



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0082341
(43) 공개일자 2024년06월10일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C07K 16/40</i> (2006.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01)
<i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>C07K 16/40</i> (2013.01)
<i>A61P 35/00</i> (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7010037</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2022년09월16일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2024년03월26일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/JP2022/034801</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2023/063026
국제공개일자 2023년04월20일</p> <p>(30) 우선권주장
JP-P-2021-169289 2021년10월15일 일본(JP)</p> | <p>(71) 출원인
치오메 바이오사이언스 가부시키키가이샤
일본 도쿄도 151-0071 시부야구 혼마치 3-12-1</p> <p>(72) 발명자
토요우라 마사요시
일본 도쿄도 151-0071 시부야구 혼마치 3-12-1 치오메 바이오사이언스 가부시키키가이샤 내
캄바야시 히로아키
일본 도쿄도 151-0071 시부야구 혼마치 3-12-1 치오메 바이오사이언스 가부시키키가이샤 내
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인리체</p> |
|--|--|

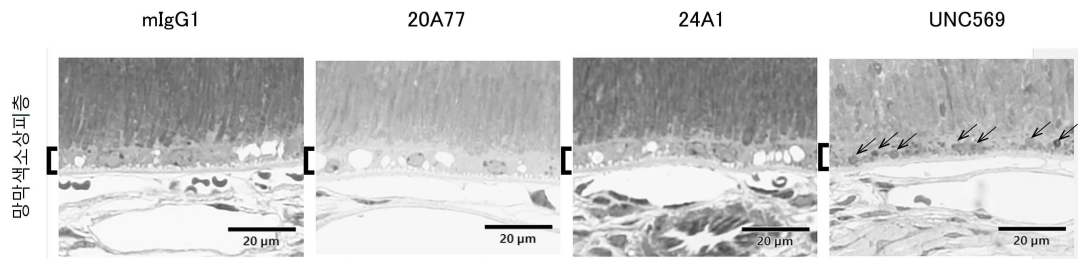
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 MerTK에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편, 및 항종양제

(57) 요약

본 발명의 과제는 종양 억제 효과를 가지면서 안독성을 발생시키기 어려운 항-MerTK 항체를 제공하는 것이다. 본 발명은 중쇄 및 경쇄의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열이 소정 요건을 만족하는, MerTK에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

(72) 발명자

사와다 아츠시

일본 도쿄도 151-0071 시부야구 혼마치 3-12-1 치
오메 바이오사이언스 가부시키키가이샤 내

타케스에 아키

일본 도쿄도 151-0071 시부야구 혼마치 3-12-1 치
오메 바이오사이언스 가부시키키가이샤 내

이노우에 토시카즈

일본 도쿄도 151-0071 시부야구 혼마치 3-12-1 치
오메 바이오사이언스 가부시키키가이샤 내

명세서

청구범위

청구항 1

중쇄 및 경쇄의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열이 하기 [요건 A]를 모두 만족하는, MerTK에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편:

[요건 A]

중쇄 CDR1이, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열이다.

중쇄 CDR2가, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열이다.

중쇄 CDR3이, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열이다.

경쇄 CDR1이, 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열이다.

경쇄 CDR2가, 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열이다.

경쇄 CDR3이, 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열이다.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

또한 하기 [요건 B]를 모두 만족하는, 항체 또는 이의 단편:

[요건 B]

중쇄 가변영역이, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열이다.

경쇄 가변영역이, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열이다.

청구항 3

중쇄 및 경쇄의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열이 하기 [요건 C]를 모두 만족하는, MerTK에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편:

[요건 C]

중쇄 CDR1이, 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열이다.

중쇄 CDR2가, 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열이다.

중쇄 CDR3이, 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열이다.

경쇄 CDR1이, 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열이다.

경쇄 CDR2가, 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열이다.

경쇄 CDR3이, 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열이다.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

또한 하기 [요건 D] 또는 [요건 E] 중 어느 하나를 모두 만족하는, 항체 또는 이의 단편:

[요건 D]

중쇄 가변영역이, 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열이다.

경쇄 가변영역이, 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열이다.

[요건 E]

중쇄 가변영역이, 서열번호 23으로 표시되는 아미노산 서열이다.

경쇄 가변영역이, 서열번호 24로 표시되는 아미노산 서열이다.

청구항 5

중쇄 및 경쇄의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열이 하기 [요건 F]를 모두 만족하는, MerTK에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편:

[요건 F]

중쇄 CDR1이, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열이다.

중쇄 CDR2가, 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열이다.

중쇄 CDR3이, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열이다.

경쇄 CDR1이, 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열이다.

경쇄 CDR2가, 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열이다.

경쇄 CDR3이, 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열이다.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

또한 하기 [요건 G] 또는 [요건 H] 중 어느 하나를 모두 만족하는, 항체 또는 이의 단편:

[요건 G]

중쇄 가변영역이, 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열이다.

경쇄 가변영역이, 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열이다.

[요건 H]

중쇄 가변영역이, 서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열이다.

경쇄 가변영역이, 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열이다.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 이의 단편을 포함하는,

항종양제.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

또한 면역 관문 저해제를 포함하는 항종양제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 MerTK에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편, 및 항종양제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] "Myeloid-Epithelial-Reproductive Tyrosine kinase"(이하, "MerTK"라고도 함)는 TAM(Tyro3, AXL 및 MerTK) 수용체 티로신 키나아제 패밀리의 일원으로 알려져 있다. MerTK는 2개의 면역 글로불린 유사 도메인, 2개의 피브로넥틴 III형 도메인, 및 1개의 티로신 키나아제 도메인을 갖는 막관통형 단백질이다.

- [0003] MerTK에는 다양한 기능이 알려져 있다.
- [0004] 예를 들면, 암세포에 발현하는 MerTK의 활성화가 암세포의 증식이나 이동을 유도하거나, 종양 미세환경에서 MerTK가 면역 억제에 기여하는 것 등이 보고되어 있다(예를 들면 비특허문헌 1, 비특허문헌 2 등).
- [0005] 그로 인해, MerTK는 암 면역 분야에서 새로운 표적 분자로 주목을 받고 있다.
- [0006] 예를 들면, 특허문헌 1에는 MerTK와, MerTK의 리간드인 "Growth arrest-specific protein 6"(이하, "Gas6"라고도 함)와의 결합을 저해하는 항-MerTK 항체가 암 치료에 유효하다고 개시되어 있다.
- [0007] 한편, MerTK와 그 리간드를 저해하는 것은 부작용을 유발할 가능성이 있다.
- [0008] 예를 들면, 비특허문헌 3에는 마우스에 대한 MerTK 저분자 저해제(UNC569) 투여로 인해, 시세포층에서 톨루이딘 블루 양성 과립이나 공포의 증가가 인정되어 안독성이 생겼다고 보고되어 있다.
- [0009] 비특허문헌 4에는 에페로사이토시스(efferocytosis) 저해능이나 항종양 효과를 갖는 항-MerTK 항체가 게잡이원숭이에게 안독성을 초래하였다고 보고되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 국제공개 제2020/076799호

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Pharmacol Ther. 2021 Sep; 225: 107822. doi: 10. 1016/j. pharmthera. 2021. 107822. Epub 2021 Mar 10
- (비특허문헌 0002) Immunity. 2020 Feb 18; 52(2): 357-373. e9. doi: 10. 1016/j. immuni. 2020. 01. 014. Epub 2020 Feb 11
- (비특허문헌 0003) Toxicol Pathol. 2018 Feb; 46(2): 193-201. doi: 10. 1177/0192623317749469. Epub 2018 Jan 8
- (비특허문헌 0004) https://www.surfaceoncology.com/wp-content/uploads/Surface_AACR19_190307c.pdf

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 그러나 현재까지 종양 억제 효과를 가지면서 안독성을 발생시키기 어려운 항 -MerTK 항체에 대한 보고는 확인된 바 없다.
- [0013] 본 발명은 상기 현상항을 감안하여 이루어진 것으로, 종양 억제 효과를 가지면서 안독성을 발생시키기 어려운 항-MerTK 항체의 제공을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명자들의 검토 결과, 소정 서열로 구성된 항체 또는 이의 단편에 의하면 상기 과제를 해결할 수 있음을 신규로 발견하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다. 보다 구체적으로, 본 발명은 아래의 것을 제공한다.
- [0015] (1) 중쇄 및 경쇄의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열이 하기 [요건 A]를 모두 만족하는, MerTK에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편.
- [0016] [요건 A]
- [0017] 중쇄 CDR1이, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열이다.

- [0018] 중쇄 CDR2가, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0019] 중쇄 CDR3이, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0020] 경쇄 CDR1이, 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0021] 경쇄 CDR2가, 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0022] 경쇄 CDR3이, 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0023] (2) 또한 하기 [요건 B]를 모두 만족하는, (1)에 기재된 항체 또는 이의 단편.
- [0024] [요건 B]
- [0025] 중쇄 가변영역이, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0026] 경쇄 가변영역이, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0027] (3) 중쇄 및 경쇄의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열이 하기 [요건 C]를 모두 만족하는, MerTK에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편.
- [0028] [요건 C]
- [0029] 중쇄 CDR1이, 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0030] 중쇄 CDR2가, 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0031] 중쇄 CDR3이, 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0032] 경쇄 CDR1이, 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0033] 경쇄 CDR2가, 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0034] 경쇄 CDR3이, 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0035] (4) 또한 하기 [요건 D] 또는 [요건 E] 중 어느 하나를 모두 만족하는, (3)에 기재된 항체 또는 이의 단편.
- [0036] [요건 D]
- [0037] 중쇄 가변영역이, 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0038] 경쇄 가변영역이, 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0039] [요건 E]
- [0040] 중쇄 가변영역이, 서열번호 23으로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0041] 경쇄 가변영역이, 서열번호 24로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0042] (5) 중쇄 및 경쇄의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열이 하기 [요건 F]를 모두 만족하는, MerTK에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편.
- [0043] [요건 F]
- [0044] 중쇄 CDR1이, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0045] 중쇄 CDR2가, 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0046] 중쇄 CDR3이, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0047] 경쇄 CDR1이, 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0048] 경쇄 CDR2가, 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0049] 경쇄 CDR3이, 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0050] (6) 또한 하기 [요건 G] 또는 [요건 H] 중 어느 하나를 모두 만족하는, (5)에 기재된 항체 또는 이의 단편.
- [0051] [요건 G]

- [0052] 중쇄 가변영역이, 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0053] 경쇄 가변영역이, 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0054] [요건 H]
- [0055] 중쇄 가변영역이, 서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0056] 경쇄 가변영역이, 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0057] (7) (1) 내지 (6) 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 이의 단편을 포함하는, 항종양제.
- [0058] (8) 또한 면역관문 저해제를 포함하는, (7)에 기재된 항종양제.

발명의 효과

- [0059] 본 발명에 따르면, 종양 억제 효과를 가지면서 안독성을 발생시키기 어려운 항-MerTK 항체가 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [0060] 도 1은 실시예에서의 인산화 저해 시험 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 2는 실시예에서 제작한 항체의 H쇄 가변영역 및 L쇄 가변영역의 아미노산 서열, 및 상기 서열에 대한 CDR 변이 도입 부위를 나타낸 도면이다.
- 도 3은 각종 동물에서 유래된 MerTK에 대한, 실시예에서 제작한 항체의 ELIS A에서의 반응성을 나타낸 도면이다.
- 도 4는 실시예에서 제작한 항체에 의한 종양 억제 효과를 나타낸 도면이다.
- 도 5는 실시예에서 제작한 항체에 의한 종양 억제 효과를 나타낸 도면이다.
- 도 6은 실시예에서 TIL 해석의 M1/M2 비를 나타낸 도면이다.
- 도 7은 실시예에서 제작한 항체에 의한 종양 억제 효과를 나타낸 도면이다.
- 도 8은 실시예에서 제작한 항체에 의한 종양 억제 효과를 나타낸 도면이다.
- 도 9는 실시예에서 제작한 항체에 의한 종양 억제 효과를 나타낸 도면이다.
- 도 10은 실시예에서 제작한 항체에 의한 종양 억제 효과를 나타낸 도면이다.
- 도 11은 실시예에서 제작한 항체에 의한 종양 억제 효과를 나타낸 도면이다.
- 도 12는 실시예에서 제작한 항체에 의한 종양 억제 효과를 나타낸 도면이다.
- 도 13은 각종 항-MerTK 항체에 의한 MerTK와 Gas6의 결합 저해능을 나타낸 도면이다.
- 도 14는 각종 항-MerTK 항체에 의한 MerTK와 TULP1의 결합 저해능을 나타낸 도면이다.
- 도 15는 각종 항-MerTK 항체에 의한 MerTK와 Gas6의 결합 저해능을 나타낸 도면이다.
- 도 16은 각종 항-MerTK 항체에 의한 MerTK와 TULP1의 결합 저해능을 나타낸 도면이다.
- 도 17은 각종 약제 투여 후 망막 색소 상피층의 TB 염색 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 18은 각종 약제 투여 후 외과립층의 TB 염색 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 19는 각종 약제 투여 후 망막 색소 상피층의 TB 염색 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 20은 각종 약제 투여 후 외과립층의 TB 염색 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 21은 항-MerTK 항체의 인간 키메라 항체 및 인간화 항체의 ELISA에서의 반응성을 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0061] 이하, 본 발명의 실시형태에 대해 설명하지만, 본 발명은 이에 한정되지 않는다.

