



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년09월06일
(11) 등록번호 10-2704018
(24) 등록일자 2024년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2021-0076705
(22) 출원일자 2021년06월14일
심사청구일자 2021년06월14일
(65) 공개번호 10-2022-0002098
(43) 공개일자 2022년01월06일
(30) 우선권주장
1020200080105 2020년06월30일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
W02019197651 A1
Sara Traini, et al, Mol Cancer Ther, 13(4)
April 2014 (2014.02.19.) 1부.*
W02017040464 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
장수환
경기도 남양주시 경춘로1286번길 35, 1604동 704
호(평내동, 상록데시앙아파트)
김송철
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 221동 2002호(
신천동, 파크리오)
(74) 대리인
특허법인태백
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 13 항

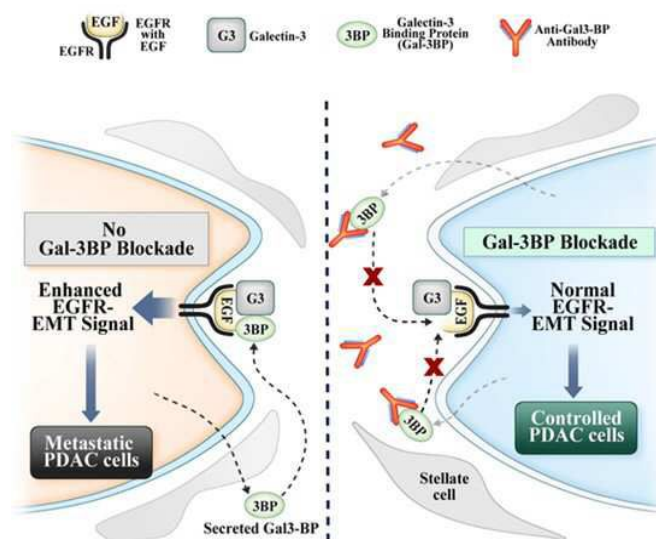
심사관 : 이미경

(54) 발명의 명칭 LGALS3BP에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 갈렉틴 3-결합 단백질(Galectin 3-binding protein; LGALS3BP)에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게, 본 발명은 특정 서열의 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR을 포함하는 LGALS3BP에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 대한 것이다. 본 발명에 따른 LGALS3BP에 특이적으로 결합하는 항체는 암 동물모델에서 암 성장 및 전이능 저해 효과를 검증한 바, 암 질환의 개선 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

G01N 33/574 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)

김효리

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 314동 2704호(신천동, 파크리오)

(72) 발명자

최연숙

서울특별시 송파구 한가람로 448, 106동 805호(풍납동, 동아한가람아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465029729
과제번호	HI14C2640010019
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	질환극복기술개발(R&D)
연구과제명	다기관 네트워크 구축을 통한 in vitro/vivo 평가모델 및 체장암 진단 기술개발을 이용한 Theragnostic 플랫폼 구축
기여율	1/1
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2019.08.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 23으로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열번호 24로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, LGALS3BP에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 6

제5항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산 분자.

청구항 7

제6항의 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 8

제7항의 재조합 발현벡터로 형질전환되어 분리된 세포.

청구항 9

서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1, 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2 및 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1, 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2 및 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, LGALS3BP에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 체장암 진단용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 체장암 진단용 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 23으로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열번호 24로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 인간화 항체인 것을 특징으로 하는 체장암 진단용 조성물.

청구항 12

서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1, 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2 및 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1, 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2 및 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, LGALS3BP에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 체장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 체장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 23으로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열번호 24로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 인간화 항체인 것을 특징으로 하는 체장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 15

서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1, 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2 및 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1, 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2 및 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, LGALS3BP에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 체장암 전이 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 체장암 전이 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 23으로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열번호 24로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 인간화 항체인 것을 특징으로 하는 체장암 전이 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 갈렉틴 3-결합 단백질(Galectin 3-binding protein; LGALS3BP)에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 용도에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 암을 치료하기 위해서는 외과적 수술로서 제거하거나, 방사선 치료법, 항암제 치료법, 면역치료법 등이 있으나, 많은 연구에도 불구하고 암환자 전체의 50% 이상이 결국 치유되지 못하고 사망한다고 보고된다. 그에 따른 이유는 외과적으로 절제를 하였다 하더라도 미세하게 전이된 암세포를 제거하지 못하여 암이 재발하거나, 다양한 항암제의 개발에도 불구하고 항암제를 이용한 암 치료 시 항암제에 대해 암세포가 사멸이 유도되지 않거나 초기에는 반응을 보여 종양이 줄어드는 듯 보이지만 치료도중이나 치료가 끝난 후 항암제에 대한 내성이 생긴 암세포들이 급격히 증식하기 때문이다. 또한, 방사선 치료도 암세포 방사선에 대한 내성을 나타내게 되어 완치가 어렵다. 항암면역치료는 암 특이 항원 또는 암 관련 항원을 이용한 면역 반응을 유도하여 항원을 갖고 있는 암세포를 면

역세포를 이용하여 제거하는 방법으로써 부작용이 거의 없어 획기적인 암 치료방법으로 부각되고 있지만, 임상적인 실효성이 높지 않은 상태이다.

[0003] 항체의약품은 1975년 최초의 단클론항체(Monoclonal antibody) 도출 이후 지속적으로 임상적 적용 가능성에 대한 연구 개발이 진행되어 왔는데, 항원에 대한 강한 결합 친화력(Binding affinity)과 높은 결합 특이성(Binding specificity)을 가지는 항체의 특성을 이용하여 특정 생물학적 반응을 매우 강하고도 선별적으로 제어할 수 있다는 작용기전이 의약품 개발 가능성의 근본적 핵심이다. 특히 화학 합성물질을 기반으로 한 기존 치료제들에 비해 항체의약품들은 높은 결합 특이성 및 인체내 안정성으로 인해 상대적으로 부작용이 적고 치료 효능은 우수한 것으로 나타나 항체물질을 이용한 치료제 개발 분야는 신약 연구개발의 차세대 핵심 분야로 각광을 받고 있다. 이에, 다양한 혈액암과 고형암의 치료에 있어서 부작용 대비 뛰어난 치료 효능을 보여주는 항체 의약품들이 잇따라 개발되어 임상에 사용되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 미국공개특허 US 2018-0216194 (2018.08.02 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 갈렉틴 3-결합 단백질(Galectin 3-binding protein; LGALS3BP)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하는 데에 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현벡터 및 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 세포를 제공하는 데에 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 전이 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 갈렉틴 3-결합 단백질(Galectin 3-binding protein; LGALS3BP)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1, 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2 및 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1, 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2 및 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, LGALS3BP에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

