



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0138539  
(43) 공개일자 2014년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/435 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2014-0061751  
(22) 출원일자 2014년05월22일  
심사청구일자 2014년05월22일  
(30) 우선권주장  
1020130058619 2013년05월23일 대한민국(KR)

(71) 출원인  
아주대학교산학협력단  
경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)  
(72) 발명자  
김용성  
경기도 수원시 영통구 권광로260번길 36 매탄현대  
힐스테이트 112동 302호  
신태환  
대구 달서구 한들로 55, 111동 702호 (장기동, 장  
기초록나라)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
김순용

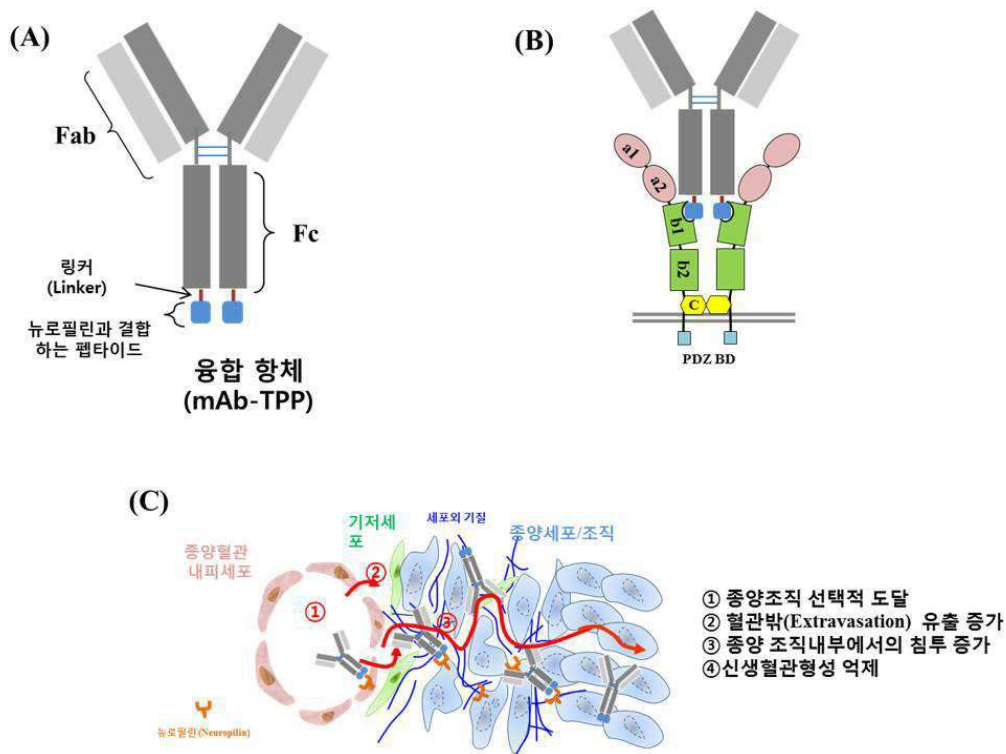
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 **뉴로필린에 특이적인 종양 침투성 펩타이드 및 이 펩타이드가 융합된 융합 단백질**

(57) 요약

본 발명은 뉴로필린에 특이적으로 결합하는 종양 침투성 펩타이드 (TPP, Trans-tumoral peptide) 또는 이 펩타이드가 융합된 융합 단백질, 소분자 약물, 나노입자 또는 리포솜에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 재조합 벡터, 이 벡터로 형질전환된 숙주세포 및 이를 이용한 종양 (뒷면에 계속)

대표도 - 도13



침투성 펩타이드의 제조방법을 제공하는 것이다. 또한, 본 발명은 상기 펩타이드 또는 이 펩타이드가 융합된 융합 단백질, 소분자 약물, 나노입자 또는 리포솜을 포함하는 암 또는 신생혈관 관련 질병의 치료, 진단 또는 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 중앙 침투성 펩타이드가 항암 항체 중쇄불변영역(Fc)의 C-말단에 융합된 융합항체는 뉴로필린과 특이적으로 결합하는 특성을 갖게 되어, 중앙조직에 특이적으로 축적되고, 중앙혈관내피세포의 세포간격을 넓혀서 혈관 밖 유출이 증진되고, 중앙조직내부에서의 침투가 증가하여, 현저히 증가된 생체내 중앙억제 활성을 보인다. 또한 본 발명에 따른 중앙 침투성 펩타이드가 융합된 융합 단백질은 뉴로필린 타겟팅으로 인한 뉴로필린 공수용체의 작용 중 신생혈관형성 기능을 억제하여 혈관신생과 관련된 질병에 대해 완화 효과를 기대할 수 있다.

(72) 발명자

**김예진**

부산광역시 사하구 다대낙조2길 100 다대롯데캐슬  
물운대아파트 102동 102호

**성은실**

경기도 수원시 팔달구 중부대로125번길 22-4 (지동) 402호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013R1A2A2A01005817
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	고형암조직 내부로 항체 침투를 촉진하는 펩타이드 원천기술을 활용한 차세대 중앙 치료용 항체 기반기술 개발
기여율	75/100
주관기관	아주대학교 산학협력단
연구기간	2013.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2013M3A6A4043874
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	글로벌프런티어사업 (혁신형의약바이오 컨버전스)
연구과제명	ARS 타겟 다기능 항체 개발
기여율	20/100
주관기관	아주대학교 산학협력단
연구기간	2013.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2009-0093826
부처명	교육부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	이공분야 중점연구소지원사업
연구과제명	신개념 그린융합소재 발굴 및 확보
기여율	5/100
주관기관	아주대학교 산학협력단
연구기간	2009.09.01 ~ 2018.08.31

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 1 내지 4로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 표시되는, 뉴로필린(neuropilin)에 특이적으로 결합하는 종양 침투성 펩타이드.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드는 세마포린 3A 또는 3F 유래 펩타이드, 또는 이의 유도체인 것을 특징으로 하는 종양 침투성 펩타이드.

### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드는 링커 펩타이드를 추가로 포함하는 것인 종양 침투성 펩타이드.

### 청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 링커 펩타이드는 1 내지 50개의 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 것인 종양 침투성 펩타이드.

### 청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 링커 펩타이드는 글라이신 (glycine), 세린 (serine) 또는 알라닌 (alanine)으로 구성되는 것인 종양 침투성 펩타이드.

### 청구항 6

청구항 3에 있어서, 상기 링커 펩타이드는 (GA)<sub>n</sub> 또는 (GGGS)<sub>m</sub>의 아미노산 서열로 이루어지며, 여기서 n 및 m은 각각 독립적으로 정수 1 내지 20인 것을 특징으로 하는 종양 침투성 펩타이드.

### 청구항 7

청구항 3에 있어서, 상기 종양 침투성 펩타이드는 서열번호 5 내지 10로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 것인 종양 침투성 펩타이드.

### 청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 종양 침투성 펩타이드가 융합된 융합 단백질.

### 청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 단백질은 항체, 항체의 단편, 면역 글로불린, 펩타이드, 효소, 성장인자 (growth factor), 사이토카인 (cytokine), 전사인자, 독소, 항원성 펩티드, 호르몬, 운반 단백질, 운동 기능 단백질, 수용체, 신호(signaling) 단백질, 저장 단백질, 막 단백질, 막횡단(transmembrane) 단백질, 내부(internal) 단백질, 외부(external) 단백질, 분비 단백질, 바이러스 단백질, 당 단백질, 절단된 단백질, 단백질 복합체, 및 화학적으로 개질된 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 종양 침투성 펩타이드가 융합된 융합 단백질.

### 청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 종양 침투성 펩타이드는 뉴로필린에 2가 (bivalent) 이상으로 결합하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

### 청구항 11

청구항 8에 있어서, 상기 융합은 링커 펩타이드에 의한 것인, 펩타이드가 융합된 융합 단백질.

### 청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 단백질이 항체인 경우 항체 단편은 항체의 중쇄불변영역 (Fc), 항원결합절편 (antigen binding fragment (Fab)), 단일사슬항체절편(single chain variable fragment (scFv)), 중쇄가변영역, 경쇄불변영역 또는 경쇄가변영역인 것인, 융합 단백질.

**청구항 13**

청구항 9에 있어서, 상기 단백질이 항체인 경우, 펩타이드는 항체의 중쇄불변영역(Fc)의 C-말단에 결합된 것인 융합 단백질.

**청구항 14**

청구항 13에 있어서, 상기 결합은 링커 펩타이드에 의한 것인 융합 단백질.

**청구항 15**

청구항 13에 있어서, 상기 항체는 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 융합 단백질.

**청구항 16**

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 종양 침투성 펩타이드가 융합된 나노입자.

**청구항 17**

청구항 16에 있어서, 상기 종양 침투성 펩타이드는 뉴로필린에 2가 (bivalent) 이상으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 나노입자.

**청구항 18**

청구항 16에 있어서, 상기 융합은 링커 펩타이드에 의한 것인, 펩타이드가 융합된 나노입자.

**청구항 19**

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 종양 침투성 펩타이드가 융합된 리포솜.

**청구항 20**

청구항 19에 있어서, 상기 종양 침투성 펩타이드는 뉴로필린에 2가 (bivalent) 이상으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 리포솜.

**청구항 21**

청구항 19에 있어서, 상기 융합은 링커 펩타이드에 의한 것인, 펩타이드가 융합된 리포솜.

**청구항 22**

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 종양 침투성 펩타이드가 융합된 소분자 약물.

**청구항 23**

서열번호 1 내지 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 표시된 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 24**

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 펩타이드를 포함하는 암 또는 신생혈관 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

**청구항 25**

청구항 8의 융합 단백질, 청구항 16의 나노입자, 청구항 19의 리포솜, 또는 청구항 22의 소분자 약물을 포함하는 암 또는 신생혈관 관련 질병의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

**청구항 26**

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 펩타이드를 포함하는 암 또는 신생혈관 관련 질환의 진단용 조성물.

**청구항 27**

청구항 8의 융합 단백질, 청구항 16의 나노입자, 청구항 19의 리포솜, 또는 청구항 22의 소분자 약물을 포함하는 암 또는 신생혈관 관련 질환의 진단용 조성물.

**명세서**

**기술분야**

- [0001] 본 발명은 뉴로필린에 특이적으로 결합하는 종양 침투성 펩타이드 (TPP, Trans-tumoral peptide)에 관한 것이다.
- [0002] 또한 본 발명은 상기 종양 침투성 펩타이드가 융합된 융합 단백질, 소분자 약물, 나노입자 또는 리포솜에 관한 것이다.
- [0003] 또한 본 발명은 상기 종양 침투성 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 재조합 벡터, 이 벡터로 형질전환된 숙주세포 및 이를 이용한 종양 침투성 펩타이드의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0004] 또한, 본 발명은 상기 종양 침투성 펩타이드 또는 이 펩타이드가 융합된 융합 단백질, 소분자 약물, 나노입자 또는 리포솜을 포함하는 암 또는 신생혈관 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0005] 또한, 본 발명은 상기 종양 침투성 펩타이드 또는 이 펩타이드가 융합된 융합 단백질, 소분자 약물, 나노입자 또는 리포솜을 포함하는 암 또는 신생혈관 관련 질환의 진단용 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

- [0006] 치료용 항체 개발 연구에 있어서, 약 35년 전부터 단일 클론항체를 생산할 수 있는 하이브리도마 (hybridoma) 기술이 개발되었다. 또한, 쥐 항체의 면역원성 (HAMA; Human anti-mouse antibody response)을 극복한 키메라/인간화 항체가 1997년 최초로 임상허가를 받았다. 또한, 완전 인간 항체인 휴미라 (Humira) 항체가 2003년도에 허가를 받았다. 나아가 치료효능을 증가시키기 위하여 이중특이항체, 항체약물결합체 (ADC; antibody drug conjugation), 중쇄불변영역 (Fc)을 개량한 지속형 항체에 대한 연구가 활발하다.
- [0007] 고형암 (solid tumor) 치료용 항체의 경우, 여러 장벽에 의하여 항체가 종양 조직 내로 전달되는 과정에서 실제 인간의 생체 내에서 종양조직 내에 전달되는 항체의 양은 주입한 양의 0.01에서 0.001%에 불과하므로 항체의 치료효과가 매우 제한적이다 (Thurber et al. 2008). 따라서 항체가 종양조직에 선택적으로 축적되고 종양조직 내부로의 고침투성을 갖도록 하는 항체 기술 개발은 항체의 치료 효과를 높일 수 있어 매우 중요하다.
- [0008] 항체가 조직으로 침투가 잘 되지 않는 원인으로는 크게 1) 항체의 본질적인 특징 (크기, 항원결합특성 등) (Thurber and Dane Wittrup, 2012), 2) 정상조직과는 다른 종양 조직의 미세생리학적 특성, 두 가지에 기인한다고 볼 수 있다 (Jain and Stylianopoulos, 2010).
- [0009] 항체는 12개의 도메인으로 이루어져있는 150kDa의 큰 분자이기 때문에, 혈액에 있는 항체들이 확산 또는 대류를 통하여 종양 조직으로 전달되기 어렵다 (Baker et al. 2008). 따라서, 이를 극복하기 위해 수행된 연구 중, 항체의 항원과 결합하는 도메인만 투여하는 시도가 있었다. 단일사슬항체절편 (scFv, 30kDa), 중쇄가변부위 (VHH, 14kDa)의 경우 항체 자체보다 종양 조직 내부로 더 많이 침투되었다. 다만, 크기가 감소함에 따라 다량 신장으로 빠져나가 반감기 (Half-Life)가 짧아져서 항체의 효능이 크게 향상되지는 않았다 (Behr et al. 1998).
- [0010] 항체가 조직 내에 많이 분포하지 못하는 또 하나의 원인은 항체의 항원 결합능이다. 고형암 치료용 항체는 종양에 관련된 항원 (Tumor-Associated antigen), 또는 종양에 과발현되며 종양의 성장에 중요한 타겟에 대하여 높은 친화도를 갖는다. 항체는 특정 항원이 있는 조직에 도달하여도, 항원 발현양이 많은 세포로 이루어진 종양조직에서는 항체의 높은 친화도 때문에 항체가 항원에 결합된 채 머무르게 된다 (Lee and Tannock, 2010). 또한 결합 후 항원과 함께 세포 내 유입 (Endocytosis)되어 결과적으로 용해 (Lysis)되어 항체가 항암효과를 제대로 발휘하지 못한다. 이를 극복하기 위하여, 친화도를 조절하거나, 반감기를 늘리기 위한 연구가 진행되고 있다

(Dennis et al. 2007).

- [0011] 항체의 종양조직 내부로의 침투 및 분포를 방해하는 종양조직의 생리학적 성질은 크게 4가지로 분류될 수 있으며, 이는 내피 장벽 (Endothelial Barrier), 높은 종양 조직 내 유압 (interstitial fluid pressure), 기질 장벽 (Stromal impediment), 상피 장벽 (Epithelial Barrier)이다.
- [0012] 내피 장벽 (Endothelial Barrier)에 있어서, 종양은 급격하게 성장하는 속도에 따라 많은 양의 영양분을 공급받기 위해 혈관 주위에 위치한 혈관내피세포 성장을 촉진시키는 인자 (Pro-angiogenic Factor)를 과발현 및 분비한다. 이에 따라 신생혈관이 불균일하게 다량 생성되어 전체적인 혈류의 속도가 감소하게 된다. 이를 극복하기 위해 일혈 (Extravasation)을 증가시켜서 치료제가 혈관으로부터 빠져나와 조직으로 분포되게 하는 방법이 있다. 일혈과 관련된 염증반응 사이토카인인 TNF- $\alpha$  와 IL-2, 일혈을 촉진하는 화학 물질 (Promoter chemical drug) (Marcucci et al. 2013), iRGD 펩타이드 등과 치료제를 병용투여 (Coadministration)하여 종양 조직으로 약물전달을 증진시킨 사례가 있다. 하지만 이러한 시도들은 항체 및 일혈촉진제의 두 가지 물질을 생산하여야 한다는 점에서 실용화 및 임상실험에 어려움이 있다. 또한 iRGD 펩타이드의 경우는 다량 (2mg/kg 혹은 4mg/kg) 투여해야 한다는 점에서 한계에 도달해 있다 (Sugahara et al. 2010).
- [0013] 높은 종양 조직 내 유압 (interstitial fluid pressure)은 약물이 혈관에서부터 조직으로 대류 되기 위한 압력차가 작거나 심지어 조직의 유압이 혈액의 유압보다 높은 상황으로부터 야기된다. 이는, 정상조직과는 달리, 종양조직에 림프관이 부재하여 조직내부 유체가 축적됨으로써 주로 발생하고, 비정상적인 혈관생성 (abnormal angiogenesis)도 기여한다. 이를 극복하기 위해서 혈관내피세포 성장을 촉진시키는 인자, 특히 혈관내피세포 성장인자-A (VEGF-A)의 작용을 막아 신생혈관 생성을 억제하여 혈관을 정상화하는 방법 또는 혈관의 유압을 증가시키는 방법이 시도되었다. 혈관의 유압을 증가시키는 방법은 혈장 단백질인 알부민을 항체와 병용 투여하여 혈관의 삼투압을 증가시켜 항체의 종양조직 전달효과를 향상시킨 사례가 있다 (Hofmann et al. 2009).
- [0014] 기질 장벽 (Stromal impediment)은 항체가 미세혈관으로 빠져 나와 조직으로 대류될 때 만나는 세포 외 기질 장벽 (Extracellular matrix barrier)으로써 주로 콜라겐 (Collagen)과 히알루로난 (Hyaluronan)으로 구성되어 있다. 세포 외 기질에 따라 종양의 모양은 크게 영향을 받는다. 그에 따라 약물이 잘 분포되는 곳과 그렇지 못한 곳의 차이가 나기 때문에 약물 분포가 불균일하게 된다. 또한 세포 외 기질의 발현 양이 많아지면 고형암 압박 (Solid stress)으로 높은 세포 밀도로 인한 종양 조직 유압이 상승하게 된다. 이를 극복하기 위한 접근 방법은 종양 조직 세포의 사멸을 유도하여 종양 조직 내 세포밀도를 줄이는 방법이 있다. 또한 종양 조직의 콜라겐을 분해하는 효소 (Collagenase)를 처리하여 고형암 압박을 줄여서 대조군과 비교하여 약물전달 효과를 약 2배 높인 사례가 있다 (Eikenes et al. 2004).
- [0015] 상피 장벽 (Epithelial Barrier)은 종양조직 상피세포들의 세포-세포간 접착 인자들이 뾰뾰하게 세포 간극을 채우고 있어 치료제가 세포 사이로 확산 또는 대류가 일어나지 못하게 된다. E-카데린 (E-cadherin)은 이러한 세포-세포간 접착의 주요 인자로 알려져 있다. 이러한 E-카데린을 감소시키는 물질이 바이러스 (Adenovirus-3)에서 발견되어, 바이러스를 구성하는 단백질 중 세포의 E-카데린을 감소시키는 활성을 가진 부분 (JO-1)만 항체와 병용 투여하여 항체의 항암효과를 증진시킨 사례가 있다 (Beyer et al. 2011).
- [0016] 현재까지 치료제를 종양으로 전달을 용이하게 하기 위한 방안들을 종합하여 보았을 때, 대부분의 사례가 치료제와 이를 종양조직으로 잘 전달하지 위한 물질을 병용 투여하는 정도에 머물고 있다. 특히, 펩타이드의 경우 작은 분자의 크기에서 기인한 약물동태학적 (pharmacokinetics)으로 매우 짧은 반감기 (half-life)때문에 실제 환자에게 투여하는 양과 투여횟수가 매우 많아야 한다. 더욱이 병용투여의 불가피한 과정인 치료제 및 종양투과작용 물질을 각각 생산해야 함으로써 산업적으로 실용 가능성이 낮다. 또한, 자연계에 존재하지 않는 펩타이드 서열 및 단백질은 면역원성 (immunogenicity)을 유발할 가능성이 존재한다. 따라서 이상적으로는 항체 그 자체로서의 조직 침투성을 획득하여 하나의 항체 분자가 종양조직 내부로의 전달효과가 증진되는 포맷 개발이 요구되고 있다.
- [0017] 자연계에 존재하는 단백질들 중에서 혈관내피세포 성장인자-A (VEGF-A)는 혈액의 분출 (일혈, Extravasation)을 유도하는 것으로 잘 알려져 있다. 이는 다른 이름으로 혈관투과성인자 (Vascular permeability factor)로도 불린다. 이 작용은 혈관내피세포 성장인자 수용체 (VEGFR2)와 결합으로 인한 현상으로 알려져 있는데, 흥미롭게도 혈관내피세포 성장인자-A의 돌연변이 실험에서 혈관내피세포 성장인자 수용체에 결합하지 못하더라도, 혈관투과성이 증진되는 사례를 보여주었다. 이는 혈관내피세포 성장인자-A의 또 다른 수용체가 존재함을 제시하였다 (Stacker et al. 1999). 동 시대에 다른 연구진에서 이 수용체가 뉴로필린 (neuropilin, NRP)임을 밝혀내었다.

[0018] 뉴로필린은 처음으로 *Xenopus nervous system*에서 발견되었다. 뉴로필린은 막투과성 당단백질 (transmembrane glycoprotein)으로서, NRP1 및 NRP2의 두 가지 형태가 있다. 뉴로필린은 정상세포에 매우 미약하게 발현되는 반면, 대부분의 종양혈관 내피세포, 고형암 세포, 혈액종양 세포에 과발현되어 있다. 뉴로필린은 VEGF 패밀리의 리간드 결합에 의해 VEGFRs (VEGF receptors)들의 공수용체 (coreceptor)로 작용한다. 특히 NRP1은 VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3의 공수용체로 작용하여 다양한 VEGF 리간드와 결합함으로써, 종양조직에서 신혈관생성 (angiogenesis), 세포 생존, 이동/부착 (migration & adhesion) 및 침윤 (invasion) 등에 기여한다. 반면 NRP2는 VEGFR2, VEGFR3의 공수용체로 작용하여 림프관 형성 (lymphangiogenesis) 및 세포부착 (adhesion)에 기여한다. 또한 NRP1/NRP2 (NRP1/2)는 Plexin family receptors의 공수용체로 작용하여 분비된 세마포린 3계열 리간드 (class 3 semaphorins : Sema3A, Sema3B, Sema3C, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema3G) 리간드와 결합한다. 뉴로필린은 기능성 세포내 도메인이 없어 리간드가 결합하더라도 단독으로 활성이 없고, 공수용체인 VEGF 수용체 또는 플렉신의 공동수용체를 통해 신호가 전달된다고 알려져 있다. Sema3는 뉴로필린, 플렉신 수용체와 2:2:2로 결합하여 작용한다.

[0019] 뉴로필린과 공수용체의 작용이 뉴로필린만 타겟팅 하였을 때에도 억제되는 사례들이 보고 되어 있다. 예를들어, 항-뉴로필린1 항체의 경우, VEGFR2와 뉴로필린1에 결합한다고 알려진 VEGF-A와 뉴로필린1에만 경쟁적으로 결합하며, VEGFR2의 작용인 신혈관생성 (angiogenesis), 세포 생존, 이동/부착 (migration & adhesion) 및 침윤 (invasion)의 억제 기능을 가진다고 보고되어 있다 (Pan Q et al. 2007). 항-뉴로필린2 항체의 경우, VEGFR3와 뉴로필린2에 동시에 결합한다고 알려진 VEGF-C와 뉴로필린2에 경쟁적으로 결합하며, VEGFR3의 작용인 림프관 형성 (lymphangiogenesis) 및 세포부착 (adhesion)의 억제 기능을 가진다고 보고되어 있다 (Caunt M et al. 2008).

[0020] 따라서 본 발명자는 상기 뉴로필린과 Sema3A 또는 Sema3F의 상호작용에 의한 혈관내피세포 투과성 증진효과를 지니는 최소한의 Sema3A 또는 Sema3F 유래 펩타이드를 부분을 유추하고, 뉴로필린과 높은 친화도를 가지도록 돌연변이 펩타이드를 고안하였다. 이 펩타이드가 동일이량체 (homodimer)로 작용하는 Sema3A/Sema3F의 기능을 모사하도록, 펩타이드를 항체의 중쇄 C-말단에 융합시켜 2가 형태 고안하였다. 이는 항체-펩타이드가 융합된 단일 분자로 항체 고유 기능은 그대로 유지시키고, 뉴로필린과 결합을 통해 항체의 종양조직 축적 및 종양조직 내부로의 침투를 증진시키며, 추가적으로 뉴로필린 타겟팅을 통한 뉴로필린 공수용체의 작용을 방해하여 신생혈관생성 억제효과를 지닌 융합항체 기술을 개발하기에 이르렀다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0021] 본 발명의 일 양상은 뉴로필린에 특이적으로 결합하는 종양 침투성 펩타이드 (TPP, Trans-tumoral peptide)를 제공하는 것이다.

[0022] 본 발명의 다른 양상은 상기 종양 침투성 펩타이드가 융합된 융합 단백질, 소분자 약물, 나노입자 또는 리포솜을 제공하는 것이다.

[0023] 본 발명의 다른 양상은 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 제조용 벡터, 이 벡터로 형질전환된 숙주세포 및 이를 이용한 종양 침투성 펩타이드의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0024] 또한, 본 발명의 다른 양상은 상기 펩타이드 또는 이 펩타이드가 융합된 융합 단백질, 소분자 약물, 나노입자 또는 리포솜을 포함하는 암 또는 신생혈관 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0025] 또, 본 발명의 다른 양상은 상기 펩타이드 또는 이 펩타이드가 융합된 융합 단백질, 소분자 약물, 나노입자 또는 리포솜을 포함하는 암 또는 신생혈관 관련 질환의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0026] 본 발명의 일 양상은 뉴로필린에 특이적으로 결합하는 종양 침투성 펩타이드 (TPP, Trans-tumoral peptide)를 제공하는 것이다.