- [0062] <MerTK에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편>
- [0063] 본 발명에 따른 MerTK에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편(이하, "본 발명의 항체 또는 이의 단편"이라고도 함)은 후술하는 바와 같이 3개의 양태를 포함한다.
- [0064] 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 항-MerTK 항체 또는 이의 단편이다.
- [0065] 종래에 항-MerTK 항체는 MerTK와, MerTK의 리간드와의 결합 저해를 통해 항종양 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있었다.
- [0066] 항-MerTK 항체는 예를 들면 MerTK와, MerTK의 리간드 중 Gas6와의 결합을 저해한 결과, 종양 미세환경을 변화시켜 항종양 효과를 발휘한다.
- [0067] 여기서, MerTK의 리간드 중 "Tubby-related protein 1"(이하, "TULP1"이라고도 함) 유전자는 안질환인 망막 색소 변성증의 원인이다. 게다가, TULP1을 녹아웃하면 광수용체 변성이 유발되는 것으로 알려져 있다 (Investigative Ophthalmology & Visual Science, August 2001, Vol. 42, No. 9). 또한 MerTK를 녹아웃하면, 눈의 시력 저하와 상관성을 갖는 것으로 인정된 이상 소견 중 하나인 외과립층 위축이 보이는 것으로 알려져 있다(Neuron. 2012 Dec 20; 76(6): 1123-32.). 따라서, 항종양 효과를 발휘하는 항-MerTK 항체여도 MerTK와 TULP1의 결합을 저해하는 항체라면 안독성을 발생시킬 우려가 있다.
- [0068] 따라서, 본 발명자들이 추가 검토를 한 결과, 본 발명의 항체 또는 이의 단편을 창출하는 데에 성공하였고, 상기 항체 등에 따르면, MerTK와 Gas6의 결합을 저해하긴 하지만 MerTK와 TULP1의 결합은 저해하지 않고, 종양 억제 효과를 가지면서 안독성을 발생시키기 어렵다는 것을 확인하였다.
- [0069] 본 발명에서 "MerTK에 특이적으로 결합한다"는 것은 본 발명의 항체 또는 이의 단편이 MerTK 단백질과 특이적으로 결합하고 다른 단백질과는 거의 또는 전혀 결합하지 않는 것을 의미한다.
- [0070] 항체 또는 이의 단편이 MerTK에 특이적으로 결합하는지 여부는 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay(ELISA법)를 통해 특정한다.
- [0071] 본 발명에서 "항체"란, 면역 글로불린 등으로도 불리는 Y자형 네 가닥 구조의 단백질을 의미한다.
- [0072] 본 발명에서 "항체의 단편"이란, 본 발명의 항체 구조 중, 항체의 상보성 결정영역(이하, "CDR"이라고도 함) 또는 가변영역 구조를 갖는 단백질을 의미한다. 단, 본 발명 항체의 단편은 MerTK에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단편이며, 적어도 후술하는 요건 A 내지 C 중 어느 하나를 모두 만족한다.
- [0073] (제1 양태에 따른 항체 또는 이의 단편)
- [0074] 본 발명의 항체 또는 이의 단편 중, 제1 양태에 따른 항체 또는 이의 단편은 중쇄 및 경쇄의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열이 하기 [요건 A]를 모두 만족한다.
- [0075] [요건 A]
- [0076] 중쇄 CDR1이, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0077] 중쇄 CDR2가, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0078] 중쇄 CDR3이, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0079] 경쇄 CDR1이, 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0080] 경쇄 CDR2가, 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0081] 경쇄 CDR3이, 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열이다.

표 1

서열번호	아미노산 서열
2	SYWMH
3	NINPSNGGTNYNEKFKS
4	LNYYGFDGFAF
6	KASQDINSYLS
7	RANRLVD
8	LQYDEFPFT

[0082]

[0083] 제1 양태에 따른 항체 또는 이의 단편은 본 발명의 효과를 보다 쉽게 발휘하는 관점에서, 바람직하게는 하기 [요건 B]를 모두 만족한다.

[0084] [요건 B]

[0085] 중쇄 가변영역이, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열이다.

[0086] 경쇄 가변영역이, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열이다.

표 2

서열번호	아미노산 서열
1	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCRASGNTFTSYWMHWVKQRPQGQLEWIGNIN PSNGGTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVVYCARLNYGFD GFAFWGQGTLVTVSA
5	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWVQKPKGKSPKTLIYRANRL VDGVPSPRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPFTFGSGTKLEIK

[0087]

[0088] 제1 양태에 따른 항체 또는 이의 단편은 실시예에서 "20A77", "20A77_mIgG1", "20A77_mIgG2a"로 지칭되는 각 항체를 포함한다.

[0089] (제2 양태에 따른 항체 또는 이의 단편)

[0090] 본 발명의 항체 또는 이의 단편 중 제2 양태에 따른 항체 또는 이의 단편은 중쇄 및 경쇄의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열이 하기 [요건 C]를 모두 만족한다.

[0091] [요건 C]

[0092] 중쇄 CDR1이, 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열이다.

[0093] 중쇄 CDR2가, 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열이다.

[0094] 중쇄 CDR3이, 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열이다.

[0095] 경쇄 CDR1이, 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열이다.

[0096] 경쇄 CDR2가, 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열이다.

[0097] 경쇄 CDR3이, 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열이다.

표 3

서열번호	아미노산 서열
10	VYDMH
11	RIRSKSSNYATNYADSVKD
12	DGSHYYYALDY
14	RASQDINNYLN
15	YSSRLHS
16	QQGKMFPWT

[0098]

[0099] 제2 양태에 따른 항체 또는 이의 단편은 본 발명의 효과를 보다 쉽게 발휘하는 관점에서, 바람직하게는 하기 [요건 D] 또는 [요건 E] 중 어느 하나를 모두 만족한다.

[0100] [요건 D]

[0101] 중쇄 가변영역이, 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열이다.

[0102] 경쇄 가변영역이, 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열이다.

[0103] [요건 E]

[0104] 중쇄 가변영역이, 서열번호 23으로 표시되는 아미노산 서열이다.

[0105] 경쇄 가변영역이, 서열번호 24로 표시되는 아미노산 서열이다.

표 4

서열번호	아미노산 서열
9	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNVYDMHWVRQAPGEGLEWVARIR SKSSNYATNYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNQLQTEDTAIYYCVRDGS HY YYALDYWGQGTSTVTVSS
13	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKLDGTVKLLIYSSRL HSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGKMFPWTFGGGKLEIK
23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNVYDMHWVRQAPGKGLWVARIR SKSSNYATNYADSVKDRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRDGS HY YYALDYWGQGTSTVTVSS
24	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDINNYLNWYQQKPKAPKLLIYSSRL HSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGKMFPWTFGGGKVEIK

[0106]

[0107] 제2 양태에 따른 항체 또는 이의 단편은 실시예에서 "24A1", "24A1_mIgG1", "24A1_mIgG2a", "24A1_hIgG1LALA", "hz24A1", "hz24A1_hIgG1LALA"로 지칭되는 각 항체를 포함한다.

[0108] 또한 "hz24A1", "hz24A1_hIgG1LALA"는 모두 "24A1"을 인간화한 항체이다.

[0109] (제3 양태에 따른 항체 또는 이의 단편)

[0110] 본 발명의 항체 또는 이의 단편 중 제3 양태에 따른 항체 또는 이의 단편은 중쇄 및 경쇄의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열이 하기 [요건 F]를 모두 만족한다.

[0111] [요건 F]

[0112] 중쇄 CDR1이, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열이다.

[0113] 중쇄 CDR2가, 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열이다.

[0114] 중쇄 CDR3이, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열이다.

[0115] 경쇄 CDR1이, 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열이다.

- [0116] 경쇄 CDR2가, 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0117] 경쇄 CDR3이, 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열이다.

표 5

서열번호	아미노산 서열
2	SYWMH
18	NINPSSGGTNYNEKFKS
4	LNYYGFDGFAF
6	KASQDINSYLS
20	RANRLVS
8	LQYDEFPFT

- [0118]
- [0119] 제3 양태에 따른 항체 또는 이의 단편은 본 발명의 효과를 보다 쉽게 발휘하는 관점에서, 바람직하게는 하기 [요건 G] 또는 [요건 H] 중 어느 하나를 모두 만족한다.
- [0120] [요건 G]
- [0121] 중쇄 가변영역이, 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0122] 경쇄 가변영역이, 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0123] [요건 H]
- [0124] 중쇄 가변영역이, 서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열이다.
- [0125] 경쇄 가변영역이, 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열이다.

표 6

서열번호	아미노산 서열
17	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCRASGNTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGNIN PSSGGTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLNYYGFDGFAFWGQGTTLVTVSA
19	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQKPKGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYSLTISLEYEDMGIYYCLQYDEFPFTFGSGTKLEIK
21	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGNTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGNIN PSSGGTNYNEKFKSRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLNYYGFDGFAFWGQGTTLVTVSS
22	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLSWFQKPKGKAPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPFTFGGGTKVEIK

- [0126]
- [0127] 제3 양태에 따른 항체 또는 이의 단편은 실시예에서 "m20A77", "m20A77_mIgG1", "m20A77_hIgG1LALA", "hz20A77", "hz20A77_hIgG1LALA"로 지칭되는 각 항체를 포함한다.
- [0128] 또한 "hz20A77", "hz20A77_hIgG1LALA"는 모두 "m20A77"을 인간화한 항체이다.
- [0129] <본 발명의 항체 또는 이의 단편의 제조방법>
- [0130] 본 발명의 항체 또는 이의 단편의 제조방법은 특별히 한정되지 않지만, 각종 항체(단클론 항체, 다클론 항체 등)나 각종 폴리펩티드의 제조방법으로 종래에 알려진 방법을 채용할 수 있다.
- [0131] 본 발명의 항체는 바람직하게는 단클론 항체로 제조되는 것이 바람직하다.
- [0132] 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 필요에 따라 정제 등을 실시해도 된다.
- [0133] 항체 또는 이의 단편이 본 발명의 항체 또는 이의 단편인지 여부는 아미노산 서열을 특정하기 위한 임의의 방법

(N-말단 아미노산 서열 분석 등)을 통해 특정할 수 있다.

- [0134] 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 발현 벡터 등을 포함한다.
- [0135] 이들 유전자, 발현 벡터는 종래 알려진 방법으로 제작할 수 있다.
- [0136] <본 발명의 항종양제>
- [0137] 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 양호한 항종양 효과를 발휘하기 때문에 항종양제로 바람직하게 사용할 수 있다.
- [0138] 본 발명의 항종양제는 예를 들면 암(폐암, 유방암, 대장암, 급성 림프성 백혈병 등) 등의 치료에 유효할 수 있다.
- [0139] 본 발명의 항종양제는 종래 알려진 항체약과 동일한 방법으로 투여할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 항종양제는 경구 투여, 정맥내 투여, 피하 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0140] 본 발명의 항종양제 중 본 발명의 항체 또는 이의 단편의 배합량은 특별히 한정되지 않으며, 투여 대상의 상태나 얻고자 하는 효과 등에 따라 적절하게 설정할 수 있다.
- [0141] 본 발명의 항종양제의 투여 대상은 특별히 한정되지 않으며, 포유류(인간, 비인간 동물) 등을 들 수 있다. 비인간 동물로는 원숭이 등을 들 수 있다.
- [0142] 본 발명의 항종양제에는 본 발명의 효과를 저해하지 않는 범위에서, 본 발명의 항체 또는 이의 단편 이외의, 의약품에 대한 배합 성분으로서 알려진 임의의 성분이 배합될 수 있다. 이러한 성분의 양이나 종류는 얻고자 하는 효과 등에 따라 적절하게 설정할 수 있다.
- [0143] 본 발명의 항종양제에는 본 발명의 항체 또는 이의 단편 이외의 약효 성분이 포함될 수도 있고 포함되지 않을 수도 있다.
- [0144] 본 발명의 항종양제는 본 발명의 항체 또는 이의 단편 이외의 약효 성분과 병용해서 사용해도 된다. 이러한 약효 성분은 본 발명의 항체 또는 이의 단편 이외의 것과 함께 배합된 단일제로 해서 투여해도 되고, 본 발명의 항체 또는 이의 단편 이외의 것과 별도제로 제조하여 본 발명의 항종양제와 병용 투여해도 된다.
- [0145] 본 발명의 항체 또는 이의 단편과 병용될 수 있는 바람직한 약효 성분으로는 면역 관문 저해제를 들 수 있다.
- [0146] 면역 관문 저해제로는 항PD-1 항체, 항PD-L1 항체, 항CTLA4 항체 등을 들 수 있다.
- [0147] 본 발명은 본 발명의 항종양제를 이용한 암의 치료방법을 포함한다.
- [0148] **실시예**
- [0149] 이하, 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이러한 실시예들에 한정되는 것은 아니다.
- [0150] <시험 1: MerTK에 대한 단클론 항체의 수립>
- [0151] 다음 방법에 따라 MerTK에 대한 단클론 항체를 획득하였다.
- [0152] (1-1) 인간 MerTK 발현 벡터의 구축
- [0153] 인간 MerTK 단백질의 아미노산 서열(UniProt 번호: Q12866)에 기초하여 5'-말단에 Kozak 번역 개시 서열, 3'측에 번역 종결 코돈을 삽입한 DNA를 유전자 합성하였다(GENEWIZ사의 서비스를 이용).
- [0154] "In-Fusion HD Cloning Kit"(타카라바이오)를 이용해서, 합성한 DNA를 "pcDNA3.4"(쓰모 피셔 사이언티픽)의 클로닝 사이트에 삽입하여 인간 MerTK 발현 벡터를 얻었다.
- [0155] (1-2) 마우스 MerTK 발현 벡터의 구축
- [0156] 마우스 MerTK 단백질의 아미노산 서열(UniProt 번호: Q60805)에 기초하여 상기 인간 MerTK 발현 벡터와 동일한 방법으로 마우스 MerTK 발현 벡터를 얻었다.
- [0157] (2-1) 인간 MerTK 마우스 Fc 융합 단백질의 발현과 정제

