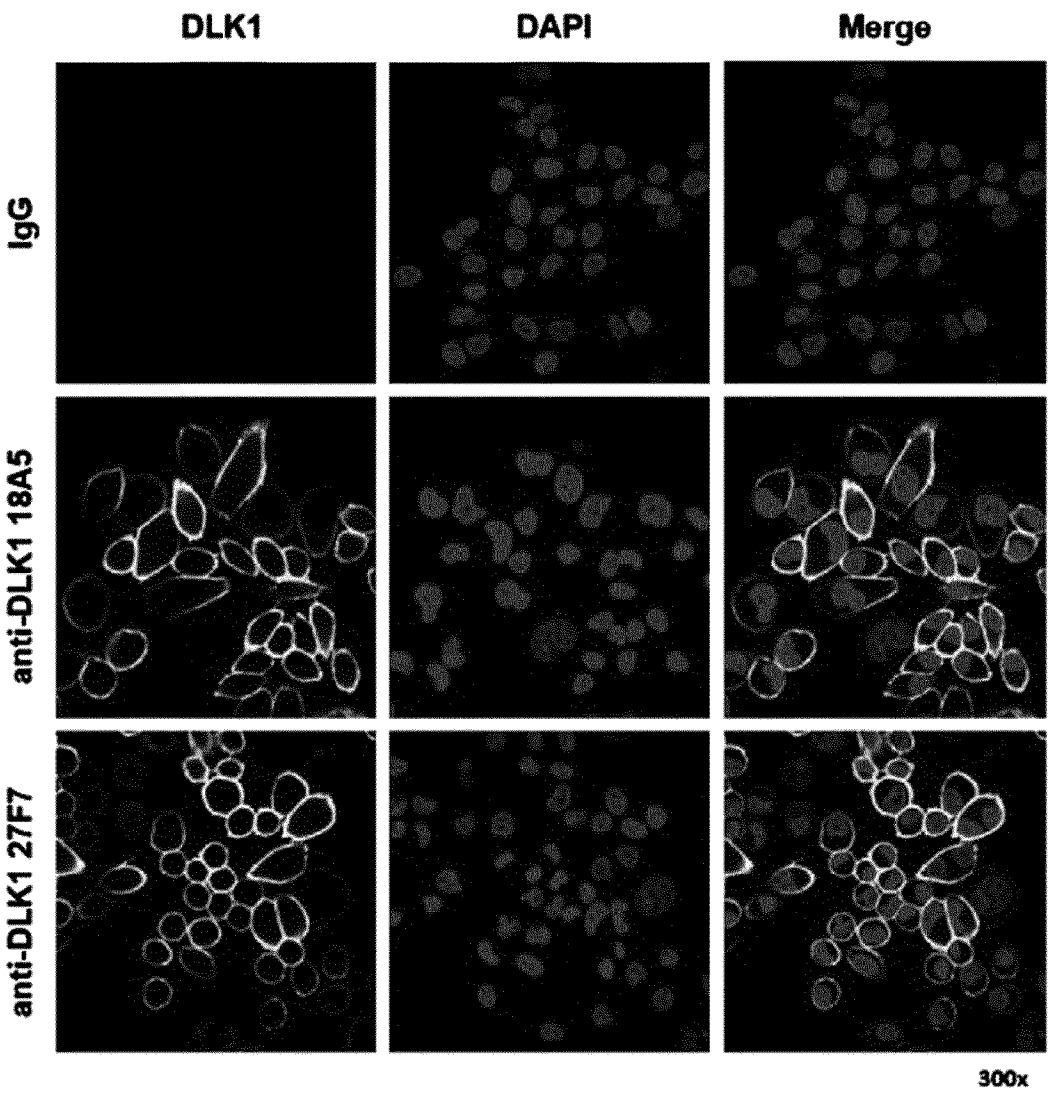
[도8]