[0027] 상기 일 양상에서의 종양 침투성이란 예를 들면 1) 종양 특이 혈관내피세포, 종양세포 또는 조직을 특이적으로

인식하여 축적되고, 2) 중앙혈관내피세포의 세포간극을 넓혀 혈관밖 유출 (Extravasation)을 촉진시키고, 3) 중앙내부에서 중앙세포간극을 조절하여 중앙내부로 깊숙이 침투를 촉진하는 특성 중 어느 하나의 특성을 갖는 것을 의미한다.

[0028] 본 발명에서의 용어 “뉴로필린 (neuropilin, NRP)” 은 막투과성 당단백질 (transmembrane glycoprotein)으로서, NRP1 및 NRP2의 두 가지 형태를 갖는다. NRP1 및 NRP2의 구조는 도 1의 (D) 및 (E)에 각각 나타낸다. 뉴로필린은 크게 5가지 도메인으로 구성되어 있는데, N-말단에서부터, a1, a2 도메인은 CUB 도메인으로 분류되며, 세마포린의 Ig-like C2 type 부분이 결합하는 부분이다. 특히 이 부위는 plexin과 복합체를 형성하여 세마포린-플렉신 (plexin)과의 결합력을 증가시키는 역할을 한다. 뉴로필린의 b1, b2 도메인은 FV/VIII 도메인으로 분류되며, VEGF 패밀리의 리간드나 분비된 세마포린 3 계열의 리간드들의 (secreted Sema3s) C-말단 부위가 결합한다. VEGF 리간드 및 세마포린 3계열 리간드는 퓨린 단백질 가수분해 효소의 인식부위를 (RXRR, Arg-X-Arg-Arg)가지고 있어, 퓨린 작용 (Furin processing)에 의해 공통적으로 C-말단에 아르지닌 (Arg) 아미노산 잔기로 끝난다 (Adams et al. 1997). 이러한 VEGF, Sema3s 리간드의 C-말단 Arg 잔기는 뉴로필린 b1b2 도메인간의 상호작용에서 매우 중요하다고 보고되어 있다 (Teesalu et al. 2009). VEGF리간드와 뉴로필린 b1b2도메인간의 결합체 3차 구조가 밝혀져 있어 (Parker et al., 2012), 뉴로필린의 b1b2 도메인과 결합에 중요한 VEGF의 아미노산 서열은 알 수가 있다. 하지만, NRP1에 결합하는 Sema3A, NRP2에 결합하는 Sema3F의 경우, 이들 리간드의 C-말단 어느 부위가 구체적으로 NRP에 결합하는지는 아직 규명되지 않았다.

[0029] 상기 서열번호 1 내지 4로 이루어진 균으로부터 선택되는 아미노산 서열로 표시된 중앙 침투성 펩타이드는, 뉴로필린의 b1b2 도메인에 결합하는 VEGF165A 리간드의 결합부위 아미노산 서열 및 길이를 분석해서, 뉴로필린에 결합한다고 알려진 세마포린 3A 및 세마포린 3F의 퓨린 C-말단 서열 VEGF165A의 염기서열을 분석하여 C-말단의 서열이 유사함을 바탕으로 설계된 펩타이드이다.

[0030] 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시된 중앙 침투성 펩타이드인 A22는 세마포린 3A의 염기성 도메인의 일부인 잔기 739 - 760 유래한 22개의 아미노산으로 구성된 펩타이드이다. 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시된 중앙 침투성 펩타이드인 A22p는 상기 A22의 C-말단으로부터 3번째의 아미노산인 758번째 아스파라진 (Asn758) 프롤린 (Proline, Pro, P)로 변경한 것이다 (Asn758Pro). 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시된 중앙 침투성 펩타이드인 F22는 세마포린 3F의 염기성 도메인의 일부인 잔기 758 - 779 유래한 22개의 아미노산으로부터 유래한 22개의 아미노산으로 구성된 펩타이드이다. 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시된 중앙 침투성 펩타이드인 F22p는 상기 F22의 C-말단으로부터 3번째의 아미노산인 777번째 아스파라진 (Asn777)을 프롤린 (Proline, Pro, P)로 변경한 것이다 (Asn777Pro). 상기 펩타이드 A22p, F22p는 각각 Sema3A 및 Sema3F 유래 펩타이드에 돌연변이를 삽입하여 뉴로필린과의 친화도가 개량된 펩타이드를 도출하기 위해 고안한 것이다.

[0031] 본 발명의 펩타이드 명칭 및 세마포린 유래 서열 및 서열번호는 아래와 같다.

TPP 명칭	유래 리간드	전체 아미노산 서열(N-말단에서 C-말단 방향)	서열번호
A22	세마포린3A	HTPGNSNKWKHLQENKKGRNRR	서열번호 1
A22p	세마포린3A	HTPGNSNKWKHLQENKKGRPRR	서열번호 2
F22	세마포린 3F	REAPGAPRSPEPQDQKKPRNRR	서열번호 3
F22p	세마포린 3F	REAPGAPRSPEPQDQKKPRPRR	서열번호 4

[0032] 상기 일 양상의 중앙 침투성 펩타이드는 링커 펩타이드를 추가로 포함할 수 있다. 상기 링커 펩타이드는 1 내지 50개의 아미노산으로 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 4 내지 20개, 더욱 바람직하게는 4 내지 15개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 링커 펩타이드는 글라이신 (glycine), 세린 (serine) 또는 알라닌 (alanine)으로 구성될 수 있으며, 바람직하게는 상기 링커 펩타이드의 서열은 (GA)<sub>n</sub> 또는 (GGGS)<sub>m</sub>의 아미노산 서열로 이루어진 것 (단, 상기 n 및 m은 각각 독립적으로 정수 1 내지 20이다)일 수 있고, 더욱 바람직하게는 GAGA 또는 (GGGS)<sub>3</sub>의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

[0034] 본 발명의 구체예에서는 상기 링커와 세마포린 유래 서열의 다양한 조합으로 중앙표적능을 확인하였으며, 펩타

이드의 명칭, 링커의 서열, 세마포린유래 서열, 전체 아미노산 길이 및 서열번호는 아래와 같다.

TPP 명칭	전체 아미노산 서열(N-말단에서 C-말단 방향)		전체 아미노산 길이	서열번호
	링커 서열	세마포린 유래 서열		
4A22	GAGA	HTPGNSNKWKHLQENKKGRNRR (서열번호 1)	26	서열번호 5
15A22	GGGGSGGGSGGGGS	HTPGNSNKWKHLQENKKGRNRR (서열번호 1)	37	서열번호 6
15A22p	GGGGSGGGSGGGGS	HTPGNSNKWKHLQENKKGRPRR (서열번호2)	37	서열번호 7
4F22	GAGA	REAPGAPRSPEPQDQKKPRNRR (서열번호 3)	26	서열번호 8
15F22	GGGGSGGGSGGGGS	REAPGAPRSPEPQDQKKPRNRR (서열번호 3)	37	서열번호 9
15F22p	GGGGSGGGSGGGGS	REAPGAPRSPEPQDQKKPRPRR (서열번호4)	37	서열번호 10

[0035]

[0036]

본 발명의 다른 양상은 상기의 종양 침투성 펩타이드가 융합된 융합 단백질, 나노입자 또는 리포솜을 제공한다.

[0037]

상기 단백질은 항체, 항체의 단편, 면역 글로불린, 펩타이드, 효소, 전사인자, 독소, 항원성 펩티드, 호르몬, 운반 단백질, 구조 단백질, 운동 기능 단백질, 수용체, 신호 (signaling) 단백질, 저장 단백질, 막 단백질, 막 횡단 (transmembrane) 단백질, 내부 (internal) 단백질, 외부 (external) 단백질, 분비 단백질, 바이러스 단백질, 선천성 (native) 단백질, 당 단백질, 절단된 단백질, 이황화 결합을 갖는 단백질, 단백질 복합체, 화학적으로 개질된 단백질 또는 프리온 (prions) 등일 수 있다.

[0038]

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

[0039]

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

[0040]

또한, 상기 종양 침투성 펩타이드는 뉴로필린에 2가 (bivalent) 또는 그 이상으로 결합할 수 있다.

[0041]

본 발명에 있어서 “융합”은 기능 또는 구조가 다르거나 같은 두 분자를 일체화하는 것으로, 상기 단백질, 나노입자 또는 리포솜에 상기 종양 침투성 펩타이드가 결합할 수 있는 모든 물리, 화학적 또는 생물학적 방법에 의한 융합일 수 있다. 상기 융합은 바람직하게는 링커 펩타이드에 의할 수 있으며, 이 링커 펩타이드는 예를 들면 항체의 Fc 단편의 C 말단에 결합할 수 있다.

[0042]

본 발명에서 완전한 항체는 2개의 전장 (full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합 (disulfide bond, SS-bond) 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나뉘어지며, 중쇄 불변 영역은 감마 ( $\gamma$ ), 뮤 ( $\mu$ ), 알파 ( $\alpha$ ), 델타 ( $\delta$ ) 및 엡실론 ( $\epsilon$ ) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1 ( $\gamma$ 1), 감마2 ( $\gamma$ 2), 감마3 ( $\gamma$ 3), 감마4 ( $\gamma$ 4), 알파1 ( $\alpha$ 1) 및 알파2 ( $\alpha$ 2)를 가진다. 경쇄의 불변 영역은 카파 ( $\kappa$ ) 및 람다 ( $\lambda$ ) 타입을 가진다.

[0043]

"중쇄 (heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하

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

- [0044] 본 발명에 있어서, 항체의 단편은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 각각의 도메인 또는 이의 단편을 의미하며, 예를 들면, 항체의 중쇄불변영역, 중쇄가변영역, 경쇄불변영역 또는 경쇄가변영역 또는 이들의 단편일 수 있다. 바람직하게는 상기 항체의 단편은 항체의 중쇄불변영역일 수 있다.
- [0045] 또한, 상기 항체의 단편은 단량체 (monomer), 이량체 (dimer) 또는 다량체일 수 있다.
- [0046] 상기 항체는 단일클론 항체, 비특이적 항체, 비-인간 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, 그리고 상기 항체들의 에피토프-결합 단편을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 상기 단일클론 항체는 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE일 수 있으며, 예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgE, IgA1, IgA5, 또는 IgD 타입일 수 있으며, IgG1 타입일 수 있다. 또한, 상기 항체의 경쇄 불변 영역은  $\lambda$  또는  $\kappa$  형일 수 있다.
- [0048] 상기 펩타이드는 항체의 중쇄불변영역 (Fc) 단편에 결합될 수 있으며, 바람직하게는 항체의 중쇄불변영역 (Fc) 단편의 C 말단에 결합할 수 있으며, 상기 결합은 링커 펩타이드에 의한 것 일수 있다.
- [0049] 또한, 본 발명의 다른 양상은 서열번호 1 내지 10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 표시된 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0050] 상기 "폴리뉴클레오티드 (polynucleotide)"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드의 중합체이다. RNA 게놈 서열, DNA (gDNA 및 cDNA) 및 이로부터 전사되는 RNA 서열을 포괄하며, 특별하게 다른 언급이 없는 한 천연의 폴리뉴클레오티드의 유사체를 포함한다.
- [0051] 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 서열번호 1 내지 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열뿐만 아니라, 그 서열에 상보적인 (complementary) 서열도 포함한다. 상기 상보적인 서열은 완벽하게 상보적인 서열뿐만 아니라, 실질적으로 상보적인 서열도 포함한다. , 이는 당업계에서 공지된 가혹 조건 (stringent conditions) 하에서, 예를 들어, 서열번호 1 내지 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 혼성화될 수 있는 서열을 의미한다.
- [0052] 또한 상기 폴리뉴클레오티드는 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오티드의 추가, 결실 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다. 상기 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 뉴클레오티드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기 뉴클레오티드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 최소 90%의 상동성 또는 최소 95%의 상동성을 나타내는 서열일 수 있다.
- [0053] 본 발명의 다른 양상은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0054] 용어 "벡터 (vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다. 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면,  $\lambda$ gt4  $\lambda$ B,  $\lambda$ -Charon,  $\lambda$   $\Delta$ z1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, CMV, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0055] 상기 재조합 벡터에서 서열번호 1 내지 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다. 용어 "작동적으로 연결된 (operatively linked)"은 뉴클레오티드 발현 조절 서열 (예를 들면, 프로모터 서열)과 다른 뉴클레오티드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 따라서, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다.

- [0056] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [0057] 상기 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들어, pL<sub>λ</sub> 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점, CMV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0058] 한편, 상기 벡터는 본 발명의 종양 침투성 펩타이드 뿐만 아니라 이 펩타이드가 융합된 항체의 단편 또는 항체를 발현할 수 있다. 펩타이드가 융합된 항체 또는 항체의 단편의 경우, 벡터는 펩타이드와 항체 또는 이의 단편이 하나의 벡터에서 동시에 발현되는 벡터 시스템이거나 또는 각각 별도의 벡터에서 발현시키는 시스템 모두 가능하다. 후자의 경우, 두 벡터는 동시 형질전환 (co-transformation) 및 표적 형질전환 (targeted transformation)을 통하여 숙주 세포로 도입될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 재조합 벡터는 예를 들면, 도 4의 (B) 또는 도 13의 (B)에 기재된 개열지도를 가질 수 있다.
- [0060] 본 발명의 또 다른 양상은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0061] 숙주 세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 원핵 세포로는, 예를 들어, E. coli JM109, E. coli BL21, E. coli RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776, E. coli W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 슈린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모 (Saccharomyce cerevisiae), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, SP2/0, CHO (Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주 등이 이용될 수 있다.
- [0062] 본 발명의 또 다른 양상은 상기 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는, 종양 침투성 펩타이드의 제조방법을 제공한다.
- [0063] 상기 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 재조합 벡터의 숙주 세포 내로의 삽입은, 당업계에 널리 알려진 삽입 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl<sub>2</sub> 방법 또는 전기천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다. E. coli 등의 미생물을 이용하는 경우 생산성은 동물세포 등에 비하여 높은 편이나 당화 (glycosylation) 문제로 인해 인такт (intact)한 Ig 형태의 항체 생산에는 적당하지 않지만, Fab 및 Fv와 같은 항원 결합 단편의 생산에는 사용될 수 있다.
- [0064] 상기 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.
- [0065] 상기 일 양상은 종양 침투성 펩타이드 (Trans-tumoral peptide, TPP) 뿐만 아니라, 이 펩타이드가 융합된 항체 또는 이의 단편의 제조를 포함하는 개념이다.
- [0066] 종양 침투성 펩타이드 (TPP)가 융합된 항체의 중쇄불변영역 (Fc) 단편을 제조하는 방법에 대한 예는 아래와 같다.

- [0067] 1) 상기 TPP을 항체의 경첩부에서 시작되는 항체의 중쇄불변영역 (Fc) 단편을 융합하여 (hinge)-CH2-CH3-linker-TPP의 핵산 (nucleic acids)을 클로닝한 재조합 TPP 융합 중쇄불변영역 (Fc-TPP) 발현 벡터를 제조하는 단계;
- [0068] 2) 상기 제조된 발현벡터를 세포에 형질전환하여 재조합 Fc-TPP 단백질을 발현하는 단계; 및
- [0069] 3) 상기 발현된 재조합 Fc-TPP 단백질을 정제, 회수하는 단계.
- [0070] 또한, 종양 침투성 펩타이드가 융합된 항체의 제조방법에 대한 예는 아래와 같다.
- [0071] 1) 상기 제조된 IgG-TPP의 VH-CH1-경첩 (hinge)-CH2-CH3-linker-TPP 의 핵산 (nucleic acids)을 클로닝한 재조합 TPP융합 IgG의 중쇄 부위 및 VL-CL의 핵산 (nucleic acids)을 클로닝한 항체 경쇄 부위 벡터를 제조하는 단계;
- [0072] 2) 상기 제조된 중쇄, 경쇄 발현벡터를 세포에 공동형질전환하여 재조합 IgG-TPP 단백질을 발현하는 단계; 및
- [0073] 3) 상기 발현된 재조합 IgG-TPP 단백질을 정제, 회수하는 단계.
- [0074] 또한, 본 발명의 일 양상은 상기 종양 침투성 펩타이드 또는 이 펩타이드가 융합된 융합 단백질, 소분자 약물, 나노입자 또는 리포솜을 포함하는 암 또는 신생혈관 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0075] 본 발명에 따른 종양 침투성 펩타이드는 뉴로필린과 특이적으로 결합함으로써, 종양에 특이적으로 분포하고 종양 내부로 침투되는 효능을 나타낸다. 또한 특정 부분을 혈관내피세포 성장인자-A (VEGF165A)의 서열로 치환함으로써 종양침투효과는 유지하고 뉴로필린에 대하여 친화도가 현저히 향상된 특성을 갖는다. 또한, 본 발명에 따른 종양 침투성 펩타이드는 헤파린 결합부위가 결손되어 비특이적 결합이 최소화된 특성을 갖는다.
- [0076] 본 발명에 따른 종양 침투성 펩타이드가 융합된 항체는 야생형 항체와 유사한 생산 수율을 나타내며, 항체가 결합하는 항원 및 종양 침투성 펩타이드가 결합하는 뉴로필린의 2종 항원을 동시에 표적할 수 있는 이중특이성 항체의 특성을 지니며 이에 따라 고효율로 항체를 종양 조직으로 도달할 수 있는 특성을 가짐으로써, 암 치료에 높은 효과를 기대할 수 있다.
- [0077] 또한, 상기 종양 침투성 펩타이드가 융합된 항체 또는 이의 단편은 원래 야생형 항체가 지니는 항원 결합능, 중쇄불변영역 (Fc)의 고유기능, 즉 FcRn (neonatal Fc receptor), Fc $\gamma$ Rs (Fc gamma receptors)과의 결합성이 유지되어, 혈액 내 긴 반감기 (long serum half-life)를 가지게 된다. 또한 정제과정에서의 결합부위 (protein A 및protein G)가 보존된다는 이점이 있을 뿐 아니라, 항체-의존성 세포 매개 세포독성 (antibody-dependent cellular cytotoxicity) 및 보체-의존성 세포독성 (complement-dependent cellular cytotoxicity)을 유지할 수 있다.
- [0078] 또한, 상기 종양 침투성 펩타이드는 뉴로필린과 특이적으로 결합함으로써, VEGF165A가 뉴로필린에 결합하는 것과 경쟁한다. 이에 따라 VEGF165A가 뉴로필린에 결합하여 지니는 신생혈관형성 (angiogenesis) 기능을 억제함으로써, 암 치료뿐만 아니라, 혈관신생 관련 질병에 대한 치료효과를 기대할 수 있다.
- [0079] 상기 암은 편평상피세포암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐의 선암, 폐의 편평상피암, 복막암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 간세포암, 위장암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁암, 침샘암, 신장암, 간암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 간암 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0080] 상기 혈관신생 관련 질병으로는 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 각막이식 거부, 신생혈관성 녹내장, 후수정체 섬유증식증, 유행성 각결막염, 비타민 A 결핍, 콘택트 렌즈 과도착용, 아토피성 각막염, 상각막윤부 각막염, 익상편 건선 각막염, 쇼그렌 증후군, 홍반성 여드름, 플릭텐성 각결막염, 매독, 마이코박테리아 감염, 지방 변성증, 화학적 화상, 세균성 궤양, 진균성 궤양, 허피스 단순포진 감염, 대상포진 감염, 원충 감염, 카포시 육종, 무릎 궤양, 테리엔 변연성 각막변성증주변성 각질용해증, 정신적 외상, 류마티스성 관절염, 전신성 홍반, 다발성 동맥염, 베게너 유육종증, 공막염, 스티브 존슨병, 주변반흔성 방사상 각막절개술, 각막 이식 거부, 켈로이드, 상처 과립화, 및 사구체신염 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0081] 상기 조성물이 암 또는 혈관신생 관련 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 제조되는 경우, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 상기 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통

상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [0082] 상기 암 또는 혈관신생 관련 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0083] 상기 암 또는 혈관신생 관련 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 상기 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg 범위 내이다. 용어 "약학적 유효량"은 암을 예방 또는 치료하는 데, 또는 혈관신생으로 인한 질환의 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0084] 상기 조성물은 당해 당업자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 한편, 상기 조성물은 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하므로, 면역 리포솜으로 제형화될 수 있다. 항체를 포함하는 리포솜은 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 면역 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 폴리에틸렌글리콜-유도체화된 포스파티딜에탄올아민을 포함하는 지질 조성물로서 역상 증발법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fab' 단편은 디설파이드-교체 반응을 통해 리포솜에 접합될 수 있다. 독소루비신과 같은 화학치료제가 추가로 리포솜 내에 포함될 수 있다.
- [0085] 또한, 본 발명의 일 양상은 상기 종양 침투성 펩타이드 또는 이 펩타이드가 융합된 융합 단백질, 소분자 약물, 나노입자 또는 리포솜을 포함하는 암의 진단용 조성물을 제공한다.
- [0086] 본 명세서에서 사용된 용어 "진단"은 병태 생리의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명에서의 진단은 암의 발병 여부 및 경과를 확인하는 것이다.
- [0087] 상기 종양 침투성 펩타이드는 영상을 통하여 암을 진단하기 위하여 분자 영상용 형광체와 결합할 수 있다.
- [0088] 상기 분자 영상용 형광체는 형광을 발생시키는 모든 물질을 말하며, 적색이나 근적외선 (near-infrared)의 형광을 발광하는 것이 바람직하며, 양자 수득량 (quantum yield)이 높은 형광체가 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0089] 상기 분자 영상용 형광체는 상기 종양 침투성 펩타이드와 결합할 수 있는 형광체, 형광 단백질 또는 기타 영상용 물질이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0090] 형광체는 플루오레신 (fluorescein), 보디피 (BODIPY), 테트라메틸로드아민 (Tetramethylrhodamine), 알렉사 (Alexa), 시아닌 (Cyanine), 알로피코시아닌 (allophycocyanine) 또는 이들의 유도체가 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0091] 형광 단백질은 Dronpa 단백질, 형광 발색 유전자 (EGFP), 적색 형광 단백질 (red fluorescent protein, DsRFP), 근적외선 형광을 나타내는 시아닌 형광체인 Cy5.5 또는 기타 형광 단백질이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0092] 기타 영상용 물질은 산화철, 방사성 동위원소 등이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, MR, PET과 같은 영상 장비에 응용될 수 있다.

**발명의 효과**

[0093] 본 발명에 따른 종양 침투성 펩타이드 및 이 펩타이드가 융합된 단백질은 뉴로필린과 특이적으로 결합하는 특성을 갖게 되어, 종양조직에 특이적으로 축적되고, 종양혈관내피세포의 세포간격을 넓혀 혈관벽 유출을 증진시키고, 종양조직내부에서도 세포간극을 조정하여 종양 조직 내부로의 침투가 현저히 증가한다. 또한 Sema3A 및 Sema3F 유래 펩타이드 및 이 야생형 펩타이드의 뉴로필린에 대한 친화도가 현저히 향상된 펩타이드가 항체 또는 항체의 단편에 융합된 융합 항체는, 펩타이드가 융합되지 않은 대조군 항체에 비해, 같은 용량으로 투여했을 때 종양조직에 특이적으로 축적되고 종양 조직 내부로의 침투가 증가하여, 생체내에서 현저히 증가된 종양억제 활성을 보인다.

[0094] 본 발명에 따른 종양 침투성 펩타이드가 융합된 항체 또는 그의 단편은 원래 항체고유의 항원결합능을 유지하면서, 종양 침투성 펩타이드가 결합하는 뉴로필린과의 결합성을 갖게 되는 이중특이성 항체의 특성을 지니며 이에 따라 고효율로 융합항체를 종양 조직에 축적되고 종양조직 내부로의 침투를 촉진시키는 특성을 가짐으로써, 종양 치료 및 진단에 높은 효과를 기대할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 종양 침투성 펩타이드가 융합된 항체의 단편은 VEGF165A의 뉴로필린1/2에 대한 결합을 억제하여 VEGF165A에 의한 신생혈관형성을 억제하는 특성을 가짐으로써, 혈관 형성과 관련된 당뇨병성 망막증, 만성관절 류마티스 또는 죽상 동맥경화증 등 다양한 질병의 치료 및 진단에도 활용을 기대할 수 있다.

[0095] 본 발명에 따른 펩타이드가 융합된 항체 또는 그의 단편은 펩타이드가 융합되지 않은 야생형 항체와 유사한 생산 수율을 나타내어, 대량생산에 문제가 없다. 또한, 융합 항체 또는 이의 단편은 원래 야생형 항체가 지니는 항원 결합능, 중쇄불변영역 (Fc)의 고유기능, 즉 FcRn (neonatal Fc receptor)과의 결합성이 유지되어, 혈액 내 긴 반감기 (long serum half-life)를 가지게 된다. 또한 정제과정에서의 결합부위 (protein A 및 protein G)가 보존된다는 이점이 있을 뿐 아니라, Fc $\gamma$ Rs (Fc gamma receptors)과의 결합성이 유지되어, 항체-의존성 세포독성 (antibody-dependent cellular cytotoxicity) 및 보체-의존성 세포독성 (complement-dependent cellular cytotoxicity)을 유지할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0096] 도 1은 세마포린과 VEGF165A 및 뉴로필린 1 및 2의 구조를 도식화 한 것이다.

(A, B) 세마포린은 크게 3가지 도메인으로 구분된다. N-말단에서부터 세마 도메인은 plexin과 결합하는 부위이고, Ig-like C2 type 부분은 뉴로필린 a1, a2와 결합하는 부분이며, Basic (Basic rich region)은 푸린 (Furin)에 의해 잘리면서 뉴로필린과 결합할 수 있는 부분이 노출되는 부위이다.

