



등록특허 10-2678735



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월26일

(11) 등록번호 10-2678735

(24) 등록일자 2024년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/40 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C07K 16/40 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
 (21) 출원번호 10-2021-0093285
 (22) 출원일자 2021년07월16일
 심사청구일자 2021년07월16일
 (65) 공개번호 10-2022-0009910
 (43) 공개일자 2022년01월25일
 (30) 우선권주장
 1020200088476 2020년07월16일 대한민국(KR)
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020140018905 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
 재단법인 오송첨단의료산업진흥재단
 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명로 123
 (72) 발명자
 이승택
 서울특별시 서초구 반포대로 275, 124동 1602호(반포동, 래미안퍼스티지아파트)
 신원식
 서울특별시 종로구 평창24길 18(평창동, 금강하이츠빌라)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 17 항

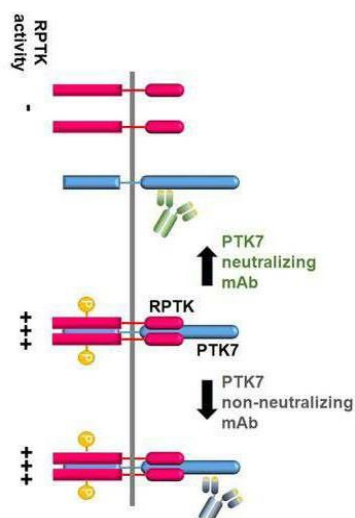
심사관 : 이미경

(54) 발명의 명칭 PTK7에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 PTK7에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 PTK7에 특이적으로 결합하여 이의 기능을 억제하는 PTK7의 중화 항체 및 이의 혈관신생, 세포 성장, 세포 이동 및 세포 침윤 억제 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 인간 PTK7 중화 단일클론 항체는 식도편평세포암 및 삼중음성유방암에서 자체적으로 효과적인 암세포 성장, 이동, 침윤 및 혈관신생 억제 효과를 나타냄을 확인하였는바, PTK7 양성의 다양한 암종에 적용할 수 있으며, 나아가 난치성 암 및 혈관신생 질환의 표적 치료제로써 개발되어 이에 대한 핵심적인 글로벌 치료제로 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 상기 PTK7 중화 단일클론 항체는 인간화 항체로 전환하여 임상에 사용할 수 있는 신약으로 개발하는데 필수적인 재료로 이용될 수 있으며, 단독으로뿐만 아니라 효과가 규명된 기존 항암제 등의 약물과 병용하여 항암 치료 효과를 극대화시키는데 활용될 수 있을 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

(72) 발명자

오시원

경기도 구리시 건원대로99번길 49-10, 2층(인창동)

최소영

세종특별자치시 누리로 27, 614동 1001호(한솔동, 첫마을6단지)

이세라

세종특별자치시 다정북로 109, 313동 302호(다정동, 가온마을3단지)

박소라

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명로 200, 예스오피스텔동 1206호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711104981

과제번호 2019M3A9A8065054

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발사업

연구과제명 비활성 수용체성 티로신 키나아제인 PTK7의 중화 단일클론 항체 기반 표적 항암 신

약의 선도물질 발굴

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2019.06.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

PTK7(protein tyrosine kinase 7)에 특이적으로 결합하며, 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역을 포함하는 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편으로서,

상기 항체 또는 이의 기능적 단편은

i) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1-VH, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2-VH, 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3-VH를 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1-VL, 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2-VL, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3-VL을 포함하는 경쇄 가변영역;

ii) 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1-VH, 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2-VH, 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3-VH를 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1-VL, 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2-VL, 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3-VL을 포함하는 경쇄 가변영역;

iii) 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1-VH, 서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2-VH, 서열번호 15의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3-VH를 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1-VL, 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2-VL, 서열번호 18의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3-VL을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는

iv) 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1-VH, 서열번호 20의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2-VH, 서열번호 21의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3-VH를 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 22의 아미노산 서열로 이루어지는 는 CDR1-VL, 서열번호 23의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2-VL, 서열번호 24의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3-VL을 포함하는 경쇄 가변영역;을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 기능적 단편은 서열번호 25의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 26의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 기능적 단편은 서열번호 27의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 28의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 기능적 단편은 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 30의

아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 기능적 단편은 서열번호 31의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 32의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 기능적 단편은 PTK7 단백질의 세포외 영역에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 항체는 IgG, IgA, IgM, IgE 및 IgD로 이루어진 군에서 선택되며, 상기 기능적 단편은 디아바디, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, dsFv 및 scFv로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 항체의 PTK7 항원 결합 부위는 Ig loop인 것을 특징으로 하는, 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 Ig loop는 서열번호 43으로 표시되는 Ig2 부위(Trp123-Ala220) 또는 서열번호 44로 표시되는 Ig67 부위(Arg529-Gln703)인 것을 특징으로 하는, 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편.

청구항 10

제1항의 항체 또는 그 기능적 단편을 암호화하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 11

제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터.

청구항 12

제11항의 벡터로 형질전환된, 세포.

청구항 13

제12항의 세포를 배양하여 경쇄 및 중쇄 가변영역을 포함하는 폴리펩티드를 생산하는 단계; 및

상기 세포 또는 이를 배양한 배양 배지로부터 상기 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는, PTK7(protein tyrosine kinase 7)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 기능적 단편의 생산방법.