- [0015] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 전이 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명은 갈렉틴 3-결합 단백질(Galectin 3-binding protein; LGALS3BP)에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게, 본 발명은 특정 서열의 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR을 포함하는 LGALS3BP에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 대한 것이다. 본 발명에 따른 LGALS3BP에 특이적으로 결합하는 항체는 암 동물모델에서 암 성장 및 전이능 저해 효과를 검증한 바, 암 질환의 개선 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 췌장암 환자유래 이중이식모델 암조직에서 단백질 기법을 이용한 LGALS3BP의 발현 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 췌장암 세포에서 LGALS3BP의 발현 저해시 암 발생 및 성장 억제 확인 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 췌장암 세포에서 LGALS3BP의 발현 저해시 세포의 이동 및 침윤 능력 감소 확인 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4은 파지 디스플레이 기법을 이용한 LGALS3BP 항체의 스크리닝 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 5는 항체 후보들의 기능적 분석을 통하여 #67 및 #84번 항체가 결합력이 뛰어나고, 암세포의 이동능력을 감소시키는 것을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 췌장암 동물모델에서 LGALS3BP 항체의 암 성장 및 전이능 저해효과 검증 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 LGALS3BP에 대한 항체 4종의 ELISA 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8 및 도 9는 인간화된 LGALS3BP 항체의 전이능 저해효과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 LGALS3BP 항체의 Gal-3BP 차단을 통한 암 전이 억제 기작을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 갈렉틴 3-결합 단백질(Galectin 3-binding protein; LGALS3BP)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0021] 바람직하게는, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 또한, 본 발명은 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1, 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2 및 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1, 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2 및 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, LGALS3BP에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0023] 바람직하게는, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 바람직하게는, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 23으로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열번호 24로 표시

되는 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 항체는 인간화 항체일 수 있다.

- [0025] 한편, 본 발명의 항체 CDR, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 표 2 및 표 4에 기재하였고, 각각의 서열에 대해서는 서열번호를 표시하였다.
- [0026] 본 발명에서 용어, “항체”는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 의미하며, 그 예로, 단일 클론 항체, 다클론 항체, 전장항체(full-length antibody) 및 항체 단편을 모두 포함할 수 있다. 또한 상기 용어, “항체”는 이가(bivalent) 또는 이중 특이성 분자(예컨대, 이중특이성 항체), 디아바디, 트리아바디 또는 테트라바디를 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 용어, “단일 클론 항체”는 실질적으로 동일한 항체 집단에서 수득한 단일 분자 조성의 항체 분자를 지칭하고, 이러한 단일 클론 항체는 다클론 항체가 여러 개의 에피토프에 결합할 수 있는 것과 달리, 특정 에피토프에 대해 단일 결합성 및 친화도를 나타낸다. 본 발명에서 용어, “전장항체”는 2 개의 전체 길이의 경쇄 및 2 개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 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 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다. IgG는 서브타입(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다.
- [0028] 본 발명에서 용어, "인간화 항체(humanized antibody)"란, 인간에게 비-면역원성(nonimmunogenic)이거나 또는 면역원성이 감소된 항체를 총칭한다. 인간화 항체는 아미노산 서열이 변형된 항체(altered antibody)이고 항체의 아미노산 서열은 원하는 목적에 맞게 재구성할 수 있다. 이러한 가능한 변화는 수없이 많고 하나 또는 몇 가지 아미노산을 변화시키는 것부터 항체의 가변 및/ 또는 불변 영역의 완전한 재구성까지 가능하다. 일반적으로 가변영역의 변형이 항원의 결합능과 친화도를 증대시키기 위하여 행하여지는데 비하여 불변영역에서의 변형은 보체(complement)의 고정, 막과의 상호작용 및 기타 효과제의 기능과 같은 세포내 작용을 증대시키기 위하여 행하여진다.
- [0029] 본 발명에서 용어, “중쇄”는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VH 및 3 개의 불변 영역 CH1, CH2 및 CH3를 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에서 용어, “경쇄”는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VL 및 불변 영역 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 용어, “단편”, “항체 단편” 및 “항원 결합 단편”은 항체의 항원결합 기능을 보유하는 본 발명의 항체의 임의의 단편을 지칭하는 것으로 호환적으로 사용된다. 예시적인 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')2 및 Fv 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 LGALS3BP에 특이적으로 결합하는 능력을 나타낼 수 있는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 항체의 서열뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물도 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/ 또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/ 또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 리신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글리신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 티로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이점에 기초하여, 아르기닌, 라신과 히스티딘; 알라닌, 글리신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 티로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0033] 본 명세서에서 사용되는 용어, “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성단위인 뉴클레오티드는 자연의 뉴클레오티드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다. 본 발명의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산 분자의 서열은 변형될 수 있으며, 상기 변형은 뉴클레오티드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.
- [0035] 본 발명에 있어서, "벡터"는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는

DNA 분자를 의미한다.

- [0036] 본 발명에서 있어서, “발현 벡터”는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 제조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택적 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 엠페실린(Ampicillin), 카나마이신(Kanamycin), 제네티신(Geneticin; G418), 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(Hygromycin), 클로람페니콜(Chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.
- [0037] 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열 중 어느 것이라도 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절서열의 예에는, 예를 들어, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, CMV의 프로모터와 인핸서, 레트로바이러스의 LTR, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 램다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스포타제의 프로모터들, 예를 들어 Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 구성과 유도의 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 항체를 발현하는 벡터는, 경쇄와 중쇄가 하나의 벡터에서 동시에 발현되는 벡터 시스템이거나 또는 경쇄와 중쇄를 각각 별도의 벡터에서 발현시키는 시스템 모두 가능하다. 후자의 경우, 두 벡터는 동시 형질전환(co-transformation) 및 표적 형질전환(targeted transformation)을 통하여 숙주세포로 도입된다. 동시 형질전환은 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 각각의 벡터 DNA를 동시에 숙주세포로 도입한 뒤 경쇄와 중쇄를 모두 발현하는 세포를 선별하는 방법이다. 표적 형질전환은 경쇄(또는 중쇄)를 포함하는 벡터로 형질전환 된 세포를 선별하고 경쇄를 발현하는 선별된 세포를 중쇄(또는 경쇄)를 포함하는 벡터로 다시 형질전환 하여 경쇄 및 중쇄 모두를 발현하는 세포를 최종적으로 선별하는 방법이다.
- [0039] 또한, 본 발명은 제조합 발현벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.
- [0040] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 세포는 관련 기술 분야에 공지된 임의의 숙주 세포일 수 있으며, 예컨대, 에스케리치아 콜라이(Escherichia coli), 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(Streptomyces), 슈도모나스(Pseudomonas)(예를 들면, 슈도모나스 푸티다(Pseudomonas putida)), 프로테우스 미라빌리스(Proteus mirabilis) 또는 스태필로코쿠스(Staphylococcus)(예를 들면, 스태필로코쿠스 카르노수스(Staphylococcus carnosus))와 같은 원핵 숙주 세포를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조 방법에서 형질전환 세포의 배양은 관련 기술 분야에 공지된 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양과정은 통상의 기술자라면 선택되는 균주에 따라 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 세포 배양은, 세포의 성장 방식에 따라 현탁배양과 부착배양, 배양방법에 따라 회분식, 유가식 및 연속배양식의 방법으로 구분된다. 배양에 사용되는 배지는 특정한 균주의 요구조건을 적절하게 만족시켜야 한다.
- [0042] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.
- [0043] 바람직하게는, 상기 암은 LGALS3BP이 발현되는 암일 수 있으며, 보다 바람직하게는, 상기 암은 췌장암일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0045] 바람직하게는, 상기 암은 LGALS3BP이 발현되는 암일 수 있으며, 보다 바람직하게는, 상기 암은 췌장암일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암 전이 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0047] 바람직하게는, 상기 암은 췌장암일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 약제학적으로 허용되는