(C) VEGF165A는 본래 VEGF의 수용체인 VEGFR2 (이하 KDR)에 결합할 수 있는 부위와 뉴로필린과 결합할 수 있는 HBD (Heparin-binding domain) 부위로 나뉜다. 또한, 각 세마포린 및 VEGF165A은 이량체 (dimer)를 형성하는 계면 (interface)이 존재한다.

(D), (E) 뉴로필린은 크게 5가지 도메인으로 구성되어 있는데, N-말단에서부터, a1, a2 도메인은 CUB 도메인으로 분류되며, 세마포린의 Ig-like C2 type 부분이 결합하는 부분이다. 특히 이 부위는 플렉신과 복합체를 형성해 세마포린-플렉신과의 결합력을 증가시키는 역할을 한다. b1, b2 도메인은 FV/VIII 도메인으로 분류되며, VEGF나 세마포린 3 계열의 리간드들의 C-말단 부위가 결합한다. 특히 이부분에는 헤파린이 결합할 수 있는 부위가 존재하며, (+)를 띄는 잔기가 많은 리간드의 결합을 용이하게 한다. 또한, MAM 은 올리고머화 (oligomerization)을 유도하며, TM (trans-membrane domain)은 뉴로필린이 세포 표면에 고정될 수 있게 하고, 세포 내 도메인 (cytosolic domain)에는 PDZ (Postsynaptic density 95, Disk large, Zona occludens 1) 도메인과 결합할 수 있는 부위가 존재한다.

도 2는 세마포린 3A (Sema3A)의 플렉신 (Plexin) 및 그 보조수용체 (co-receptor)인 뉴로필린과의 2:2:2 복합체를 도식화한 것이다. 자연계에 존재하는 세마포린 3A (Sema3A) 및 세마포린 3F (Sema3F)는 동중이중체를 형성하며 Sema 도메인은 플렉신의 Sema 도메인과 상호작용한다. 그리고 세마포린의 C-말단 부위는 뉴로필린의 b1 도메인과 상호작용한다.

도 3은 뉴로필린과 리간드 및 TPP가 융합된 항체 중쇄불변영역 (Fc-TPP)의 결합 복합체를 도식화한 것이다. 각 단백질들은 이중체 (dimer)의 형태로 C-말단 부위가 뉴로필린 (특히 b1 도메인)에 결합할 것이라고 예상하였다.

도 4는 Fc-TPP를 동물세포에서 발현하기 위한 벡터의 모식도이다. (A)는 숙주세포에 발현시키기 위한 벡터의 개열지도의 Fc-TPP를 인코딩하는 부분을 나타낸다. 도 4의 (B)는 Fc-TPP를 숙주세포에 발현시키기 위한 벡터의 전체 개열지도를 나타낸다.

도 5은 TPP가 융합된 항체 중쇄불변영역의 도식과 발현 정제 SDS-PAGE를 나타낸다.

(A) 항체 중쇄불변영역은 N-말단에 경첩 (hinge)부터 시작하여 2개의 이황화 결합을 유지하게 하여 이중체를 형성하기 용이하게 제작하였다. CH3 말단에 4개의 아미노산 GAGA 혹은 15개의 아미노산 (G4S)<sub>3</sub>의 펩타이드 링커를 이용하여 TPP의 외부 노출 정도를 조절하였고, 이후 22개의 세마포린 유래서열 및 개량한 유래서열을 추가하여 제작하였다.

(B) SDS-PAGE상에서 각 클론들의 이중체 형성과 정제 시 순도를 확인할 수 있다. 또한 TPP를 도입한 만큼 크기의 차이를 확인할 수 있다.

도6은 NRP-1 및 2의 b1b2 도메인에 대한 결합 여부를 확인하기 위한 ELISA 실험 결과이다. VEGFR2-Fc, NRP-1 및 2의 b1b2 domain을 플레이트에 고정하고, 비오틴레이션 (biotinylation)된 펩타이드들과 Fc-TPP클론들을 100nM의 농도 (펩타이드의 경우 100nM, 1 $\mu$ M)로 결합시킨 후 항-비오틴-항체 AP (anti-biotin antibody-AP) (alkaline phosphatase, SIGMA-ALDRICH co., USA)와 pNPP (p-nitrophenyl palmitate, SIGMA-ALDRICH co., USA)로 결합 유무를 확인하였다. (A)는 대조군 및 세마포린 3A 유래 펩타이드 및 Fc-TPP를, (B)는 대조군 및 세마포린 3F 유래 펩타이드 및 Fc-TPP를 비교하여 나타낸다. 비교적 돌연변이가 유도된 A22p, F22p 펩타이드, Fc-A22p/F22p 클론들에서 뉴로필린1/2에 대한 강한 결합이 나타났고, 연결자가 GAGA, (G4S)<sub>3</sub>인 클론들 중에서 (G4S)<sub>3</sub> 연결자를 사용한 클론들에서 미약하게 더 높은 결합이 나타났다. 그리고 대조군인 VEGFR2에 대한 결합은 관찰 되지 않았다. 이로써 TPP가 뉴로필린에 선택적으로 결합하는 것으로 나타났다.

도7은 Fc-TPP 중 뉴로필린에 대한 결합력이 강하게 나타난 클론들에 대하여, VEGF165A 또는 Semaphorin3A와 뉴로필린에 경쟁하여 결합하는지 확인하여 뉴로필린에 대한 결합 특이성을 확인하였다. Fc-15A22p가 Fc-15-F22p보다 더 높은 리간드의 농도에서 경쟁하는 것을 확인하였다.

도 8은 이 실험에서 TPP의 생물학적 동정을 위해 사용된 세포주 표면의 뉴로필린 1 및 2의 발현 정도를 FACS 분석을 수행한 결과이다. PPC-1 (인간 대장암 세포주), FaDu (인간 두경부암 세포주), HUVEC (인간 혈관내피 세포주), SK-OV-3 (인간 난소암 세포주)에서 실험을 수행한 결과, 각 세포주에 뉴로필린 1과 뉴로필린 2가 발현된 것을 확인하였다.

도 9의 (A)는 Fc-TPP이 세포 표면에 발현된 뉴로필린 1 및 2에 결합하는 지 확인하기 위해, 인간 난소암 세포주 (SK-OV-3)에서 FACS 분석한 결과이다. 앞의 생화학적 동정 결과 (도 6)에서 뉴로필린1 및 2-b1b2도메인에 결합능을 가지는 Fc, Fc-15A22P, Fc-15F22P를 동일 조건으로 처리하여 그 결합능을 확인하였다. 그 결과, 대조군인 Fc와는 달리, Fc-15A22P와 Fc-15F22P는 세포 표면에 결합함을 확인하였다. (B)는 (A) 결과를 토대로 Fc-TPP의 결합능이 뉴로필린 1 및 2에 특이적임을 확인하기 위하여, 정제된 뉴로필린1- b1b2 도메인과 뉴로필린2-b1b2 도메인을 각각 Fc 및 Fc-TPP와 상온에서 미리 반응시킨 후, (A)실험과 동일한 방법으로 결합능을 확인한 결과를 나타낸 도이다. 그 결과, 뉴로필린 1및 2-b1b2 도메인을 미리 반응시킨 샘플에서 Fc-TPP의 결합능이 현저히 감소됨을 확인하였으며, 이는 Fc-TPP가 뉴로필린 1 및 2에 특이적으로 결합함을 의미한다.

도 9의 (C) 및 (D)는 뉴로필린1 및 2에 결합능을 갖는 VEGF165A 와 세마포린 3A, 세마포린 3F과의 결합 부위 비교를 위하여 FACS 분석을 수행한 결과이다. 그 결과, Fc-TPP의 결합능이 VEGF165에 의해 저해됨을 확인하였고, Fc-15A22P의 경우, 세마포린 3A에 의해, Fc-15F22P의 경우, 세마포린 3F에 의해 결합능이 저해됨을 확인하였다.

도 10은 Fc-TPP의 세포내로의 뉴로필린1 및 2 특이적인 유입능을 확인하기 위해, 공초점 현미경 (confocal microscopy) 분석을 통해 Fc-TPP와 뉴로필린1 및 2와의 중첩 (co-localization)을 관찰한 결과이다. 인간 전립선암 세포주인 PPC-1에 PBS, Fc, Fc-15A22P, Fc-15F22P를 동일 조건으로 처리하여, 세포 내로 유입된 정도를 염색하여 관찰한 결과, Fc와는 달리, Fc-15A22P와 Fc-15F22P는 세포 내로 유입이 된 것을 관찰 하였다. 또한, 이는 세포 내의 뉴로필린1 및 2와 중첩됨으로써, Fc-TPP의 유입능은 뉴로필린 1 및 2 특이적임을 확인하였다.

도 11a는 Fc-TPP의 HUVEC에서의 생물학적 기작을 알아보기 위한 웨스턴 블롯 결과이다. 또한 TPP의 효과적인 포맷을 확인하기 위해 단일 형태인 펩타이드 A22, A22P, F22, F22P를 사용하였고, 융합 형태인 Fc 포맷의 경우, TPP와의 링커 길이에 따른 비교를 위하여, Fc-4A22, Fc-15A22, Fc-15A22P, Fc-4F22, Fc-15F22, Fc-15F22P를 사용하였다. 대조군으로 VEGF165A와 세마포린 3A의 경우, 세마포린 3F와는 달리 HUVEC에서 투과능 향상 효과를 보

이며, 이는 VE-cadherin의 감소로 간접적으로 확인할 수 있다. 세마포린 3A 유래 TPP의 경우, Fc-15A22와 Fc-15A22P가 효과적으로 VE-카데린을 감소시켰으며, VEGF165A와 세마포린 3A도 마찬가지로 결과를 보였다. 또한, 세마포린 3F 유래 TPP의 경우, 본래 리간드인 세마포린 3F는 VE-카데린의 변화를 유도하지 않았으나, Fc-15F22P는 동일조건에서 VE-카데린을 감소시켰다.

도 11b는, TPP가 혈관 내피세포 (HUVEC)의 투과능을 향상시키는지 확인하기 위하여, 트랜스웰 어세이 (Transwell assay)를 수행한 결과이다. 그 결과, VEGF165, 세마포린 3A, Fc-15A22, Fc-15A22P, Fc-15F22P가 효과적으로 투과능을 향상 시켰다. 반면, 단일 형태의 펩타이드 A22, A22P, F22, F22P는 투과능을 향상 시키지 못했다. 이는 도 11a의 결과와 밀접한 연관성이 있는 결과이다.

도 11c는 실제 종양 조직 내의 TPP의 침투능을 확인하기 위한 면역조직화학 (Immunohistochemistry) 결과이다. 인간 표피암 세포주인 A431를 누드마우스에 이식하여 TPP의 효과를 혈관 (CD31)과의 이중염색을 통해 확인한 결과, 펩타이드인 A22P와 대조군인 Fc와는 달리 Fc-15A22 및 Fc-15A22P의 경우, 종양 조직에 선택적으로 도달하며, 종양 조직 내로 효과적으로 침투됨을 확인하였다.

도 11d는 혈관 투과능의 향상을 에반스 블루 어세이 (Evans Blue assay)를 통해 확인한 결과이다. 그 결과, 위의 결과와 마찬가지로 Fc와는 달리 Fc-15A22P에 의해 효과적으로 조직 침투능이 향상되었음을 확인하였다.

도 11e는 혈관 내피 세포뿐만 아니라, 암세포에서의 효과를 확인하기 위하여, 인간 두경부암 세포주인 FaDu에서 E-카데린의 변화를 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다. 그 결과, 세마포린 3A 유래 TPP의 경우, 세마포린 3A와는 달리 Fc-15A22와 Fc-15A22P만이 E-카데린의 감소를 유도 했으며, 세마포린 3F 유래 TPP의 경우, 세마포린 3F와 마찬가지로 Fc-15F22P만이 E-카데린의 감소를 유도하였다. 또한, 뉴로필린 1과 2 siRNA를 공동 주입하여 뉴로필린 1과 2의 발현을 감소 시켰을 때, Fc-TPP에 의한 E-카데린의 감소가 일어나지 않는 것을 확인함으로써, Fc-TPP가 뉴로필린 특이적으로 E-카데린의 감소를 유도한다는 것을 확인하였다.

도 12a는 Fc-15A22P의 VEGF165A에 의한 혈관 내피세포의 튜브 형성 (tube formation)이 억제되는지 확인하기 위하여, 튜브 형성 어세이 (tube formation assay)를 수행한 결과이다. 그 결과, Fc-15A22P가 VEGF165A에 의해 유도된 내피세포의 튜브 형성을 효과적으로 억제 시켰다.

도 12b는 마우스의 생체내에서 VEGF165A에 의해 유도된 신생혈관형성을 Fc-15A22P가 억제할 수 있는지 알아보기 위하여, 매트릭셀 플러그 어세이 (in vivo matrigel plug assay)를 수행하였다. 또한, 면역조직화학 (Immunohistochemistry)을 통해 항 CD31 항체로 혈관의 밀도를 측정하였다. 그 결과, Fc-15A22P는 마우스 생체내에서 VEGF165A에 의해 유도되는 혈관의 형성을 억제할 수 있음을 확인하였다.

도 13의 (A)는 단일클론항체의 중쇄불변영역 C-말단에 뉴로필린과 결합하는 펩타이드가 펩타이드 링커로 연결된 융합항체 (mAb-TPP) 모식도이다.

(B)는 상기 (A)의 융합항체가 뉴로필린 1 혹은 2의 b1 도메인에 결합하는 모식도이다.

(C)는 상기 융합항체 (mAb-TPP)를 생체내에 투입하였을 때 예상되는 기작을 나타낸 모식도이다. 펩타이드가 융합된 항체가 종양혈관내피 및 다양한 종양세포에 과발현된 뉴로필린 1 또는 2에 결합하여 ①종양조직 선택적 분포가 증가하고, ②종양혈관 밖 유출 (extravasation)이 증가하고, ③ 종양조직 내부로의 침투가 증가되는 신호 전달을 유도하여 융합항체의 종양조직 특이 분포 및 종양조직 내부로의 침투를 현저히 증가시킬 수 있다.

도 14는 IgG 중쇄-TPP를 발현하기 위한 벡터의 개열지도의 예이다. (A)는 숙주세포에 발현시키기 위한 벡터의 개열지도의 IgG 중쇄-TPP를 인코딩하는 부분을 나타낸다. (B)는 IgG 중쇄-TPP를 숙주세포에 발현시키기 위한 벡터의 전체 개열지도를 나타낸다.

도 15는 각각 IgG 경쇄를 동물세포에서 발현하기 위한 벡터의 개열지도의 예이다. (A)는 숙주세포에 발현시키기 위한 벡터의 개열지도의 IgG 경쇄를 인코딩하는 부분을 나타낸다. (B)는 IgG 경쇄를 숙주세포에 발현시키기 위한 벡터의 전체 개열지도를 나타낸다.

도 16의 (A)는 기존의 항-EGFR IgG인 Cetuximab IgG의 Fc C-말단에 TPP를 도입하여 구축된 항체를 도식화한 그림이다. (B)는 HEK293F세포에 공동형질 전환을 통해 일시적으로 발현 및 정제한 다음, 환원성 및 비환원성 조건의 SDS-PAGE 상에서 크기 및 순도를 분석한 결과이다. (C)는 Sandwich ELISA를 통하여 Cetuximab-TPP가 항원인 EGFR과 뉴로필린에 동시에 결합할 수 있음을 확인한 결과이다.

도 17의 (A)는 기존의 항-HER2 IgG인 Trastuzumab에도 상기 실험과 마찬가지로 TPP를 도입한 항체의 도식화된

그림이다. (B)는 HEK293F세포에 공동형질 전환을 통해 일시적으로 발현 및 정제한 다음, 환원성 및 비환원성 조건의 SDS-PAGE 상에서 크기 및 순도를 분석한 결과이다. (C) Sandwich ELISA를 Trastuzumab-TPP가 항원인 Her2 과 뉴로필린에 동시에 결합할 수 있음을 확인한 결과이다.

도 18은 mAb 및 mAb-TPP의 FcRn에 대한 pH에 따른 결합능이 유사한지 확인하기 위하여 SPR (Surface Plasmon Resonance)를 수행한 결과이다. mAb (Cetuximab, Trastuzumab)가 pH6.0에서 결합곡선이 나타나고, pH7.4에서는 완전히 결합하지 않는 야생형 항체의 특성이 mAb-TPP (Cetuximab-TPP, Trastuzumab-TPP)에서 유지되는 것을 증명하는 결과이다.

도 19a는 Cetuximab-TPP의 종양조직 내 침투능을 확인하기 위한 IHC 결과이다. EGFR이 발현되어 있는 인간 두경부암 세포주인 FaDu와 인간 표피암 세포주인 A431를 각각 누드마우스에 이식한 후, Cetuximab과 Cetuximab-15A22P를 주입한 후, 조직 내 침투능을 혈관 (CD31)과의 이중염색을 통해 확인하였다. 그 결과, Cetuximab의 경우, 혈관 주변에만 침투되는 반면, Cetuximab-15A22P의 경우, 혈관으로부터 좀 더 멀리 조직 내부로 침투되었음을 확인하였다 (상부 패널). 이를, Image J를 이용하여 정량화 하였다 (하부 패널).

도 19b는 도 18a의 조건의 마우스에서 적출한 암세포 조직으로부터 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다.

도 19c는 항상된 종양 조직 내 침투성이 실제로 암세포 억제에 영향을 미치는지 확인 하기 위한 누드마우스에서의 암세포 성장 저해 실험 결과이다. 그 결과 PBS에 비해 Cetuximab과 Cetuximab-15A22P가 암세포의 성장을 저해하였고, Cetuximab-15A22P가 동일 조건에서 더 효과적으로 억제함을 확인 하였다.

도 19d는 상기 실험시 마우스의 무게를 측정한 결과이다. Cetuximab을 주입한 실험군과 비교하였을 때, Cetuximab-15A22P 을 주입한 실험군의 마우스 무게에는 큰 차이가 없었다. 이는 Cetuximab과 비교하여 Cetuximab-15A22P이 마우스에 다른 독성이 없음을 간접적으로 증명한 결과이다.

도 20a는 Trastuzumab-TPP의 종양조직 내 침투능을 확인하기 위한 IHC 결과이다. HER2가 발현되어 있는 인간 난소암 세포주인 SK-OV-3를 누드마우스에 이식한 후, Trastuzumab과 Trastuzumab-15A22P를 주입한 후, 조직 내 침투능을 혈관 (CD31)과의 이중염색을 통해 확인하였다. 그 결과, Trastuzumab의 경우, 혈관 주변에만 침투되는 반면, Trastuzumab-15A22P의 경우, 혈관으로부터 좀 더 멀리 조직 내부로 침투되었음을 확인하였다. (상부 패널) 이를 Image J를 이용하여 정량화하였다 (하부 패널).

도 20b는 19a의 조건의 마우스에서 적출한 암세포 조직으로부터 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다.

도 20c는 Trastuzumab-TPP의 암세포 성장 억제 효과를 확인하기 위한 실험 결과이다. 그 결과, 동일 조건에서 Trastuzumab에 비해 Trastuzumab-15A22P가 효과적으로 암세포의 성장 억제를 유도함을 확인하였다.

도 20d는 상기 실험시 마우스의 무게를 측정한 결과이다. Trastuzumab을 주입한 실험군과 비교하였을 때, Trastuzumab-15A22P 을 주입한 실험군의 마우스 무게에는 큰 차이가 없었다. 이는 Trastuzumab과 비교하여 Trastuzumab-15A22P이 마우스에 다른 독성이 없음을 간접적으로 증명한 결과이다.

도 21은 두경부암 세포주인 FaDu와 난소암 세포주인 SK-OV-3에서 Fc-TPP와 mAb-TPP를 처리하여 세포성장 저해 정도를 in vitro에서 평가한 결과이다. 그 결과, Cetuximab 및 Cetuximab-15A22P는 FaDu 세포주에서 약 30%정도 세포성장을 억제하였고, Trastuzumab 및 Trastuzumab-15A22P는 SK-OV-3 세포주에서 약 30-35% 정도 세포성장을 억제 하였다. 각각의 mAb와 mAb-TPP간의 차이는 없는 것으로 확인되었다. 이와 마찬가지로, Fc와 Fc-TPP는 FaDu와 SK-OV-3에서 모두 세포성장 저해 효과가 나타나지 않았다. 이는, 뉴로필린에 의한 TPP의 기작은 TPP 자체가 직접적으로 암세포의 성장에는 영향을 끼치지 않으면서, 종양 조직 내 침투능을 증가시켜 효과를 극대화시킨다는 것을 의미한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0097] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0098] 실시예 1: 뉴로필린에 특이적으로 결합하는 세마포린3계열 리간드 유래 펩타이드 및 뉴로필린과 친화도가 향상된 펩타이드의 디자인

[0099] 뉴로필린을 특이적으로 결합하는 펩타이드를 유추하기 위해 뉴로필린과 결합한다고 알려진 리간드들, 즉 혈관내

피성장인자-A, B, C, D (Vascular endothelial cell growth factor; VEGF-A, B, C, D), 세마포린 3-A, B, C, D, E, F (Semaphorin class 3), 섬유아세포증식인자-2 (fibroblast growth factor-2; FGF2), 간세포성장인자 (Hepatocyte growth factor; HGF), 및 갈렉틴-1 (galectin-1)]의 서열을 분석하였다.

- [0100] 대표적으로 혈관내피성장인자-A와 세마포린 3계열 (Semaphorin class 3) 의 전체 서열을 PubMed Entrez Protein Database로부터 선별하였다.
- [0101] 도 1의 (A) 및 (B)에 나타난 바와 같이, 분비 세마포린 3계열 (Sema3s)리간드는 세마포린 3A부터 3G까지 밝혀졌으며, 공통적으로 3가지 도메인으로 구분된다. N-말단에서부터 살펴보면, 세마 도메인은 플렉신 (plexin)과 결합하는 부위이고, Ig-like C2 type 부분은 뉴로필린 a1, a2와 결합하는 부분이며, 염기성 잔기 풍부 도메인 (Basic rich region)은 푸린 (Furin)에 의해 잘리면서 뉴로필린과 결합할 수 있는 부분이 노출되는 부위이다.
- [0102] 도 1의 (C)에서 나타난 바와 같이, 현재까지 알려진 뉴로필린의 리간드 중 뉴로필린에 가장 강하게 결합하는 혈관내피세포 성장인자-A 특히, VEGF165A는 본래 VEGF의 수용체인 VEGFR2에 결합할 수 있는 부위와 뉴로필린과 결합할 수 있는 HBD (Heparin-binding domain) 부위로 나뉜다. VEGF165A의 경우, 뉴로필린 1 결합 시 뉴로필린 1과 결합하는 부분 (160-165, Exon8a) 이외에 뉴로필린 1에 결합된 헤파린과 결합하는 (+)를 띄는 잔기가 많은 부분 (115-159, Exon7a, 7b)을 함께 포함하고 있다. (+)를 띄는 잔기가 많은 부분은 세포 외벽에 있는 헤파린에 비특이적 결합 (non-specific binding)을 야기할 수 있다. 또한 VEGF165A는 Exon8에 해당하는 부분에 시스테인 (Cysteine)을 포함하고 있어, 항체 등과 같은 단백질에 융합하여 발현하였을 때, 발현양 감소를 초래할 수 있을 것이라고 예상하여 배제하였다.
- [0103] 도 1의 (D) 및 (E)에서 나타난 바와 같이, 뉴로필린은 크게 5가지 도메인으로 구성되어 있는데, N-말단에서부터, a1, a2 도메인은 CUB 도메인으로 분류되며, 세마포린의 Ig-like C2 type 부분이 결합하는 부분이다. 특히 이 부위는 플렉신과 복합체를 형성해 세마포린-플렉신과의 결합력을 증가시키는 역할을 한다. b1, b2 도메인은 FV/VIII 도메인으로 분류되며, VEGF나 세마포린 3 계열의 리간드들의 C-말단 부위가 결합한다. 특히 이부분에는 헤파린이 결합할 수 있는 부위가 존재하며, (+)를 띄는 잔기가 많은 리간드의 결합을 용이하게 한다. 또한, MAM 은 올리고머화 (oligomerization)을 유도하며, TM (trans-membrane domain)은 뉴로필린이 세포 표면에 고정될 수 있게 하고, 세포 내 도메인 (cytosolic domain)에는 PDZ (Postsynaptic density 95, Disk large, Zona occludens 1) 도메인과 결합할 수 있는 부위가 존재한다.
- [0104] 도 2는 세마포린 3A (Sema3A)의 플렉신 (Plexin) 및 그 보조수용체 (co-receptor)인 뉴로필린과의 2:2:2 복합체를 도식화한 것이다. 자연계에 존재하는 세마포린 3A (Sema3A) 및 세마포린 3F (Sema3F)는 동종이중체를 형성하며 Sema 도메인은 플렉신의 Sema 도메인과 상호작용한다. 그리고 세마포린의 C-말단 부위는 뉴로필린의 b1 도메인과 상호작용한다.
- [0105] 도 3은 뉴로필린과 리간드 및 TPP가 융합된 항체 중쇄불변영역의 결합 복합체를 도식화한 것이다. 각 단백질들은 자연계에 존재하는 세마포린 3A 및 3F와 유사하게 이중체 (dimer)의 형태로 C-말단 부위가 뉴로필린 (특히 b1 도메인)에 결합할 것이라고 예상하였다.
- [0106] 상기와 같은 혈관내피성장인자-A와 세마포린 3계열의 구조 및 서열에 근거하여 서열 유사성을 분석한 결과 C-말단에 유사성을 발견하였다. 특히, 세마포린 3계열의 뉴로필린과의 결합은 푸린 (furin)에 의해 잘린 (cleavage) 뒤 활성이 있다고 알려져 있는데, 여기서 뉴로필린과 상호작용을 하는 혈관내피성장인자-A의 c-말단과 유사함을 발견하였다. 이를 하기의 표 1로 나타내었다. 하기 표 1은 뉴로필린 1 및 2의 리간드인 세마포린 3계열 리간드 및 혈관내피성장인자-A 계열 리간드들의 C-말단 부분 아미노산 서열 유사성 분석 결과를 나타낸다.