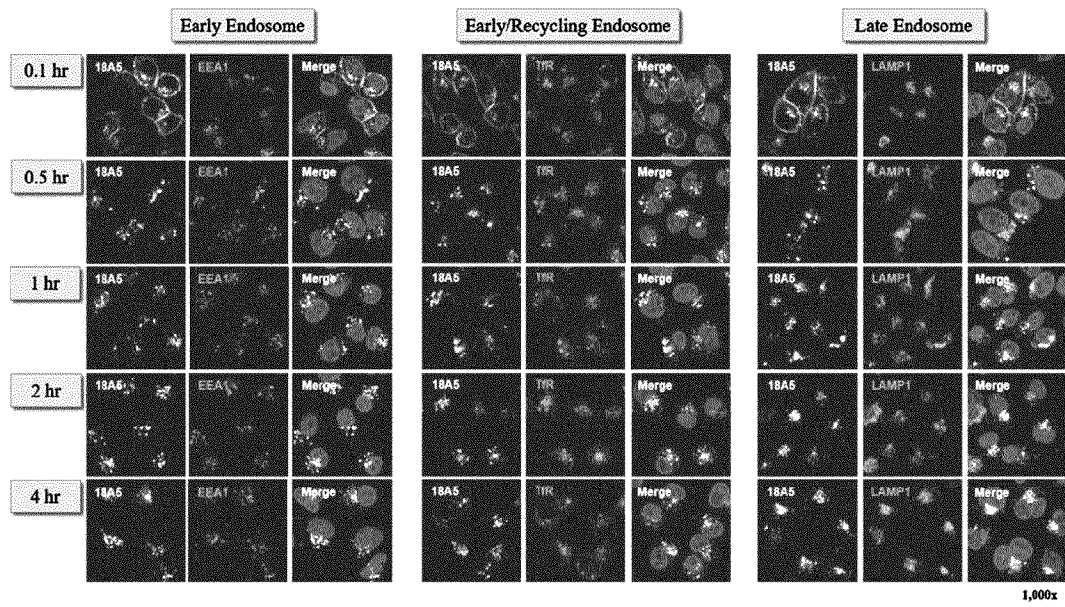
[도9]



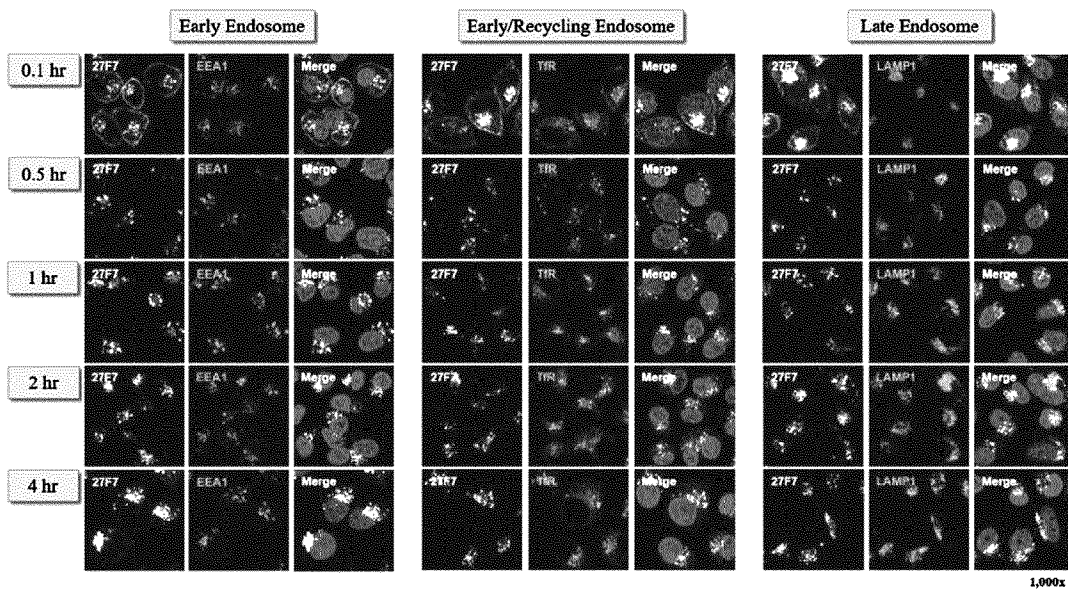
[도10]



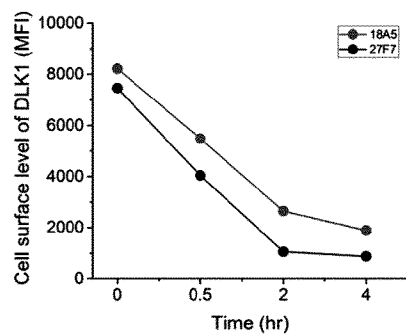
[도11]



[도12]