담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 암 전이 예방 또는 치료용 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유향제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장 내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 될 수 있으며, 본 발명의 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0050] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

[0051] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화하여 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유향액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0053] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0054] <실험예>

[0055] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0056] 1. 이동, 침윤 및 증식 분석

[0057] 이동 및 침윤 능력은 Transwell chambers (Corning Costar) 및 6.5-mm 직경 폴라카보네이트 필터(8 μm pore size)의 매트릭셀 코팅된 챔버를 사용하여 각각 분석하였다. 세포는 트립신 처리하였고, 무혈청 배양 배지에 최종 농도 1×10^6 cells/mL로 현탁시켰다. 100 μl 세포 현탁액을 각 상부 웰에 로딩하고, 주화성 물질로서 배양 배지를 플레이트에 첨가하였다. 챔버는 37°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 세포를 고정시켰고, 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. 상부 챔버의 비이동 세포는 면봉으로 제거하였다. 이동 및 침윤된 세포의 수는 광학 현미경(×200)으로 세포를 계수하여 정량화하였다.

[0058] 세포 생존능은 Ezcytox를 사용하여, 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다. 세포는 2×10^3 cells/100 μl/96 well로 접종하였고, 37°C에서 72시간 동안 배양시켰다. 웰의 흡광도는 Molecular Devices microplate reader를 사용하여, 대조군 파장 650 nm에 대비 450 nm에서 측정하였다.

[0059] 2. 생체 내(in vivo) 종양 형성 및 이미지 분석

[0060] 100 μL PBS에 재현탁시킨 110621 세포(2×10^6)를 6주령 내지 8주령 수컷 BALB/c 누드 마우스의 등쪽 옆구리에 주입하였다. 종양 성장을 관측하였고, 부피는 캘리퍼를 사용하여 측정하였다. 종양 크기 (mm³) = L (길이) × W² (너비)/2. 피하 종양은 잘라냈고, 무게를 측정하였다. 종양 조직은 포르말린으로 고정시켰고, 파라핀으로 포매한 후, H&E으로 염색하였다. 증식 세포 검출을 위한 면역조직화학 염색은 Ki-67 항체를 사용하여 수행하였고, 양성 염색 세포는 5개 선택 영역에서 면역-양성 세포의 수를 계수하여 계산하였다.

[0061] 3. 면역조직화학 분석

[0062] 신선한 검체를 10% 포르말린에 4일 동안 담그고, 파라핀으로 포매하였다. 4-μm 파라핀 절편을 자일렌으로 탈-

과라핀화하였고, 단계적인 알코올을 통하여 재수화하였다. 내재성 퍼옥시데이즈 활성은 메탄올에 녹인 3% 과산화수소로 20분 동안 차단시켰다. 열 매개 항원성 부활은 Tris-EDTA buffer (abcam)로 20분 동안 수행하였다. 비특이적 결합을 차단하기 위해서, 3% 정상 염소 혈청으로 20분 동안 반응시킨 후, 상기 절편을 1% 정상 염소 혈청에 희석한 Ki67 항체 (abcam, 1:50)와 밤새도록 반응시켰다. 절편들은 PBS로 헹구었고, HRP-결합 2차 항체 (1:200)로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 최종적으로, 상기 절편들은 디아미노벤지딘(diaminobenzidine; DAB) (Thermo Scientific)으로 진행시켰고, 헤마톡실린으로 대비염색하였다. Permount (Fisher Scientific)를 사용하여 커버슬립을 마운팅한 후, 광 현미경으로 관측하였고, Image J program을 사용하여 분석하였다.

[0063] **4. Gal-3BP 항체 스크리닝을 위한 파지 디스플레이**

[0064] 3마리의 흰색 레그혼 닭을 재조합 Gal-3BP 단백질로 3차례 면역화 및 부스팅하였다. 3번째 부스팅 후, 닭들을 희생시켰고, TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 총 RNA를 분리하기 위해서, 비장, 파브리키우스 소낭(bursae of Fabricius) 및 골수를 수집하였다. SuperScript® IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여, 제조사의 프로토콜에 따라 상보적 DNA를 합성하였다. cDNA를 주형으로 사용하여, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 코딩하는 유전자들을 증폭하였고, 닭 scFv-디스플레이 파지 라이브러리를 제작하는데 사용하였다. 닭 scFv-디스플레이 파지 라이브러리는 Gal-3BP 단백질에 대하여 4 라운드의 바이오패닝을 수행하였다. 간단히 설명하면, scFv 파지-디스플레이 라이브러리를 3 µg의 5.0 × 10⁶ 마그네틱 비드 (Dynabeads M-270 epoxy, Invitrogen)가 결합된 재조합 Gal-3BP 재조합 단백질에 첨가하였고, 37°C에서 2시간 동안 회전하며 반응시켰다. 바이오패닝 동안, PBS에 녹인 0.05% (v/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)(PBST) 500 µL로 비드를 씻어냈다. 비드에 결합한 파지를 용출시켰고, 중화시킨 후, *E. coli* ER2738 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)에 감염시키고, 구제하였다. 마지막 라운드의 아웃풋 타이터(output titer) 플레이트로부터 scFv 클론을 임의로 선택하였고, Gal-3BP-coated microtiter plates (Corning Life Sciences, NY, USA)을 사용하여 파지 효소 면역분석에 적용하였다. 반응성 scFv 클론들의 염기서열은 Sanger sequencing (Cosmogentech, Seoul, Korea)을 통해 결정하였다.

[0065] **<실시예 1> 췌장암 환자유래 이중이식모델 암조직에서 단백질 기법을 이용한 LGALS3BP의 발굴**

[0066] 췌장암과 유방암에서 단백질 기법을 이용하여 각 암종별 특이적인 단백질들을 발굴하였고, 그 중 문헌조사 등을 통하여 LGALS3BP의 췌장암 특이적 발현을 검증하였다. 그리고 암세포의 배양액에서도 분비되며, 암을 이식한 마우스 모델의 혈장에서도 발현이 되는 것을 확인하였다(도 1).