표 1

Sema3A (722-760)	CEQVWKRDRKQRRQRPQHTPGNSNKWKHLQENKKGRNRR
Sema3B (710-731)	CRP-----QPALQSL--PLE-----SRKGRNRR
Sema3C (709-745)	CKDTRQQHQQGDESQ--KMRGDYGKLGKALINSRKSRRNRR
Sema3D (731-763)	CEQMWHREK--RQQR---NKGGP-KWKHMQEMKKKRNRR
Sema3E (734-770)	CTDRKRKCLKMSPSK--WKYANPQEKKLRKPEHYRLPR
Sema3F (756-779)	CQGYWRHVPPSPREA----PGAP-RSPEPQDQKPKRNRR
Sema3G (750-774)	CFRSRSRGKQARGKS-----WA---GLELGGKMK
VEGF165 (138-165)	CKNTDSRCKARQLEL-----NERTCRCDKPRR
VEGF145 (110-145)	ARQEKKSVRGKGGQ---KRRKRKKSRYKSWSVCDKPRR
Clustal Consensus	. : :

[0107]

[0108]

상기 서열 유사성을 기반으로 하여, 세마포린 3계열 (Semaphorin class 3)이 퓨린 (furin)에 의해 잘리는 부분의 C-말단에서부터 N-말단으로 항체에 도입하기 위한 잠재적인 서열들을 유추하였다. 하기 표 2는 세마포린 3계열 리간드 및 혈관내피성장인자-A 계열 리간드들의 잠재적인 뉴로필린 결합부위의 아미노산 서열 정보를 나타낸다.

표 2

Nrp1/2 리간드	C-말단 서열
Sema3A	EQVWKRDRKQRRQRPQHTPGNSNKWKHLQENKKGRNRR
Sema3B	RPQPALQSLPLESRKGRNRR
Sema3C	KDTRQQHQQGDESQKMRGDYGKLGKALINSRKSRRNRR
Sema3D	EQMWHREKRRQRNKGKPKWKHMQEMKKKRNRR
Sema3E	TDRKRKCLKMSPSKWKYANPQEKKLRKPEHYRLPR
Sema3F	QGYWRHVPPSPREAAPGAPRSPEPQDQKPKRNRR
VEGF165	ARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR
VEGF145	ARQEKKSVRGKGGQKRRKRKKSRYKSWSVCDKPRR
VEGF121	ARQEKCDKPRR

[0109]

[0110]

이중에 뉴로필린과 결합능이 잘 알려진 세마포린 3A (Sema3A) 및 세마포린 3F (Sema3F)의 C-말단 서열정보에서 각각 22개의 아미노산을 선발하였다. 즉 세마포린 3A의 염기성 도메인의 일부인 잔기 739 - 760 유래한 22개의 아미노산을 가진 A22 펩타이드, 세마포린 3F의 염기성 도메인의 일부인 잔기 758 - 779 유래한 22개의 아미노산을 가진 F22 펩타이드를 선택하였다.

[0111]

또한 세마포린 3계열 리간드와 혈관내피성장인자-A 계열 리간드들의 잠재적인 뉴로필린 결합부위의 아미노산 서열을 비교분석한 결과, 특징이 C-말단으로부터 3번째인 아미노산 잔기가 세마포린 3계열 리간드는 아스파라진 (Asn)으로 보존된 것과 비교하여, 뉴로필린에 대한 친화도가 높은 혈관내피성장인자-A계열 리간드들은 그 잔기가 프롤린 (Pro)으로 보존되었음을 알았다 (표 2). 특히, 이 프롤린은 뉴로필린 상호작용에서 도메인을 특정 구조로 제한하는 역할을 하여 뉴로필린-도메인간의 친화도에 큰 기여를 할 것이라고 예상하였다. 이와 같은 논리로 뉴로필린에 대한 친화도가 향상된 펩타이드를 고안하기 위해 A22, F22의 마지막 3번째 아미노산을 프롤린으로 대체한 A22p, F22p를 고안하였다. 하기 표 3은 뉴로필린에 결합하는 세마포린 3A 및 3F의 C-말단 유래 아미노산 서열을 지닌 A22, F22 및 뉴로필린에 대한 친화도를 향상시키고자 고안한 A22p, F22p 펩타이드 서열 및 서열번호를 나타낸다. A22p, F22p에서 돌연변이 유도한 부위는 밑줄로 강조하였다.

표 3

TPP 명칭	유래 리간드	뉴로필린 타겟 서열	서열번호
A22	세마포린3A	HTPGNSNKWKHLQENKKGRNRR	서열번호1
A22p	세마포린3A	HTPGNSNKWKHLQENKKGRPRR	서열번호2
F22	세마포린3F	REAPGAPRSPEPQDQKKPRNRR	서열번호3
F22p	세마포린3F	REAPGAPRSPEPQDQKKPRPRR	서열번호4

[0112]

[0113] 실시예 2: 중앙 침투성 펩타이드가 항체 중쇄불변영역인 Fc에 융합된 Fc-TPP의 구축

[0114] 상기 실시예 1에서 고안된 4종의 펩타이드 서열을 인간 항체 IgG1의 불변부위영역 Fc의 C-말단에 도입하기 위한 링커의 길이를 실험하기 위하여 글라이신, 세린 및 알라닌으로 구성되는 4개의 아미노산 또는 15개의 아미노산으로 이루어진 링커를 선발하였다. 선발된 링커는 GAGA 및 (GGGS)3의 서열을 갖는다. 이에 대한 클론 명칭 및 서열 정보는 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

TPP 명칭	Fc의 C-말단에 융합된 아미노산 서열(N-말단에서 C-말단 방향)		전체 아미노산 길이	서열번호
	연결자 서열	뉴로필린 타겟 서열		
4A22	GAGA	HTPGNSNKWKHLQENKKGRNRR(서열번호 1)	26	서열번호5
15A22	GGGS	HTPGNSNKWKHLQENKKGRNRR(서열번호 1)	37	서열번호6
15A22p	GGGS	HTPGNSNKWKHLQENKKGRPRR(서열번호 2)	37	서열번호7
4F22	GAGA	REAPGAPRSPEPQDQKKPRNRR(서열번호 3)	26	서열번호8
15F22	GGGS	REAPGAPRSPEPQDQKKPRNRR(서열번호 3)	37	서열번호9
15F22p	GGGS	REAPGAPRSPEPQDQKKPRPRR(서열번호 4)	37	서열번호10

[0115]

[0116] 항체 중쇄부위 C-말단에 연결한 중앙 침투성 펩타이드와 링커 명칭 및 서열 정보

[0117] 표4에 있는 펩타이드 (서열번호 5-10)를 인간 항체 IgG1의 불변부위영역 Fc의 C-말단에 융합시켜 2가 형태로 뉴로필린에 결합하는 특성을 갖도록 하였다. 이는 원래 세마포린 3A, 3F리간드가 동종이량체 (homodimer)로 뉴로필린에 붙는 것을 모사하여, 타겟인 뉴로필린 수용체를 활성화시키기 위한 고안이다.

[0118] Fc의 C-말단에 고안된 중앙 침투성 펩타이드 (TPP)가 융합된 Fc-TPP 발현 벡터를 동물세포 발현벡터에 클로닝하여 구현하였다. 도 4의 (A)는 숙주세포에 발현시키기 위한 벡터의 개열지도의 Fc-TPP를 인코딩하는 부분을 나타낸다. 도 4의 (B)는 Fc-TPP를 숙주세포에 발현시키기 위한 벡터의 전체 개열지도를 나타낸다.

[0119] Fc-TPP를 제작하기에 앞서 Fc를 제한효소 AscI/HindIII로 pSecTag2A 벡터에 클로닝하였다. 각 Fc-TPP는 Fc를 주형으로 하여 CH3에서 시작하는 동일한 정방향 시발체와 c-말단에 TPP를 도입하기 위한 각각의 역방향 (reverse) 시발체들로 PCR하여 CH3에서부터 말단까지 제한효소 BsrGI/HindIII로 치환하였다

[0120] 상기와 같이 Fc 및 Fc-TPP를 발현하면, 정제된 단백질을 SDS-PAGE상에서 TPP가 도입된 만큼의 크기가 다르게 나타난다. (도면 5 (B)) Fc를 크기에 대한 대조군으로 사용하였다. 대조군으로 사용할 22개의 아미노산으로 이루어진 세마포린 유래 서열의 바이오틴-펩타이드는 화학적 합성으로 제작되었다 (Peptron, Korea).

[0121] 실시예 3: Fc-TPP의 발현 및 정제

[0122] HEK293-F 시스템 (Invitrogen)을 사용하여 상기 실시예 2 에서 구축된 각각의 Fc-TPP를 인코딩하는 플라스미드 (도 4)를 일시적 트랜스펙션 (transient transfection)을 이용하여 단백질을 발현시켰다. 진탕 플라스크에서, 무혈청 FreeStyle 293 발현 배지 (Invitrogen)에서 부유 성장하는 HEK293-F 세포 (Invitrogen)를 플라스미드 및 폴리에틸렌아민 (Polyethylenimine, PEI) (Polyscience)의 혼합물로 트랜스펙션하였다. 진탕 플라스크 (Corning)에 200 mL 트랜스펙션 시, HEK293-F 세포를 2.0E\*6 세포/ml의 밀도로 배지 100ml에 파종하여, 120 rpm, 8 % CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 그 후, Fc-TPP를 인코딩하는 플라스미드를 10ml FreeStyle 293 발현 배지 (Invitrogen)에 250 µg (2.5 µg/ml)로 희석하여, PEI 750 µg (7.5 µg/ml)을 희석한 10ml의 배지와 혼합하여 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 그 후, 반응시킨 혼합배지를 앞서 100ml로 파종한 세포에 넣어 4시간 동안 120 rpm, 8% CO<sub>2</sub>에서 배양 후, 나머지 100 ml의 FreeStyle 293 발현 배지를 추가하여 7일동안 배양하였다. 상청액은 7일 후에 채취하였다.

[0123] 표준 프로토콜을 참조하여 채취한 세포 배양 상청액으로부터 단백질을 정제하였다. 단백질 A 세파로오스 컬럼 (Protein A Sepharose column) (GE healthcare)에 항체를 적용하고 PBS (pH 7.4)로 세척하였다. 0.1M 글라이신 완충액을 이용하여 pH 3.0에서 항체를 용리한 후 1M Tris 완충액을 이용하여 샘플을 즉각적으로 중화하였다. 용리한 항체 분획은 Pierce Dextran Desalting Column (5K MWC0)를 이용하여PBS (pH7.4)로 완충액을 교환한 후, MILLIPORE Amicon Ultra (10 MWC0) 원심분리 농축기를 사용하여 농축하고, 정제된 Fc-TPP는 280nm 파장에서 흡광도와 흡광계수를 이용하여 정량하였다. 정제된 Fc-TPP는 환원성 및 비환원성 조건으로 SDS-PAGE 상에서 분석하였다.

[0124] 도 5의 (A)는 TPP가 융합된 항체 중쇄불변영역을 도식화한 것이다. 항체 중쇄불변영역은 N-말단에 경첩 (hinge)부터 시작하여 2개의 이황화 결합을 유지하게 하여 이량체를 형성하기 용이하게 제작하였다. CH3 말단에 GAGA 혹은 (GGGS)3의 링커 펩티드를 이용하여 TPP의 외부 노출 정도를 조절하였고, 이후 22개의 세마포린 유래서열을 추가하여 제작하였다.

[0125] 도 5의 (B)는 정제된 Fc-TPP의 환원성 및 비환원성 조건에서 SDS-PAGE 상을 분석한 결과이다. 도 5의 (B)에서는 SDS-PAGE상에서 각 클론들의 이량체 형성과 순도를 확인할 수 있다.

[0126] 하기 표 5는 정제된 TPP융합 단백질의 배양 1 L당 생산되는 단백질의 수율을 나타낸다. 3회 수행하여 얻는 결과를 통계처리 하였으며, ±는 표준편차 값을 나타낸다. 얻어진 단백질의 수율은 야생형 단백질과 큰 차이가 없었다.

표 5

클론의 명칭	수율 (mg/l)	클론의 명칭	수율 (mg/l)
Fc	34.2±4.8	Fc-4F22	34.8±2.1
Fc-4A22	24.3±4.7	Fc-15F22	35.3±9.8
Fc-15A22	45.0±8.3	Fc-15F22p	35.7±5.8
Fc-15A22p	42.1±8.6		

[0128] Fc-TPP 발현 정제수율 비교

[0129] 실시예 4: Fc-TPP의 뉴로필린 1 및 2의 b1b2 도메인 (Neuropilin1/2-b1b1 domain)에 대한 결합능의 확인

[0130] 정제된 Fc-TPP의 뉴로필린1 및 2의 b1b2 도메인 (Neuropilin (NRP) 1/2-b1b1 domain)에 대한 결합능을 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)에서 확인하였다.

[0131] 대조군으로 VEGF165A, 세마포린 3A (26-760), 세마포린 3F (19-779) 및 Fc와 각각의 Fc-TPP를 NHS-비오틴 키트 (SIGMA-ALDRICH co., USA)를 이용하여 비오틴화 (biotinylation)시켰다.

[0132] 표적분자 뉴로필린 1의 b1b2 도메인 (273-586) 및 뉴로필린 2의 b1b2 도메인 (275-595)와 대조군인 VEGFR2 (46-753)을 96 well EIA/RIA 플레이트 (COSTAR Corning In., USA)에 1µg씩 1시간 동안 상온에서 결합시킨 후

0.1 % PBST (0.1 % Tween20, pH 7.4, 137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, SIGMA-ALDRICH co., USA)로 10분 간 3회 씻어내었다. 5 % 스킵 밀크 (skim milk) (5 % Skim milk, pH 7.4, 137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, SIGMA-ALDRICH co., USA)로 1시간 동안 결합한 후 0.1 % PBST (0.1 % Tween20, pH 7.4, 137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, SIGMA-ALDRICH co., USA)로 10분간 3회 씻어내었다. 대조군으로 비오틴화된 VEGF165A, 세마포린3A, 세마포린3F 및 Fc, 실험군으로 각각의 Fc-TPP, TPP 펩타이드를 100nM (혹은 펩타이드 1 μM의 농도로 결합시킨 후 0.1 % PBST로 10분 간 3회 씻어내었다. AP가 접합된 항 바이오틴 항체 (alkaline phosphatase-conjugated anti-biotin mAb, Sigma, USA) 결합시킨 후 pNPP (pnitrophenyl palmitate, SIGMA-ALDRICH co., USA)로 반응시켜 405 nm 흡광도를 정량하였다. AP-pNPP를 30분간 반응시켜 얻은 ELISA 결과를 통해 발현 정제한 Fc-TPP의 뉴로필린1 및 2의 b1b2 도메인에 대한 결합능을 확인하였다.

[0133] 도 6은 NRP-1 및 2의 b1b2 도메인에 대한 결합 여부를 확인하기 위한 ELISA 실험 결과이다. (A)는 대조군 및 세마포린 3A 유래 펩타이드 및 Fc-TPP를, (B)는 대조군 및 세마포린 3F 유래 펩타이드 및 Fc-TPP를 비교하여 나타낸다. 비교적 돌연변이가 유도된 A22p, F22p 펩타이드, Fc-A22p/F22p 클론들에서 강한 결합이 나타났고, 연결자가 GAGA, (G4S)3인 클론들 중에서 (G4S)3 연결자를 사용한 클론들에서 미약하게 더 높은 결합이 나타났다.

[0134] **실시예 5: Fc-TPP의 뉴로필린 1 및 2의 b1b2 도메인에 대한 결합특이성의 확인**

[0135] Fc-TPP의 뉴로필린 1 및 2 b1b2 도메인에 대한 결합특이성을 확인하기 위하여 대조군인 혈관내피세포 성장인자 (VEGF165A) 및 세마포린 3A와의 결합 경쟁 ELISA를 수행하였다.

[0136] 구체적으로는, 뉴로필린1의 b1b2 도메인 (273-586), 뉴로필린2의 b1b2 도메인 (275-595)를 96 웰 EIA/RIA 플레이트 (COSTAR Corning In., USA)에 1시간 동안 상온에서 결합시킨 후 0.1 % PBST (0.1 % Tween20, pH 7.4, 137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, SIGMA-ALDRICH co., USA)로 10분 간 3회 씻어내었다. 5% Skim milk (5 % Skim milk, pH 7.4, 137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, SIGMA-ALDRICH co., USA)로 1시간 동안 결합한 후 0.1 % PBST (0.1 % Tween20, pH 7.4, 137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, SIGMA-ALDRICH co., USA)로 10분간 3회 씻어내었다. 높은 결합력을 보인 Fc-15A22p (30nM), Fc-15F22p (30nM)와 혈관내피세포 성장인자 (VEGF165A) (25nM 에서 0.02nM), 세마포린 3A (3.3 μM에서 0.2nM)를 농도별로 섞은 혼합물을 생성하여 뉴로필린1 및 2-b1b2 도메인에 결합시켰다. AP가 접합된 항 인간 항체 (alkaline phosphatase-conjugated anti-human mAb, Sigma, USA)로 결합시킨 후 pNPP (pnitrophenyl palmitate, SIGMA-ALDRICH co., USA)로 반응시켜 405 nm 흡광도를 정량하였다. ELISA 결과를 통해 혈관내피세포 성장인자 (VEGF165A), 세마포린 3A과 Fc-TPP가 뉴로필린 1 및 2 b1b2 도메인에 대한 결합을 경쟁하는 것으로 확인하였다.

[0137] 도 7은 Fc-TPP 중 뉴로필린에 대한 결합력이 강하게 나타난 클론들에 대하여, VEGF165A 및 세마포린 3A와 뉴로필린에 경쟁하여 결합하는지 확인한 결과이다. 도 7에서 나타난 바와 같이 Fc-15A22p가 Fc-15F22p보다 더 높은 리간드의 농도에서 경쟁하는 것을 확인하였다.

[0138] **실시예 6: Fc-TPP의 뉴로필린 1 및 2의 b1b2 도메인에 대한 결합력 확인**

[0139] Fc-TPP의 뉴로필린 1 및 2 b1b2 도메인에 대한 결합력을 더 자세히 확인하기 위하여 SPR (Surface plasmon resonance)을 수행하였다. Biacore2000 기기 (GE healthcare)를 이용하였으며, ELISA상에서 결합능이 확인된 VEGF165, 세마포린 3F, 세마포린 3A, Fc-4A22, Fc-4F22, Fc-15A22, Fc-15F22, Fc-15A22p 및 Fc-15F22p의 뉴로필린 1 및 2 b1b2 도메인에 대한 결합력을 분석하였다.

[0140] 구체적으로는, 뉴로필린 1 및 2 b1b2 도메인 각각을 10 mM Na-아세테이트 완충액 (pH 4.0)에 희석하여 CM5 센서 칩 (GE healthcare, USA)에 약 1000 reponse units (RU) 고정화하였다. HBS-EP 완충액[10 mM HEPES, 3 mM ethylenediaminetetraacetic acid, and 0.005% surfactant P20 (pH 7.4), GE Healthcare]을 30 μl/min 유속으로 분석하였으며, VEGF165를 80nM 에서 5nM, 세마포린 3F 및 세마포린 3A를 1 μM에서 62.5nM, Fc-TPP를 25 μM 에서 1.5625 μM의 농도로 분석하였다. 결합, 해리 분석후 CM5칩의 재생 (regeneration)은 완충액 (20mM NaOH, 1M NaCl, pH10.0)을 30 μl/min 유속으로 1분간 흘려주어 시행되었다. 결합 3분, 해리 3분으로 얻어진 각 센서그램 (sensorgram)은 공백 칸 (Blank cell)과 비교하여 정상화 (normalization) 및 절감 (Subtraction)하여 친화도를 계산하였다.

[0141] 표 6은 SPR (Surface plasmon resonance, BIACORE 2000, GE healthcare, USA)를 이용한, Sema3A 유래 A22 펩

타이드 및 단일돌연변이 A22p의 Fc-TPP의 형태에서의 뉴로필린 1, 2 (NRP1 및 2)의 b1b2 도메인에 대한 친화도 분석 결과를 나타낸다. 표 7은 Sema3F 유래 F22 펩타이드 및 단일돌연변이 F22p의 Fc-TPP의 형태에서의 뉴로필린 1, 2 (NRP1 및 2)의 b1b2 도메인에 대한 친화도 분석 결과를 나타낸다.

[0142]

표 6, 7 에서 나타나 바와 같이 연결자가 GAGA인 클론들과 (GGGS)3인 클론간에 친화도 차이는 Fc-4A22와 Fc-15A22를 비교하였을 때, 10배 가량 친화도 차이가 나타났다. Pro 돌연변이 클론들의 친화도는 야생형 뉴로필린 결합 펩타이드를 융합한 것보다 약 100배 높은 친화도를 지님을 보여주었다. 분석 시 적어도 5개의 센서그램을 이용하여 분석하였으며, 2회 수행하여 얻은 결과를 통계처리 하였다. ±는 독립적인 실험의 결과의 표준편차 값을 나타내었다.

표 6

[0143]

클론	수용체 (Receptors)	결합도 (Association rate) ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	해리도 (Dissociation rate) kd (s <sup>-1</sup> )	친화도 (Binding affinity) K <sub>D</sub> (M)
VEGF165	NRP1-b1b2	9.75 ± 0.53 × 10 <sup>5</sup>	3.42 ± 0.29 × 10 <sup>-3</sup>	3.51 ± 0.36 × 10 <sup>-9</sup>
	NRP2-b1b2	1.17 ± 0.12 × 10 <sup>5</sup>	3.73 ± 0.19 × 10 <sup>-3</sup>	3.20 ± 0.14 × 10 <sup>-8</sup>
Sema3A	NRP1-b1b2	2.89 ± 0.07 × 10 <sup>4</sup>	8.08 ± 0.06 × 10 <sup>-4</sup>	2.79 ± 0.14 × 10 <sup>-8</sup>
	NRP2-b1b2	6.96 ± 0.03 × 10 <sup>3</sup>	1.61 ± 0.28 × 10 <sup>-3</sup>	2.31 ± 0.22 × 10 <sup>-7</sup>
Fc-4A22	NRP1-b1b2	1.02 ± 0.14 × 10 <sup>3</sup>	1.93 ± 0.05 × 10 <sup>-2</sup>	1.80 ± 0.14 × 10 <sup>-5</sup>
	NRP2-b1b2	6.09 ± 0.63 × 10 <sup>3</sup>	1.23 ± 0.16 × 10 <sup>-1</sup>	2.02 ± 1.41 × 10 <sup>-5</sup>
Fc-15A22	NRP1-b1b2	4.86 ± 0.98 × 10 <sup>3</sup>	2.95 ± 0.04 × 10 <sup>-2</sup>	6.06 ± 0.42 × 10 <sup>-6</sup>
	NRP2-b1b2	3.94 ± 0.42 × 10 <sup>3</sup>	3.87 ± 0.09 × 10 <sup>-2</sup>	9.8 ± 0.14 × 10 <sup>-6</sup>
Fc-15A22p	NRP1-b1b2	9.15 ± 0.06 × 10 <sup>3</sup>	5.77 ± 0.16 × 10 <sup>-4</sup>	6.3 ± 0.21 × 10 <sup>-8</sup>
	NRP2-b1b2	6.06 ± 0.04 × 10 <sup>3</sup>	3.76 ± 0.17 × 10 <sup>-4</sup>	6.2 ± 0.14 × 10 <sup>-8</sup>

표 7

[0144]

클론	수용체 (Receptors)	결합도 (Association rate) ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	해리도 (Dissociation rate) kd (s <sup>-1</sup> )	친화도 (Binding affinity) K <sub>D</sub> (M)
VEGF165	NRP1-b1b2	9.75 ± 0.53 × 10 <sup>5</sup>	3.42 ± 0.29 × 10 <sup>-3</sup>	3.51 ± 0.36 × 10 <sup>-9</sup>
	NRP2-b1b2	1.17 ± 0.12 × 10 <sup>5</sup>	3.73 ± 0.19 × 10 <sup>-3</sup>	3.20 ± 0.14 × 10 <sup>-8</sup>
Sema3F	NRP1-b1b2	3.98 ± 0.69 × 10 <sup>3</sup>	9.73 ± 0.19 × 10 <sup>-4</sup>	2.45 ± 0.14 × 10 <sup>-7</sup>
	NRP2-b1b2	4.34 ± 0.24 × 10 <sup>3</sup>	1.50 ± 0.35 × 10 <sup>-3</sup>	3.45 ± 0.32 × 10 <sup>-7</sup>
Fc-4F22	NRP1-b1b2	2.18 ± 0.12 × 10 <sup>2</sup>	2.25 ± 0.18 × 10 <sup>-3</sup>	1.03 ± 0.04 × 10 <sup>-5</sup>
	NRP2-b1b2	1.21 ± 0.15 × 10 <sup>2</sup>	1.57 ± 0.40 × 10 <sup>-3</sup>	1.30 ± 0.21 × 10 <sup>-5</sup>
Fc-15F22	NRP1-b1b2	1.35 ± 0.24 × 10 <sup>3</sup>	5.34 ± 0.24 × 10 <sup>-2</sup>	3.97 ± 0.31 × 10 <sup>-5</sup>
	NRP2-b1b2	1.05 ± 0.03 × 10 <sup>3</sup>	1.30 ± 0.21 × 10 <sup>-2</sup>	1.24 ± 0.18 × 10 <sup>-5</sup>
Fc-15F22p	NRP1-b1b2	1.73 ± 0.26 × 10 <sup>4</sup>	1.38 ± 0.12 × 10 <sup>-3</sup>	7.97 ± 0.51 × 10 <sup>-8</sup>
	NRP2-b1b2	1.34 ± 0.24 × 10 <sup>4</sup>	1.23 ± 0.16 × 10 <sup>-3</sup>	9.24 ± 0.17 × 10 <sup>-8</sup>

**[0145] 실시예 7: Fc-TPP의 세포 표면에 발현된 뉴로필린 1 및 2과의 특이적 결합 확인**

**[0146]** 우선적으로, 이 실험에서 TPP의 생물학적 동정을 위해 사용된 세포주 표면의 뉴로필린 1 및 2의 발현 정도를 확인하기 위하여, FACS 분석을 수행하였다.

**[0147]** 도 8은 세포주에 뉴로필린 1 및 2가 발현됨을 나타낸 도면이다. 나타난 바와 같이, PPC-1 (인간 대장암 세포주), FaDu (인간 두경부암 세포주), HUVEC (인간 혈관내피 세포주), SK-OV-3 (인간 난소암 세포주)에서 실험을 수행한 결과, 각 세포주에 뉴로필린 1과 뉴로필린 2가 발현된 것을 확인하였다.