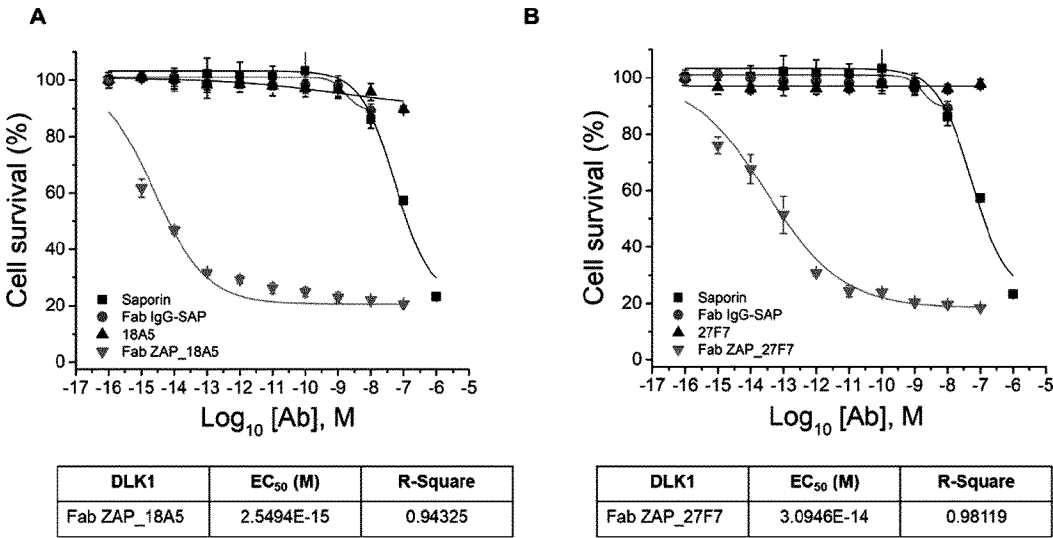


[도13]