[0067] **<실시예 2> 췌장암 세포에서 LGALS3BP의 발현 저해시 암 발생 및 성장 억제 확인**

[0068] 환자 유래 췌장암 세포에서 LGALS3BP의 발현을 저제한 후 마우스에 이식한 결과, 암 발생이 현저히 감소함을 확인하였고, 발생된 암의 무게도 줄어들었으며 암세포의 증식을 표현하는 ki67 지수도 감소하였다(도 2).

[0069] **<실시예 3> 췌장암 세포에서 LGALS3BP의 발현 저해시 세포의 이동 및 침윤 능력 감소 확인**

[0070] LGALS3BP를 안정적으로 저제한 경우, 환자 유래 췌장암세포의 표면 부착능력, 이동능력, 침윤능력이 LGALS3BP의 발현 저해시 현저히 감소함을 확인하였다(도 3).

[0071] **<실시예 4> 파지 디스플레이 기법을 이용한 LGALS3BP 항체의 발굴**

[0072] LGALS3BP를 저해하는 항암제 개발을 목표로 특이적 결합 항체를 발굴하는 작업을 진행하여, 결합력이 높은 후보들을 파지 디스플레이 방법으로 스크리닝하였다(도 4).

[0073] 구체적으로 *E. coli*에서 LGALS3BP를 생산, 정제하고 이를 닭에 주사하여(immunization) 항체가 생성되도록 유도하였다. 이 닭에서 RNA를 추출하고 항체부분의 cDNA를 합성하여 단일쇄 항체(single-chain antibody)의 형태로 파지미드(Phagemid)에 발현시켰다. 이를 파지 라이브러리(Phage library)라 하고, 상기 라이브러리를 LGALS3BP에 결합시켜서 높은 결합력을 가지는 항체만을 선별하는 작업을 수행하였다. 이는 ELISA와 비슷한 시험관 내 결합(in vitro binding) 방법으로 바이오-패닝(bio-panning) 이라고 한다.

[0074] 그 결과, 표 1에 나타낸 바와 같이, 결합력이 높은 항체 5개를 아래와 같이 선별하였다(ELISA결과).

표 1

CH2-18	CH2-19	CH2-44	CH2-67	CH2-84
1.0114	0.3682	0.4829	2.1639	1.1669
1.128	1.3764	1.142	2.608	0.5577
	1.3301	0.77	0.5791	
	1.4122		2.0092	

[0075]

[0076]

이 항체 후보들의 기능적 분석을 통하여 #67 및 #84번 항체가 결합력이 뛰어나고, 암세포의 이동능력을 감소시키는 것을 확인하였다(도 5).

[0077]

상기 #67 및 #84번 항체의 아미노산 서열 및 뉴클레오티드 서열은 표 2 내지 표 5에 나타났다.

표 2

[0078]

CH2-67	LGALS3BP #67 항체 아미노산 서열
CDRH1	GFTFSSYGLG (서열번호 1)
CDRH2	GISSGGATFYGAAMKG (서열번호 2)
CDRH3	DARSGSWSPDAGQIDA (서열번호 3)
CDRL1	SGSSGSHYG (서열번호 4)
CDRL2	SNDKRPS (서열번호 5)
CDRL3	GSIDSSGI (서열번호 6)
VH	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKGSGFTFSSYGLGWVRQAPGKGLLEYVAGISSGGATFYGAAMKGRATISRDNQ STVRLQLNNLRAEDTATYYCAKDARSGSWSPDAGQIDAWGHGTEVIVSSTS (서열번호 7)
VL	LTQPSSVSANLGGTVEITCSGSSGSHYGFQKSPGAPVTLIYSNDKRPSDIPSRFSGSKSGSTATLITGVQA EDEAVYFCGSIDSSGIFGAGTTLTVL (서열번호 8)

표 3

[0079]

CH2-67	LGALS3BP #67 항체 뉴클레오티드 서열
VH	GCC GTG ACG TTG GAC GAG TCC GGG GGC GGC CTC CAG ACG CCC GGA GGA GCG CTC AGC CTC GTC TGC AAG GGC TCC GGG TTC ACC TTC AGC AGT TAT GGC CTG GGT TGG GTG CGA CAG GCG CCC GGC AAG GGG CTC GAG TAC GTT GCG GGT ATT AGT AGC GGT GGT GCA ACA TTC TAC GGG GCG GCG ATG AAG GGC CGT GCC ACC ATC TCG AGG GAC AAC GGG CAG AGC ACA GTG AGG CTG CAG CTG AAC AAC CTC AGG GCT GAG GAC ACC GCC ACC TAC TAC TGC GCC AAA GAT GCT CGC AGT GGT AGT TGG AGT CCT GAT GCT GGT CAA ATC GAC GCA TGG GGC CAC GGG ACC GAA GTC ATC GTC TCC TCC ACT AGT (서열번호 17)
VL	CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG TCA GCA AAC CTG GGA GGA ACC GTC GAG ATC ACC TGC TCC GGG AGT AGT GGC AGC CAC TAT GGC TGG TTC CAG CAG AAG TCA CCT GGC AGT GCC CCT GTC ACT CTG ATC TAT AGC AAC GAC AAG AGA CCC TCG GAC ATC CCT TCA CGA TTC TCC GGT TCC AAA TCC GGC TCC ACA GCC ACA TTA ACC ATC ACT GGG GTC CAA GCC GAG GAC GAG GCT GTC TAT TTC TGT GGG AGC ATA GAC AGC AGT GGT ATA TTT GGG GCC GGG ACA ACC CTG ACC GTC CTA (서열번호 18)

표 4

[0080]

CH2-84	LGALS3BP #84 항체 아미노산 서열
CDRH1	GFTFNGYGMN (서열번호 9)
CDRH2	GIDDTGSYTAYAPAVRG (서열번호 10)
CDRH3	GYGDVWGGDEIDA (서열번호 11)
CDRL1	SGGSSGYG (서열번호 12)
CDRL2	DNDKRPS (서열번호 13)
CDRL3	GGYDNSVGI (서열번호 14)
VH	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFNGYGMNVVRQAPGKGLEWVAGIDDTGSYTAYAPAVRGRATISRDNQ STVRLQLNNLRAEDTATYYCAKGYGDVWGGDEIDA WGHGTEVIVSSTS (서열번호 15)

VL	LTQPSSVSANLGGTVKITCSGGSSGYGWHQKSPGSAPVTVIYDNDKRPSPDIPSRFSGSLSGSTNTLTIITGVQAEDEAVYFCGGYDNSVGIIFGAGTTLTVL (서열번호 16)
----	---