- [0158] 인간 MerTK 마우스 Fc 융합 단백질(이하, "hMerTKECD-mFc"라고도 함)로서, 인간 MerTK 단백질(UniProt 번호 Q12866)의 1번부터 505번째 아미노산과, 마우스 IgG2a 중쇄(UniProt 번호 P01863)의 114번부터 330번째 아미노산을 융합시킨 단백질을 설계하였다. 이 아미노산 서열을 바탕으로 발현 벡터를 구축하여 hMerTKECD-mFc 발현 벡터를 얻었다.
- [0159] 이어서, hMerTKECD-mFc 발현 벡터를 도입 플라스미드로 해서 "Expi293 expression system"(쓰모 피서 사이언티픽)을 이용해서 일시적 발현을 실시하였다.
- [0160] 일시적 발현 후 배양 상청을 회수하고, "HiTrap ProteinGHP 칼럼"(사이티바)을 이용한 친화성 정제를 실시하였다.
- [0161] 친화성 정제한 용출액을 농축하고 "Sephadex 200pg 16/60"(사이티바)를 이용한 겔 여과 정제를 실시하였다.
- [0162] 겔 여과 정제의 용출 분획을 SDS-PAGE법으로 밴드를 확인하고, 밴드가 확인된 프랙션을 회수하여 hMerTKECD-mFc로 사용하였다.
- [0163] (2-2) 마우스 MerTK 마우스 Fc 융합 단백질의 발현과 정제
- [0164] 마우스 MerTK 마우스 Fc 융합 단백질(이하, "mMerTKECD-mFc"라고도 함)로서, 마우스 MerTK 단백질(UniProt 번호 Q60805)의 1번부터 497번째 아미노산과, 마우스 IgG2a 중쇄(UniProt 번호 P01863)의 114번부터 330번째 아미노산을 융합시킨 단백질을 설계하였다. 이 아미노산 서열을 바탕으로 상기 hMerTKECD-mFc 조제방법과 동일한 방법으로 단백질의 발현 및 정제를 실시하여 mMerTKECD-mFc를 얻었다.
- [0165] (3-1) 인간 MerTK 안정 발현 EL4 세포의 구축
- [0166] 인간 MerTK 발현 벡터를 도입 플라스미드로 하고 "Nucleofector"(Lonza)를 이용해서 마우스 림프종 세포주 EL4에 유전자 도입을 실시하였다.
- [0167] 유전자 도입 후, 배지에 "G418"(나카라이테스크)을 첨가하고, 세포를 96-웰 플레이트에 파종하여 배양하였다.
- [0168] 배양 후, G418 내성적인 증식이 보여진 세포에 대해, 항-인간 MerTK 항체(R&D systems, MAB8912)를 이용한 유세포 분석(flow cytometry)을 통해 인간 MerTK의 발현을 확인하였다. 최종적으로 단클론 유래 세포주를 선택하고 이것을 인간 MerTK 안정 발현 EL4 세포(이하, "hMerTK-EL4"라고도 함)로 아래 시험에 사용하였다.
- [0169] (3-2) 마우스 MerTK 안정 발현 BaF/3 세포의 구축
- [0170] 마우스 MerTK 발현 벡터를 도입 플라스미드로 하고 "Nucleofector"(Lonza)를 이용해서 마우스 pro-B 세포주 Ba/F3에 유전자 도입을 실시하였다.
- [0171] 유전자 도입 후, 배지에 "G418"(나카라이테스크)을 첨가하고, 세포를 96-웰 플레이트에 파종하여 배양하였다.
- [0172] 배양 후, G418 내성적인 증식이 보여진 세포에 대해, 항-마우스 MerTK 항체(R&D systems, AF591)를 이용한 유세포 분석을 통해 마우스 MerTK의 발현을 확인하였다. 최종적으로 단클론 유래 세포주를 선택하고 이것을 마우스 MerTK 안정 발현 BaF/3 세포(이하, "mMerTK-Ba/F3"라고도 함)로 아래 시험에 사용하였다.
- [0173] (4) MerTK에 대한 단클론 항체의 제작
- [0174] 아래의 두 가지 방법에 따라 MerTK 정제 단백질, 또는 MerTK 안정 발현 세포를 MerTK 유전자 결핍 마우스(The Jackson Laboratory, B6; 129-MerTK<tm1G41>/J)에 면역시켰다.
- [0175] 면역 후, 단리한 림프절 세포를 이용해서 MerTK에 대한 단클론 항체를 제작하였다.
- [0176] (면역방법-1)
- [0177] 항원으로 hMerTKECD-mFc 및 mMerTKECD-mFc(모두 MerTK 정제 단백질)을 사용 하였다.
- [0178] 각 항원을 아쥘반트(adjuvant) "TiterMaxGold"(TiterMax)와 혼합하고, 마우스 1마리당 항원 투여량이 100 µg이 되도록 죽저 정맥 투여를 실시하였다. 투여 후 7일째 및 10일째에 마우스 1마리당 항원 투여량을 10 µg로 설정한 점 외에는 상기와 동일하게 추가 면역을 실시하였다.
- [0179] 면역 종료 후, 마우스로부터 슬와 림프절을 채취하여 세포 현탁액을 조제한 후, 이것을 SP2/0-Ag14 골수종 세포와 혼합하고 전기식 세포 융합 장치("ECFG21", 네파진)에 의한 전기식 세포 융합을 실시하였다.

- [0180] 융합 후 세포를 "ClonaCell™-HY Medium D"("ST-03804", STEMCELL)에 현탁하고 플라스틱 페트리 샬레에 과종하였다.
- [0181] 과종 후 8 내지 10일 후에 형성된 콜로니를, 하이브리도마용 배지를 분주한 96-웰 플라스틱 플레이트 내에 단리하고, 그 배양 상청을 하기 평가에 사용하였다.
- [0182] 또한 하이브리도마용 배지로는 RPMI1640("A1049101", 써모 피셔 사이언티픽)에 대해 1/50량의 "Nutridom-CS"("11363743001", 머크) 및 1/50량의 "HAT Supplement"("21060017", 써모 피셔 사이언티픽)을 첨가한 것을 사용하였다.
- [0183] (면역방법-2)
- [0184] 항원으로 hMerTK-EL4 및 mMerTK-Ba/F3(모두 MerTK 안정 발현 세포)를 사용 하였다. 이들 세포는 PBS의 현탁용액으로서 조제하였다.
- [0185] 각 항원을 아쥘반트 "TiterMaxGold"(TiterMax)와 혼합하고, 마우스 1마리당 항원 투여량이 1×10^7 개(세포수)가 되도록 죽저 정맥 투여를 실시하였다. 투여 후 7일째 및 10일째에 마우스 1마리당 항원 투여량을 1×10^5 개로 설정하고 복강내 투여한 점 외에는 상기와 동일하게 추가 면역 실시하였다.
- [0186] 면역 종료 후, 상기 (면역방법-1)과 동일한 방법으로 배양 상청을 얻어 하기 평가에 사용하였다.
- [0187] (5) 항체 스크리닝
- [0188] 상기에서 얻어진 각 배양 상청을 이용해서 인간 및 마우스의 MerTK에 결합능을 갖는 하이브리도마 클론을 스크리닝하였다.
- [0189] 구체적으로는 인간 MerTK를 내재적으로 발현하는 인간 흑색종 균주 G361, 및 mMerTK-Ba/F3을 이용해서 유세포 분석에 의한 항체 결합성 평가를 실시하였다.
- [0190] 약 15,000 클론을 스크리닝한 결과, 인간 및 마우스 MerTK에 대한 결합능을 갖는 하이브리도마 클론이 76 클론 얻어졌다.
- [0191] <시험 2: 항체 평가>
- [0192] 상기에서 얻어진 하이브리도마 클론을 아래 각 평가에 제공하여 MerTK에 대한 단클론 항체로서의 기능을 확인하였다.
- [0193] (1) 인산화 저해 활성
- [0194] 아래 방법에 따라 각 클론에 대해 MerTK 인산화 저해 활성을 평가하였다. 상기 활성이 높을수록 MerTK에 대한 결합능이 높은 것을 의미한다.
- [0195] (방법)
- [0196] 인간 MerTK 안정 발현 세포(hMerTK-EL4)를 10% FBS를 포함하는 "DMEM high glucose 배지"(Thermo Fisher Scientific)에서 배양하였다.
- [0197] 배양 후, 세포를 PBS로 세척하고 무혈청 배지에 현탁하여 1×10^6 cells/well이 되도록 96-웰에 과종하고 37°C에 3시간 인큐베이션하였다.
- [0198] 인큐베이션 후, 각 클론을 첨가하여 1시간 반응시키고 200nM 인간 Gas6(R&D systems)로 10분간 자극하고 hMerTK-EL4를 원심 분리하여 회수하였다.
- [0199] 회수한 hMerTK-EL4를 세포 용해액에 용해하고, 얻어진 용해액 중 인산화 MerTK 단백질의 양을 "Human Phospho-Mer DuoSet IC ELISA"(R&D systems)를 이용해서 측정하였다.
- [0200] 또한 세포 용해액으로는 Milli-Q 물에 1%의 "IGEPAL CA-630"(SIGMA), 1x농도분의 "Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Inhibitor Cocktail"(Thermo Fisher Scientific)을 첨가한 것을 사용하였다.
- [0201] [결과]

- [0202] 76 클론 중 14 클론에서 인산화 저해 활성이 보여졌다.
- [0203] 상기 14 클론 중 특히 높은 저해 활성을 나타낸 클론으로서 "20A77" 및 "24A1"을 선발하여 아래 시험에 제공하였다.
- [0204] 이들 클론의 인산화 저해 활성을 도 1에 나타내었다. 도 1에 도시된 바와 같이 "20A77" 및 "24A1"은 각각 농도 의존적으로 Gas6와 MerTK의 결합, 및 MerTK의 인산화를 저해하고 MerTK에 대한 결합능이 높다는 것을 알 수 있었다.
- [0205] (2) 항체 서열 해석
- [0206] 아래 방법에 기초하여 "20A77" 및 "24A1" 각각에 대해 그 면역 글로불린 유전자 가변영역의 서열 해석을 실시하였다.
- [0207] 하이브리도마 세포를 확대 배양하고 "RNeasy mini kit"(Qiagen)로 RNA를 추출하고, "SuperScript III First-Strand Synthesis Super mix"(Invitrogen)에 의한 cDNA 합성을 실시하였다.
- [0208] 합성한 cDNA를 템플레이트로 사용하고 PCR법으로 항체 가변영역 서열을 증폭하였다. 또한 중쇄 및 경쇄 모두 가변영역 상류 및 불변영역 하류를 인식하는 프라이머를 사용해서 증폭시켰다.
- [0209] 얻어진 DNA 단편을 "ZeroBlunt TOPO TA Cloning and Sequencing kit"(ThermoFisher Scientific)의 키트에 첨부된 벡터에 클로닝하여 DNA 서열 해석을 실시하였다.
- [0210] 얻어진 항체 서열에 대해 kabat 등의 방법(Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991)에 따라 CDR 영역을 결정하였다.
- [0211] 해석된 항체 서열 및 그 CDR 영역 서열의 개요를 하기 표 7에 나타내었다.
- [0212] 또한 아래 표에 기재된 약호는 아래의 의미를 갖는다.
- [0213] VH: 중쇄 가변영역
- [0214] CDRH: 중쇄 CDR
- [0215] VL: 경쇄 가변영역
- [0216] CDRL: 경쇄 CDR

표 7

	VH	CDRH 1	CDRH 2	CDRH 3	VL	CDRL 1	CDRL 2	CDRL 3
20A77	서열 번호 1	서열 번호 2	서열 번호 3	서열 번호 4	서열 번호 5	서열 번호 6	서열 번호 7	서열 번호 8
24A1	서열 번호 9	서열 번호 10	서열 번호 11	서열 번호 12	서열 번호 13	서열 번호 14	서열 번호 15	서열 번호 16

- [0217]
- [0218] (3) 재조합 마우스 항체의 제작 및 항체 서열 변경
- [0219] 표 7에 기재된 각 항체 서열과, 마우스 IgG1 중쇄 및 κ 경쇄 또는 마우스 IgG2a 중쇄 및 κ 경쇄를 연결하고, 마우스 IgG1 및 마우스 IgG2a 항체 유전자 서열을 설계하였다. 설계한 항체 서열을 바탕으로 발현 벡터를 구축하여 항체 발현 벡터를 얻었다.
- [0220] 항체 발현 벡터를 도입 플라스미드로 하고 "Expi293 expression system"(Thermo Fisher Scientific)을 이용해서 일시적 발현을 실시하였다.
- [0221] 일시적 발현을 실시한 배양 상청을 회수하여 "Ab-Capcher ExTra 칼럼"(프로테노마)을 이용한 친화성 정제를 실시하였다.
- [0222] 친화성 정제한 용출액을 농축하여 히스티딘 버퍼(1% Histidine, pH 6.0)을 완충액으로 사용하고,

"Sephadex200pg 16/60"(싸이티바)을 이용한 겔 여과 정제를 실시하였다.