청구항 14

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편을 유효성분으로 포함하는, 혈관신생 억제제.

청구항 15

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편을 유효성분으로 포함하는, 종양세포의 성장, 이동 또는 침윤 억제제.

청구항 16

제14항의 혈관신생 억제제를 유효성분으로 포함하는, 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

상기 혈관신생 관련 질환은 암, 자궁내막증, 비만, 관절염, 동맥경화증, 혈관종, 혈관섬유종, 혈관기형, 혈관유착, 부종성 경화증, 당뇨병성 망막증, 황반변성, 혈관신생성 녹내장, 혈관신생에 의한 각막 질환, 건선, 모세관 확장증, 화농성 육아종, 지루성 피부염 및 알츠하이머병으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 17

삭제

청구항 18

제15항의 종양세포의 성장, 이동 또는 침윤 억제제를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 PTK7에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 PTK7에 특이적으로 결합하여 이의 기능을 억제하는 PTK7의 중화 항체 및 이의 혈관신생, 세포 이동 및 세포 침윤 억제 용도에 관한 것이다.

배경 기술

Receptor protein tyrosine kinase(RPTK)는 인간에서 총 58종이 알려져 있으며, 리간드(ligand)가 결합하는 세포외 도메인(extracellular domain), 막통과 도메인(transmembrane domain) 및 세포내 티로신 인산화효소 도메

[0001]

[0002]

인(intracellular tyrosine kinase domain)으로 구성되어 있다. 리간드가 결합하면 RPTK는 이합체화(dimerization) 되고, 세포질 도메인(cytoplasmic domain)이 인산화를 통해 활성화되어 신호전달을 유도하게 된다.

[0003] 그러나 Defective RPTK들은 인산화를 촉매하는 티로신 인산화효소 도메인에 돌연변이(mutation)가 일어나 불활성 상태가 된 RPTK의 서브 그룹으로, 인간에서는 ErbB3, PTK7, EphA10, EphB6 및 RYK의 5종의 Defective RPTK가 보고되어 있다. 이러한 Defective RPTK는 비활성 상태이지만 그림에도 불구하고 발암 등 생리학적 기능이 제시되고 있다. 예컨대, ErbB3는 다른 ErbB family member와 결합하여 발암 신호전달 과정을 유발함이 규명되었고, ErbB3 중화 인간 항체(KTN3379)가 저항성 없는 표적 항암 치료제로 개발되어 임상 시험 중에 있다.

[0004] Defective RPTK 중 다른 하나인 인간 PTK7은 본 발명자가 처음으로 발견하여 명명한 것으로(Oncogene, 1993;8:3403-10, J. Biochem., 1996;119(2):235-9), 비활성형 수용체 타입의 단백질 인산화 효소(defective receptor protein tyrosine kinase; defective RPTK)이다. 구체적으로 PTK7 폴리펩타이드는 ER 신호 펩타이드, 7개의 면역글로불린(immunoglobulin) 형태의 루프(loop, 이하, Ig loop)를 갖는 세포외 도메인, 막통과 도메인, 막근접 도메인(juxtamembrane domain), 효소 활성이 결여된 티로신 인산화효소 도메인 및 C-말단 꼬리 부위로 이루어져 있다. PTK7은 초파리와 닭의 발생과정에서 axon guidance나 심장 형성 과정에 관여한다고 보고되었고, 평면세포 극성(planar cell polarity; PCP) 및 Wnt 신호전달 과정에 관여하는 것으로 보고되었다. 또한, 개구리의 한 속인 제노프스(Xenopus)의 발생과정에서 PTK7이 RPTK 중 하나인 ROR2와 결합하여 평면세포 극성과 신경능 이동(neural crest migration)을 조절한다고 보고하였다.

[0005] 또한, PTK7은 대장암 등 여러 종류의 암에서 발현 증가가 관찰되었으며, 발암 및 암의 전이에도 관여함이 규명되었다. 구체적으로, 본 발명자들은 대장암 세포에서 PTK7이 ADAM17에 의하여 shedding되고, 이어서 γ -secretase에 의하여 절단되어 PTK7-CTF2를 생성하고, PTK7-CTF2는 핵으로 이동하여 세포 성장과 연관된 유전자 발현을 유도함을 보고한 바 있다(J. Biol. Chem. 2012;287:25001-9). 또한, 본 발명자들은 PTK7이 혈관 신생에도 중요한 역할을 수행함을 발견하였다(Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008;371:793-8). 상기와 같은 많은 연구들을 통해 PTK7이 KDR 또는 FGFR1 등의 RPTK를 활성화하여 발암성을 촉진시키는 기전을 갖고 있으며(Biochim. Biophys. Acta, 2015;1853:2251-60, FASEB J., 2019;33:12960-71), 여러 암에서 발암 연관성이 규명되었으므로, PTK7은 다양한 암의 표적 유전자로 주목받고 있다. 그러나 PTK7은 티로신 인산화효소의 활성부위가 변형되어 있으므로 활성 저해제의 개발이 용이하지 않은 바, PTK7의 기능을 억제하기 위한 다른 접근이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 상기와 같은 배경 하에, 본 발명자들은 PTK7의 기능을 억제하여 다양한 암종의 치료에 이용될 수 있는 중화 항체를 개발하기 위해 연구 노력한 결과, PTK7의 세포외 영역에 특이적으로 결합함으로써 PTK7의 활성을 억제하여 결과적으로 암세포의 성장, 이동, 침윤 및 혈관신생 효과가 억제되는 것을 확인하였는바, 이로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 이에, 본 발명은 PTK7(protein tyrosine kinase 7)에 특이적으로 결합하며, 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역을 포함하는 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그 기능적 단편을 암호화하는, 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 기능적 단편의 생산방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 기능적 단편을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 억제제, 및 상기 억제제를 유효성분으로 포함하는 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 기능적 단편을 유효성분으로 포함하는 종양세포의 성장, 이동 또는 침윤 억제제, 및 상기 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 또 다른

목적으로 한다.