표 5

CH2-84	LGALS3BP #84 항체 뉴클레오티드 서열
VH	GTG ACG TTG GAC GAG TCC GGG GGC GGC CTC CAG ACG CCC GGA GGA GCG CTC AGC CTC GTC TGC AAG GCC TCC GGG TTC ACC TTC AAC GGT TAC GGC ATG AAC TGG GTG CGA CAG GCG CCC GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTC GCT GGT ATT GAT GAC ACT GGT AGT TAC ACA GCA TAC GCG CCG GCG GTG AGG GGC CGT GCC ACC ATC TCG AGG GAC AAC GGG CAG AGC ACA GTG AGG CTG CAG CTG AAC AAC CTC AGG GCT GAG GAC ACC GCC ACC TAC TAC TGC GCC AAA GGT TAT GGT GAT GTT TGG GGT GGT GAT GAG ATC GAC GCA TGG GGC CAC GGG ACC GAA GTC ATC GTC TCC TCC ACT AGT (서열번호 19)
VL	CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG TCA GCA AAC CTG GGA GGA ACC GTC AAG ATC ACC TGC TCC GGG GGT AGC AGC GGC TAT GGC TGG CAC CAG CAG AAA TCA CCT GGC AGT GCC CCT GTC ACT GTG ATC TAT GAC AAC GAC AAG AGA CCC TCG GAC ATC CCT TCA CGA TTC TCC GGT TCC CTA TCC GGC TCC ACA AAC ACA TTA ACC ATC ACT GGG GTC CAA GCC GAG GAC GAG GCT GTC TAT TTC TGT GGT GGC TAC GAC AAC AGT GTC GGT ATA TTT GGG GCC GGG ACA ACC CTG ACC GTC CTA (서열번호 20)

[0082] <실시예 5> 웨장암 동물모델에서 LGALS3BP 항체의 암 성장 및 전이능 저해효과 검증

[0083] 환자 유래 웨장암 세포를 이용한 웨장 동소 이식 모델에서 IVIS를 통하여, 두 가지 항체의 항암 효과를 테스트 하였다. 도 6에서 보는 바와 같이 항체를 투여한 그룹에서 암의 크기가 줄어들었음을 확인하였고, 폐 전이 모델에서도 항체를 투여함으로써 암세포의 비율이나 폐 결절(lung nodule)의 현저한 감소를 확인하였다(도 6).

[0084] <실시예 6> LGALS3BP 항체의 인간염기서열화 (Humanization)

[0085] 항-LGALS3BP 항체 CH2-84의 인간염기서열화(humanization)를 진행하였다.

[0086] CH2-84와 가장 유사한 human germline genes; 하기 human gene으로의 인간염기서열화를 진행하였다. CDRs는 제외하고 FRs에 대해서만 진행하였다.

표 6

Gene segment	Human genes and allele	No. of different residues ; Ch vs Hu
Light chain V gene	IGLV3-25*02	18
Light chain J gene	IGLJ2*01	2
Heavy chain V gene	IGHV3-NL1*01	21
Heavy chain J gene	IGHJ1*01	3

[0088] 그 결과, 총 3개의 후보 클론이 확보되었다.

[0089] 1) Hu2-84_11-7; VL11 & VH7 조합으로 chicken sequence 2개 남음.

[0090] 2) Hu2-84_12-7; VL12 & VH7 조합으로 chicken sequence 3개 남음.

[0091] 3) Hu2-84_13-7; VL13 & VH7 조합으로 chicken sequence 3개 남음.

[0092] 상기 인간염기서열화된 항체 각각의 VL, VH와 closest human germline 서열은 아래와 같다. CDRs은 밑줄로 표시하였고, 인간염기서열화되지 않은 닭 유래 잔기는 굵게 표시하였다.

[0093] >IGHV3-NL1*01_IGHJ1*01

[0094] QVQLVESGGG VVQPGSLRL SCAAS_____MHVWRQA PGKLEWVS_ _____RFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAK_____WGQGLTVTV SS

- [0095] >VH7
- [0096] QVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFN GYGMNWVRQA PGKGLEWVSG IDDTGSYTAY APAVRGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKGY GDVWGGDEID AWGQGTLTVT SS (서열번호 21)
- [0097] >IGLV3-25*02_IGLJ2*01
- [0098] ELTQPPSVSV SPGQTARITC _____WY QQKPGQAPVL VIY_____ GIPERFSGSS SGTTVTLTIS GVQAEDEADY YC_____ _FGGGTKLTV L
- [0099] >VL11
- [0100] ELTQPPSVSV SPGQTARITC SGSSSGYGWH QQKPGQAPVL VIYDNDKRPS GIPERFSGSS SGTTVTLTIS GVQAEDEADY YCGGYDNSVG IFGGGTKLTV L (서열번호 22)
- [0101] >VL12
- [0102] ELTQPPSVSV SPGQTARITC SGSSSGYGWH QQKPGQAPVL VIYDNDKRPS GIPERFSGSL SGTTVTLTIS GVQAEDEADY YCGGYDNSVG IFGGGTKLTV L (서열번호 23)
- [0103] >VL13
- [0104] ELTQPPSVSV SPGQTARITC SGSSSGYGWH QQKPGQAPVL VIYDNDKRPS GIPERFSGSS SGSTVTLTIS GVQAEDEADY YCGGYDNSVG IFGGGTKLTV L (서열번호 24)

[0105] <실시예 7> Humanized LGALS3BP 항체의 전이능 저해효과 검증

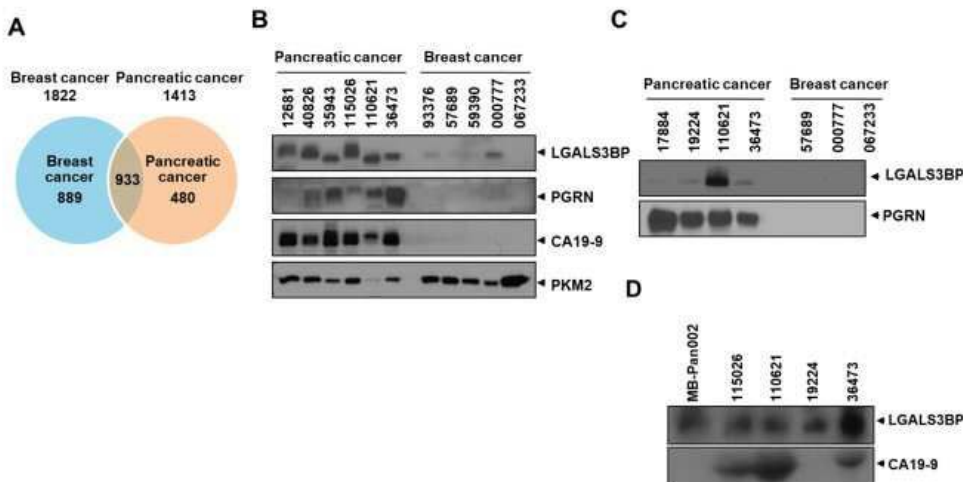
[0106] 인간화 된 항체가 기존의 CH2-84와 동일한 전이능 저해효과를 가지고 있는지 검증하기 위하여 췌장암 환자 유래 세포로 migration assay를 수행하였다.

[0107] 그 결과, 도 8 및 도 9에서 나타낸 바와 같이, 두 개의 인간화 된 항체가 기존 CH2-84와 유사한 정도의 암세포 전이 억제능을 가지고 있음을 확인하였다.