- [0223] 겔 여과 정제의 용출 분획에 대해 SDS-PAGE법으로 밴드를 확인하였다. 밴드가 확인된 프랙션을 회수하여 "20A77" 및 "24A1"의 마우스 IgG1형 항체 및 마우스 IgG2a형 항체를 얻었다(각각 "20A77_mIgG1", "20A77_mIgG2a", "24A1_mIgG1", "24A1_mIgG2a"라고도 함).
- [0224] 또한 CDR 영역의 아미노산 변형을 시도하였다. 서열 변형의 도입 부위는 도 2에 도시한 바와 같고, CDR 영역 내에 존재하는 절단 반응 및 탈아미노화 반응을 받을 가능성이 높은 서열에 대해 실시하였다. CDR의 서열 변형을 실시한 항체를 "m20A77"이라고도 한다. 그 서열 정보를 하기 표 8에 기재하였다.
- [0225] 또한 "m20A77"에 대해서도 상기와 동일한 방법으로 마우스 IgG1형 항체(" m20A77_mIgG1"이라고도 함)를 얻었다.

표 8

	VH	CDRH1	CDRH2	CDRH3	VL	CDRL1	CDRL2	CDRL3
m20A77	서열 번호 17	서열 번호 2	서열 번호 18	서열 번호 4	서열 번호 19	서열 번호 6	서열 번호 20	서열 번호 8

- [0226] (4) 각종 동물 유래 MerTK에 대한 교차 반응성
- [0227] 각종 동물(인간, 마우스, 게잡이원숭이, 랫트)에서 유래된 MerTK에 대한, 상기에서 얻어진 항체 클론의 교차 반응성을 ELISA법으로 확인하였다.
- [0228] ELISA법에서는 각종 동물(인간, 마우스, 게잡이원숭이, 랫트)에서 유래된 MerTK의 인간 Fc 융합 단백질을 항원으로 사용하였다. 구체적으로는 인간, 마우스 MerTK 항원으로는 "Recombinant Human Mer Fc Chimera Protein"(R&D systems) 및 "Recombinant Mouse Mer Fc Chimera Protein"(R&D systems)을 사용하였다. 게잡이원숭이 MerTK 및 랫트 MerTK 항원으로는 hMerTKECD-mFc나 mMerTKECD-mFc와 동일한 방법으로 제조된 게잡이원숭이 MerTKECD-hFc(이하, "cynoMerTKECD-hFc"라고도 함), 랫트 MerTKECD-hFc(이하, "ratMerTKECD-hFc"라고도 함)를 사용하였다.
- [0229] ELISA법은 아래의 방법으로 실시하였다.
- [0230] 먼저, 각 항원을 각각 ELISA 플레이트(Nunc)에 5 µg/ml 농도로 첨가하고 실온에서 하룻밤 고상시켰다.
- [0231] 고상액을 제거한 후, 블로킹 반응으로서 1% BSA/PBS를 첨가하고 실온에서 1시간 정치하였다.
- [0232] 블로킹 후 0.05% Tween20/PBS액으로 세척하고 1차 반응으로서 항체액을 실온에서 1시간 반응시켰다.
- [0233] 세척 후, 2차 반응으로서 HRP 표지 항체(GE Healthcare)를 1시간 동안 반응 시켰다. 세척 후, 발색 기질액으로서 TMB(Dako)를 첨가하여 발색시키고, 10분 후에 1N 황산을 첨가하여 반응을 정지하고 450nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0234] 도 3에 각종 동물에서 유래된 MerTK에 대한 "m20A77_mIgG1" 및 "m24A1_mIgG1"의 ELISA에서의 반응성을 나타낸다.
- [0235] 도 3에 도시된 바와 같이 "20A77" 및 "24A1" 모두 인간, 마우스, 게잡이원숭이 및 랫트의 항원에 거의 동일한 반응성을 보였다. 이러한 결과로부터 "20A77" 및 "24A1"은 모두 높은 중 교차 반응성을 갖는 것을 알 수 있었다.
- [0236] <시험 3: 본 발명 항체의 항종양 효과>
- [0237] 아래 방법에 따라 "20A77_mIgG2a"의 항종양 효과를 평가하였다. 평가 시에는 마우스 대장암 세포주 CT26(ATCC)를 이용한 동계 종양 모델을 사용하였다.
- [0238] 마우스(Balb/c)에 대해 1마리당 5×10⁶세포의 CT26을 마우스 우측 옆구리 피하에 이식하였다.
- [0239] 종양 이식 후 5일째에 그룹을 나누고 이소타입 컨트롤 항체인 mIgG2a 및 "20A77_mIgG2a"를 복강 내에 10mg/kg 용량으로 1주일에 2회 빈도로 투여하였다.

- [0241] 투여 후, 종양 사이즈를 주 2회 빈도로 계측을 시작하고, 종양 이식 후 19일째에 종료하였다. 또한 종양 사이즈는 캘리퍼스를 이용해서 종양의 단경과 장경을 각각 계측하고 아래 식을 통해 산출하였다.
- [0242] 종양 사이즈=(단경(mm))²×(장경(mm))×3.14/6
- [0243] 도 4 및 도 5에 평가 결과를 나타내었다. 이들 결과에 나타난 바와 같이 "20A77_mIgG2a"는 mIgG2a 투여군에 비해 유의하게 종양을 억제하였다.
- [0244] 또한 종양 이식 후 19일째에 종양을 채취하여 종양 침윤 림프구(TIL) 해석을 실시하였다.
- [0245] TIL 해석 시에는 먼저 종양 채취 후, "Tumor Dissociation kit, mouse"(밀테니 바이오테크) 유래 효소액과 함께 "gentleMACS C Tubes"(밀테니 바이오테크)에 종양 덩어리를 첨가하고 "gentleMACS Octo Dissociator"(밀테니 바이오테크)를 이용해서 종양 분산을 실시하였다.
- [0246] 종양 분산 후, 1% FBS/PBS로 세척한 후, 표 9에 기재된 유세포 분석(FCM) 해석용 항체를 이용해서 염색하였다. 염색 후, FACS calibur(BD)를 이용해서 FCM 해석을 실시하였다.
- [0247] 도 6에 "M1/M2 비"를 나타내었다. M1은 염증성 마크로파지를 나타내고, M2는 면역억제성 마크로파지를 나타낸다. M1/M2 비는 MerTK 저해에 의한 종양 미세환경의 특징적 변화를 나타내는 지표이다. 도 6에 도시된 바와 같이 "20A77_mIgG2a" 투여에 의해 M1/M2 비가 증가하고, 종양 미세환경이 항종양 환경으로 변화되고 있는 것으로 나타났다.

표 9

항체명	제조사	카탈로그 번호
FITC anti-mouse CD45 Antibody	Biolegend	103108
APC anti-mouse F4/80 Antibody	Biolegend	123115
FITC anti-mouse CD86 Antibody	Biolegend	105005
PE anti-mouse CD206 (MMR) Antibody	Biolegend	141705

- [0248]
- [0249] <시험 4: 본 발명 항체의 약효 용량>
- [0250] 아래 방법에 따라 "20A77_mIgG1" 및 "24A1_mIgG1"의 투여량에 따른 항종양 효과를 평가하였다. 평가 시에는 상기 "시험 3"과 마찬가지로 마우스 대장암 세포주 CT26(ATCC)를 이용한 동계 종양 모델을 사용하였다.
- [0251] "20A77_mIgG1" 투여군에서는 용매(1% Histidine buffer, pH 6.0) 및 "20A77_mIgG1"을 복강 내에 3, 10 또는 30mg/kg 용량으로 1주일에 2회 빈도로 투여하였다.
- [0252] "24A1_mIgG1" 투여군에서는 용매(1% Histidine buffer, pH 6.0) 및 "24A1_mIgG1"을 복강 내에 3, 5 또는 30mg/kg의 용량으로 1주일에 2회 빈도로 투여하였다.
- [0253] 종양 사이즈는 주 2회 빈도로 계측하였고 "20A77_mIgG1" 투여군에서는 종양 이식 후 19일째에, "24A1_mIgG1" 투여군에서는 종양 이식 후 22일째에 종료하였다.
- [0254] 도 7 내지 10에 평가 결과를 나타내었다.
- [0255] 도 7 및 8에 도시된 바와 같이 "20A77_mIgG1" 투여군에서는 모든 농도에서 용매 대조군에 비해 종양 증식 억제 효과가 인정되었다.
- [0256] 특히 3mg/kg 및 30mg/kg 투여군에서 유의한 억제 효과가 인정되었다.
- [0257] 도 9 및 10에 도시된 바와 같이 "24A1_mIgG1" 투여군에서는 용매 대조군에 비해 특히 5mg/kg 및 30mg/kg 투여군

에서 유의하게 종양 증식을 억제하였다.

- [0258] <시험 5: 본 발명의 항체 및 항PD-1 항체의 병용 투여에 따른 항종양 효과>
- [0259] 아래 방법에 따라 "20A77_mIgG1" 및 "24A1_mIgG1"과, 항PD-1 항체의 병용에 따른 항종양 효과를 평가하였다. 평가 시에는 상기 "시험 3"과 마찬가지로 마우스 대장암 세포주 CT26(ATCC)를 이용한 동계 종양 모델을 사용하였다.
- [0260] 항PD-1 항체는 항종양 효과를 갖는 것으로 알려져 있다.
- [0261] 각 투여군에는 아래 항체를 1주일에 2회 빈도로 투여하였다. 투여는 종양 이식 후 19일째까지 실시하였다.
- [0262] "mIgG1": "mIgG1"을 5mg/kg
- [0263] "m20A77": "20A77_mIgG1"을 3mg/kg
- [0264] "24A1": "24A1_mIgG1"을 5mg/kg
- [0265] "αPD-1": 항-마우스 PD-1 항체("29F. 1A12", BioXcell)를 0.3mg/kg
- [0266] "m20A77 + αPD-1": "m20A77_mIgG1"과 항-마우스 PD-1 항체를 각각 3mg/kg, 0.3mg/kg
- [0267] "24A1 + αPD-1": "24A1_mIgG1"과 항-마우스 PD-1 항체를 각각 5mg/kg, 0.3mg/kg
- [0268] 도 11 및 12에 평가 결과를 나타내었다.
- [0269] 이들 도면에 도시된 바와 같이 "20A77_mIgG1"은 PD-1 항체와의 병용에 의해 항종양 효과가 증강되는 경향이 있었다.
- [0270] 또한 "24A1_mIgG1"은 PD-1 항체와 병용함에 따라 항종양 효과가 증강되었다.
- [0271] 이상으로부터, 본 발명의 항체는 항PD-1 항체와 병용함으로써 항종양 효과가 증강되는 것을 알 수 있었다.
- [0272] <시험 6: 각종 리간드 결합 저해능 평가>
- [0273] "20A77" 및 "24A1"을 이용해서 MerTK의 각종 리간드 결합 저해능을 평가하였다.
- [0274] MerTK의 리간드로는 인간 Gas6(R&D systems) 및 인간 TULP1(abcam)을 사용하였고, 각각 "Biotin Labeling Kit-NH"(Dojindo)를 사용해서 비오틴 표지를 실시하였다.
- [0275] Gas6는 항종양 효과와 관계된 리간드이며, MerTK와 Gas6의 결합 저해 활성을 갖는 항체는 항종양 효과를 발휘할 수 있다.
- [0276] TULP1은 안독성과 관계된 리간드이며, MerTK와 TULP1의 결합 저해 활성을 갖는 항체는 안독성을 가질 수 있다.
- [0277] 따라서, Gas6와의 결합 저해 활성이 높으면서 TULP1과의 결합 저해 활성이 낮은 항체는 안독성이 낮은 항종양제로 유효할 수 있다.
- [0278] 리간드 결합 저해 시험은 아래와 같이 실시하였다.
- [0279] 먼저, ELISA용 플레이트(Nunc)에 인간 MerTK(R&D systems)를 5 μg/ml 농도로 첨가하고 실온에서 하룻밤 고상시켰다. 고상액을 제거한 후, 블로킹 반응으로서 1% BSA/PBS를 첨가하고 실온에서 1시간 정치하였다.
- [0280] 블로킹 후, 0.05% Tween20/PBS액으로 세척하고, 1차 반응으로서 항체액을 실온에서 1시간 반응시켰다.
- [0281] 세척 후, 2차 반응으로서, 비오틴화 Gas6 또는 비오틴화 TULP1을 각각 10nM 또는 40nM 농도로 첨가하고 실온에서 1시간 반응시켰다.
- [0282] 세척 후, 3차 반응으로서 HRP 표지된 스트렙타비딘(씨모 피셔 사이언티픽)을 30분간 반응시켰다.
- [0283] 세척 후, 발색 기질액으로서 TMB(Dako)를 첨가하여 발색시키고, 20분 후 1N 황산을 첨가하여 반응을 정지하고 450nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0284] 도 13 및 14에 평가 결과를 나타내었다.
- [0285] 이들 도면에 도시된 바와 같이 양성 대조(항-염소 MerTK 다클론 항체)는 Gas6 및 TULP1 모두에 대해 MerTK와의 결합을 저해하였다.