[0013]

[0014] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 PTK7(protein tyrosine kinase 7)에 특이적으로 결합하며, 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역을 포함하는 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편으로서,

[0016] 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 1, 7, 13, 또는 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1-VH, 서열번호 2, 8, 14, 또는 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2-VH, 서열번호 3, 9, 15, 또는 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3-VH를 포함하며,

[0017] 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 4, 10, 16, 또는 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1-VL, 서열번호 5, 11, 17, 또는 23의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2-VL, 서열번호 6, 12, 18, 또는 24의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3-VL을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일 구현예로, 상기 항체 또는 이의 기능적 단편은 서열번호 25의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 26의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 항체 또는 이의 기능적 단편은 서열번호 27의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 28의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 항체 또는 이의 기능적 단편은 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 30의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 항체 또는 이의 기능적 단편은 서열번호 31의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 32의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 항체 또는 이의 기능적 단편은 PTK7 단백질의 세포외 영역에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 항체는 IgG, IgA, IgM, IgE 및 IgD로 이루어진 군에서 선택되며, 상기 기능적 단편은 디아바디, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, dsFv 및 scFv로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 항체의 PTK7 항원 결합 부위는 lg loop일 수 있다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 lg loop는 서열번호 43으로 표시되는 lg2 부위(Trp123-Ala220) 또는 서열번호 44로 표시되는 lg67 부위(Arg529-Gln703)일 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그 기능적 단편을 암호화하는, 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 벡터를 제공한다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된, 세포를 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 세포를 배양하여 경쇄 및 중쇄 가변영역을 포함하는 폴리펩티드를 생산하는 단계; 및 상기 세포 또는 이를 배양한 배양 배지로부터 상기 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는, PTK7(protein tyrosine kinase 7)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 기능적 단편의 생산방법을 제공한다.

[0032] 또한, 본 발명은 상기 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편을 유효성분으로 포함하는, 혈관신생 억제제를 제공한다.

[0033] 또한, 본 발명은 상기 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편을 유효성분으로 포함하는, 종양세포의 성장, 이동 또는 침윤 억제제를 제공한다.

[0034] 또한, 본 발명은 상기 혈관신생 억제제를 유효성분으로 포함하는, 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0035] 본 발명의 일 구현예로, 상기 혈관신생 관련 질환은 암, 자궁내막증, 비만, 관절염, 동맥경화증, 혈관종, 혈관

섬유증, 혈관기형, 혈관유착, 부종성 경화증, 당뇨병성 망막증, 황반변성, 혈관신생성 억제제, 혈관신생에 의한 각막 질환, 건선, 모세관 확장증, 화농성 욕아증, 지루성 피부염 및 알츠하이머병으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