**[0148]** Fc-TPP가 세포 표면에 발현된 뉴로필린 1 및 2와도 결합하는지 확인하기 위해 FACS 분석을 수행하였으며, 뉴로필린1 및 2에 특이적으로 결합하는 것으로 확인된 Fc-15A22P와 Fc-15F22P를 사용하였다.

**[0149]** 구체적으로, 인간 난소암 세포주 (SK-OV-3)를 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C 조건에서 배양 후, 각 샘플당 1x10<sup>5</sup>개의 세포를 2 % BSA가 첨가된 PBS 완충액에 재현탁하여 FACS tube에 옮겨 실험을 수행하였다. 완충액에 Fc, Fc-15A22P, Fc-15F22P를 각각 1 μM로 희석하여 4 °C에서 1시간동안 반응시킨 후, Fc를 인지하는 FITC 결합된 항체 (Sigma)를 이용하여 세포에 결합된 단백질을 염색하여 FACS Calibur (BD Bioscience) 로 분석하였다.

**[0150]** 도 9는 Fc-TPP이 세포 표면에 발현된 뉴로필린 1 및 2에 결합하는 지 확인하기 위해, 인간 전립선암 세포주 (PPC-1)에서 FACS 분석한 결과이다. 도 9의 (A) 에 나타난 바와 같이, Fc-15A22P, Fc-15F22P의 경우, Fc와는 달리 PPC-1 세포 표면에 결합하는 것을 확인하였다.

**[0151]** 또한, 이와 같은 결합능이 뉴로필린1 및 2에 특이적임을 확인하기 위하여, 상기 실험에서 사용했던 뉴로필린1 및 2의 b1b2 도메인 2μM을 Fc, Fc-15A22P, Fc-15F22P 1 μM에 각각 혼합하여 상온에서 20분 동안 반응시킨 후, 마찬가지로 방법으로 SK-OV-3 세포주에 4°C에서 1시간 동안 반응시켜 단백질을 염색한 후, FACS 분석을 하였다. 도 9의 (B)에서 나타난 바와 같이, 뉴로필린1 및 2-b1b2 도메인에 Fc-15A22P, Fc-15F22P를 미리 반응 시킨 샘플에서 Fc-TPP의 결합능이 현저히 감소됨을 확인하였다. 이는 Fc-TPP가 뉴로필린 1 및 2에 특이적으로 결합함을 의미한다.

**[0152]** 추가적으로, Fc-TPP가 뉴로필린 1 및 2에 결합하는 부위를 확인 하기 위해, Fc-15A22P와 Fc-15F22P를 각각 VEGF165A (1 μg/ml)와 혼합하여, 위와 같은 방법으로 결합능을 확인하였다 도 9의 (C)에서 나타난 바와 같이, VEGF165A에 의해 결합능이 감소된 것을 확인하였고, 이는 VEGF165A와 경쟁적 결합함을 의미한다.

**[0153]** 또한 Fc-15A22P, Fc-15F22P가 유래된 리간드인 세마포린 3A, 세마포린 3F (100 μg/ml)를 각각 혼합하여 반응시킨 후, 결합능을 확인하였다 도 9의 (D)에서 나타난 바와 같이, Fc-15A22P 및 Fc-15F22P 각각은 세마포린 3A 및 3F에 의해 결합능이 감소된 것을 확인 하였고, 이는 Fc-TPP와 뉴로필린 1 및 2와의 결합이 본래의 리간드와 유사하게 특이적임을 의미한다.

**[0154] 실시예 8: Fc-TPP의 뉴로필린 1 및 2를 통한 세포내로의 특이적 유입능 확인**

**[0155]** 다른 뉴로필린 리간드들의 세포 유입능과 같이, Fc-TPP도 뉴로필린 1 또는 뉴로필린 2에 의해 세포내 유입능을 가지고 있는지 확인하기 위하여, 세포내 유입 여부 및 뉴로필린1 및 2와의 중첩 (co-localization) 여부를 공초점 현미경 (confocal microscopy)으로 관찰하였다.

**[0156]** 구체적으로는, 24 웰 플레이트에 각 웰 당 5x10<sup>4</sup>개의 PPC-1 세포를 10 % FBS가 포함된 DMEM 배지 0.5 ml로 넣어 24시간 동안 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C 조건에서 배양하였다. 세포가 안정화 되면, 각 웰을 PBS 0.5 ml를 이용하여 세척하였고, TOM (Transfection optimized medium, WelGENE Inc, Korea) 배지 0.5 ml에 Fc 및 Fc-15A22P, Fc-15F22P를 1 μM로 희석하여 1시간 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 그 후, 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, Fc-TPP의 경우, FITC (녹색형광)가 결합되어있는 Fc를 특이적으로 인지하는 항체 (Sigma)로 염색하였고, 뉴로필린 1과 2는 각각을 인지하는 1차 항체 (SantaCruz)와 TRITC (적색형광)가 결합되어 있는 2차 항체 (Sigma)를 이용하여 염색하였다. DAPI를 이용하여 핵을 염색 (청색형광)하여 공초점 현미경으로 분석하였다.

**[0157]** 도 10은 Fc-TPP의 뉴로필린 1 및 2를 통한 세포내로의 특이적인 유입능을 확인하기 위해, 공초점 현미경 분석을 통해 Fc-TPP와 뉴로필린1 및 2와의 중첩 (co-localization)을 관찰한 결과이다. 도 10에서 나타난 바와 같이,

대조군인 Fc의 경우, 세포내 유입이 되지 않은 반면, Fc-15A22P와 Fc-15F22P는 세포내로 유입되는 것을 확인하였고, 이는 뉴로필린 1 및 2와 각각 중첩 (co-localization)됨을 확인하였다. 이는, Fc-TPP가 뉴로필린 1 및 2에 의한 특이적인 유입능을 가짐을 의미한다.

[0158] **실시예 9: Fc-TPP의 세포투과능 향상 확인**

[0159] (1) Fc-TPP의 HUVEC에서의 생물학적 기작을 알아보기 위한 웨스턴 블롯

[0160] 세마포린 3A 또는 VEGF165A는 뉴로필린 1 (NRP1)을 공-수용체 (co-receptor)로 이용하여 혈관 투과능 (vascular permeability)을 향상시킨다고 알려져 있다. 이러한 과정에서 내피세포의 VE (vascular endothelial)-카데린 (cadherin)의 감소, 인산화 등의 변화가 일어나게 된다. 즉, VE-카데린 또는 E (Epithelial)-카데린은 내피세포와 상피세포 사이의 adherent junction의 기초를 형성하며 내피세포간의 접촉에 관여하게 되는데, 이 분자들의 변화는 adherent junction의 조밀함을 완화시켜 혈관의 투과성을 높이고 세포내 투과능을 향상시킨다.

[0161] 이를 바탕으로 혈관 투과성의 증진을 간접적으로 확인할 수 있는 실험 방법으로, 웨스턴 블롯을 통한 VE-카데린의 변화를 확인하였다. 구체적으로는, 6 웰 플레이트에 HUVEC 세포를 웰 당  $3 \times 10^5$ 개의 세포를 시딩 (seeding)한 후, 24시간 배양한 후, 단일 펩타이드 및 Fc-TPP를 1  $\mu$ M로 10분간 처리하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. SDS-PAGE를 수행한 겔을 PVDF 막 (membrane)에 옮기고 각각 VE-카데린과  $\beta$ -actin을 인지하는 1차 항체 (SantaCruz)와 HRP가 결합된 2차 항체 (SantaCruz)를 이용하여 검출하였으며, 분석은 ImageQuant LAS4000 mini (GE Healthcare)를 이용하였다.

[0162] 도 11a는 Fc-TPP의 HUVEC에서의 생물학적 기작을 알아보기 위한 웨스턴 블롯 결과이다. 도 11a에 나타난 바와 같이, 세마포린 3A 유래 단백질의 경우, 대조군인 VEGF165A와 세마포린 3A를 처리했을 때, VE-카데린의 감소가 관찰되었고, 단일 펩타이드인 A22 및 A22P에서는 VE-카데린의 변화가 관찰되지 않았다. 또한 Fc 및 Fc-4A22의 경우, VE-카데린이 감소하지 않았으며, Fc-15A22, Fc-15A22P의 경우, VE-카데린이 감소된 것을 확인하였다 (좌측 패널). 세마포린 3F 유래 TPP의 경우, 대조군인 VEGF165A와 Fc-15F22P만이 VE-카데린의 감소를 유도하였다 (우측 패널).

[0163] (2) Fc-TPP의 혈관 내피세포 투과능을 확인하기 위한 트랜스웰 어세이 (Transwell assay)

[0164] 상기 실험 결과를 토대로, 혈관 내피세포의 투과능의 향상 여부를 확인하기 위한 실험으로 단일 펩타이드 및 Fc-TPP를 처리하여 트랜스웰 어세이 (Transwell assay)를 수행하였다.

[0165] 구체적으로는, 혈관 내피세포 (HUVEC)를 Transwell plate (Corning)에 웰 당  $5 \times 10^4$ 개의 세포를 EGM (Endothelial Growth Medium, PromoCell) 배지를 이용하여 상위 챔버 (upper chamber)에 시딩 (seeding) 해 준 후, 3일 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 그 후, EBM (Endothelial Basal Medium, PromoCell) 배지로 바꿔 준 후, 대조군으로 VEGF165A, 세마포린 3A 및 세마포린 3F를 약 1.3 nM로, 단일 펩타이드 및 Fc-TPP는 1  $\mu$ M로 30 분 동안 처리하였다. 그 후, Dextran-FITC (Sigma) 50  $\mu$ g을 상위 챔버 (upper chamber)에 넣어, 혈관 내피세포의 투과성이 향상되었을 경우, 하위 챔버 (lower chamber)에서 형광 물질이 관찰되는 원리를 이용하여, 30분 후, 하위 챔버의 배지를 샘플링 하여 형광을 측정하였다.

[0166] 도 11b는 TPP가 혈관 내피세포 (HUVEC)의 투과능을 향상시키는지 확인하기 위하여, Transwell assay를 수행한 결과이다. 도 11b에 나타난 바와 같이, VEGF165A와 세마포린 3A의 경우 혈관 내피세포 투과능이 향상된 것을 확인하였고, 단일 펩타이드인 A22와 A22P, Fc 부분과 TPP의 링커 길이가 짧은 Fc-4A22의 경우, 혈관 투과능의 향상을 유도하지 않았다. 반면에, 융합 형태인 Fc-15A22, Fc-15A22P의 경우, 혈관 내피세포의 투과능이 향상되었음을 확인하였다. 세마포린 3F 유래 TPP의 경우, 세마포린 3F 자체로는 혈관 내피세포 투과능을 향상시키지 못하였으나, Fc-15F22P의 경우 혈관 투과능의 향상을 유도하였다. 또한 단일 펩타이드인 F22와 F22P, 융합 형태이지만 결합능이 낮은 Fc-4F22, Fc-15F22의 경우에는 혈관 내피세포 투과능을 향상시키지 않았다.

[0167] (3) 마우스 모델에서 Fc-TPP의 투과능 향상을 확인하기 위한 면역조직화학 (Immunohistochemistry, IHC) 실험

- [0168] 상기 실시예 9의 (1) 내지 (2)에서는 *in vitro* 상에서 Fc-TPP가 혈관 내피세포의 투과능을 향상시킴을 확인하였다. 따라서 마우스 모델에서 Fc-TPP의 투과능 향상을 확인 하기 위해 IHC (Immunohistochemistry) 실험을 수행하였다.
- [0169] 종양 조직 내의 Fc-TPP의 투과능 향상을 확인하기 위한 실험으로, Balb/c 누드 마우스에 A431 cell을 마우스 당  $5 \times 10^6$  개의 세포를 피하주사로 주입시켰고, 약 9일 후 종양의 부피가 약  $300-400 \text{ mm}^3$  정도가 되었을 때, 각각 PBS, Fc, Fc-15A22P 및 펩타이드인 A22P를 5 mg/kg으로 정맥 주사하였다. 주사 후, 각각 3시간 후 마우스로부터 종양을 적출 하여, 면역조직화학 (immunohistochemistry) 실험을 수행하였다. 적출한 종양은 동결절편 (frozen section) 방법으로 20  $\mu\text{m}$ 의 두께로 잘라, 1차 항체인 CD31항체 (BD Pharmingen)와 이를 인지하는 TRITC (적색형광)이 결합된 2차 항체로 혈관을 염색하였고, 조직 내에 분포되어 있는 Fc-TPP를 관찰하기 위해, Fc를 인지하는 FITC (녹색형광)이 결합된 항체를 사용하였다.
- [0170] 도 11c는 실제 종양 조직 내의 TPP의 침투능을 확인하기 위한 면역조직화학 결과이다. 도 11c에 나타난 바와 같이, 단일 펩타이드인 A22와 A22P의 경우, 조직 내로 침투되지 않은 반면, 융합 형태인 Fc-15A22와 Fc-15A22P의 경우, 대조군인 Fc와는 달리 종양 조직 선택적으로 도달하며, 종양 조직 내로 침투 되었음을 확인하였다. 또한, Fc-15A22보다 뉴로필린 1 및 2에 대한 결합능이 높은 Fc-15A22P가 더 효과적으로 조직 내로 침투됨을 확인하였다.
- [0171] (4) 혈관 투과능 확인을 위한 인 비보 에반스 블루 어세이 (Evans Blue assay)
- [0172] 추가적으로, 혈관 투과능의 향상을 *in vivo*에서도 확인하기 위하여, 에반스 블루 어세이 (Evans Blue assay)를 수행하였다. 실험 방법으로는 Balb/c 누드 마우스 (나라바이오, 4주령, female)에 FaDu cell을 마우스 당  $5 \times 10^6$  개의 세포를 피하주사로 주입시켰고, 약 10여일 후 종양의 부피가 약  $500 \text{ mm}^3$  정도가 되었을 때, 1 mg의 Evans Blue (Sigma)와 각각 PBS, Fc, Fc-15A22P를 7.5 mg/kg으로 정맥 주사하였다. 대조군으로는 VEGF165A (400 ng), Semaphorin 3A (400 ng)을 동일 조건으로 주사하였다. 40분 후, 마우스의 심장을 통해 1% BSA를 녹인 PBS로 관류시키고, 종양 조직을 적출하였다 (도 11d). 그리고 1 ml의 2,2 N-methylaformamide (Sigma)에 넣고 37°C에서 밤새, 가벼운 교반 (mild shaking) 조건에서 반응 시켰다. 그 후, 원심분리를 통해 상등액을 얻어 흡광도 (600 nm)를 측정하여, Evans Blue가 투과된 양을 정량화 하였다.
- [0173] 도 11d는 혈관 투과능의 향상을 Evans Blue assay를 통해 확인한 결과이다. 좌측 패널은 적출한 암세포의 사진이고, 우측 패널은 이를 정량화 하기 위해 흡광도 (600nm)를 측정한 결과이다. 도 11d에 나타난 바와 같이, VEGF165A와 세마포린 3A은 공지된 바와 같이 혈관투과능이 증가되었고, Fc와는 달리 Fc-15A22P도 혈관 투과능이 증가한 것을 확인하였다.
- [0174] (5) TPP의 암세포에서의 효과 확인
- [0175] TPP의 효과를 암세포에서도 확인하기 위하여, 인간 두경부암 세포주인 FaDu에서 상기 실험과 같은 조건으로 E-카데린의 변화를 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다
- [0176] 도 11e는 인간 두경부암 세포주인 FaDu에서 E-카데린의 변화를 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다. 도 11e에서 나타난 바와 같이, 세마포린 3A 유래 TPP의 경우, 세마포린 3A는 E-카데린의 변화를 유도하지 않았으나, Fc-15A22와 Fc-15A22P가 E-카데린의 감소를 유도하였다. 또한, 세마포린 3F의 경우, E-카데린의 감소를 유도하였고, Fc-15F22P를 처리하였을 때, E-카데린이 감소하였다.
- [0177] 상기 실험 결과를 종합해 봤을 때, 세마포린 3A와 3F에서 각각 펩타이드를 유래하여 Fc-TPP를 구축하였으나, 본래 단백질의 성질인 뉴로필린 1이나 뉴로필린 2에 대한 특이성, VE-카데린이나 E-카데린의 감소 등의 신호 전달의 경향성은 본래의 단백질과 유래 펩타이드 간에 항상 같은 결과를 유도하지는 않았다. 또한, 뉴로필린 1 및 2에 결합능을 가지는 펩타이드가 단일 형태로는 TPP에 의한 신호전달을 유도하지 못했으나, 융합된 형태인 Fc-TPP로 처리하였을 때는 신호전달을 효과적으로 유도함을 확인하였으며, 이는 뉴로필린1 및 2에 의한 신호전달은 Fc-TPP의 융합 형태일 때 효과적으로 전달됨을 의미한다. 그리고 Fc-4A/F22는 신호전달을 유도하지 못한 반면, Fc-15A/F22, Fc-15A/F22P의 경우 신호 전달을 유도하였다. 이는, 단일 형태의 펩타이드보다는 융합 형태인 Fc-

TPP가 뉴로필린1 및 2에 의한 신호 전달을 효과적으로 유도하고, Fc-TPP 중에서도 링커의 길이에 따라 그 효과에 차이가 나타남을 의미한다.

[0178] **실시예 10: Fc-TPP의 신생혈관형성 억제능 확인**

[0179] (1) Fc-15A22P의 HUVEC에서의 튜브 형성 억제능 확인 위한 튜브 형성 어세이 (tube formation assay)

[0180] VEGF165A는 뉴로필린1을 공-수용체로 이용하여 신생 혈관을 형성 (angiogenesis) 시킨다고 알려져 있다. 이를 바탕으로 신생 혈관 형성을 in vitro에서 확인할 수 있는 실험 방법으로, 튜브 형성 어세이를 수행하였다. 실험 방법으로는 50  $\mu$ l의 ECMatrix를 96 웰 플레이트에 주입하고 37  $^{\circ}$ C에서 2시간 폴리머화하였다. 2시간 후에, HUVEC 세포를 EBM (Endothelial basal medium, PromoCell) 배지를 이용하여 현탁시키고 VEGF165A (20 ng/ml), Fc, Fc-15A22P (1  $\mu$ M)와 섞어서 ECMatrix 상에 웰 당  $1 \times 10^4$  개씩 플레이팅하고 8시간 배양하였다. 배양된 세포를 현미경으로 관찰하여 이미지를 얻었다.

[0181] 도 12a는 튜브 형성 억제능을 튜브 형성 어세이를 통해 확인한 결과이다. 도 12a에 나타난 바와 같이, VEGF165A는 공지된 바와 같이 튜브 형성이 증가되었고, Fc와는 달리 Fc-15A22P는 튜브 형성을 억제한 것을 확인하였다.

[0182] (2) Fc-15A22P의 신생혈관형성 억제능을 확인하기 위한 인 비보 매트릭셀 플러그 어세이 (in vivo matrigel plug assay)

[0183] 추가적으로, 신생혈관형성 억제능을 in vivo에서도 확인하기 위하여, 매트릭셀 플러그 어세이를 수행하였다. 실험 방법은 6-8주령의 balb/c 누드 마우스의 피하에 마우스 당 A431 cell  $7.5 \times 10^6$  개의 세포와 80  $\mu$ g의 Fc 또는 Fc-15A22P, 그리고 0.4 ml의 매트릭셀 (Matrigel, BD Biosciences)을 주입한 후 9일 후에 매트릭셀 플러그를 적출하여 다음 이미지를 촬영한 후 (도 12b), 동결절편 방법으로 20  $\mu$ m의 두께로 잘라, 면역조직화학 (Immunohistochemistry) 실험을 수행하였다. 1차 항체인 CD31 항체와 이를 인지하는 TRITC (적색형광)이 결합된 2차 항체로 혈관을 염색하여 혈관의 밀도를 측정하였다. 도 12b는 Fc-15A22P가 마우스 생체 내에서 VEGF165A에 의해 유도되는 혈관의 형성을 억제할 수 있음을 확인한 결과이다.

[0184] **실시예 11: mAb-TPP의 생산 및 항원 결합능 확인**

[0185] (1) mAb-TPP 생산을 위한 벡터 및 발현, 정제

[0186] 상기 실시예 9에서 in vitro 및 in vivo 상으로 Fc-TPP가 혈관 내피세포의 투과능을 향상시킴을 확인하였다. 따라서, 마우스 모델에서 TPP의 효과를 검증하기 위한 포맷으로 항체의 Fc 말단에 TPP를 융합하였다.

[0187] 도 13의 (A)에서는 단일클론항체의 중쇄불변영역 C-말단에 뉴로필린과 결합하는 펩타이드가 펩타이드 링커로 연결된 융합항체 (mAb-TPP) 모식도를 나타내었다. (B)는 상기 (A)의 융합항체가 뉴로필린 막단백질의 b1 도메인에 결합하는 모식도를 나타내었다 또한, (C)에서는 상기 융합항체 (mAb-TPP)를 생체내에 투입하였을 때 예상되는 기작을 나타내었다. 펩타이드가 융합된 항체가 중앙혈관내피 및 다양한 종양세포에 과발현된 뉴로필린 막단백질에 결합하여 ①종양조직 선택적 분포가 증가하고, ②종양혈관 밖 유출 (extravasation)이 증가하고, ③ 종양조직 내부로의 침투가 증가되는 신호전달을 유도하여 융합항체의 종양조직 특이 분포 및 종양조직 내부로의 침투를 현저히 증가시킬 수 있다.

[0188] 마우스 모델에서 TPP의 효과를 검증하기 위한 포맷으로서 TPP가 융합된 Cetuximab 및 Trastuzumab를 제조하였다. 기존의 항-EGFR 항체인 Cetuximab IgG 및 Trastuzumab IgG의 Fc의 c-말단에 TPP를 융합하였다. 도 14 및 도 15는 각각 IgG 중쇄 -TPP와 IgG 경쇄를 숙주세포에서 발현시키기 위한 예시적 벡터의 개열지도이다.

[0189] 도 16 및 17의 (A)는 이 TPP 융합된 항체의 모식도는 나타낸다. 발현 및 정제는 상기 실시예 4에서 수행한 방법으로 HEK293F에서 수행하였고, SDS-PAGE를 통해 순도를 확인하였다. 도 16 및 17의 (B)는 HEK293F세포에 공동형질 전환을 통해 일시적으로 발현 및 정제한 다음, 환원성 및 비환원성 조건의 SDS-PAGE 상에서 크기 및 순도를 분석한 결과이다.

[0190] 하기 표 8는 정제된 TPP융합 단백질의 배양 1 L당 생산되는 단백질의 수율을 나타낸다. 3회 수행하여 얻는 결과

를 통계처리 하였으며, ±는 표준편차 값을 나타낸다. 얻어진 단백질의 수율 (Cetuximab-15A22p 및 Trastuzumab-15A22p) 은 각각의 야생형 단백질 (Cetuximab 및 Trastuzumab)의 수율과 비교하여 큰 차이가 없었다.