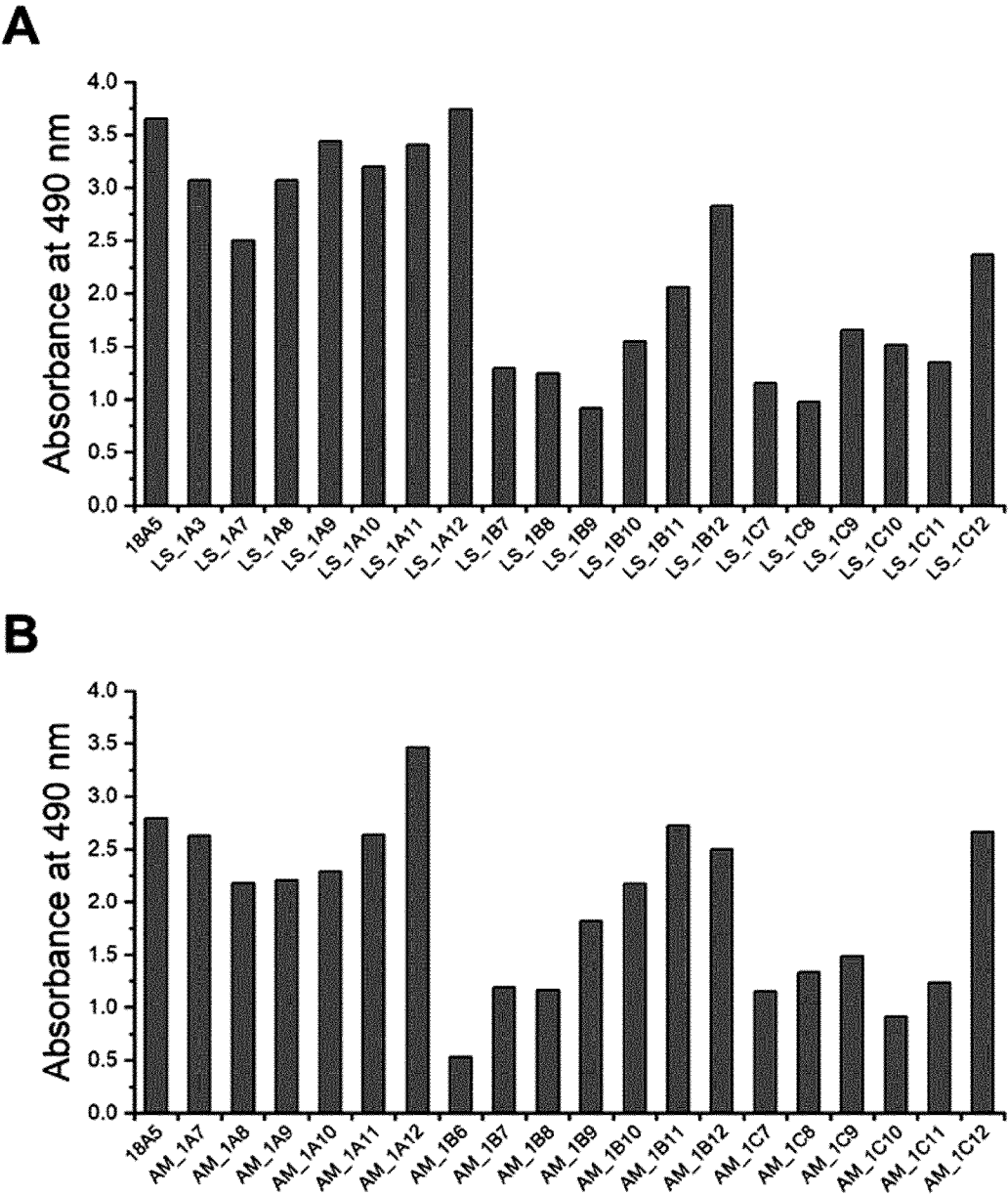


Time (hr)	항-DLK1 항체의 세포 내 유입 비율 (%)	
	18A5	27F7
0	100.0	100.0
0.5	33.2	45.8
2	67.8	85.8
4	77.1	88.2

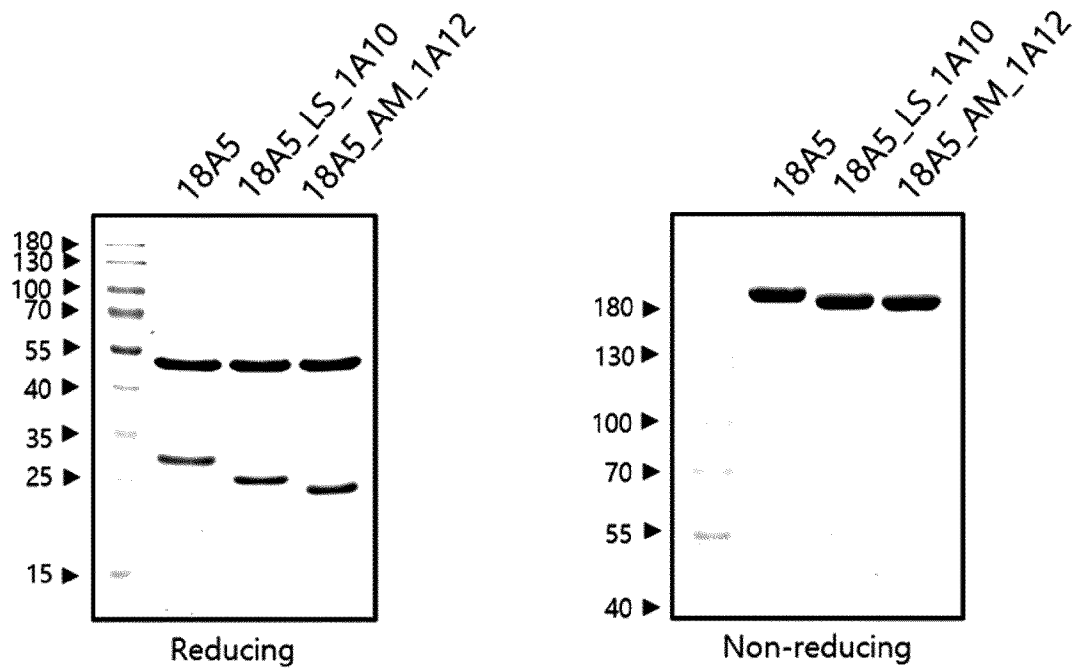
[도14]