- [0286] 반면, "20A77" 및 "24A1"은 Gas6와 MerTK의 결합은 저해했지만 TULP1과 MerTK의 결합은 저해하지 않았다.
- [0287] 이상으로부터, 본 발명의 항체는 양호한 항종양 효과를 가지면서 안독성이 낮은 항체일 수 있음을 알 수 있었다.
- [0288] 또한 다수의 항-MerTK 항체에 대해 상기와 마찬가지로 리간드 결합 저해능을 평가하였다. 그 결과의 일부를 도 15 및 16에 나타내었다.
- [0289] 그러나 거의 모든 항체가 Gas6와 MerTK의 결합, 및 TULP1과 MerTK의 결합을 모두 저해하였다.
- [0290] Gas6와 MerTK의 결합을 강하게 저해하면서 TULP1과 MerTK의 결합을 저해하지 않는 항체는 "20A77" 및 "24A1"뿐이었다.
- [0291] <시험 7: in vivo 안독성 시험에 의한 안독성 검증>
- [0292] 상기 "시험 6"에서 확인된 결과에 기초하여, 아래 방법에 따라 본 발명의 항체에 의한 in vivo에서의 안독성에 대해 검증하였다.
- [0293] 안독성 시험은 마우스(Balb/c)를 이용해서 실시하였다.
- [0294] 각 마우스에 "20A77_mIgG1", "24A1_mIgG1" 또는 이소타입 컨트롤 항체(mIgG1)를 10mg/kg 용량으로 1주일에 2회 빈도로 정맥내 투여하였다.
- [0295] 안독성 양성 대조로서, MerTK 저분자 저해제인 UNC569를 150mg/kg 용량으로 10일간 경구 투여하였다.
- [0296] 첫회 투여 후 29일째에 눈을 적출하여 카르노프스키 고정을 실시하고, 어플라이드 메디컬 리서치에 위탁하여 수지 포매 및 절편 제작, 톨루이딘 블루 염색(이하, "TB 염색"이라고도 함)을 실시하였다. TB 양성 과립의 증가는 눈의 이상 소견이 진행되고 있음을 의미한다.
- [0297] TB 염색 후의 절편 사진을 도 17 및 18에 나타내었다.
- [0298] 도 17과 같이 UNC569 투여군에서는 망막 색소 상피층에 TB 양성 과립 증가가 인정되었다(화살표 부위).
- [0299] 반면, "20A77_mIgG1" 또는 "24A1_mIgG1"을 투여한 군에서는 TB 양성 과립 증가는 인정되지 않았다.
- [0300] 또한 도 18과 같이 모든 투여군에서 외과립층 위축(눈의 시력 저하와 상관성이 인정된 이상 소견)은 인정되지 않았다.
- [0301] 이상으로부터, 본 발명의 항체는 항종양 효과를 발휘하는 한편 안독성에 대한 우려가 적은 항체임이 시사되었다.
- [0302] <시험 8: in vivo 안독성 시험에 의한 독성 용량 검증>
- [0303] 상기 "시험 7"에서 확인된 결과에 기초하여, 아래 방법에 따라 본 발명 항체의 독성 용량에 대해 검증하였다.
- [0304] 안독성 시험은 마우스(Balb/c)를 이용해서 실시하였다.
- [0305] 각 마우스에 용매 또는 "m20A77_mIgG1"을 3 또는 10mg/kg 용량으로 1주일에 2회 빈도로 정맥내 투여하였다.
- [0306] 첫회 투여 후 30일째에 눈을 적출하여 카르노프스키 고정을 실시하고, 어플라이드 메디컬 리서치에 위탁하여 수지 포매 및 절편 제작, TB 염색을 실시하였다.
- [0307] TB 염색 후의 절편 사진을 도 19 및 20에 나타내었다.
- [0308] 도 19와 같이 모든 투여군에서 TB 양성 과립 증가는 인정되지 않았다. 한편, 도 20과 같이 용매 대조군, 3mg/kg, 10mg/kg 모든 투여군에서 이상 소견인 외과립층 위축은 인정되지 않았다.
- [0309] <시험 9: 인간화 항체의 제작>
- [0310] "m20A77" 및 "24A1"에 대해, 마우스 중쇄 및 경쇄 가변영역과, 인간 IgG1 중쇄 및 κ 경쇄 불변영역의 키메라 항체(이하, "인간 키메라 항체"라고도 함)를 제작하였다. 인간 키메라 항체는 상기 "(3) 재조합 마우스 항체의 제작 및 항체 서열 변경"과 동일한 방법으로 제작하였다.
- [0311] 얻어진 인간 키메라 항체에 대해 아래 방법에 따라 항체 서열 인간화를 실시하였다.
- [0312] 먼저, 각 항체 가변영역의 서열에 대해 CDR 이식법에 따른 인간화를 실시하였다. 인간화 서열의 설계는

Tsurushita 등(2005. Design of humanized antibodies: From anti-Tac to Zenapax. Methods 36: 69-83.)의 방법을 참고로 실시하였다.

[0313] 이어서, 마우스 항체의 3차원 분자 모델을 정범으로 작성하였다. 이 분자 모델을 바탕으로 프레임워크 영역의 아미노산 서열 중에서 CDR의 구조 형성에 중요하다고 생각되는 잔기, 및 항원과의 반응에 필수라고 생각되는 잔기를 추정하였다.

[0314] 이러한 작업과 병행하여, 인간 항체 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 cDNA 서열 데이터베이스 중에서 각 항체의 중쇄 가변영역, 경쇄 가변영역에 상동성이 높은 서열을 검색하였다.

[0315] 검색한 인간 항체 서열의 프레임워크 부분의 서열과 각 항체의 CDR 서열을 연결한 서열을 설계하고, 거기에 CDR 구조 형성 또는 항원과의 반응에 필수라고 생각된 잔기의 서열을 추가로 이식하여 표 10에 기재된 인간화 항체 서열 "hz20A77" 및 "hz24A1"을 설계하였다.

[0316] 또한 인간화 항체 서열이 갖는 CDR 서열은 근원이 된 마우스 항체의 것과 동일하다.

표 10

	VH	CDRH 1	CDRH 2	CDRH 3	VL	CDRL 1	CDRL 2	CDRL 3
hz20A77	서열 번호 21	서열 번호 2	서열 번호 18	서열 번호 4	서열 번호 22	서열 번호 6	서열 번호 20	서열 번호 8
hz24A1	서열 번호 23	서열 번호 10	서열 번호 11	서열 번호 12	서열 번호 24	서열 번호 14	서열 번호 15	서열 번호 16

[0317]

설계된 항체는 아래와 같이 제작되었다.

[0318]

[0319] 중쇄 가변영역의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 서열은 α-락토알부민 시그널 펩티드를 접속한 후, LALA 서열을 도입한 인간 IgG1 불변영역(이하, "hIgG1LALA"라고도 함)과 함께 pcDNA3.4 벡터에 "In-Fusion HD Cloning Kit"(타카라바이오)를 이용해서 클로닝하였다.

[0320]

[0320] 경쇄 가변영역의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 서열은 중쇄 가변영역과 마찬가지로 α-락토알부민 시그널 펩티드를 접속한 후, 인간 Igκ 불변영역과 함께 pcDNA3.4 벡터에 "In-Fusion HD Cloning Kit"(타카라바이오)를 이용해서 클로닝하였다.

[0321]

[0321] 이어서, 항체를 상기 "(3) 재조합 마우스 항체의 제작 및 항체 서열 변경" 과 동일한 방법으로 제작하였다.

[0322]

[0322] 제작된 항체에 대해 ELISA법으로 항원 결합 활성을 확인하였다. 그 결과를 도 21에 나타내었다.

[0323]

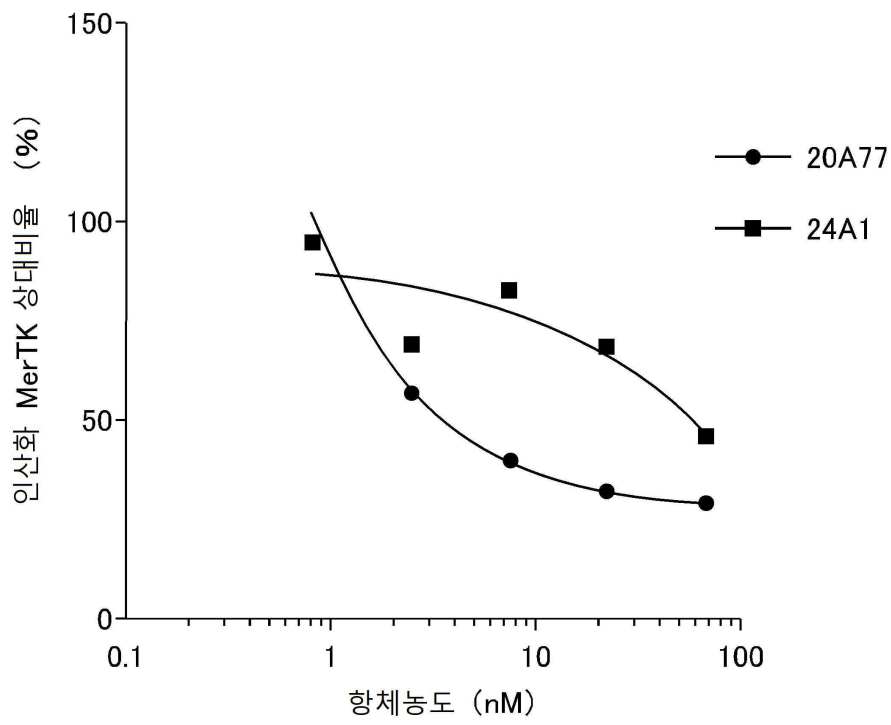
[0323] 도 21에 도시된 바와 같이, 얻어진 인간화 항체("hz20A77_hIgG1LALA" 및 "hz24A1_hIgG1LALA")는 모두 근원이 된 인간 키메라 항체("m20A77_hIgG1LALA" 및 "24A1_hIgG1LALA")와 동일 정도 또는 그 이상의 반응성을 나타냈다.

[0324]

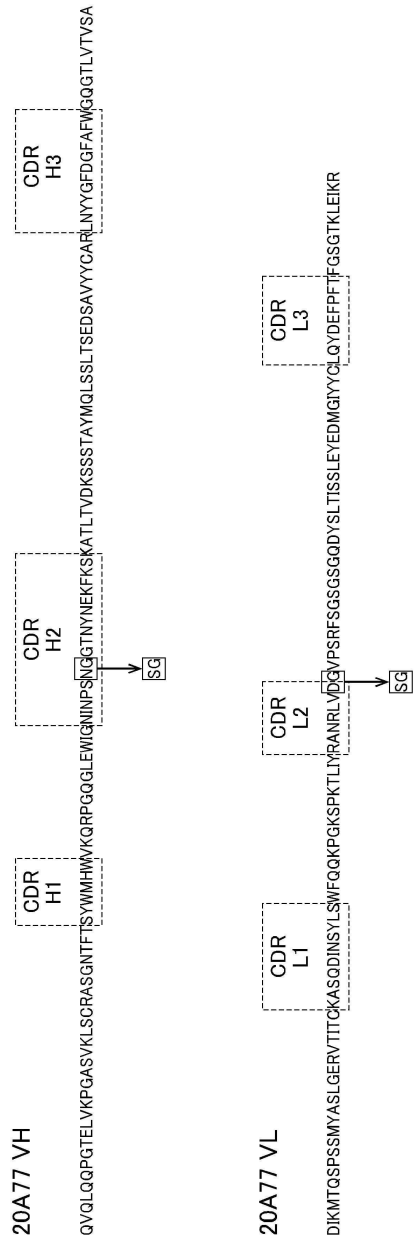
[0324] 이러한 결과로부터, 제작된 인간화 항체군은 인간 MerTK에 대한 반응성을 충분히 갖는 것으로 나타났다.