- [0036] 또한, 본 발명은 상기 종양세포의 성장, 이동 또는 침윤 억제제를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0037] 또한, 본 발명은 상기 혈관신생 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0038] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물의, 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료용도를 제공한다.
- [0039] 또한, 본 발명은 상기 종양세포의 성장, 이동 또는 침윤 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0040] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물의, 암 예방 또는 치료용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명에 따른 4종의 인간 PTK7 중화 단일클론 항체는 식도편평세포암 및 삼중음성유방암에서 자체적으로 효과적인 암세포 성장, 이동, 침윤 및 혈관신생 억제 효과를 나타냄을 확인하였는바, PTK7 양성의 다양한 암종에 적용할 수 있으며, 나아가 난치성 암 및 혈관신생 질환의 표적 치료제로써 개발되어 이에 대한 핵심적인 글로벌 치료제로 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 상기 PTK7 중화 단일클론 항체는 인간화 항체로 전환하여 임상에 사용할 수 있는 신약으로 개발하는데 필수적인 재료로 이용될 수 있으며, 단독으로뿐만 아니라 효과가 규명된 기존 항암제 등의 약물과 병용하여 항암 치료 효과를 극대화시키는데 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 본 발명에 따른 PTK7 중화 단일클론 항체(neutralizing mAb) 및 비중화 단일클론 항체(non-neutralizing mAb)에 의한 RPTK의 활성 조절을 나타낸 모식도이다.
- 도 2a는 PTK7 단백질의 구조를 도시한 것이고, 도 2b는 PTK7의 세포외 도메인(extracellular domain)에 해당하는 soluble PTK7 (sPTK7)을 발현하는 HEK293 세포를 배양하여, 배양액에 있는 단백질을 황산 암모늄으로 침전한 후 크로마토그래피를 수행하여 인간 sPTK7 단백질을 정제한 결과이다.
- 도 3은 식도편평세포암 세포주인 KYSE-30에 PTK7 단일클론 항체 9종을 각각 3 또는 10 μ g/ml 농도로 처리한 후, 혈청에 의해 유도된 세포 성장의 저해 효과를 비교 분석한 결과이다(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. Vector. N=3).
- 도 4는 KYSE-30 세포주에 PTK7 단일클론 항체 9종을 각각 3 또는 10 μ g/ml 농도로 처리한 후 콜라겐이 코팅된 배양용기에서 상기 항체에 의한 세포 부착 저해 효과를 비교 분석한 결과이다(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. Vector. N=3).
- 도 5는 KYSE-30 세포주에 PTK7 단일클론 항체 9종을 각각 3 μ g/ml 농도로 처리한 후, 혈청에 의해 유도된 세포질 단백질의 티로신 인산화(pY), Akt 및 Erk의 인산화(pAkt 및 pErk) 저해 효과를 비교 분석한 결과이다.
- 도 6은 FGFR1을 발현하는 HEK293 세포에 PTK7 단일클론 항체를 각각 3 또는 10 μ g/ml 농도로 처리한 후, acidic FGF에 의해 유도된 FGFR1 인산화의 저해 정도를 비교 분석한 결과이다(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. Vector. N=5).
- 도 7은 삼중음성유방암 세포주인 MDA-MB-231에 PTK7 단일클론 항체 9종을 각각 3 또는 10 μ g/ml 농도로 처리한 후, 혈청에 의해 유도된 세포 성장의 저해 효과를 비교 분석한 결과이다(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. Vector. N=3).
- 도 8은 MDA-MB-231 세포주에 PTK7 단일클론 항체 9종을 각각 3 또는 10 μ g/ml 농도로 처리한 후 콜라겐이 코팅된 배양용기에서 상기 항체에 의한 세포 부착 저해 효과를 비교 분석한 결과이다(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. Vector. N=3).
- 도 9는 MDA-MB-231 세포주에 PTK7 단일클론 항체 9종을 각각 3 μ g/ml 농도로 처리한 후, 혈청에 의해 유도된 세포질 단백질의 티로신 인산화(pY), Akt 및 Erk의 인산화(pAkt 및 pErk) 저해 효과를 비교 분석한 결과이다.

도 10은 KDR을 과발현하는 HEK293 세포에 본 발명에서 선별된 5종의 PTK7 중화 단일클론 항체를 각각 3 또는 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 후, VEGF에 유도된 KDR 인산화의 저해 효과를 비교 분석한 결과이다(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. Vector. N=3).

도 11은 KDR을 과발현하는 HEK293 세포에 본 발명에서 선별된 5종의 PTK7 중화 단일클론 항체를 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 후, VEGF에 유도된 세포 이동에 대한 저해 효과를 wound healing 방법으로 분석한 결과이다(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. None. N=3).

도 12는 본 발명에서 최종 선별된 4종의 PTK7 중화 단일클론 항체의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역에 대한 아미노산 서열정보를 나타낸 것이다.

도 13a는 본 발명에 따른 4종의 PTK7 중화 단일클론 항체와 sPTK7 (PTK7-Ext-His) 및 이의 deletion mutant들과의 결합의 결과를 모식도로 나타낸 것이다.

도 13b는 본 발명에 따른 4종의 PTK7 중화 단일클론 항체와 sPTK7 (PTK7-Ext-His) 및 이의 deletion mutant들과의 결합을 면역침전 방법으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 본 발명자들은 티로신 인산화효소의 활성부위가 변형되어 있어 활성 저해제 개발이 용이하지 않은 PTK7의 기능을 효과적으로 억제하기 위하여 인간 PTK7 중화 단일클론 항체 4종을 개발하였으며, 이의 발암, 전이 및 혈관신생에 대한 억제 효과를 확인하였는바 이로써 본 발명을 완성하였다.
- [0044] 이에, 본 발명은 PTK7(protein tyrosine kinase 7)에 특이적으로 결합하며, 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역을 포함하는 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편으로서, 상기 중쇄 가변영역은 서열번호 1, 7, 13, 또는 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1-VH, 서열번호 2, 8, 14, 또는 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2-VH, 서열번호 3, 9, 15, 또는 21의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3-VH를 포함하며, 상기 경쇄 가변영역은 서열번호 4, 10, 16, 또는 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1-VL, 서열번호 5, 11, 17, 또는 23의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2-VL, 서열번호 6, 12, 18, 또는 24의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3-VL을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편을 제공한다.
- [0045] 본 발명에서 사용되는 용어, “항체(Antibody)”는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하며, 폴리클로날(polyclonal) 항체 및 모노클로날(monoclonal) 항체를 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 무린 항체), 이중결합항체(예를 들면, 양특이성 항체), 이중 특이적(bispecific) 항체와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함한다. 본 발명에 있어서 항체는 바람직하게 단일클론 항체이다.
- [0046] 본 발명의 ‘항체’, ‘항-PTK7 항체’ 및 ‘PTK7에 특이적으로 결합하는 항체’는 본 발명에서 가장 광의의 의미로 사용되며, 구체적으로 PTK7에 특이적으로 결합하는 결합 부위를 포함한다.
- [0047] 본 발명에 따른 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편은 PTK7에 특이적으로 결합하며, 특히 PTK7의 세포외 도메인에 매우 높은 친화도로 특이적으로 부착할 수 있다.
- [0048] 상기 PTK7은 당업계에 PTK7으로 알려진 것이라면 그 구체적 생물기원이 특별히 제한되지 않으며, 예컨대, 생쥐(mouse), 인간, 쥐(rat), 닭, 개 또는 원숭이를 포함하는 포유류 유래의 것일 수 있고, 바람직하게는 인간 유래의 것을 의미하는 것일 수 있다.
- [0049] 전형적으로 항체는 중쇄 및 경쇄를 가지며 각각의 중쇄 및 경쇄는 불변영역 및 가변영역(상기 부위는 “도메인”으로 또한 알려져 있음)을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변영역은 각각 중쇄가변영역(VH) 또는 경쇄가변영역(VL)의 하나의 도메인으로 이루어져 있다. 경쇄와 중쇄는 각각의 가변영역과 불변영역이 나란히 정렬되어 1개의 공유 이황결합(disulfide bond)에 의해 연결되고, 경쇄와 결합한 두 분자의 중쇄는 2개의 공유 이황결합을 통해 연결되어 전체 항체의 형태를 형성한다. 전체 항체는 중쇄 및 경쇄의 가변영역을 통해 항원에 특이적으로 결합하며, 전체 항체는 2개의 중쇄 및 경쇄의 쌍(HC/LC)으로 구성되어 있으므로, 한 분자의 전체 항체는 두 개의 가변영역을 통해 동일한 두 개의 항원에 결합하는 2가의 단일 특이성을 갖게 된다.
- [0050] 항체가 항원에 결합하는 부위를 포함하는 가변영역은 “상보성 결정 영역”(complementarity-determining region, 이하, ‘CDR’)이라고 불리우는 3개의 다변 가능한 영역 및 4개의 “구조영역”(framework region)을 포함한다. 상기 CDR은 주로 항원의 에피토프(epitope)에 결합하는 역할을 한다. 각각의 사슬의 CDR은 전형적으