표 8

[0191]

클론	수율 (mg/L culture)
Cetuximab	39.9±6.2
Cetuximab-15A22p	37.4±4.7
Trastuzumab	113.6±9.2
Trastuzumab-15A22p	105.8±8.9

[0192]

TPP융합 Cetuximab, Trastuzumab 정제수율 비교

[0193]

(2) mAb-TPP의 항원 결합능 확인 SPR

[0194]

SPR (Surface plasmon resonance)을 통하여 mAb-TPP가 기존 항체의 항원결합능과 결합 친화도를 유지하는지 확인하기 위하여, CM5 칩 위에 EGFR, Her2를 약 1000RU만큼 고정화하였다. 30 µl/min의 속도로 흐르는 HBS-EP 완충액[10 mM HEPES, 3 mM 에틸렌디아민테트라아세트산, 및 0.005% surfactant P20 (pH 7.4), GE Healthcare]으로 분석하였다. 결합, 해리 분석 후 CM5칩의 재생 (regeneration)은 완충액 (20mM NaOH, 1M NaCl, pH10.0)을 30 µl/min 유속으로 1분간 흘려주어 시행되었다. mAb (Cetuximab, Trastuzumab) 및 mAb-TPP (Cetuximab-TPP, Trastuzumab-TPP)의 결합 3분, 해리 3분으로 얻어진 각 센서그램 (sensorgram)은 공백 칸 (Blank cell)과 비교하여 정상화 (normalization) 및 절감 (Subtraction)하여 친화도를 계산하였다. 그 결과를 표 9에 나타낸다. 표 9에서 나타난 바와 같이, Cetuximab의 EGFR에 대한 친화도가 다른 문헌들에서와 거의 유사하게 분석되었으며, Cetuximab-TPP가 Cetuximab과 비교하여 EGFR에 대한 친화도가 유사하게 분석되었다. 또한, Trastuzumab의 Her2에 대한 친화도가 다른 문헌들에서와 거의 유사하게 분석되었으며, Trastuzumab-TPP가 Trastuzumab과 비교하여 Her2에 대한 친화도가 유사하게 분석되었다. mAb에 TPP를 융합하였을 때, 기존의 항체의 항원결합에는 아무 영향을 주지 않는 것을 확인하였다. 분석 시 적어도 5개의 센서그램을 이용하여 분석하였으며, 2회 수행하여 얻은 결과를 통계처리 하였다. ±는 독립적인 실험의 결과의 표준편차 값을 나타내었다.

표 9

[0195]

Clone	Receptors	Association rate ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Dissociation rate kd (S <sup>-1</sup> )	Binding affinity K <sub>D</sub> (nM)
Cetuximab	EGFR	6.24±0.17×10 <sup>6</sup>	1.50±0.35×10 <sup>-3</sup>	0.24±0.02
Cetuximab-15A22p	EGFR	7.17±0.12×10 <sup>6</sup>	1.53±0.37×10 <sup>-3</sup>	0.21±0.01
Trastuzumab	Her2	7.90±0.07×10 <sup>4</sup>	1.06±0.14×10 <sup>-5</sup>	0.14±0.01
Trastuzumab-15A22p	Her2	8.45±0.31×10 <sup>4</sup>	1.67±0.37×10 <sup>-5</sup>	0.20±0.05

[0196]

Cetuximab, Trastuzumab의 EGFR, Her2에 대한 친화도 분석 결과

[0197]

(3) mAb-TPP의 이중특이성 확인을 위한 Sandwich ELISA

[0198]

Sandwich ELISA를 수행하여 mAb-TPP의 이중결합능을 확인하였다.

[0199]

구체적으로, 뉴로필린1-b1b2 도메인 (273-586), 뉴로필린2 -b1b2 도메인 (275-595)를 각 1 µg씩, 96 웰 EIA/RIA 플레이트 (COSTAR Corning In., USA)에 1시간 동안 상온에서 결합시킨 후 0.1 % PBST (0.1 % Tween20, pH 7.4, 137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, SIGMA-ALDRICH co., USA)로 10분 간 3회 씻어내었다. 5%

Skim milk (5 % Skim milk, pH 7.4, 137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, SIGMA-ALDRICH co., USA)로 1시간 동안 결합한 후 0.1 % PBST (0.1 % Tween20, pH 7.4, 137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, SIGMA-ALDRICH co.,USA)로 10분간 3회 씻어내었다. mAb 및 mAb-TPP를 100nM의 농도로 뉴로필린1 및 2-b1b2 도메인에 결합한 후 0.1 % PBST (0.1 % Tween20, pH 7.4, 137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, SIGMA-ALDRICH co.,USA)로 10분간 3회 씻어내었다. 각 웰에 상기된 방법으로 바이오티닐레이션 된 EGFR (SIGMA-ALDRICH co.,USA) 및 Her2-ECD (R&D systems, Minneapolis, MN)를 1µM부터 1nM까지 희석하여 결합시킨 후 0.1 % PBST (0.1 % Tween20, pH 7.4, 137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, SIGMA-ALDRICH co.,USA)로 10분간 3회 씻어내었다. AP가 접합된 항 인간 항체 (alkaline phosphatase-conjugated anti-human mAb, Sigma, USA)로 결합시킨 후 pNPP (pnitrophenyl palmitate, SIGMA-ALDRICH co., USA)로 반응시켜 405 nm 흡광도를 정량하였다.

[0200] 도 16 및 도 17의 (C)는 ELISA 결과를 통해 mAb-TPP가 뉴로필린1 혹은 2와 본래 mAb의 항원에 대한 동시결합능이 있는 것으로 이중특이성이 확인한 결과이다.

[0201] (4) mAb-TPP의 Fc receptor에 대한 결합능 확인 SPR

[0202] SPR (Surface plasmon resonance)을 통하여 mAb-TPP가 기존 항체의 Fc 수용체에 대한 결합능이 유지되는지 확인하기 위하여 Fc γ RIIa, Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIb, FcRn에 대한 친화도를 분석하였다. Fc γ RIIa, Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIb에 대하여는 상기 실시예 6와 동일한 방법으로 수행되었다. FcRn에 대하여는 야생형 항체의 경우 pH6.0에서만 FcRn에 결합하고, pH7.4에서는 결합하지 않는 특성을 지닌다. 친화도 분석을 위하여 pH6.0 조건에서 mAb 및 mAb-TPP의 FcRn에 대한 SPR을 수행하였다. CM5 칩 위에 FcRn을 약 1000RU만큼 고정화하였다. 30 µl/min의 속도로 흐르는 PBST 완충액[pH 6.0, 137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, 0.005% surfactant P20, SIGMA-ALDRICH co.,USA,]으로 분석하였다. 결합, 해리 분석 후 CM5칩의 재생 (regeneration)은 HBS-EP 완충액 [10 mM Hepes, 3 mM 에틸렌디아민테트라아세트산, 및 0.005 % surfactant P20 (pH 8.0), GE Healthcare]을 30 µl/min 유속으로 1분간 흘려주어 시행되었다. mAb (Cetuximab, Trastuzumab) 및 mAb-TPP (Cetuximab-TPP, Trastuzumab-TPP)의 결합 3분, 해리 3분으로 얻어진 각 센서그램 (sensorgram)은 공백 칸 (Blank cell)과 비교하여 정상화 (normalization) 및 절감 (Subtraction)하여 친화도를 계산하였으며, 그 결과를 표 10에 나타내었다.

[0203] 이 센서그램과 상기 실시예 6와 같이 분석된 센서그램 중 pH6.0에서 분석했던 농도 중, 최고 농도인 625nM에서의 pH에 따른 결합 차이를 확인하였다. 도 18은 mAb 및 mAb-TPP의 FcRn에 대한 pH에 따른 결합능이 유사한지 확인한 결과를 나타낸다. 도 18에 나타난 바와 같이, mAb (Cetuximab, Trastuzumab) 및 mAb-TPP (Cetuximab-TPP, Trastuzumab-TPP) 모두 pH 6.0에서만 FcRn에 결합하고, pH7.4에서는 결합하지 않는 특성을 확인하였고, 이에 따라 TPP융합이 Fc 수용체에 대한 결합능에 영향을 주지 않는 것을 확인하였다.

표 10

[0204]

클론	수용체	결합도 (Association rate) $k_a$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	해리도 (Dissociation rate) $k_d$ ( $S^{-1}$ )	친화도 (Binding affinity) $K_D$ (M)
Cetuximab	FcRn (pH 6.0)	$8.27 \pm 0.60 \times 10^3$	$4.28 \pm 0.16 \times 10^{-3}$	$5.17 \pm 0.21 \times 10^{-7}$
Cetuximab-15A22p	FcRn (pH 6.0)	$7.71 \pm 0.04 \times 10^3$	$4.35 \pm 0.06 \times 10^{-4}$	$5.64 \pm 0.10 \times 10^{-7}$
Trastuzumab	FcRn (pH 6.0)	$3.24 \pm 0.07 \times 10^3$	$1.49 \pm 0.14 \times 10^{-3}$	$4.59 \pm 0.16 \times 10^{-7}$
Trastuzumab-15A22p	FcRn (pH 6.0)	$7.23 \pm 0.30 \times 10^3$	$3.72 \pm 0.31 \times 10^{-3}$	$5.15 \pm 0.15 \times 10^{-7}$
Cetuximab	Fc γ R IIa	$8.64 \pm 0.04 \times 10^3$	$2.28 \pm 0.17 \times 10^{-3}$	$2.64 \pm 0.14 \times 10^{-7}$
Cetuximab-15A22p	Fc γ R IIa	$1.40 \pm 0.07 \times 10^4$	$3.28 \pm 0.14 \times 10^{-3}$	$3.12 \pm 0.16 \times 10^{-7}$
Trastuzumab	Fc γ R IIa	$2.39 \pm 0.20 \times 10^4$	$5.04 \pm 0.25 \times 10^{-3}$	$2.11 \pm 0.10 \times 10^{-7}$

Trastuzumab-15A22p	Fc γ R IIa	$2.47 \pm 0.17 \times 10^4$	$7.98 \pm 0.35 \times 10^{-3}$	$3.23 \pm 0.27 \times 10^{-7}$
Cetuximab	Fc γ R IIIa	$1.94 \pm 0.19 \times 10^4$	$1.91 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	$9.85 \pm 0.12 \times 10^{-7}$
Cetuximab-15A22p	Fc γ R IIIa	$1.98 \pm 0.20 \times 10^4$	$1.68 \pm 0.25 \times 10^{-2}$	$8.47 \pm 0.21 \times 10^{-7}$
Trastuzumab	Fc γ R IIIa	$1.61 \pm 0.28 \times 10^4$	$1.50 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	$9.33 \pm 0.85 \times 10^{-7}$
Trastuzumab-15A22p	Fc γ R IIIa	$2.23 \pm 0.28 \times 10^4$	$2.09 \pm 0.03 \times 10^{-2}$	$9.38 \pm 0.17 \times 10^{-7}$
Cetuximab	Fc γ R II Ib	$5.10 \pm 0.45 \times 10^3$	$4.20 \pm 0.19 \times 10^{-2}$	$8.23 \pm 0.14 \times 10^{-6}$
Cetuximab-15A22p	Fc γ R II Ib	$1.57 \pm 0.45 \times 10^3$	$1.45 \pm 0.20 \times 10^{-2}$	$9.22 \pm 0.22 \times 10^{-6}$
Trastuzumab	Fc γ R II Ib	$5.30 \pm 0.14 \times 10^3$	$4.47 \pm 0.22 \times 10^{-2}$	$8.43 \pm 0.33 \times 10^{-6}$
Trastuzumab-15A22p	Fc γ R II Ib	$7.08 \pm 0.43 \times 10^3$	$6.66 \pm 0.13 \times 10^{-2}$	$9.39 \pm 0.23 \times 10^{-6}$

[0205] IgG-TPP의 Fc receptor에 대한 친화도 분석 KD 값

[0206] **실시예 12: mAb-TPP의 조직 침투능 향상 확인**

[0207] 상기 실험에서 구축된 IgG-TPP로 종양 조직 내의 항체의 침투를 확인하기 위하여, Balb/c 누드 마우스에 각각 FaDu와 A431을 마우스 당  $5 \times 10^6$ 개의 세포를 피하주사로 주입시켰고, 약 9일 후 종양의 부피가 약  $300-400 \text{ mm}^3$  정도가 되었을 때, 각각 PBS, Cetuximab, Cetuximab-15A22P를 2.5 mg/kg으로 정맥 주사하였다. 주사 후, 각각 3시간, 12시간 후 마우스로부터 종양을 적출하여, 면역조직화학실험을 수행하였다. 실시예 9과 동일하게 조직을 염색하여 관찰하였다.

[0208] 도 19a는 Cetuximab-TPP의 종양조직 내 침투능을 확인하기 위한 IHC 결과이다. 도19a에 나타난 바와 같이, FaDu와 A431 두 암세포 조직에서 Cetuximab의 경우 혈관 주위에만 녹색 형광이 관찰되는 반면에, Cetuximab-15A22P의 경우, Cetuximab과 비교했을 때, 혈관으로부터 좀 더 멀리 조직 내부로 침투되었음이 확인되었다. 또한 3시간, 12시간 샘플의 비교를 통해, 시간에 따라 더 조직 내부로 침투됨을 확인 하였다. 이를 정량화 하기 위해 ImageJ를 사용하였다.

[0209] 추가적으로 이 조건에서 사용된 암세포 조직으로부터 웨스턴 블롯을 수행하였으며, 그 결과를 도 19b에 나타내었다. 도 19b에서 알 수 있는 바와 같이, 인간 항체의 중쇄 부위와 경쇄 부위를 각각 인지 하는 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였을 때, Cetuximab에 비해 Cetuximab-15A22P의 경우, 조직 내에 더 많은 양이 존재함을 확인하였다. 또한, 암세포의 전이와 관련된 단백질인 N-카데린과 비멘틴 (vimentin), 피브로넥틴 등의 변화 없이 E-카데린만이 Cetuximab-TPP에 의해 감소됨을 확인 하였다. E-카데린의 감소와 N-카데린, 비멘틴, 피브로넥틴 등의 증가가 동반되는 암세포의 전이 현상과는 달리, TPP에 의한 효과로는 암세포의 전이 및 침투가 일어나지 않음을 간접적으로 증명하였다.

[0210] 또한, 실제로 이러한 경향성이 암세포 억제에 영향을 미치는지 확인하기 위해, 누드마우스에서 암세포 성장이 저해 확인 실험을 수행하였다. 실시예 9과 마찬가지로 FaDu 세포주를 누드마우스에 피하주사 하였고, 세포를 이식한지 약 5일 후, 종양의 부피가 약  $120 \text{ mm}^3$  정도가 되었을 때, Cetuximab과 Cetuximab-15A22P를 2.5, 10 mg/kg으로 3일 간격, 6번 정맥주사를 하였다 (N=6).

[0211] 도 19c에서 나타난 바와 같이, 대조군인 PBS에 비해 Cetuximab (CTX)과 Cetuximab-15A22P는 암세포의 성장을 억제하였고, Cetuximab 보다 Cetuximab-15A22P가 더 효과적으로 억제함을 확인하였다. 또한, 도 19d에서 나타난 바와 같이, Cetuximab 실험군과 비교하여 Cetuximab-15A22P 실험군이 크게 체중의 변화가 없는 것을 확인하였으며, 이에 따라 독성은 없는 것으로 판단되었다.

[0212] 상기 실험과 동일한 방법으로, 구축된 Trastuzumab-15A22P를 이용하여 종양 조직 내의 침투된 항체의 확인하기 위한 IHC실험을 수행하였다. Balb/c 누드 마우스에 SK-OV-3을 마우스 당  $5 \times 10^6$ 개의 세포를 피하주사로 주입시켰

고, 약 9일 후 종양의 부피가 약  $300-400 \text{ mm}^3$  정도가 되었을 때, 각각 PBS, Trastuzumab 및 Trastuzumab-15A22P를 2.5 mg/kg으로 정맥 주사하였다. 주사 후, 각각 3시간, 12시간 후 마우스로부터 종양을 적출 하여, 상기 실험과 동일하게 조직을 염색하여 관찰하였다.

[0213] 도 20a는 Trastuzumab-TPP의 종양조직 내 침투능을 확인 하기 위한 IHC 결과이다. 도20a에 나타난 바와 같이, Trastuzumab의 경우 혈관 주위에만 녹색 형광이 관찰되는 반면에, Trastuzumab-15A22P의 경우, Trastuzumab과 비교했을 때, 혈관으로부터 좀 더 멀리 조직 내부로 침투되었음이 확인되었다. 또한 3 시간, 12시간 샘플의 비교를 통해, 시간에 따라 더 조직 내부로 침투됨을 확인하였다. 이를 정량화 하기 위해 Image J를 사용하였다.

[0214] 추가적으로 이 조건에서 사용된 암세포 조직으로부터 웨스턴 블롯을 수행하였으며, 그 결과를 도 20b에 나타낸다. 도 20b에서 나타난 바와 같이, 인간 항체의 중쇄 부위와 경쇄 부위를 각각 인지 하는 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였을 때, Trastuzumab에 비해 Trastuzumab-15A22P의 경우, 조직 내에 더 많은 양이 존재 함을 확인하였다. 또한, 암세포의 전이와 관련된 단백질인 N-카테린과 비멘틴, 피브로넥틴 등의 변화없이 E-카테린만이 Trastuzumab-TPP에 의해 감소 됨을 확인 하였다. 이를 통해, TPP에 의해 암세포의 전이 및 침투가 일어나지 않음을 간접적으로 증명하였다.

[0215] 상기 실험과 마찬가지로, Trastuzumab-TPP의 암세포 성장 억제 효과를 확인하기 위해,  $5 \times 10^6$ 개의 SK-OV-3 세포를 누드마우스에 피하주사 하였고, 세포를 이식한지 약 7일 후, 종양의 부피가 약  $80 \text{ mm}^3$  정도가 되었을 때, Trastuzumab과 Trastuzumab-15A22P를 2.5, 5 mg/kg으로 3일 간격, 6번 정맥주사를 하였다 (N=6). 도 20c는 Trastuzumab -TPP의 암세포 성장 억제 효과를 확인하기 위한 종양의 부피를 측정 한 실험 결과이다. 도 20c에서 알 수 있는 바와 같이 동일 조건에서 Trastuzumab에 비해 Trastuzumab-15A22P가 효과적으로 암세포의 성장 억제를 유도함을 확인하였다. 도 20d는 상기 실험시 마우스의 무게를 측정한 결과이다. 도 20d에서 나타난 바와 같이, Trastuzumab 실험군과 비교하여 Trastuzumab-15A22P 실험군이 크게 체중의 변화가 없는 것을 알 수 있으며, 다른 독성은 없는 것으로 판단되었다.

[0216] 상기의 결과는 종양 침투성 A22p 펩타이드가 다양한 항원을 인지하는 여러 단일클론항체에 대하여 일반적인 적용이 가능함을 나타낸다.

[0217] **실시예 13: Fc-TPP, mAb-TPP의 세포 독성 평가**

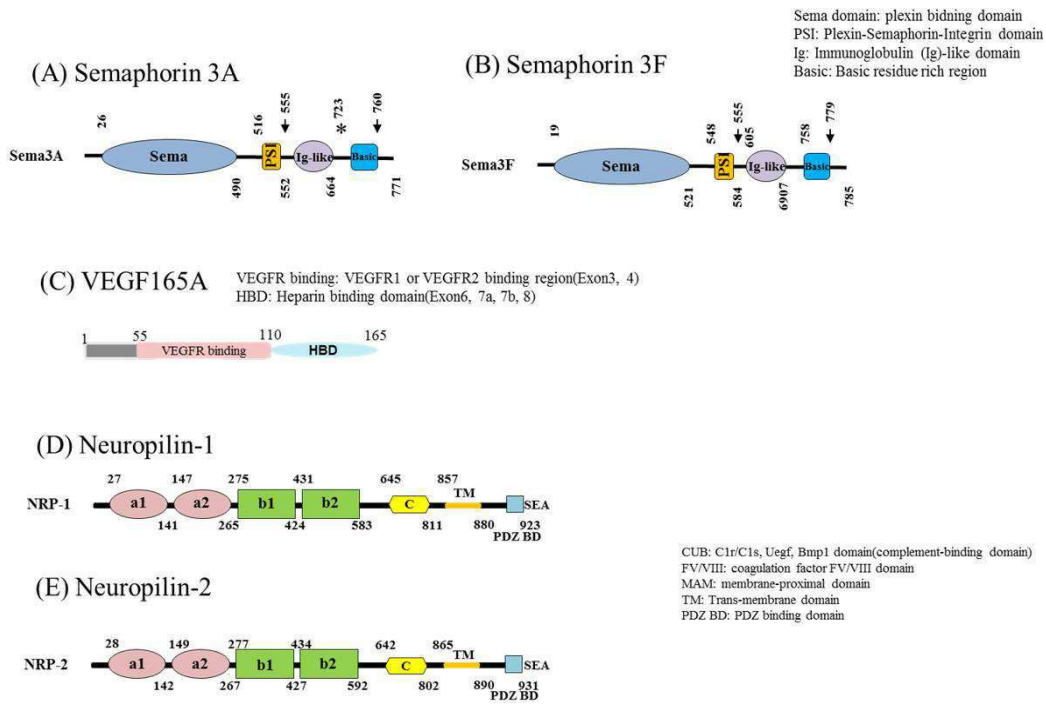
[0218] 상기의 결과, TPP의 조직 내 침투능 향상 효과에 의한 마우스에서의 암세포 성장 저해를 확인 하였다. In vitro 상에서, TPP 자체가 세포 독성을 가지는지 확인 하기 위해, 상기 실험에서 사용한 세포주인 FaDu와 SK-OV-3에 Fc-TPP와 mAb-TPP를 각각 처리하여 세포 성장 저해 정도를 평가하였다.

[0219] 구체적으로는, 24웰 플레이트에 웰당  $1 \times 10^4$  개의 세포 (FaDu, SK-OV-3)를 각각 10% FBS가 포함된 배지 0.5 ml에 희석하여 배양하였다. 세포가 안정화 되었을 때, 1  $\mu\text{M}$ 의 Fc, Fc-15A22P, mAb, mAb-15A22P를 처리하여 72시간 동안 관찰 한 후, 살아 있는 세포의 개수를 카운팅하여 세포의 성장 정도를 비교하였다. FaDu 세포주에는 Fc, Fc-15A22P, Cetuximab, Cetuximab-15A22P를, SK-OV-3에는 Fc, Fc-15A22P, Trastuzumab, Trastuzumab-15A22P를 처리하여 그 효과를 확인하였다.

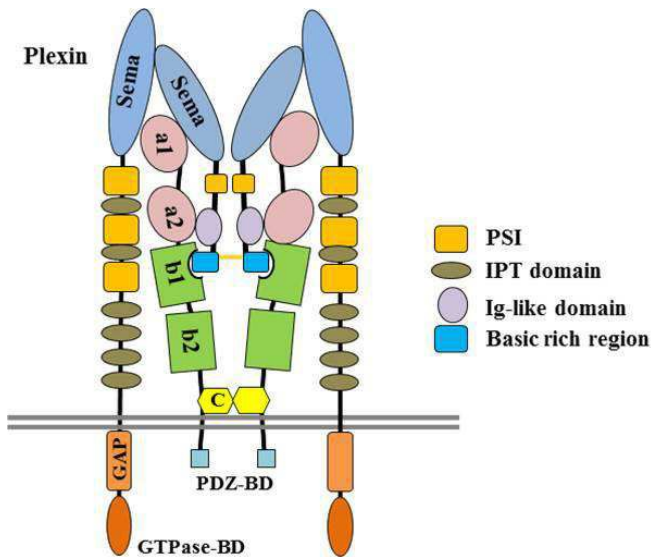
[0220] 도 21은 FaDu와 SK-OV-3에서 Fc-TPP와 mAb-TPP를 처리하여 세포성장 저해 정도를 in vitro에서 평가한 결과이다. 도 21에서 나타난 바와 같이, Cetuximab 및 Cetuximab-15A22P는 FaDu 세포주에서 약 30%정도 세포성장을 억제하였고, Trastuzumab 및 Trastuzumab-15A22P는 SK-OV-3 세포주에서 약 30-35% 정도 세포성장을 억제 하였다. 각각의 mAb와 mAb-TPP간의 차이는 없는 것으로 확인되었다. 이와 마찬가지로, Fc와 Fc-TPP는 FaDu와 SK-OV-3에서 모두 세포성장을 저해하지 않았다. 이는, 뉴로필린에 의한 TPP의 효과는 TPP 자체가 직접적으로 암세포의 성장에는 영향을 끼치지 않으면서, 종양 조직 내 침투능을 증가시켜 효과를 극대화 시킨다는 것을 의미한다. 또한, 상기 실험을 통해 확인한 mAb-TPP의 효과가 각각 EGFR과 뉴로필린, HER2와 뉴로필린 간의 상호작용에 의한 효과는 아님을 간접적으로 확인하였다.