도면

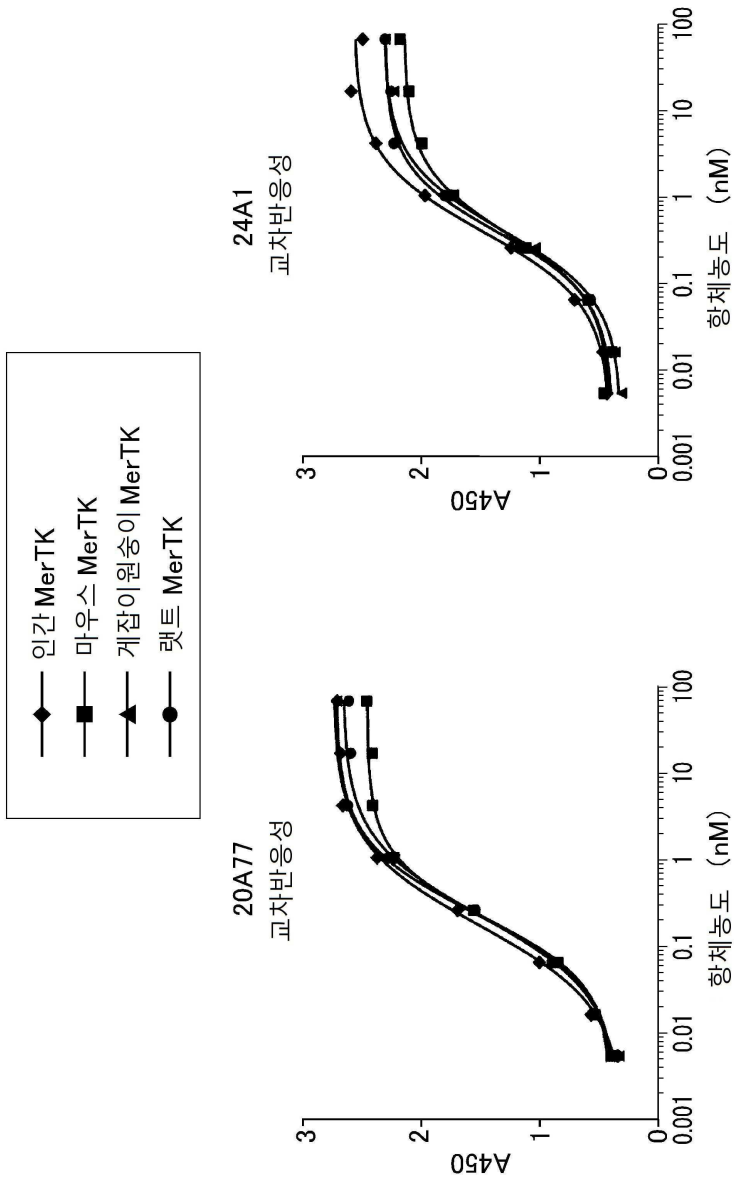
도면1



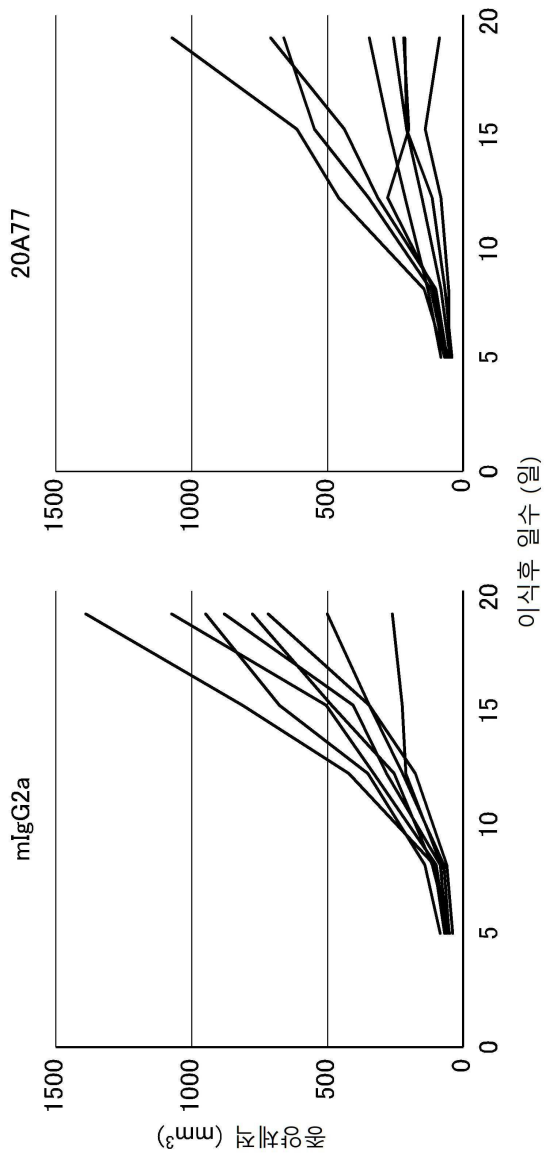
도면2



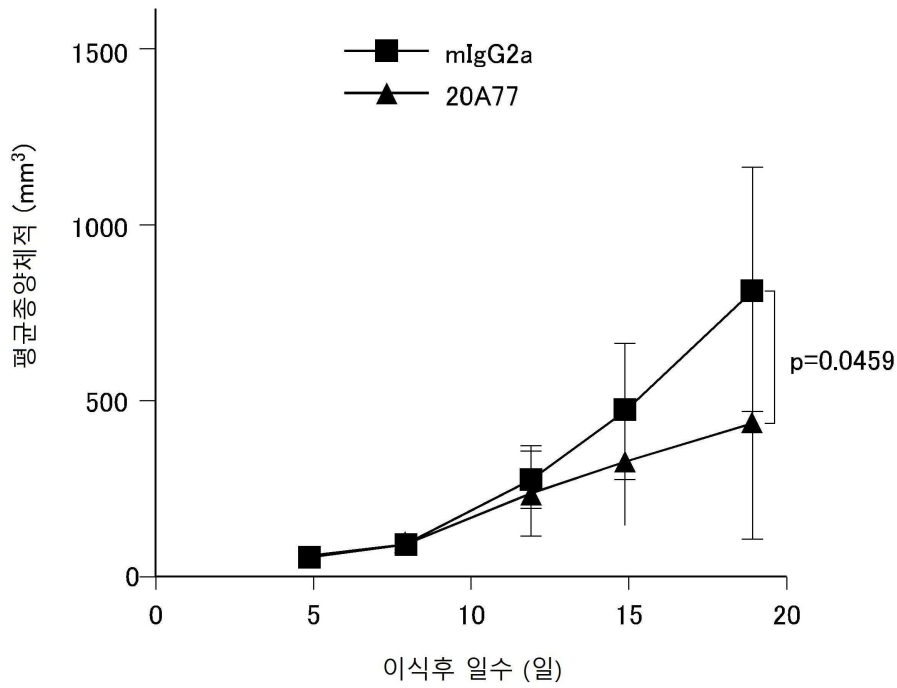
도면3



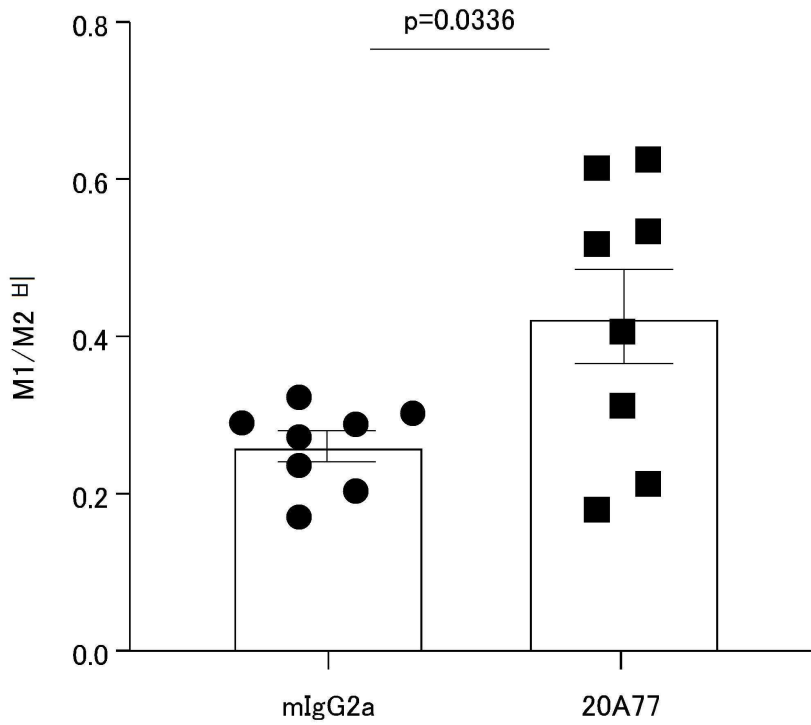
도면4



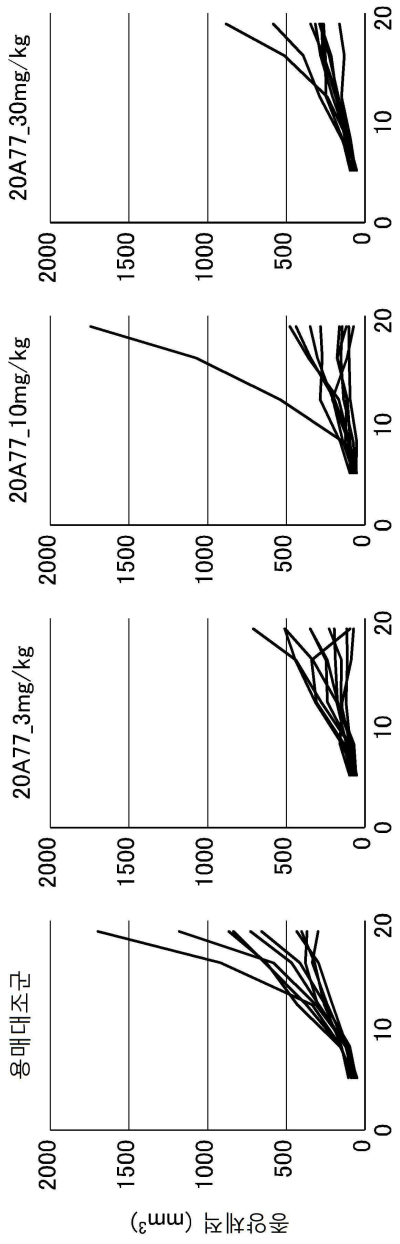
도면5



도면6

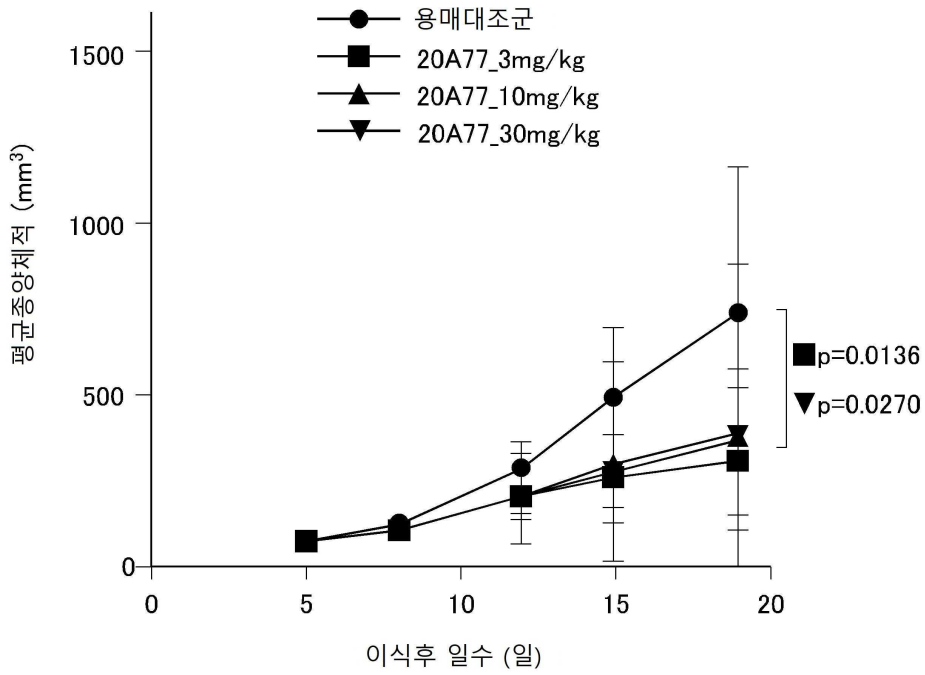


도면7

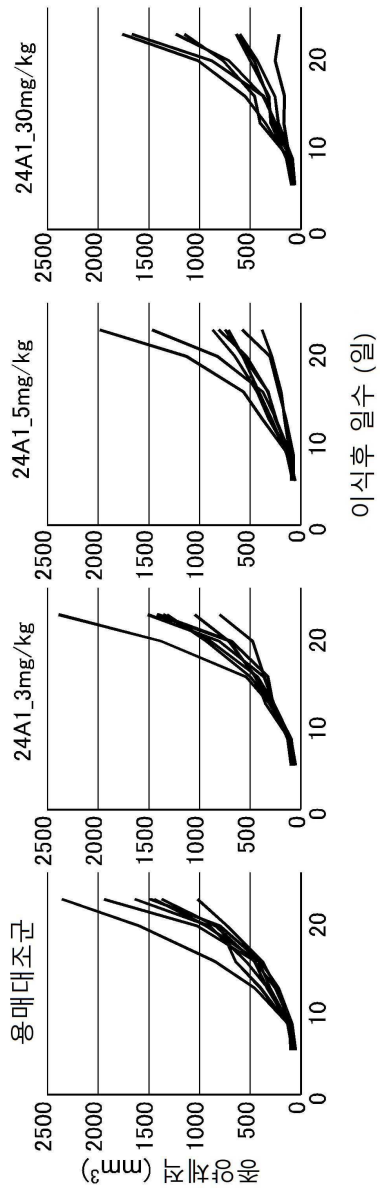


이식후 일수 (일)