로 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3로 불리우고, 또한 특정 CDR이 위치하고 있는 사슬에 의해서 식별된다. 그러나 모든 CDR 단계들이 항원 결합에 직접 관여할 필요는 없다.

- [0051] 본 발명에 있어서, 상기 항체는 IgG, IgA, IgM, IgE 및 IgD로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 IgG일 수 있다. 상기 IgG 형태의 항체는 IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄ 서브타입 형태를 모두 포함한다.
- [0053] 본 발명의 상기 기능적 단편은 전체 항체의 항원 특이적 결합력을 유지하고 있는 항체의 단편을 의미하며, 상기 단편은 모항체의 PTK7 친화도의 적어도 20%, 50%, 70%, 80%, 바람직하게는 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 또는 그 이상을 보유한다. 구체적으로, 상기 단편은 디아바디, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, dsFv 및 scFv 로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명의 항체 또는 그 단편은 이의 생물학적 활성을 실질적으로 변경하지 않는 보존적 아미노산 치환(항체의 보존적 변이체라고 함)을 포함할 수 있다.
- [0055] 본 발명자들은 구체적인 실시예에서 상기 항-PTK7 항체를 제조하고 이의 PTK7 기능 억제에 따른 항암 효과를 확인하였다.
- [0056] 본 발명의 일 실시예에서는, PTK7 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체를 생산하기 위해 상기 항체를 생산하기 위한 하이브리도마 세포주를 제작 및 선별하였으며, 결과적으로 PTK7 단백질 구조에서 세포의 도메인을 항원으로 이에 대한 결합력이 가장 우수한 9종의 단일클론 항체를 생산하는 세포주들을 선별하였다. 또한 상기 각 하이브리도마 세포주들로부터 9종의 항체를 생산하였다(실시예 2 참조).
- [0057] 본 발명의 다른 실시예에서는, 식도편평세포암 세포주인 KYSE-30에 9종의 항체를 상이한 두 농도로 각각 처리하고 세포 이동 및 부착 억제 효과를 평가하였고(실시예 3-1 참조), 또한 각 항체가 PTK7의 활성을 억제하는지 분자적 수준에서 확인하기 위해 각 항체를 FGFR1을 발현시킨 HEK293 세포에 상이한 두 농도로 각각 처리하고 acidic FGF에 의해 유도된 FGFR1 인산화의 저해 정도를 평가하였다(실시예 3-2 참조).
- [0058] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 삼중음성유방암 세포주인 MDA-MB-231에 역시 9종의 항체를 상이한 두 농도로 각각 처리하고 세포 이동 및 부착 억제 효과를 평가하였고, 항체 처리에 의한 티로신 인산화와 Akt와 Erk의 인산화를 분석하여 삼중유방암세포에서 본 발명에 따른 각 항체의 암세포 성장 및 부착, 발암 신호전달 과정의 억제효과를 평가하였다(실시예 4 참조).
- [0059] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 상기 실시예 결과들로부터 우수한 항암 효과를 나타내는 5종의 항체를 선별한 후 각 항체가 PTK7의 혈관신생을 억제하는 효과가 있는지를 조사하였다. 그 결과, 상기 각 항체에서 VEGF에 의하여 유도된 kinase insert domain receptor(KDR)의 인산화를 억제하는 효능과 KDR을 발현하는 세포의 이동을 저해하는 효과가 관찰되었으나, 특히 4종의 항체에서 저해능이 우수하였다(실시예 5 참조).
- [0060] 상기 실시예 결과들로부터, 우수한 항암 및 항 신생혈관 효능이 있는 최종 4종의 항체를 선별하였다. 본 발명에 따른 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편은 PTK7의 기능을 효과적으로 차단하여 다양한 암종에서 PTK7의 발현 또는 활성화에 의한 발암, 전이 혈관신생을 우수한 효과로 억제함으로써 항암효과를 달성할 수 있음을 알 수 있다.
- [0061] 본 발명에 있어서, 바람직하게 상기 항체 또는 이의 기능적 단편은 각각 서열번호 25의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 26의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역; 서열번호 27의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 28의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역; 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 30의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 31의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 32의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 것일 수 있다.
- [0062] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0063] 본 발명에서 사용되는 용어 ‘폴리뉴클레오티드’는 올리고뉴클레오티드 또는 핵산으로 기재될 수도 있으며, DNA분자들(예를 들어, cDNA 또는 유전체(genomic DNA), RNA 분자들(예를 들어, mRNA), 뉴클레오티드 유사체들을 사용하여 생성된 상기 DNA 또는 RNA의 유사체들(예를 들어, 펩티드 핵산 및 비-자연적으로 발생하는 뉴클레오티드 유사체들) 및 이들의 하이브리드들이 포함된다. 상기 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥(single-stranded) 또는 이중-가닥(doublestranded)이 될 수 있다.
- [0064] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 항체 또는 그 단편을 암호화하는 것이면 그 서열이 특별히 제한되지