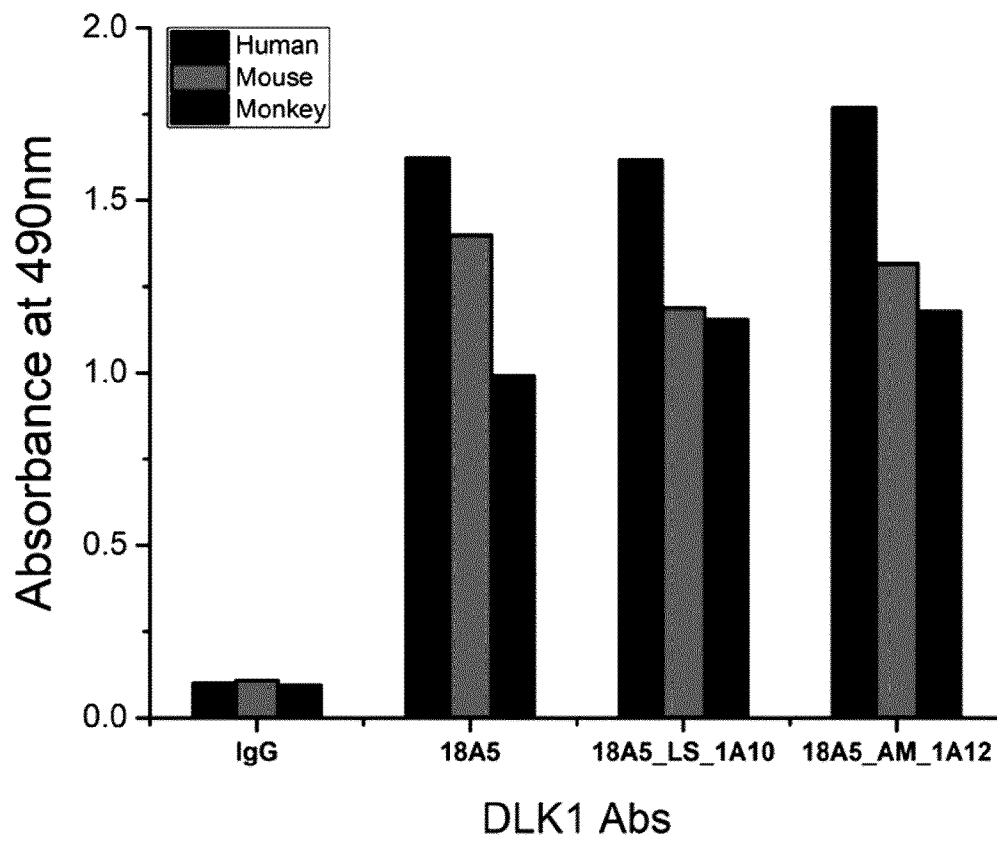
[도15]



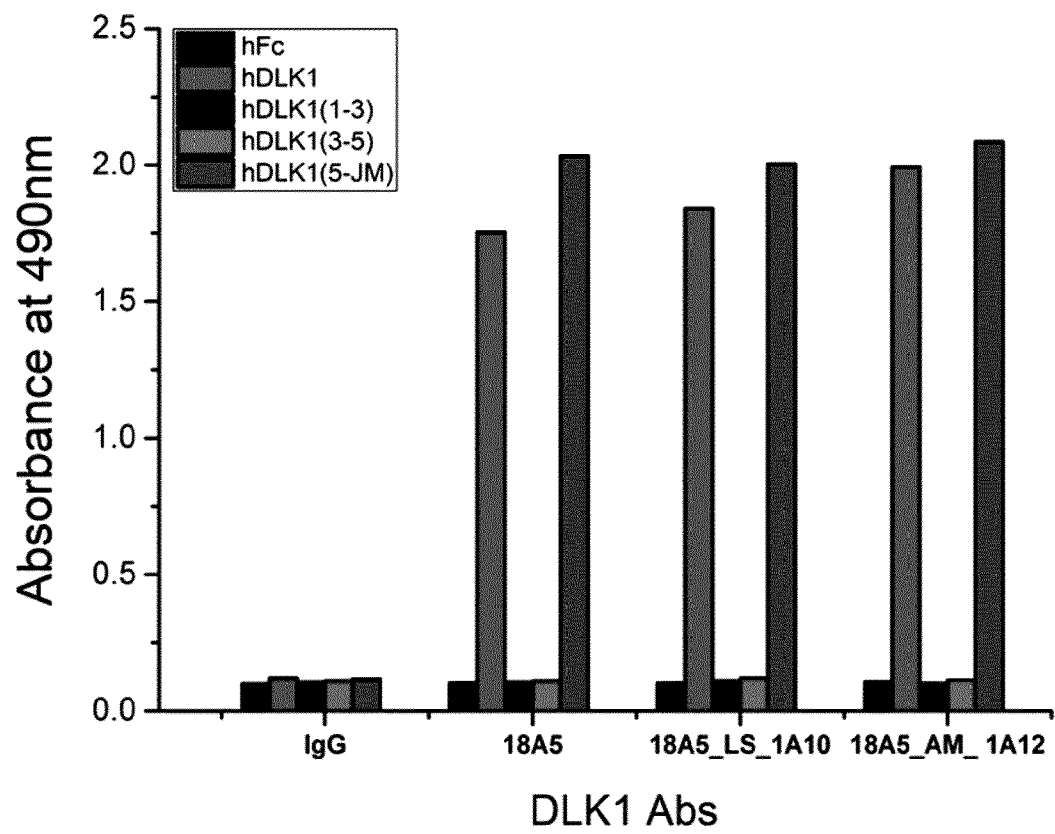
[도16]