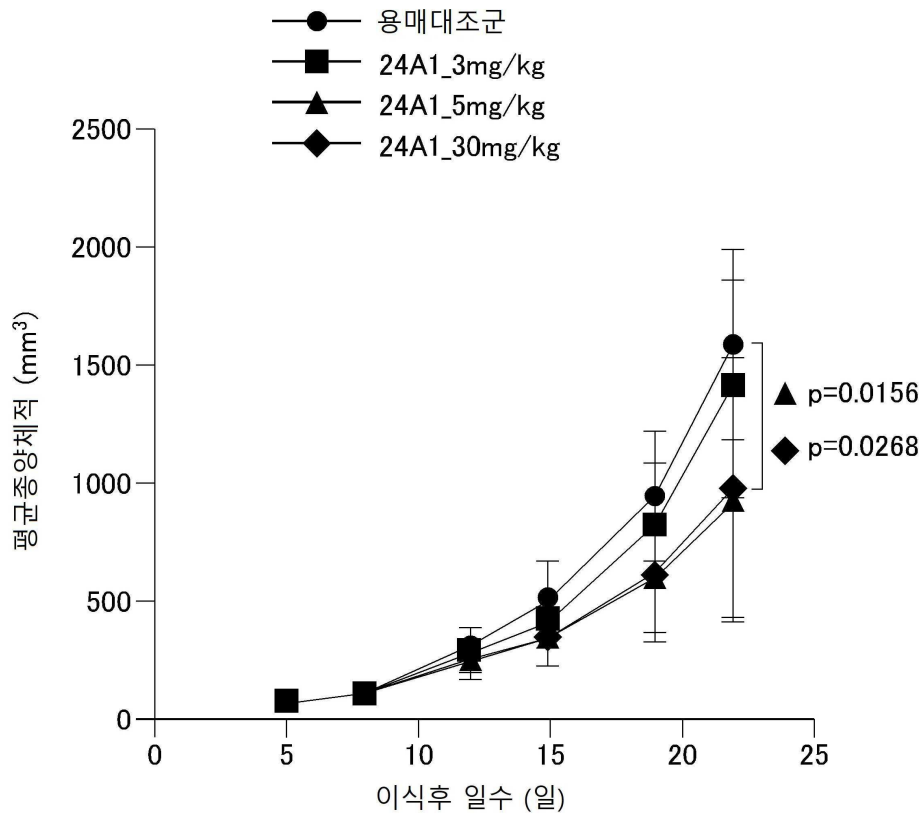
도면8



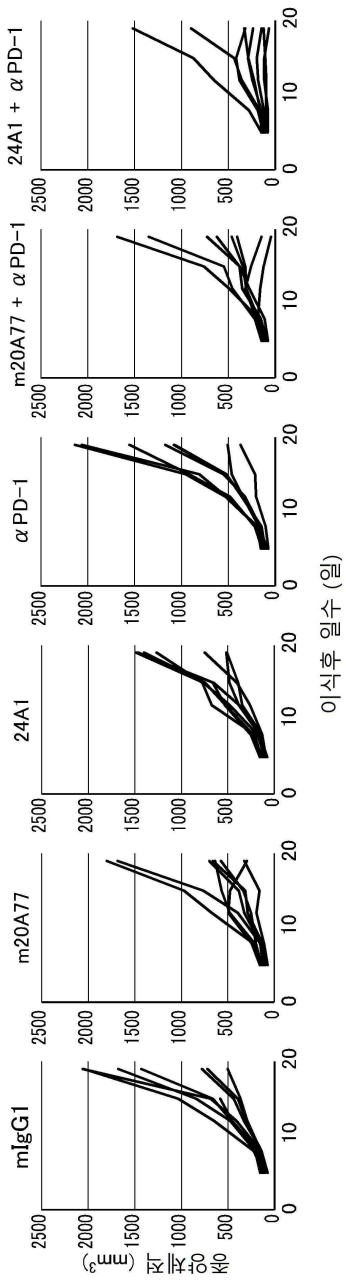
도면9



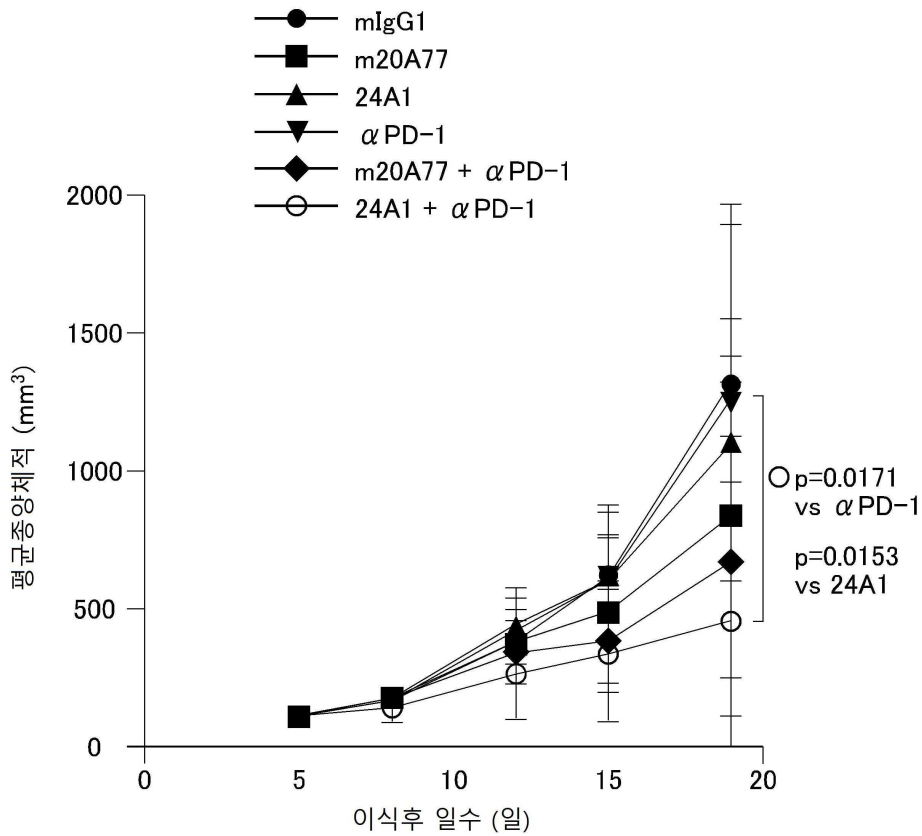
도면10



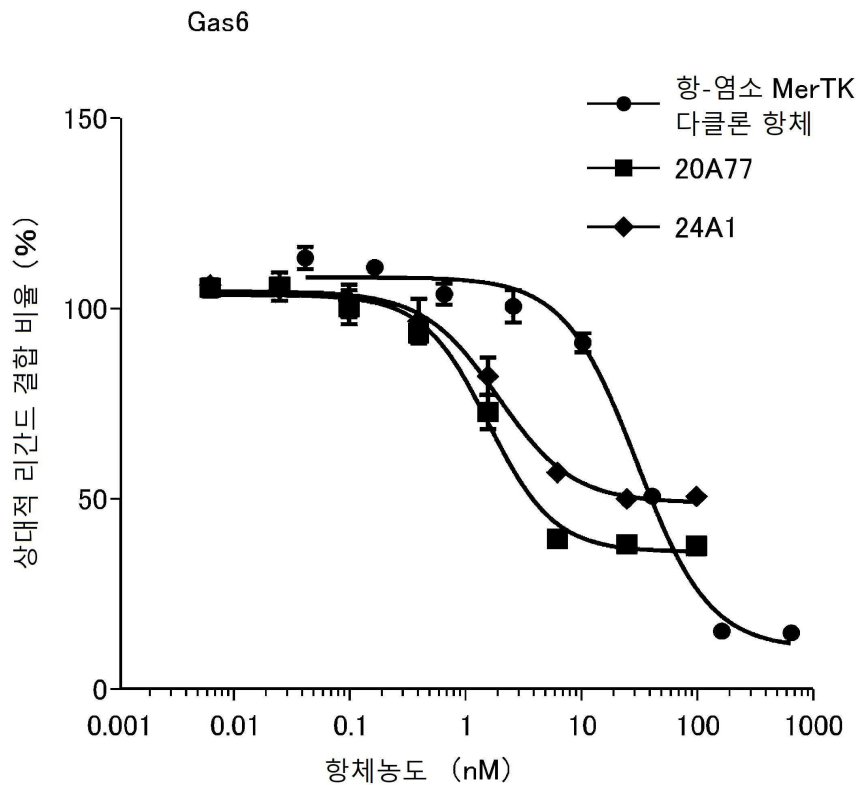
도면11



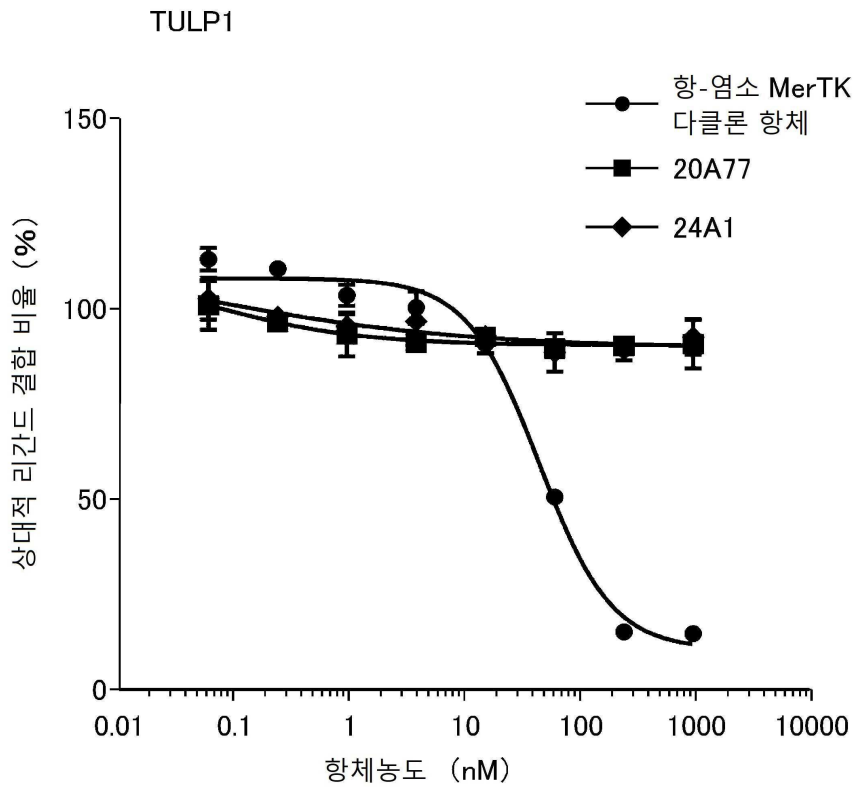
도면12



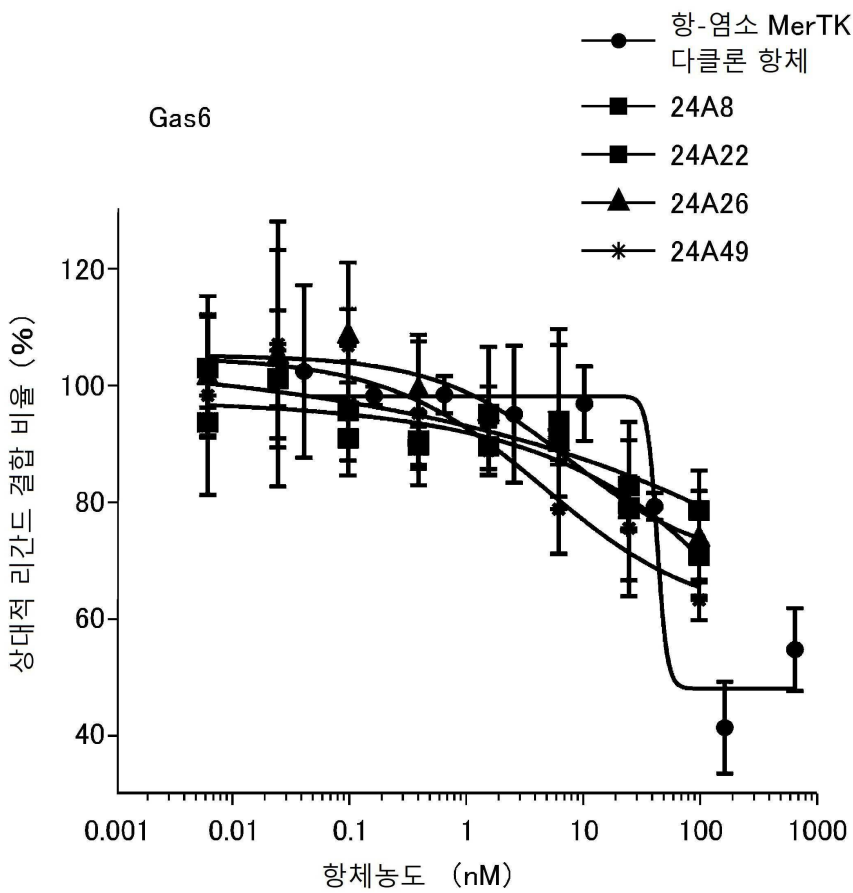
도면13



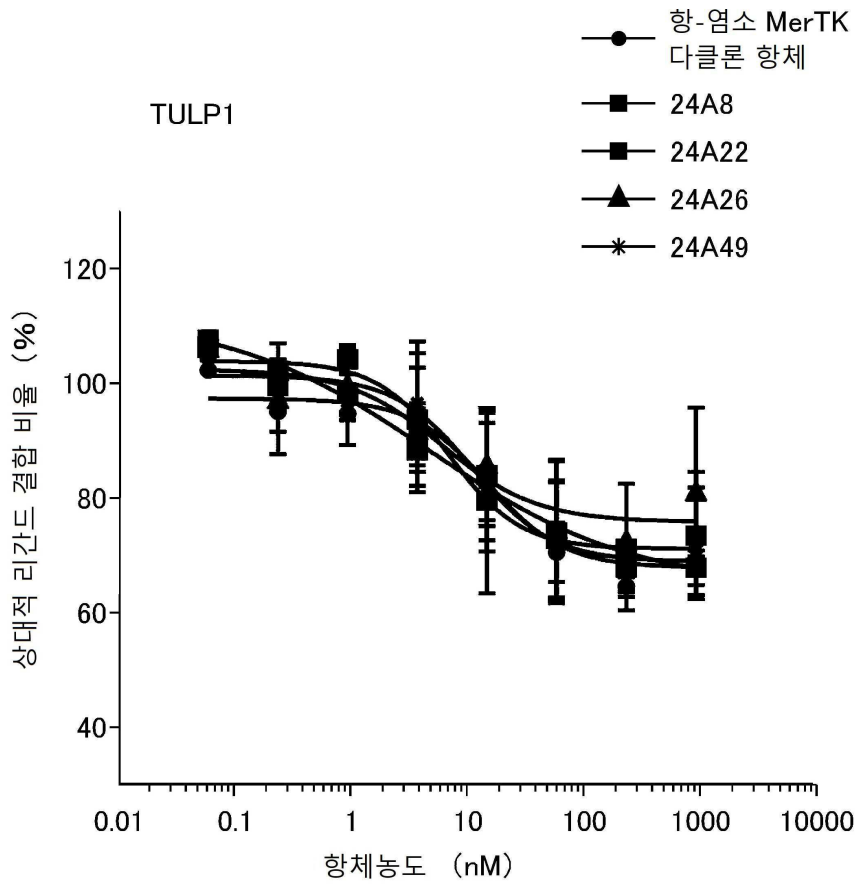
도면14



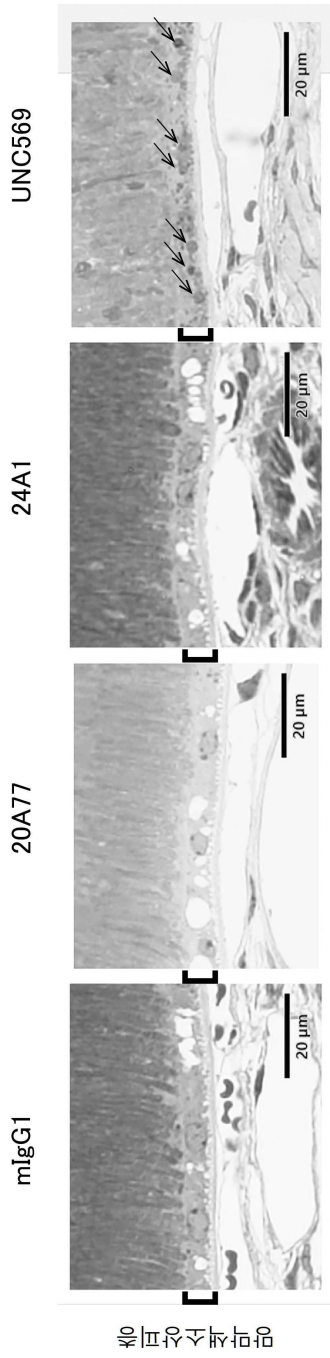
도면15