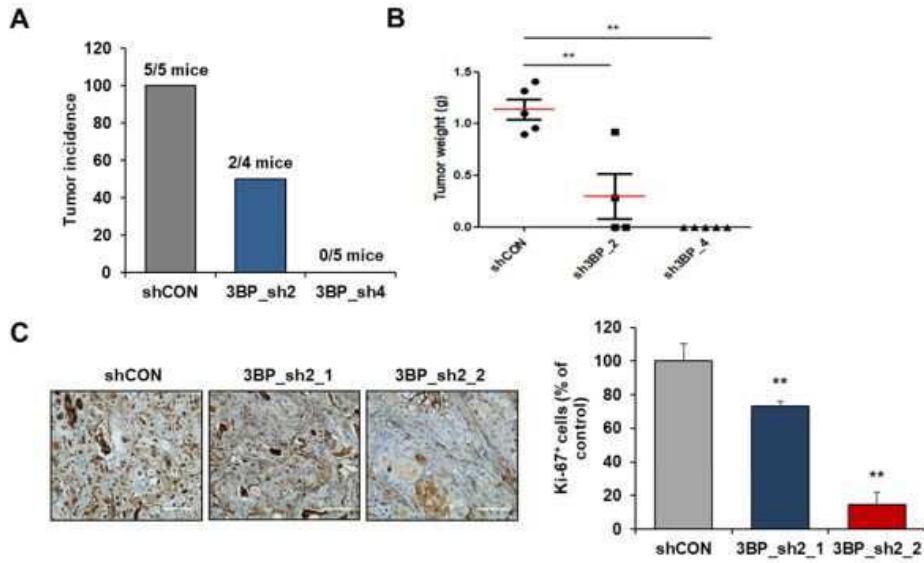
[0108] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