아니하는 것이다.

- [0065] 본 발명에 있어서, 바람직하게 상기 항체 또는 이의 기능적 단편은 각각 서열번호 33의 염기서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 34의 염기서열로 이루어진 경쇄 가변영역; 서열번호 35의 염기서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 36의 염기서열로 이루어진 경쇄 가변영역; 서열번호 37의 염기서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 38의 염기서열로 이루어진 경쇄 가변영역; 또는 서열번호 39의 염기서열로 이루어진 중쇄 가변영역 및 서열번호 40의 염기서열로 이루어진 경쇄 가변영역을 포함하는 것일 수 있다.
- [0066] 본 발명의 항체 또는 그 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 당 업계에 잘 알려진 방법에 의하여 얻어질 수 있다. 예를 들어, 상기 항체의 중쇄 및 경쇄의 일부분 또는 전부를 코딩하는 DNA 서열 또는 해당 아미노산 서열에 근거하여, 당해 분야에 잘 알려진 올리고뉴클레오타이드 합성기법, 예를 들어 중합효소 연쇄 반응(PCR)법 등을 사용하여 합성할 수 있다.
- [0067] 본 발명에 있어서, 상기 항체 또는 이의 기능적 단편의 PTK7 항원 결합 부위는 PTK7의 Ig loop일 수 있으며, 보다 구체적으로 본 발명의 PTK7 중화 항체 #43가 결합하는 Ig loop는 서열번호 43으로 표시되는 Ig2 부위(Trp123-Ala220, 123번 위치의 Trp 내지 220번 위치의 Ala)일 수 있고, PTK7 중화 항체 #32, #42, #50은 서열번호 44로 표시되는 Ig67 부위(Arg529-Gln703, 529번 위치의 Arg 내지 703 위치의 Gln)에 결합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0068] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0069] 본 발명에서 사용되는 용어, '벡터(vector)'는 본 발명의 항체 또는 그 단편의 재조합 생산을 위하여 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 복제 또는 발현의 목적으로 이용되며, 일반적으로 시그널 서열, 복제 기원, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함한다. 본 발명의 벡터는 바람직하게는 발현벡터일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 조절시퀀스, 예를 들어 프로모터에 작동 가능하게 연결된 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터일 수 있다.
- [0070] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.
- [0071] 본 발명의 세포는 본 발명의 발현 벡터에 포함된 항체 또는 그 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는데 사용될 수 있는 세포라면 그 종류는 특별히 제한되지 아니한다. 본 발명에 따른 발현 벡터로 형질 전환된 세포(숙주세포)는 원핵생물(예를 들어, 대장균), 진핵생물(예를 들어, 효모 또는 다른 균류), 식물 세포(예를 들어, 담배 또는 토마토 식물 세포), 동물 세포(예를 들어, 인간 세포, 원숭이 세포, 햄스터(hamster) 세포, 랫 세포(rat cell), 마우스 세포(mouse cell), 곤충 세포 또는 이들에서 유래한 하이브리도마일 수도 있으나, 바람직하게는 인간을 포함하는 포유류에서 유래한 세포일 수 있다.
- [0072] 본 발명에서 사용되는 용어 '형질전환(transformation)'은 외래성 폴리뉴클레오티드가 도입됨에 의한 숙주 세포의 유전자형의 변형을 의미하며, 그 형질전환에 사용된 방법과 상관없이 외래성 폴리뉴클레오티드가 숙주 세포 내로 도입된 것을 의미한다. 숙주 세포 내로 도입된 외래성 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포의 게놈 내로 통합되어 유지되거나 통합되지 않고 유지될 수 있는데, 본 발명은 양자 모두 포함한다.
- [0073] 본 발명에 따른 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편을 발현할 수 있는 재조합 발현 벡터는 당 업계에 공지된 방법, 예를 들어 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주입, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기천공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 핵산을 유입시키기 위한 공지된 방법에 의해 항체 또는 그 단편을 생산하기 위한 세포 내부로 도입하여 형질 전환할 수 있으나, 형질전환 방법이 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0074] 또한, 본 발명은 상기 세포를 배양하여 경쇄 및 중쇄 가변영역을 포함하는 폴리펩티드를 생산하는 단계; 및 상기 세포 또는 이를 배양한 배양 배지로부터 상기 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는, PTK7(protein tyrosine kinase 7)에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 기능적 단편의 생산방법을 제공한다.
- [0075] 상기 세포 배양은 세포의 종류에 따라 배지 조성 및 배양 조건이 달라질 수 있으며 이는 해당 기술분야의 통상의 기술자가 적절히 선택 및 조절할 수 있다.
- [0076] 상기 항체 분자는 세포의 세포질 내에 축적되거나, 세포로부터 분리되거나, 적절한 신호 서열에 의하여 페리플라즈마 또는 세포외 배지(supernatant)로 표적화(targeted)될 수 있다.또한, 생산된 항체 분자를 본 기술분야의