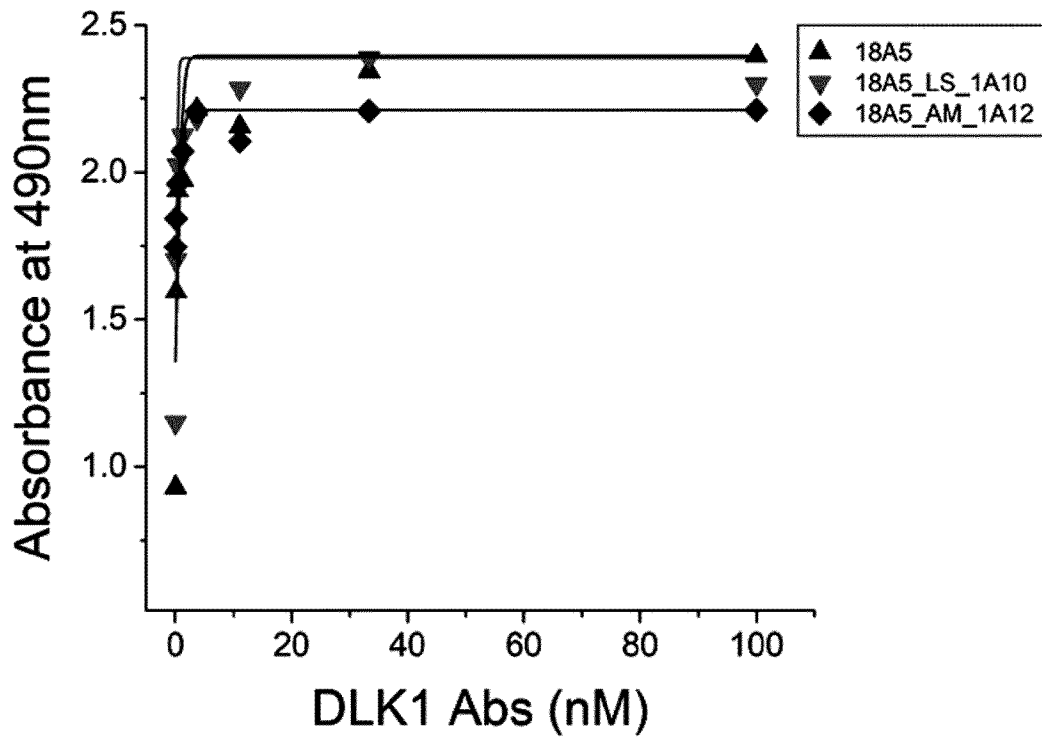
[도17]



[도18]