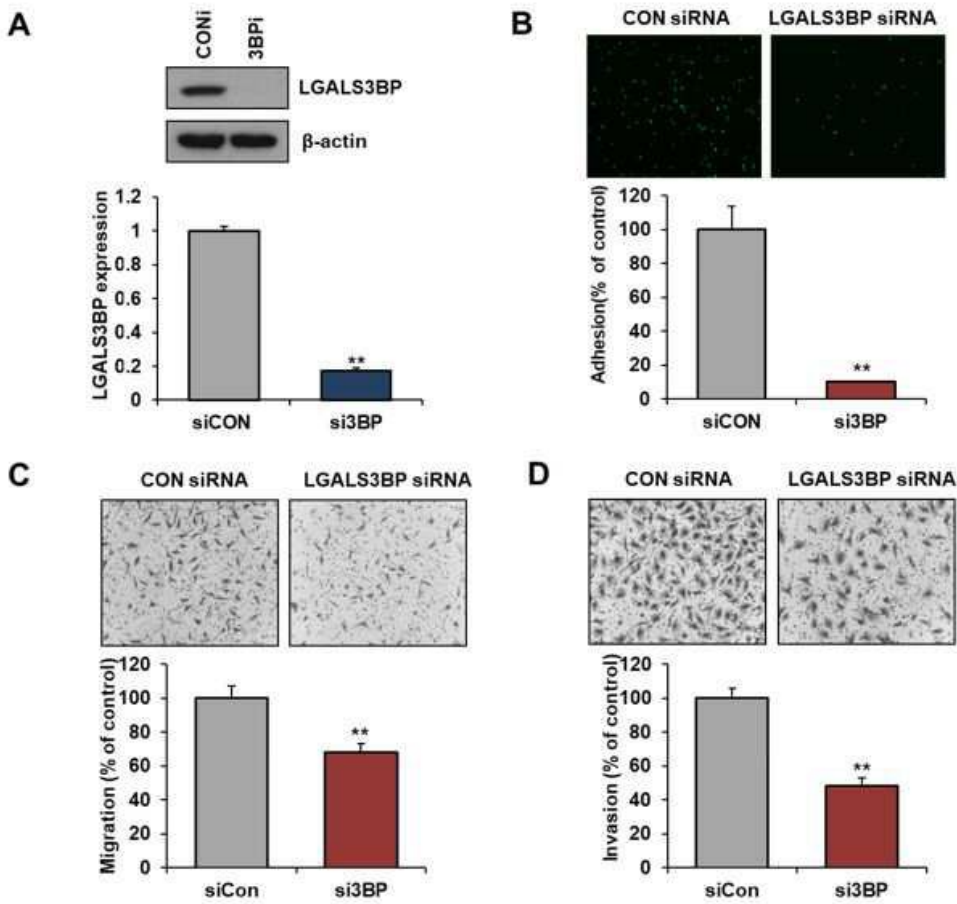
도면1



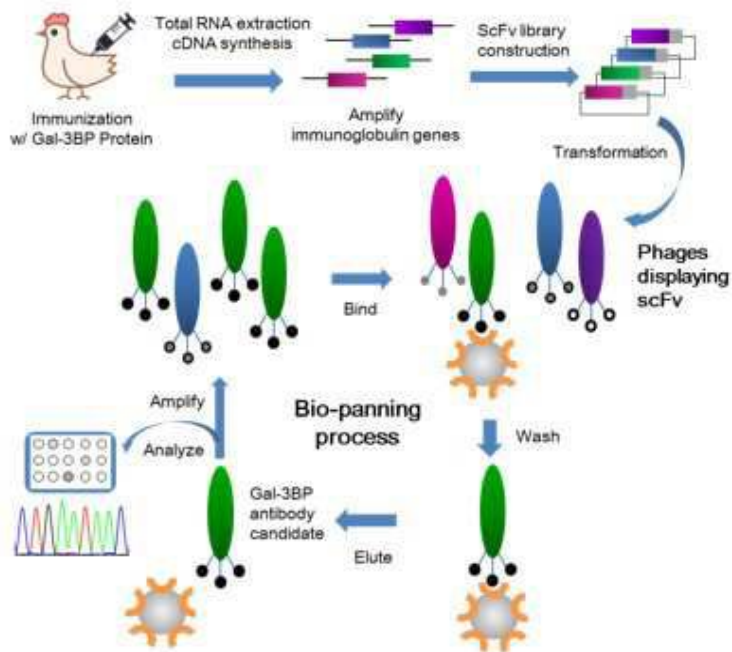
도면2



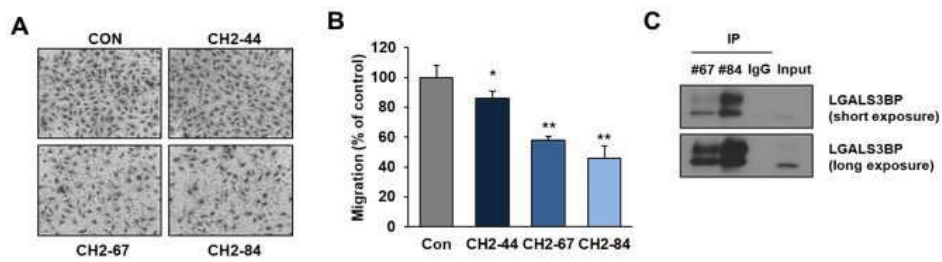
도면3



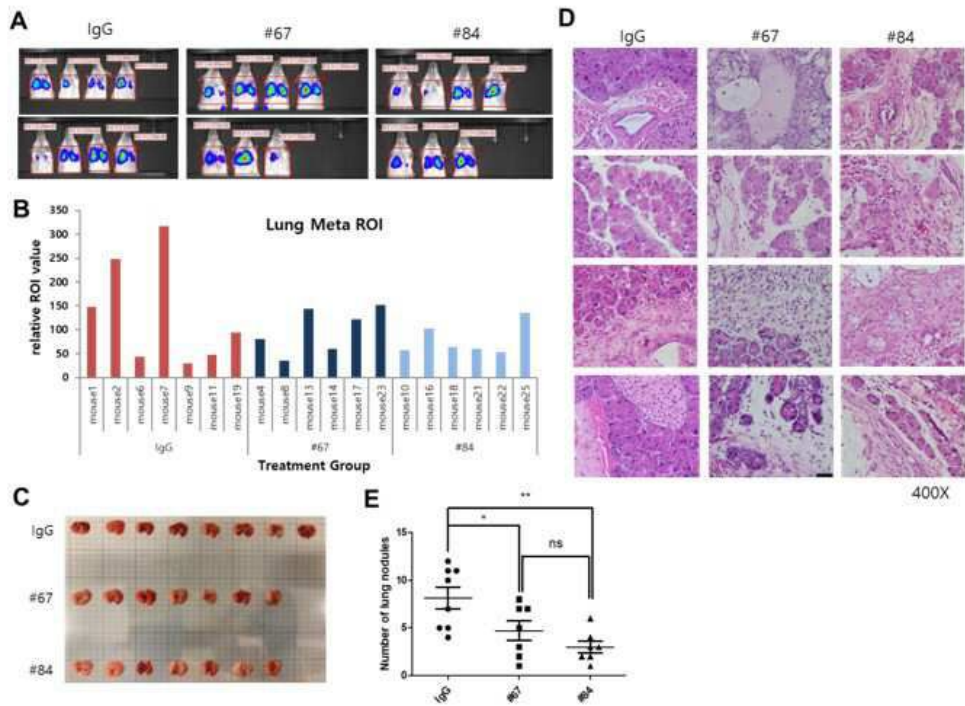
도면4



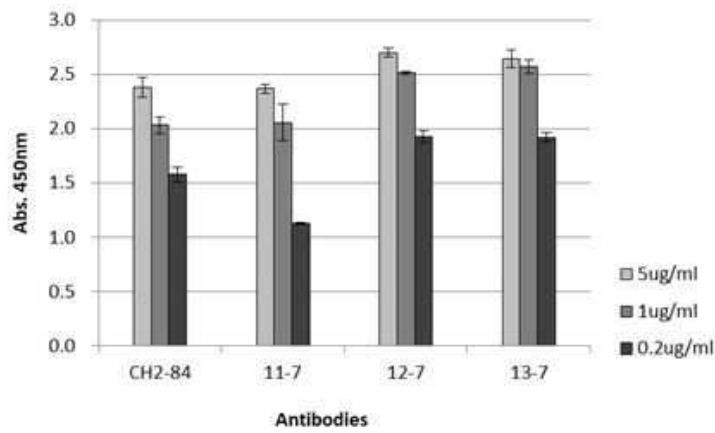
도면5



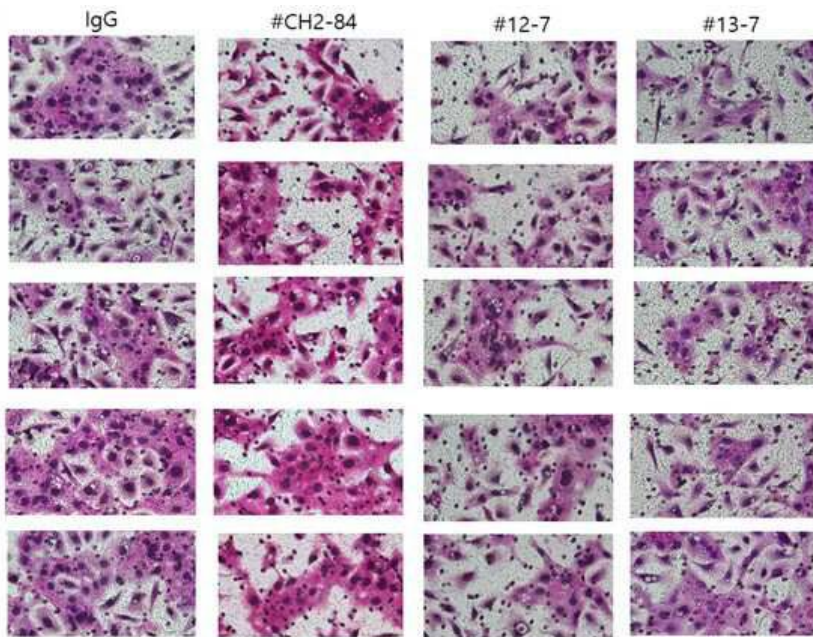
도면6



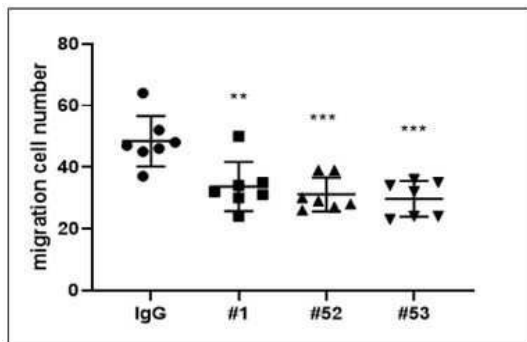
도면7



도면8



도면9



Migrated Cell count
(7 random fields/sample)

IgG	#1 (CH-84)	#52 (12-7)	#53 (13-7)
45	30	29	24
37	34	30	32
47	32	26	23
52	31	27	24
48	24	28	35
64	50	39	36
46	35	39	34

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #67 heavy chain CDR2

<400> 2

Gly Ile Ser Ser Gly Gly Ala Thr Phe Tyr Gly Ala Ala Met Lys Gly

1 5 10 15

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #67 heavy chain CDR3

<400> 3

Asp Ala Arg Ser Gly Ser Trp Ser Pro Asp Ala Gly Gln Ile Asp Ala

1 5 10 15

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #67 light chain CDR1

<400> 4

Ser Gly Ser Ser Gly Ser His Tyr Gly

1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #67 light chain CDR2

<400> 5

Ser Asn Asp Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 6

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #67 light chain CDR3
 <400> 6