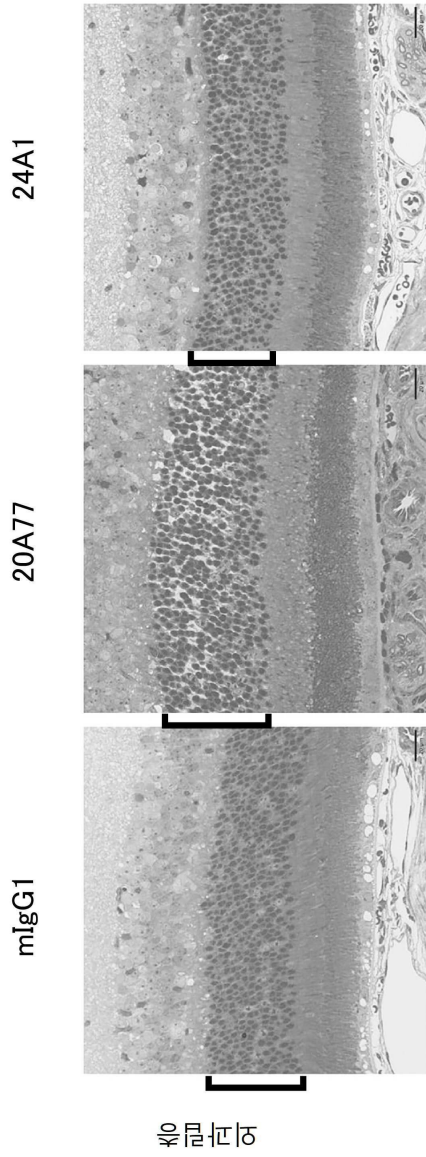
도면16



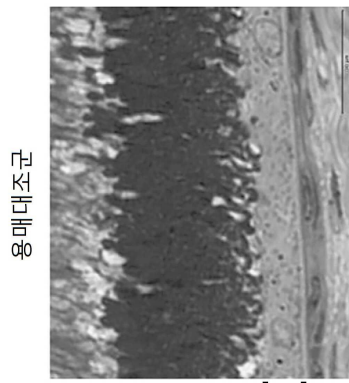
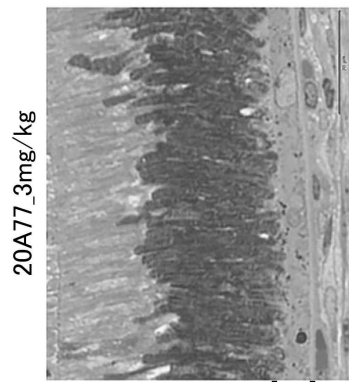
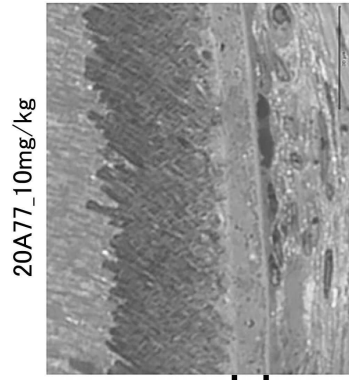
도면17



도면18

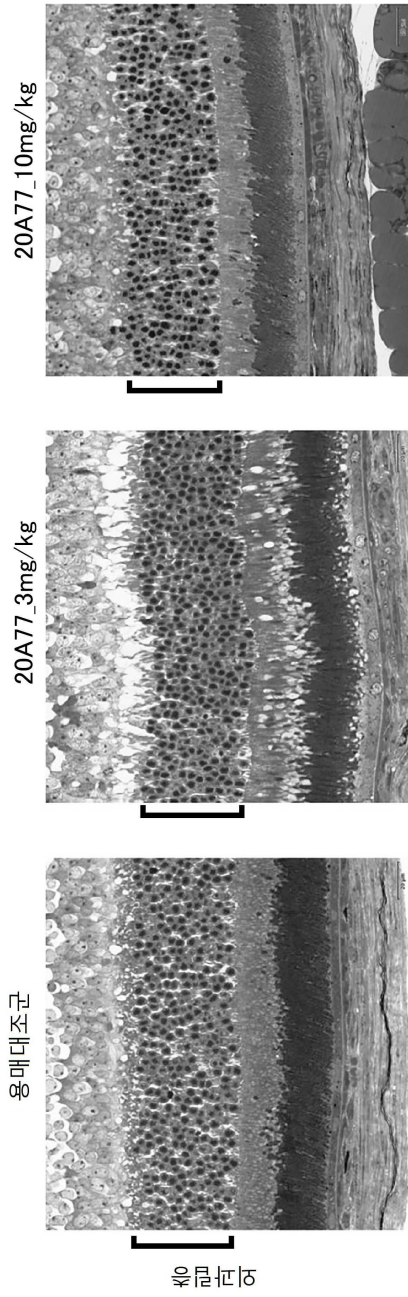


도면19

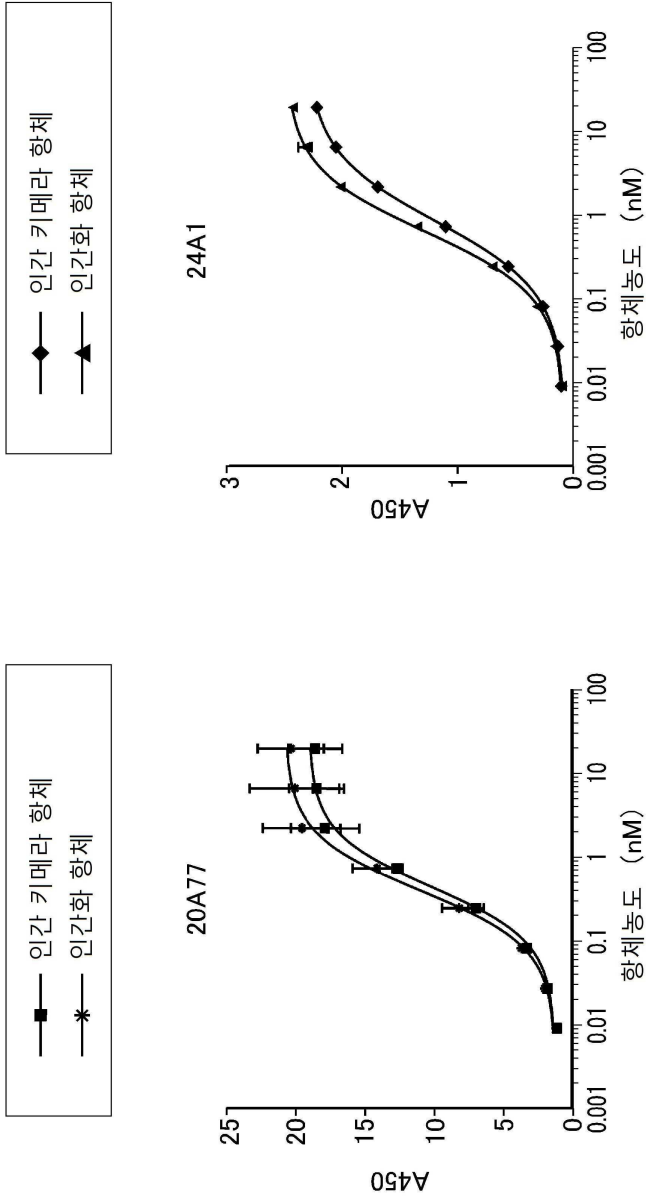


흰쥐심장조직

도면20



도면21



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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