통상의 기술자에게 잘 알려져 있는 방법을 이용하여 리폴딩(refolding)시키고 기능적 형태(conformation)를 갖도록 하는 것이 바람직하다. 상기 폴리펩타이드의 회수는 생산된 폴리펩타이드의 특성 및 세포의 특성에 따라 달라질 수 있으며, 이는 본 기술분야의 통상의 지식을 가진 자가 적절히 선택 및 조절할 수 있다.

[0077] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 그 단편을 치료와 접촉시키는 단계 및 상기 항체 또는 그 단편을 검출하는 단계를 포함하는 PTK7의 특이적 검출 방법을 제공한다.

[0078] 통상의 기술자는 항체를 이용하여 단백질을 검출하는 공지의 방법을 적절하게 선택하고, 선택된 방법에 적합하게 시료를 준비할 수 있다. 또한 시료는 암 또는 암전이 여부를 진단하고자 하는 피검체에서 채취된 생검 등으로 얻어진 세포나 조직, 혈액, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액 등일 수도 있다. 상기 항체를 이용하여 단백질을 검출하는 방법이란 여기 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 웨스턴 블랏, 면역 블랏, 닷 블랏, 면역조직화학염색(immunohistochemistry), 효소면역분석(ELISA), 방사능면역검정법(radioimmunoassay), 경쟁적 결합 분석, 면역침전 등이 있다.

[0079] 상기 항체 또는 그 단편은 이의 '검출'을 위하여, 일반적으로 검출가능 모이어티(moiety)로 표시될 수 있다. 예를 들어 방사성 동위원소 또는 형광표지로 표시될 수 있고, 다양한 효소-기질 표지가 이용가능하며, 상기 효소적 표지의 예는 초파리 루시페라제 및 세균 루시페라제와 같은 루시페라제, 루시페린(luciferin), 2,3-다이하이드로프탈라진디옥세스, 말레이트 디하이드로게나제, 유라제(urase), 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRPO)와 같은 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타제, β -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 라이소자임, 사카라이드 옥시다제(예를 들어 글루코스옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 디하이드로게나제), 헤테로사이클릭 옥시다제(예를 들어 유리카제 및 잔틴 옥시다제), 락토퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제 등을 포함한다. 항체에 효소를 접합시키는 기술은 공지된 기술을 이용하여 항체에 직접 또는 간접적으로 접합될 수 있다. 예를 들어, 항체는 바이오틴(biotin)에 접합될 수 있고 상기에 언급된 3종의 광범위한 카테고리에 속하는 임의의 표지들이 아비딘과, 또는 그 반대로 접합될 수 있다. 바이오틴은 아비딘(avidin)에 선택적으로 결합하고, 따라서 이 표지는 이러한 간접적 방식으로 항체에 접합될 수 있다.

[0080] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편을 유효성분으로 포함하는, 혈관신생 억제제를 제공한다.

[0081] 또한, 본 발명은 상기 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편을 유효성분으로 포함하는, 종양세포의 성장, 이동 또는 침윤 억제제를 제공한다.

[0082] 또한, 본 발명은 상기 혈관신생 억제제를 유효성분으로 포함하는, 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0083] 본 발명에서, 상기 “혈관신생 관련 질환”은 비정상적이거나 과도한 혈관신생(angiogenesis)이 지속적으로 일어남으로써 유도될 수 있는 질환으로, 구체적으로는 암, 자궁내막증, 비만, 관절염, 동맥경화증, 혈관종, 혈관섬유종, 혈관기형, 혈관유착, 부종성 경화증, 당뇨병성 망막증, 황반변성, 혈관신생성 녹내장, 혈관신생에 의한 각막 질환, 건선, 모세관 확장증, 화농성 육아종, 지루성 피부염 및 알츠하이머병으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0084] 또한, 본 발명은 상기 종양세포의 성장, 이동 또는 침윤 억제제를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0085] 본 발명에 있어서, 상기 암은 PTK7의 발현 또는 활성이 증가되어 있는 것이 바람직하며, 구체적으로는 방광암, 골암, 혈액암, 유방암, 흑색종양, 갑상선암, 부갑상선암, 결장암, 직장암, 인후암, 후두암, 폐암, 식도암, 췌장암, 대장암, 위암, 설암, 피부암, 뇌종양, 자궁암, 두부 또는 경부암, 담낭암, 구강암, 결장암, 항문 부근암, 중추신경계 종양, 간암 및 대장암으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0086] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 항-PTK7 항체 또는 이의 기능적 단편을 포함하는 혈관신생 억제제 또는 종양세포의 성장, 이동 또는 침윤 억제제를 유효성분으로 포함하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로텍스트린, 텍스트로즈 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화

에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.