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Gly Ile
 1 5

<210> 7
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #67 VH
 <400> 7

Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Leu Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Ser Ser Gly Gly Ala Thr Phe Tyr Gly Ala Ala Met Lys
 50 55 60
 Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg Leu
 65 70 75 80
 Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Asp Ala Arg Ser Gly Ser Trp Ser Pro Asp Ala Gly Gln Ile Asp
 100 105 110
 Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser Thr Ser
 115 120 125

<210> 8
 <211> 101
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #67 VL

<400> 8

Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Gly Thr Val Glu

1 5 10 15

Ile Thr Cys Ser Gly Ser Ser Gly Ser His Tyr Gly Trp Phe Gln Gln

20 25 30

Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Leu Ile Tyr Ser Asn Asp Lys

35 40 45

Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser

50 55 60

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Val

65 70 75 80

Tyr Phe Cys Gly Ser Ile Asp Ser Ser Gly Ile Phe Gly Ala Gly Thr

85 90 95

Thr Leu Thr Val Leu

100

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #84 heavy chain CDR1

<400> 9

Gly Phe Thr Phe Asn Gly Tyr Gly Met Asn

1 5 10

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #84 heavy chain CDR2

<400> 10

Gly Ile Asp Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Ala Tyr Ala Pro Ala Val Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #84 heavy chain CDR3

<400> 11

Gly Tyr Gly Asp Val Trp Gly Gly Asp Glu Ile Asp Ala

1 5 10

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #84 light chain CDR1

<400> 12

Ser Gly Gly Ser Ser Gly Tyr Gly

1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #84 light chain CDR2

<400> 13

Asp Asn Asp Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #84 light chain CDR3

<400> 14

Gly Gly Tyr Asp Asn Ser Val Gly Ile

1 5
 <210> 15
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #84 VH
 <400> 15
 Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Gly Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ala Gly Ile Asp Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Ala Tyr Ala Pro Ala Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Tyr Gly Asp Val Trp Gly Gly Asp Glu Ile Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser Thr Ser

115 120
 <210> 16
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #84 VL
 <400> 16
 Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Gly Thr Val Lys
 1 5 10 15
 Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ser Ser Gly Tyr Gly Trp His Gln Gln Lys
 20 25 30

Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Asp Asn Asp Lys Arg
 35 40 45

Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ser Gly Ser Thr
 50 55 60

Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Val Tyr
 65 70 75 80

Phe Cys Gly Gly Tyr Asp Asn Ser Val Gly Ile Phe Gly Ala Gly Thr
 85 90 95

Thr Leu Thr Val Leu
 100

<210> 17
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #67 VH

<400> 17
 gccgtgacgt tggacgagtc cgggggcccgc ctccagacgc ccggaggagc gtcagcctc 60
 gtctgcaagg gctccgggtt caccttcagc agttatggcc tgggttgggt gcgacaggcg 120
 cccggcaagg ggctcgagta cgttgcgggt attagtagcg gtggtgcaac attctacggg 180
 gcggcgatga agggccgtgc caccatctcg agggacaacg ggagagcac agtgaggctg 240
 cagctgaaca acctcagggc tgaggacacc gccacctact actgcgcaa agatgctcgc 300
 agtggtagtt ggagtctga tgctggtcaa atcgacgat ggggccacgg gaccgaagtc 360
 atcgtctcct ccactagt 378

<210> 18
 <211> 303
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #67 VL

<400> 18
 ctgactcagc cgtcctcggg gtcagcaaac ctgggaggaa ccgtcgagat cacctgctcc 60
 gggagtagtg gcagccacta tggctgggtc cagcagaagt cacctggcag tgcccctgtc 120
 actctgatct atagcaacga caagagacc tcggacatcc cttcacgatt ctccggttcc 180

aaatccggct ccacagccac attaaccatc actgggggtcc aagccgagga cgaggctgtc 240
 tatttctgtg ggagcataga cagcagtggg atatttgggg ccgggacaac cctgaccgtc 300
 cta 303

<210> 19
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> #84 VH

<400> 19
 gtgacgttgg acgagtccgg gggcggcctc cagacgccg gaggagcgt cagcctcgtc 60
 tgcaaggcct ccgggttac cttcaacggg tacggcatga actgggtgcg acaggcgcgc 120
 ggcaaggggc tggagtgggt cgctggtatt gatgacactg gtagttacac agcatacgcg 180
 ccggcgggtga ggggccgtgc caccatctcg agggacaacg ggcagagcac agtgaggctg 240
 cagctgaaca acctcagggc tgaggacacc gccacctact actgcgcaa aggttatggt 300
 gatgtttggg gtggtgatga gatcgacgca tggggccacg ggaccgaagt catcgtctcc 360

tccactagt 369

<210> 20
 <211> 303
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> #84 VL

<400> 20
 ctgactcagc cgtcctcggg gtcagcaaac ctgggaggaa ccgtcaagat cacctgctcc 60
 ggggtagca gcggtatgg ctggcaccag cagaaatcac ctggcagtgc ccctgtcact 120
 gtgatctatg acaacgacaa gagaccctcg gacatcctt cagattctc cggttcccta 180
 tccggctcca caaacacatt aaccatcact ggggtccaag ccgaggacga ggctgtctat 240
 ttctgtggtg gctacgacaa cagtgtcggg atatttgggg ccgggacaac cctgaccgtc 300

cta 303

<210> 21
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized #84 VH7

<400> 21

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Gly Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Asp Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Ala Tyr Ala Pro Ala Val

50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Gly Tyr Gly Asp Val Trp Gly Gly Asp Glu Ile Asp Ala Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 22

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized #84 VL11

<400> 22

Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala

1 5 10 15

Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ser Ser Gly Tyr Gly Trp His Gln Gln

20 25 30

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Asp Asn Asp Lys Arg

35 40 45

Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Thr

50 55 60

Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Cys Gly Gly Tyr Asp Asn Ser Val Gly Ile Phe Gly Gly Gly Thr
 85 90 95
 Lys Leu Thr Val Leu
 100

<210> 23

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized #84 VL12

<400> 23

Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala
 1 5 10 15
 Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ser Ser Gly Tyr Gly Trp His Gln Gln
 20 25 30
 Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Asp Asn Asp Lys Arg
 35 40 45

Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ser Gly Thr Thr
 50 55 60

Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Cys Gly Gly Tyr Asp Asn Ser Val Gly Ile Phe Gly Gly Gly Thr
 85 90 95
 Lys Leu Thr Val Leu
 100

<210> 24

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized #84 VL13

<400> 24

Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala

1 5 10 15

Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ser Ser Gly Tyr Gly Trp His Gln Gln

20 25 30

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Asp Asn Asp Lys Arg

35 40 45

Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ser Thr

50 55 60

Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr

65 70 75 80

Tyr Cys Gly Gly Tyr Asp Asn Ser Val Gly Ile Phe Gly Gly Gly Thr

85 90 95

Lys Leu Thr Val Leu

100