도면

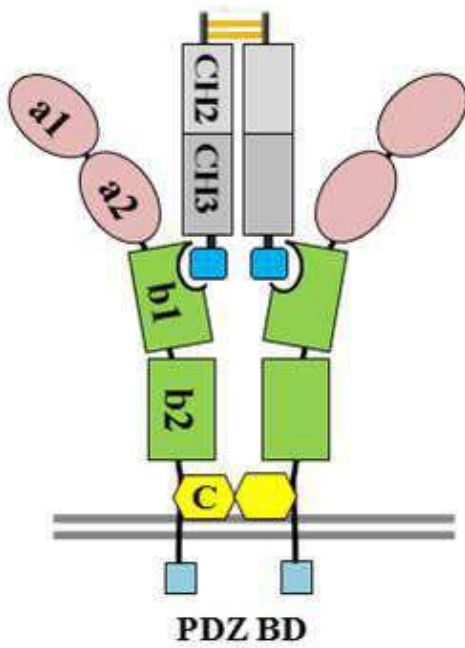
도면1



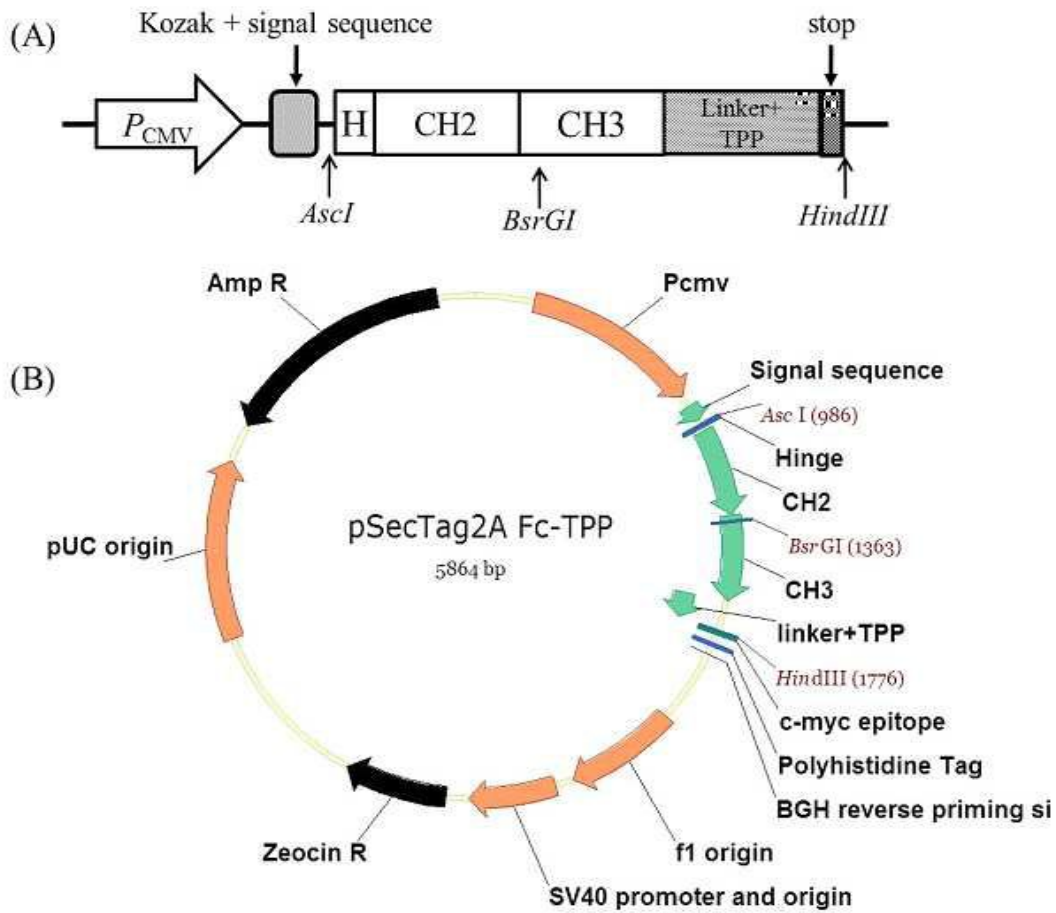
도면2



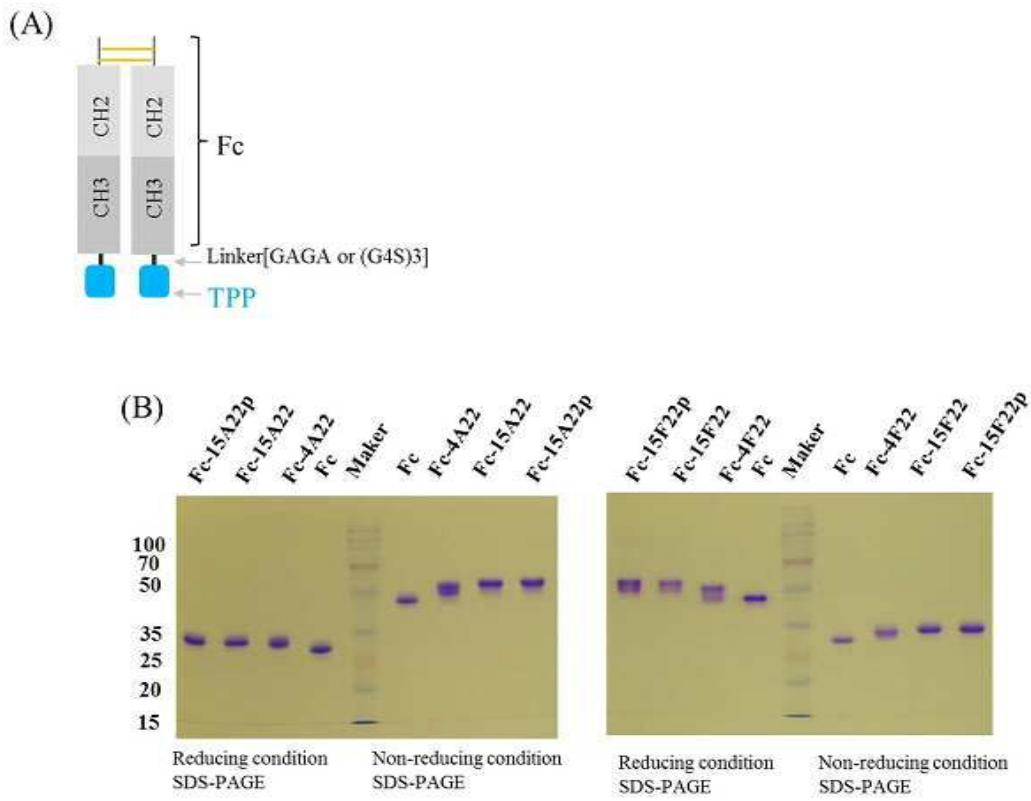
도면3



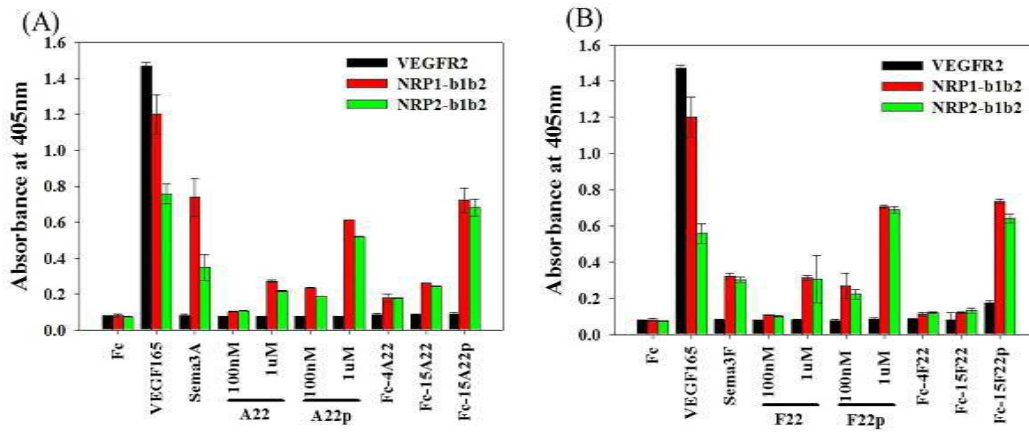
도면4



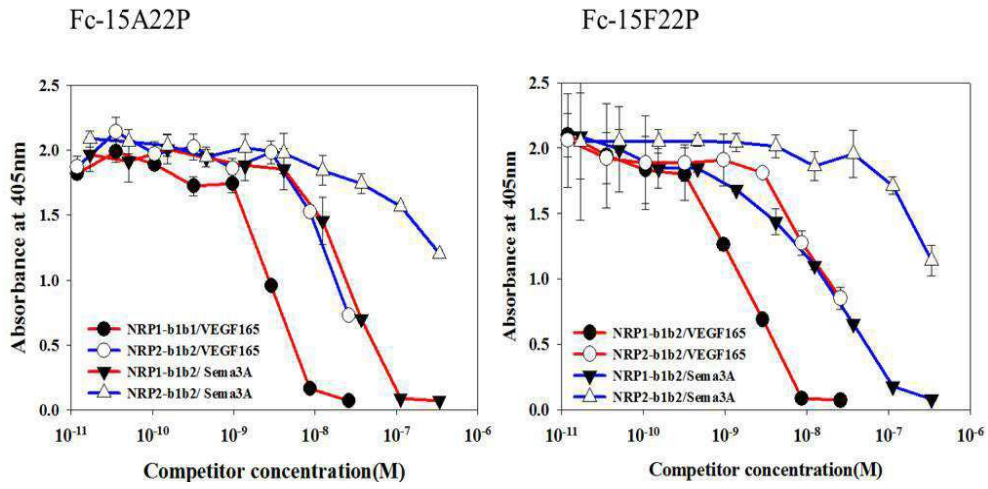
도면5



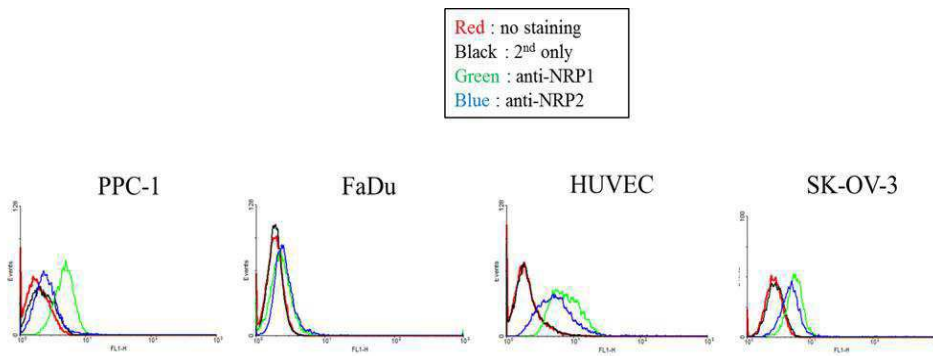
도면6



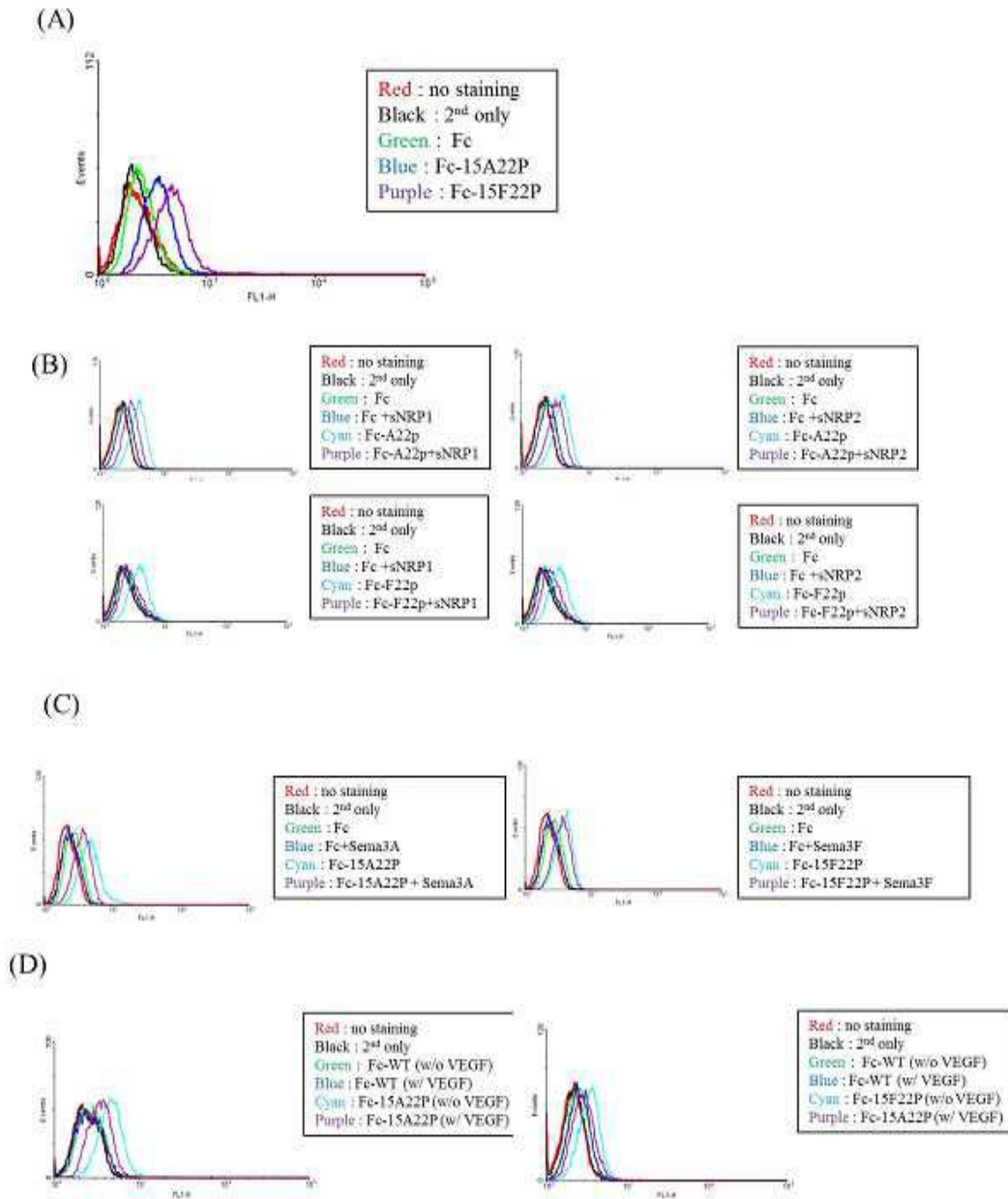
도면7



도면8

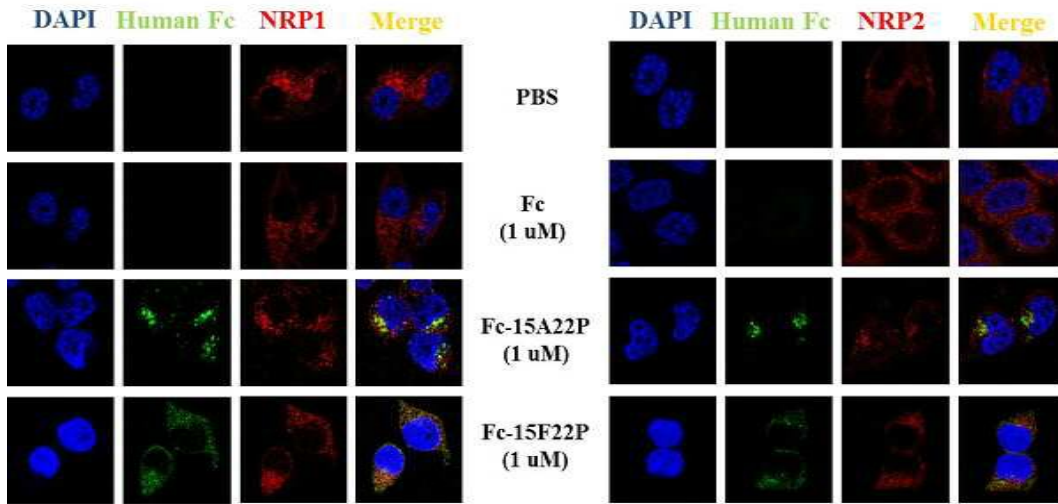


도면9

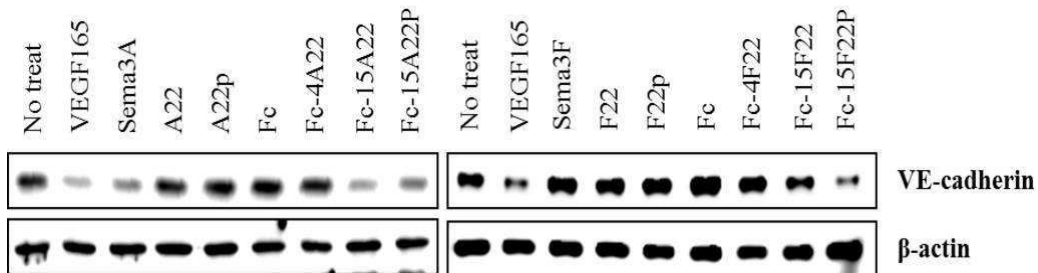


도면10

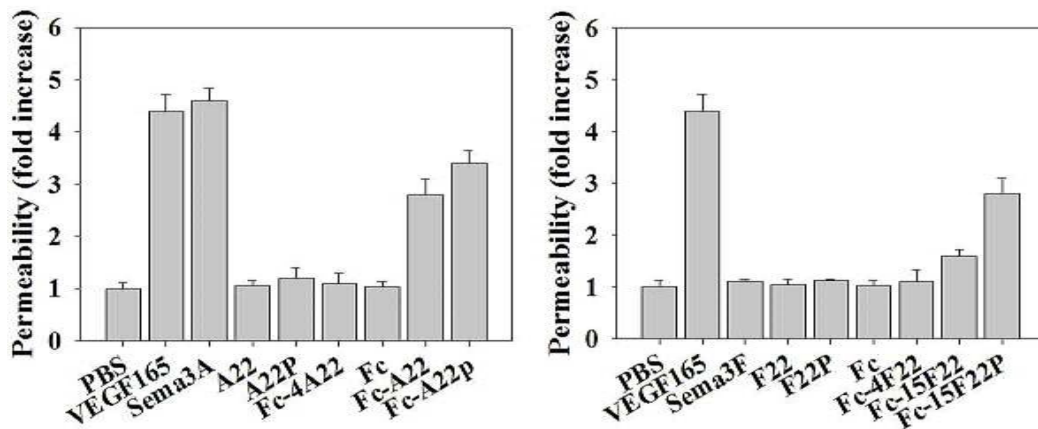
PPC-1



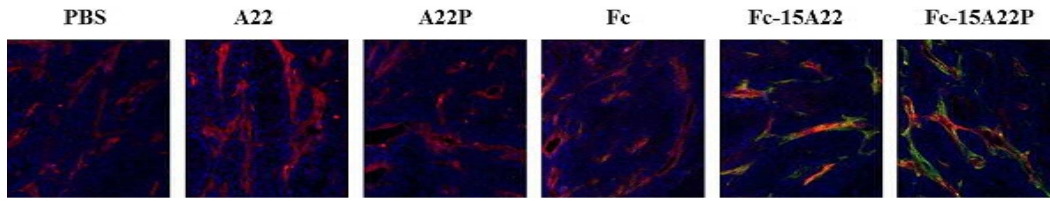
도면11a



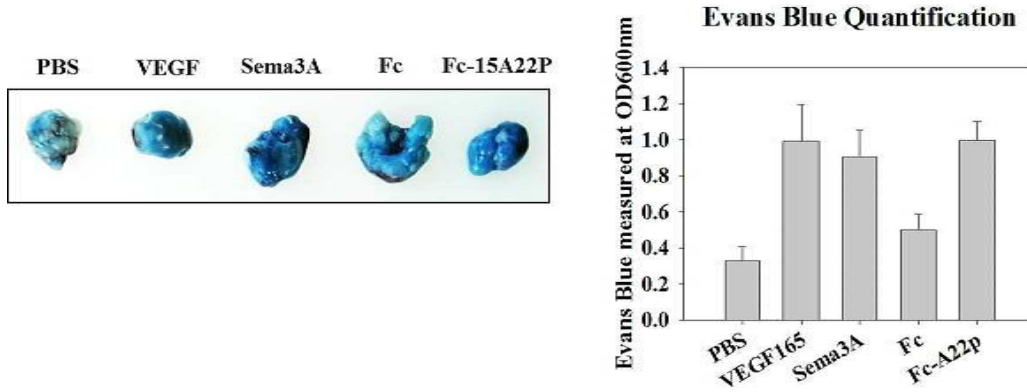
도면11b



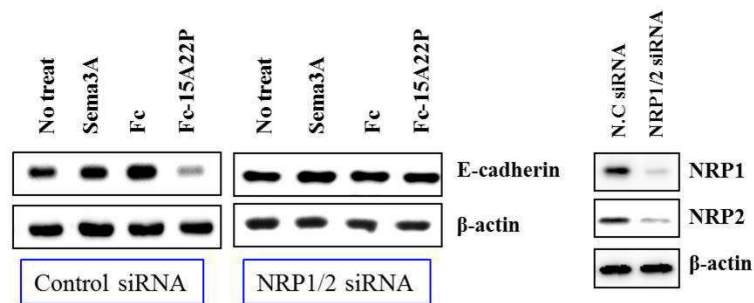
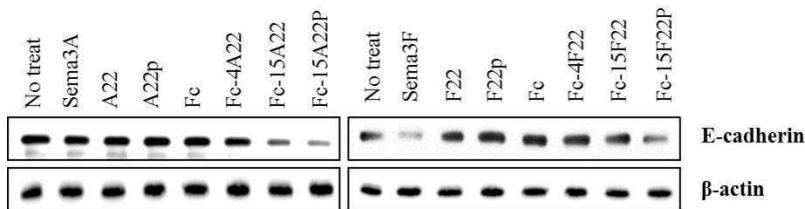
도면11c