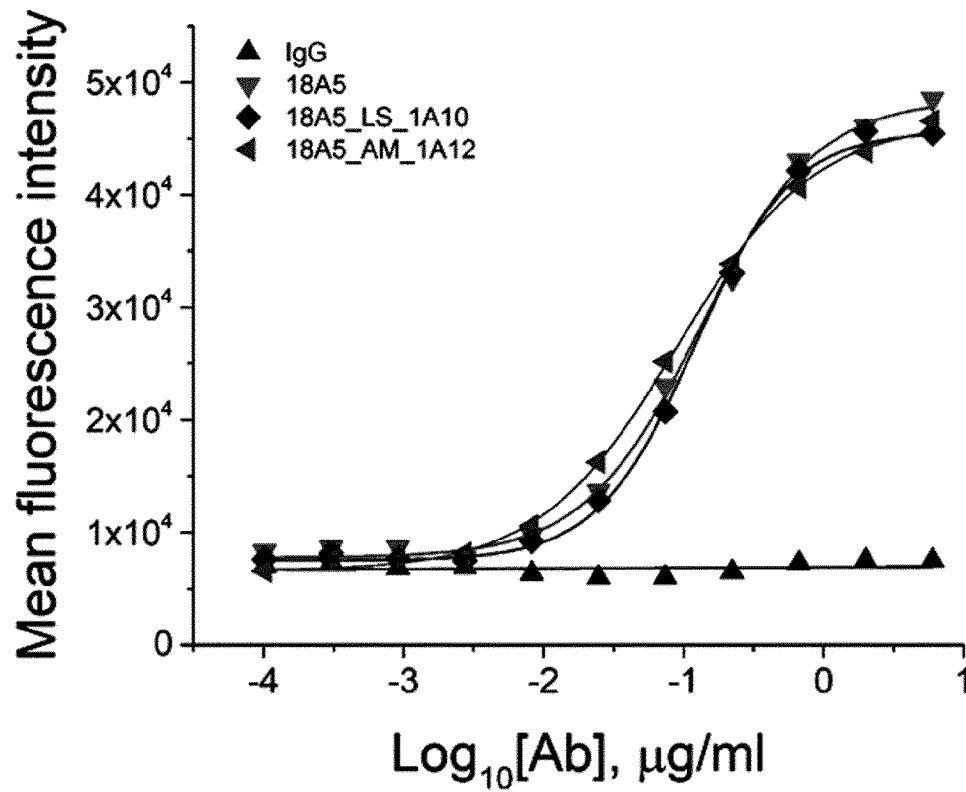


[도19]



mAb	18A5	18A5_LS_1A10	18A5_AM_1A12
Kd(nM)	0.06407	0.04669	0.01259
R-square	0.9581	0.98	0.7717

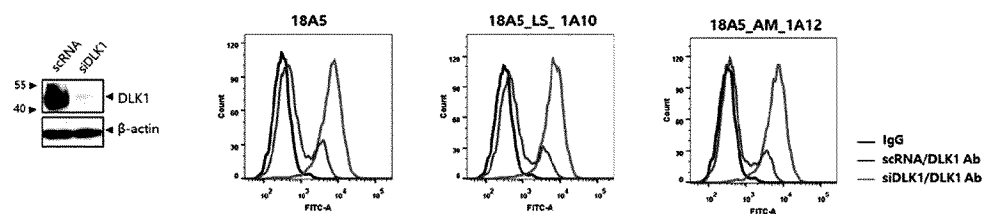
[도20]



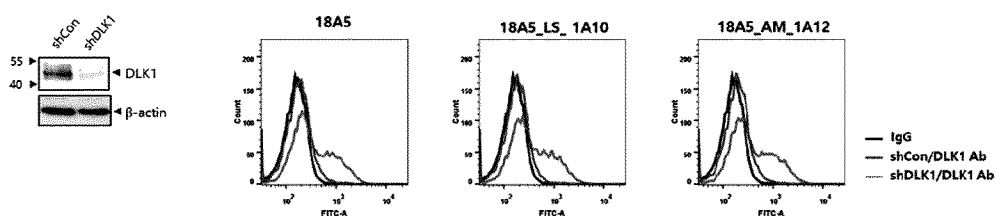
	18A5	18A5_LS_1A10	18A5_AM_1A12
EC ₅₀ (µg/ml)	0.1307	0.12	0.0903
Adj. R-Square	0.998	0.9988	0.9991
Top	48502	45654	46547
Bottom	7745	7495	6585

[도21]