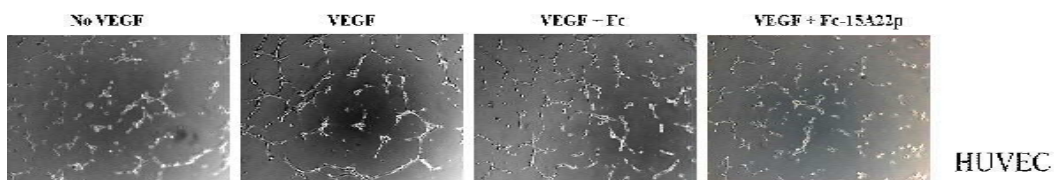
도면11d



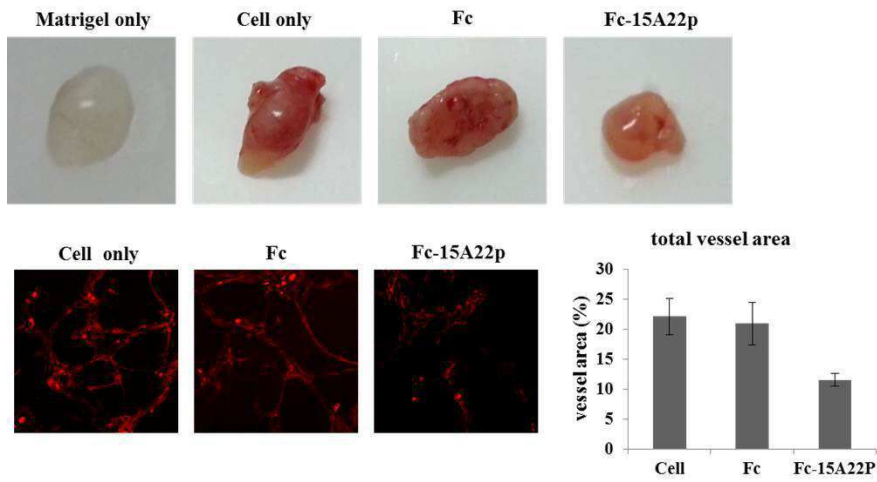
도면11e



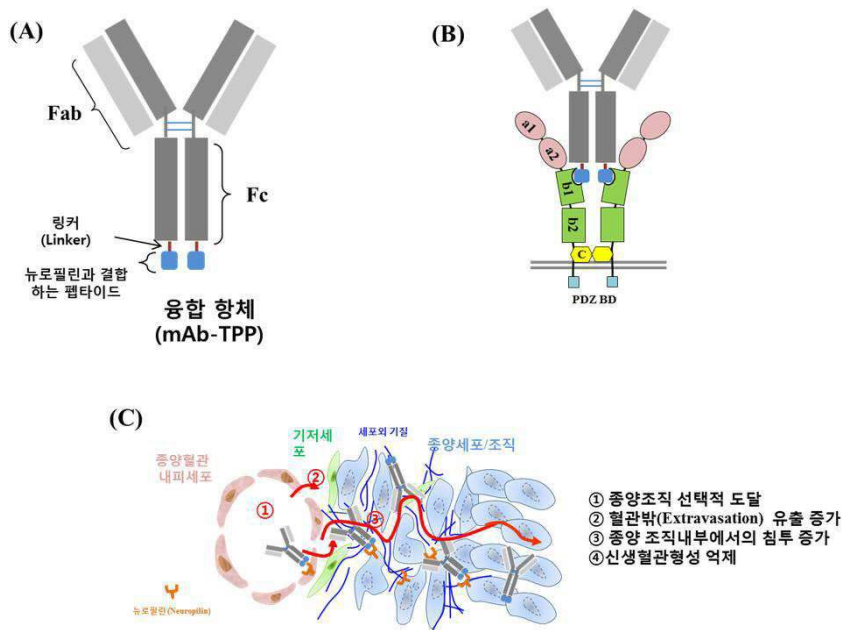
도면12a



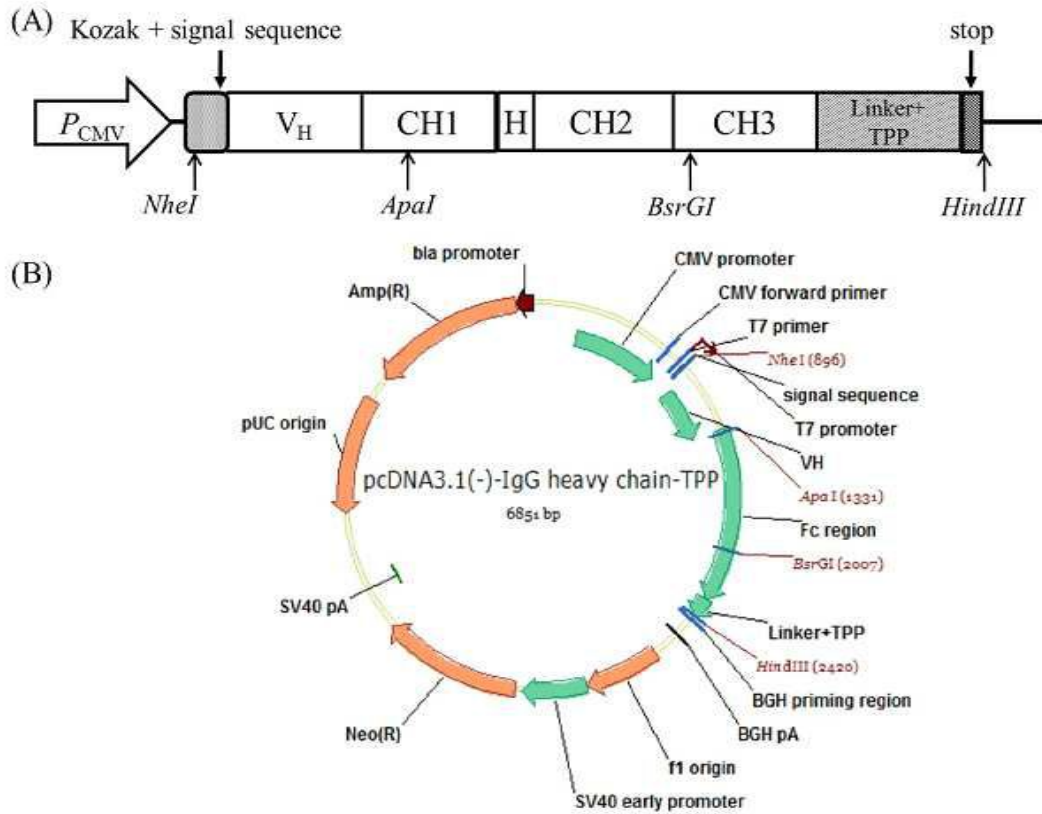
도면12b



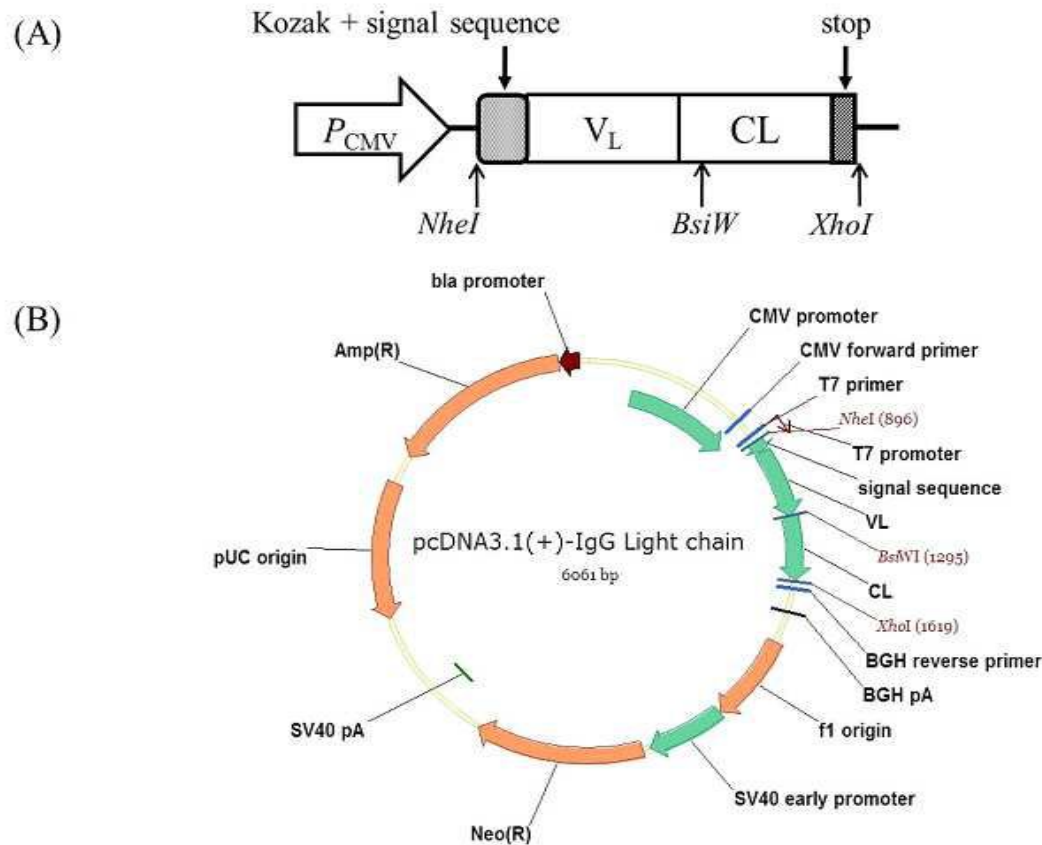
도면13



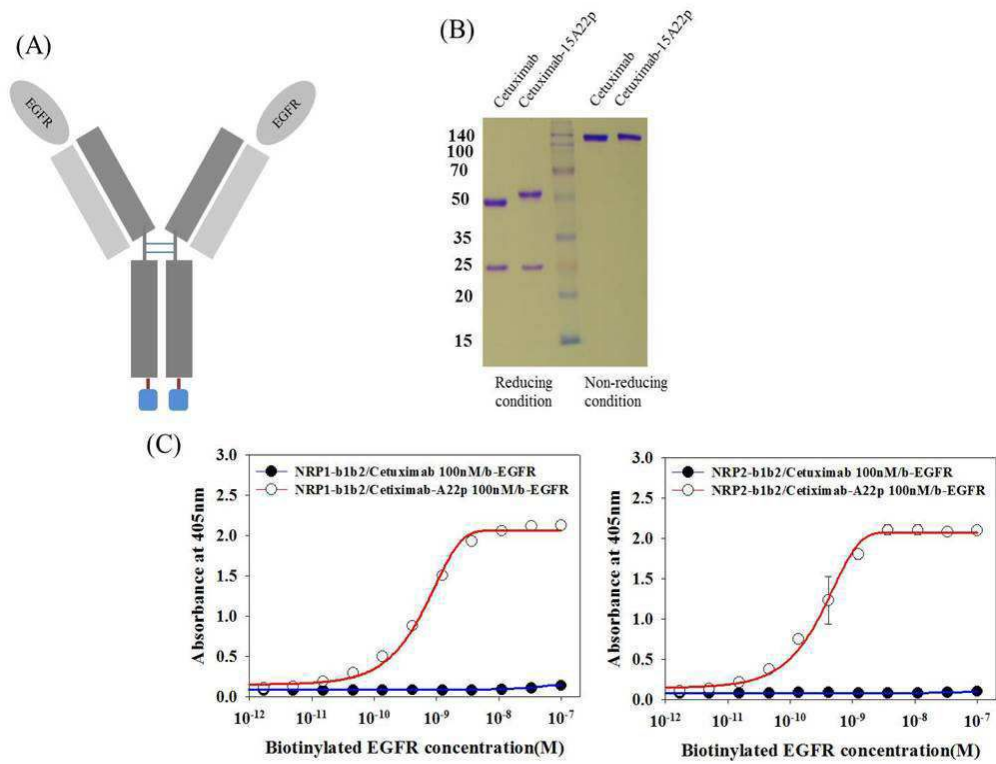
도면14



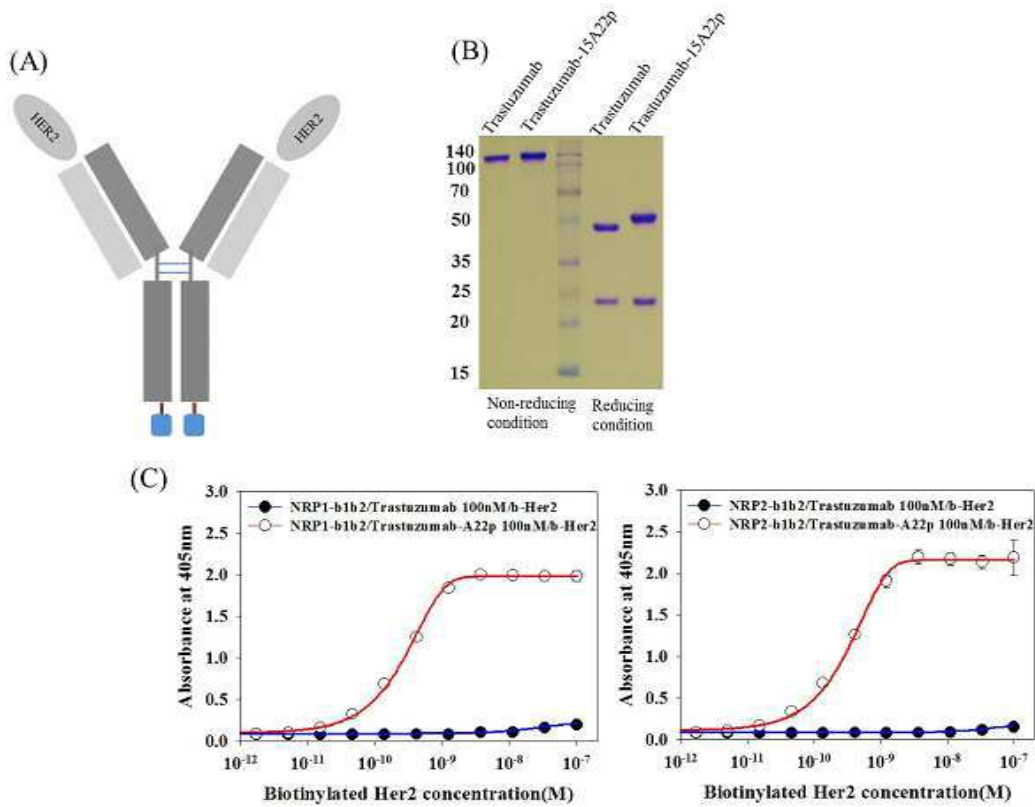
도면15



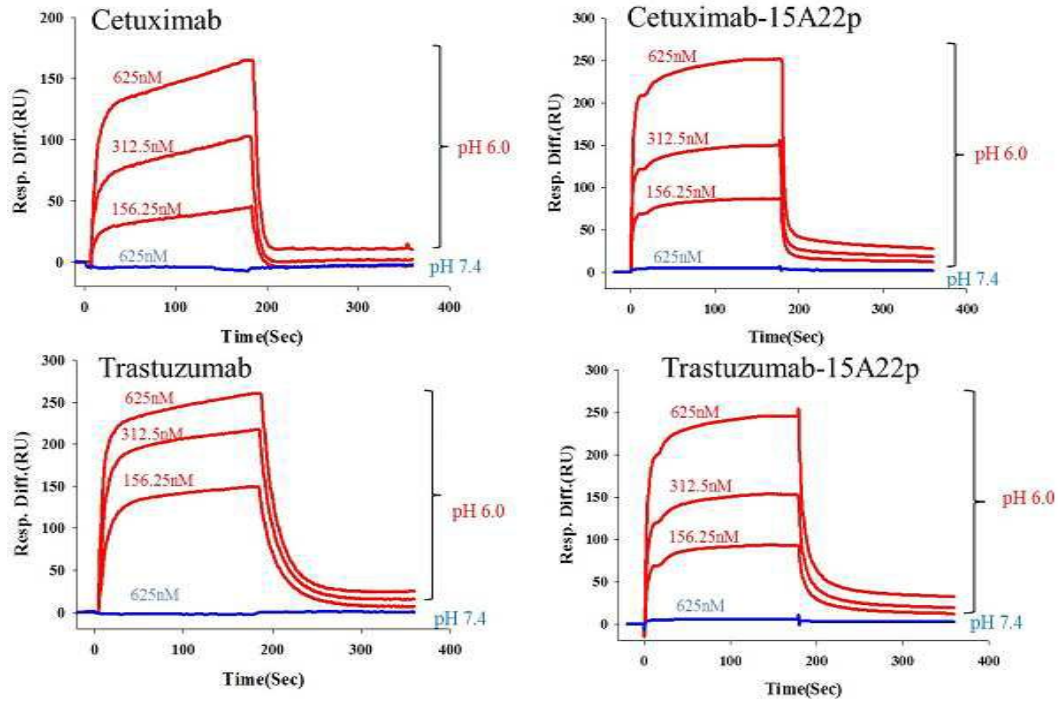
도면16



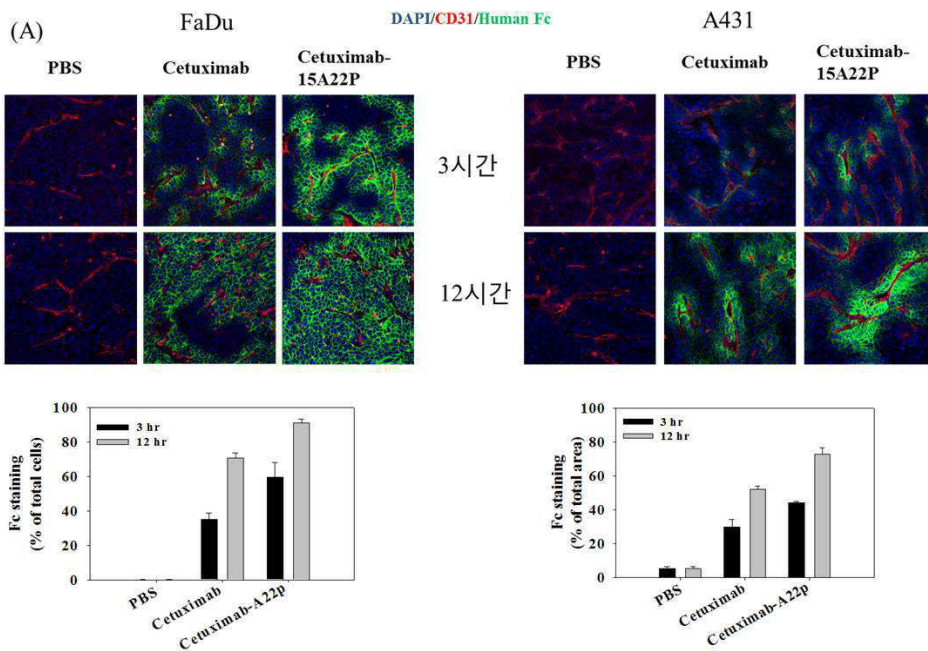
도면17



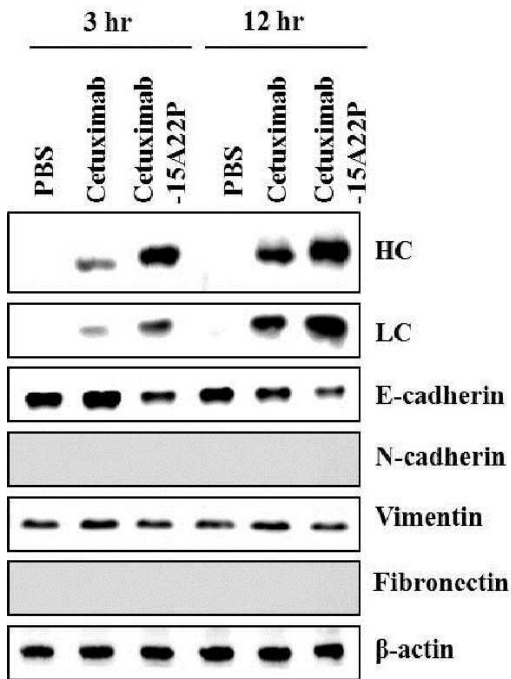
도면18



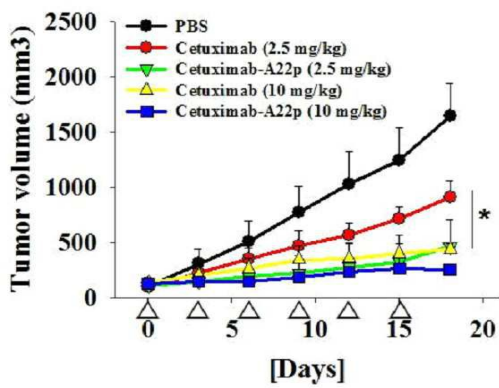
도면19a



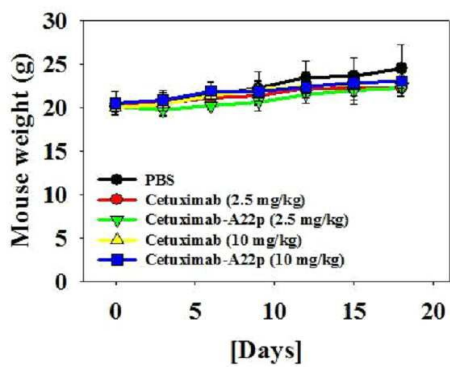
도면19b



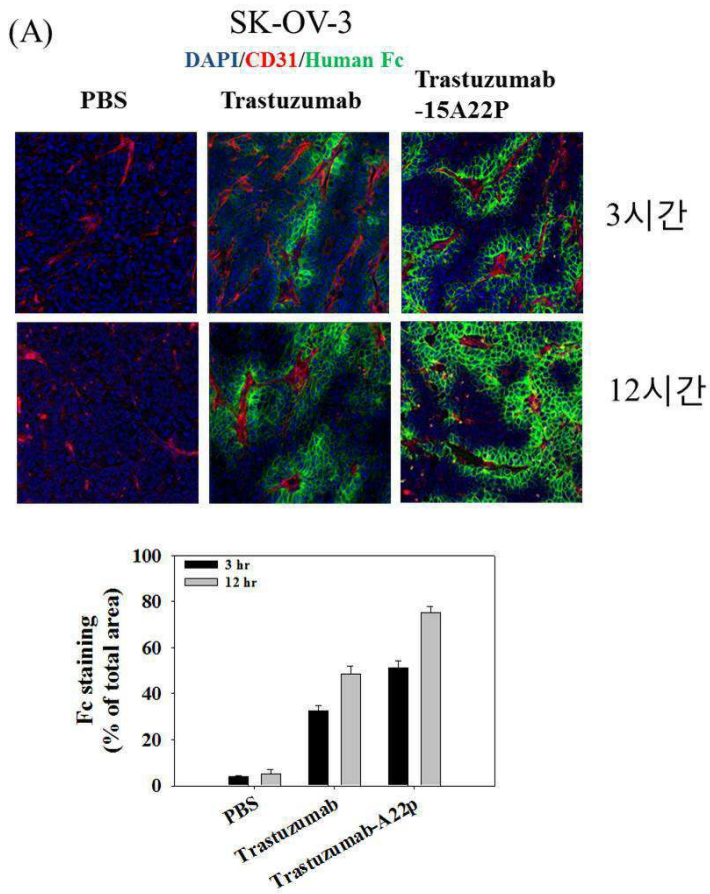
도면19c



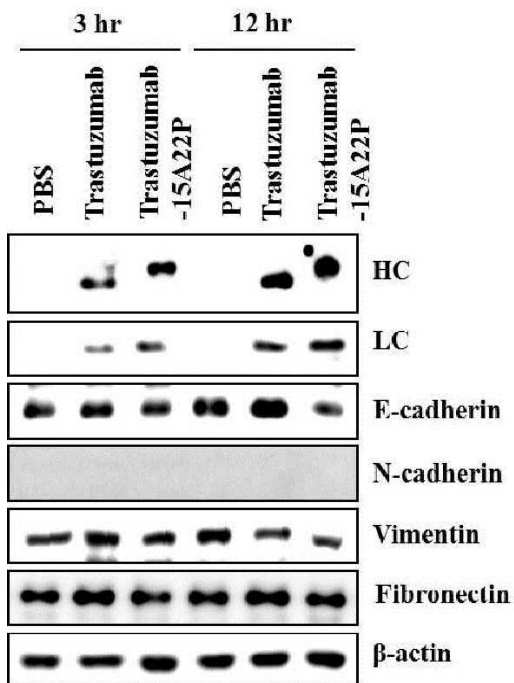
도면19d



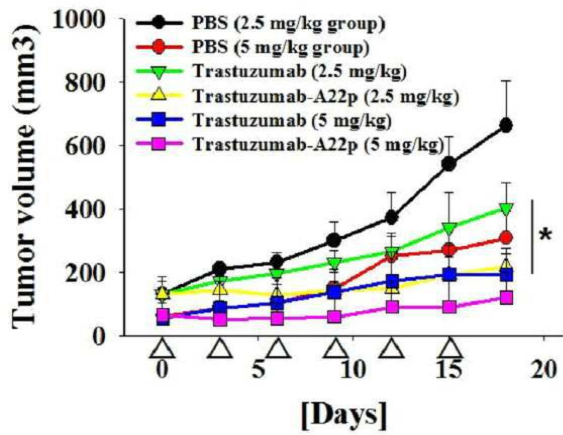
도면20a



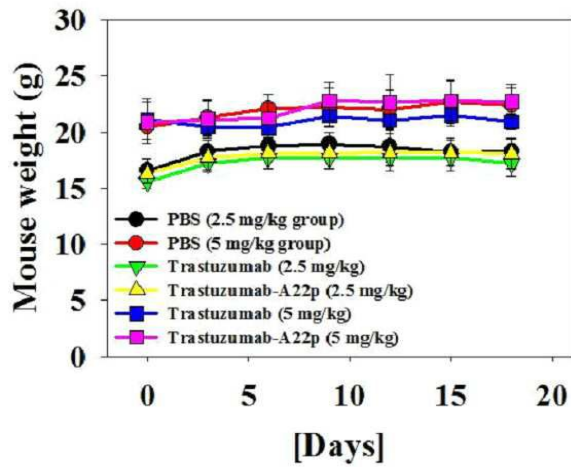
도면20b



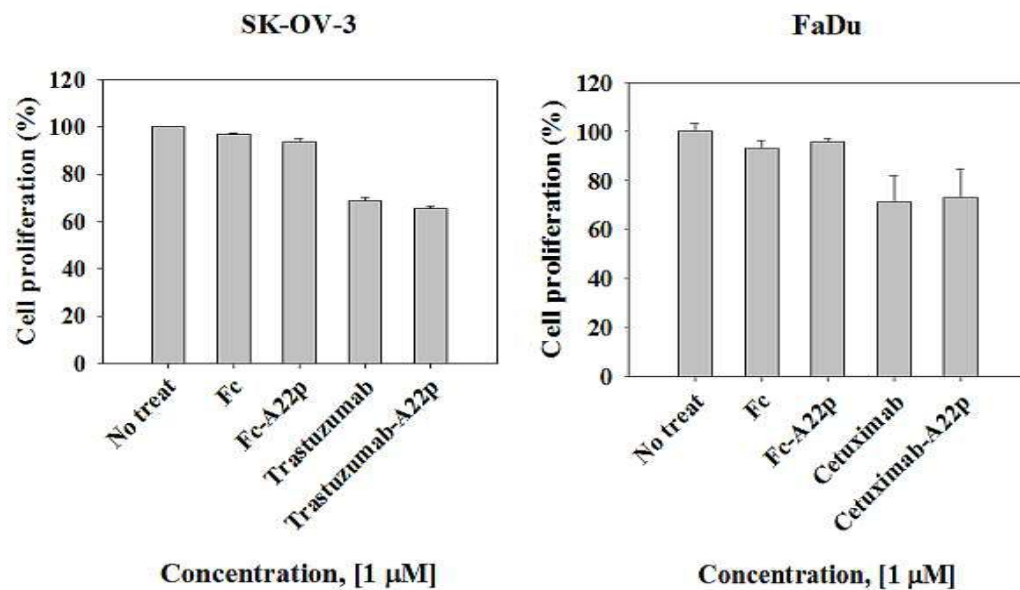
도면20c



도면20d



도면21



서열목록

<110> AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION  
 <120> Neuropilin specific tumor penetrating peptide and fusion protein  
 fused with the same  
 <130> 1\_22p  
 <150> KR 1020130058619  
 <151> 2013-05-23  
 <160> 10  
 <170> KopatentIn 2.0  
 <210> 1  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> A22  
 <400> 1

His Thr Pro Gly Asn Ser Asn Lys Trp Lys His Leu Gln Glu Asn Lys  
 1 5 10 15

Lys Gly Arg Asn Arg Arg  
 20

<210> 2  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> A22p  
 <400> 2

His Thr Pro Gly Asn Ser Asn Lys Trp Lys His Leu Gln Glu Asn Lys  
 1 5 10 15

Lys Gly Arg Pro Arg Arg  
 20

<210> 3  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> F22

<400> 3  
 Arg Glu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Ser Pro Glu Pro Gln Asp Gln Lys  
 1 5 10 15

Lys Pro Arg Asn Arg Arg  
 20

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F22p

<400> 4

Arg Glu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Ser Pro Glu Pro Gln Asp Gln Lys  
 1 5 10 15

Lys Pro Arg Pro Arg Arg  
 20

<210> 5

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4A22

<400> 5

Gly Ala Gly Ala His Thr Pro Gly Asn Ser Asn Lys Trp Lys His Leu  
 1 5 10 15

Gln Glu Asn Lys Lys Gly Arg Asn Arg Arg  
 20 25

<210> 6

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 15A22

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His  
 1 5 10 15

Thr Pro Gly Asn Ser Asn Lys Trp Lys His Leu Gln Glu Asn Lys Lys  
 20 25 30

Gly Arg Asn Arg Arg  
 35

<210> 7

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 15A22p

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His  
 1 5 10 15

Thr Pro Gly Asn Ser Asn Lys Trp Lys His Leu Gln Glu Asn Lys Lys  
 20 25 30

Gly Arg Pro Arg Arg  
 35

<210> 8

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4F22

<400> 8

Gly Ala Gly Ala Arg Glu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Ser Pro Glu Pro  
 1 5 10 15

Gln Asp Gln Lys Lys Pro Arg Asn Arg Arg  
 20 25

<210> 9

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 15F22

<400> 9

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg

1                    5                    10                    15  
Glu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Ser Pro Glu Pro Gln Asp Gln Lys Lys  
                          20                    25                    30  
Pro Arg Asn Arg Arg

                          35  
<210>    10  
<211>    37  
<212>    PRT  
<213>    Artificial Sequence  
<220><223>    15F22p  
<400>    10

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg  
1                    5                    10                    15  
Glu Ala Pro Gly Ala Pro Arg Ser Pro Glu Pro Gln Asp Gln Lys Lys  
                          20                    25                    30  
Pro Arg Pro Arg Arg  
                          35