A

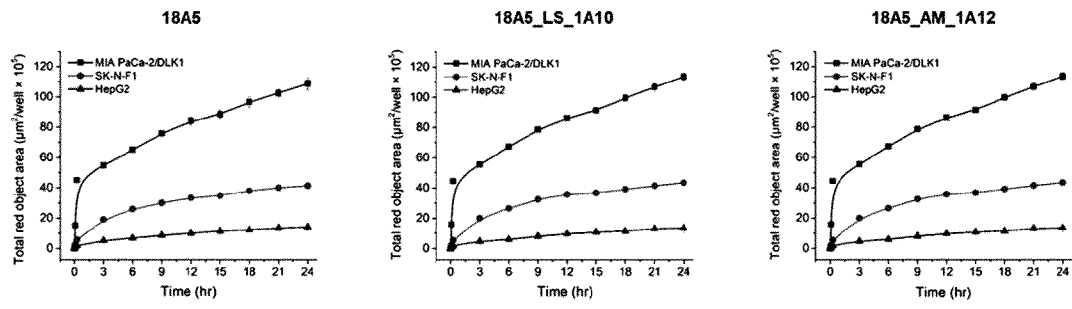


B

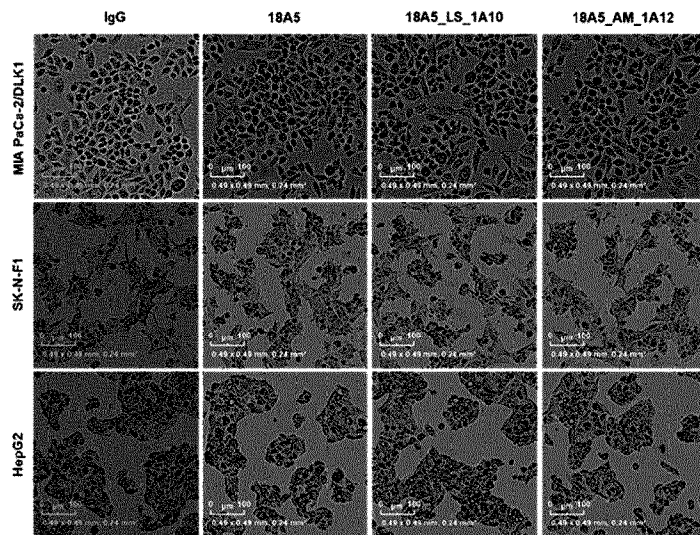


[도22]

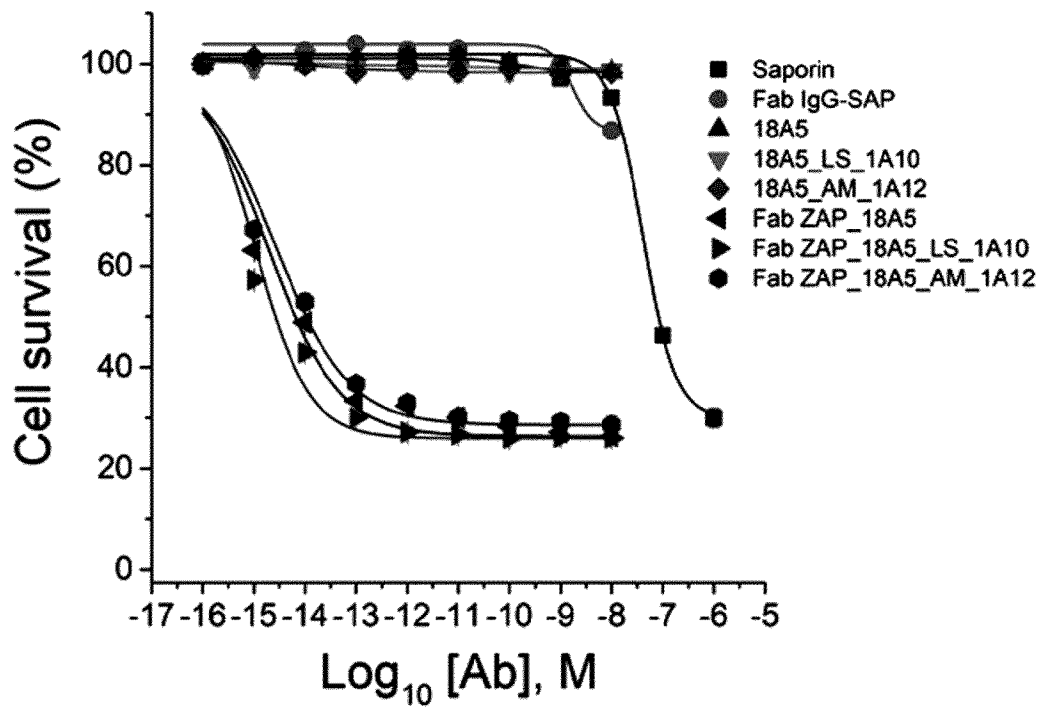
A



B



[도23]



DLK1	EC ₅₀ (M)	R-Square
Fab ZAP_18A5	1.9828E-15	0.9518
Fab ZAP_18A5_LS_1A10	1.1019E-15	0.9577
Fab ZAP_18A5_AM_1A12	2.5910E-15	0.9658