[0087] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0088] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 “약학적으로 유효한 양”은 의학적 치료 또는 진단에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 진단하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0089] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성률 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0090] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0091] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0092] 본 발명에서 “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0093] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물의 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료용도를 제공한다.

[0094] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물의 암 예방 또는 치료용도를 제공한다.

[0096] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0098] [실시예]

[0099] **실시예 1. 실험재료 및 실험방법**

[0100] **1-1. 세포배양**

[0101] 본 발명의 실시예에서 사용한 인간 태아 신장 HEK293 세포, 식도편평세포암 KYSE-30 세포, 삼중음성유방암 MDA-MB-231 세포는 10% FBS, 100 unit/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)을 이용해 5% CO₂ 및 95% 공기가 존재하는 37℃에서 배양하였다.

[0103] **1-2. His-tag가 부착된 인간 sPTK7 발현 플라스미드의 제조**

[0104] 먼저, 인간 PTK7 전장 cDNA(J Biochem (Tokyo) 119: 235-239)에서 4.2-kb의 EcoRI 단편을 얻어, pcDNA3 벡터 (Invitrogen사로부터 구입)의 EcoRI 사이트에 서브클로닝함으로써 인간 PTK7 발현 벡터인 pcDNA3-hPTK7을 제작하였다. 인간 PTK7 단백질의 세포외 도메인 중 C-말단 부분을 암호화하고 있는 640-bp의 cDNA 단편에 His-tag 암호화 서열과 번역 종료 코돈을 포함하도록 중합 연쇄 반응 (polymerase chain reaction; PCR)을 통하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머 쌍은 5'-AAAAGCTCAAGTTCACACCA-3'(서열번호 41) (GenBank U40271의 염기서열 1646-1665)과 5'-GCCTAGATCAATGATGATGATGATGCTGGATCATCTTGTAGGG-3'(서열번호 42) [GenBank U40271의 염기서열 2239-2256인 His-tag 암호화 서열 (상기 서열 중 밑줄 그은 부분), 종료 코돈 및 XbaI 사이트 (상기 서열 중 이탤릭체 부분)]이었다. pcDNA3-hPTK7은 XhoI (GenBank U40271의 염기서열 1829)과 XbaI (pcDNA3의 다중 클로닝 부위 (multi-cloning site))으로 절단하여 1.6 kb의 단편을 제거한 후, 상기 PCR 결과물을 XhoI과 XbaI의

로 절단하여 0.45 kb의 단편을 분리하고 접합시킴으로써, 인간 sPTK7 발현벡터인 pcDNA3-hPTK7-Ext-His 플라스미드를 얻었다. 제조된 플라스미드는 양방향 서열확인을 통하여 PCR 오차가 없음을 확인하였다.

[0106] 실시예 2. PTK7 단일클론 항체 생산

[0107] 2-1. PTK7 단일클론 항체 생산 하이브리도마 세포주의 제작 및 선별

[0108] 본 발명자들은 PTK7 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체를 생산하기 위하여, 먼저 상기 항체를 생산하기 위한 하이브리도마(hybridoma) 세포주를 제작 및 선별하고자 하였다.

[0109] 이를 위해, 도 2a에 도시된 바와 같은 PTK7 단백질 구조에서 세포외 도메인(Extracellular domain)(soluble PTK7; sPTK7)을 발현하는 상기 실시예 1-2의 방법으로 제조한 sPTK7 발현벡터인 pcDNA3-hPTK7-Ext-His를 HEK293 세포에 인산칼슘 방법으로 형질감염시킨 후 1.2 mg/ml의 G418을 처리하여 G418-저항성 세포 클론들을 선별하였다. 선별된 세포 클론들을 대상으로 항-펜타-His 단일 항체(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 인간 sPTK7를 안정적으로 발현하는 세포 클론들을 재선별하였다. 이후, 인간 sPTK7을 안정적으로 발현하는 세포 클론을 7일간 무혈청 배지로 배양하여 획득한 배양액에 페닐메탄설폰일 플루오라이드(phenylmethanesulphonyl fluoride; PMSF)와 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA)을 각각 1 mM이 되도록 가하였다. 이 배양액에 황산암모늄(ammonium sulfate)을 가하여 70%까지 포화시켜 단백질을 침전시킨 뒤, 침전물들을 1 mM 페닐메탄설폰일 플루오라이드와 1 mM 에틸렌디아민테트라아세트산이 포함된 인산 완충 식염수(50 mM NaH₂PO₄, pH7.4, 150 mM NaCl)로 용해시켜 인산 완충 식염수로 투석하였다. 투석을 마친 시료들을 Ni²⁺-NTA 아가로오스(Qiagen사로부터 구입)에 로딩하여 이미다졸로 용출한 후, 인산 완충 식염수로 재투석하여 정제한 인간 sPTK7을 확보하였다. 정제된 결과는 도 2b에 나타내었다.

[0110] 다음으로, 정제된 인간 sPTK7을 항원으로 하여 마우스 항-PTK7 하이브리도마 세포주를 제작하였고, 각 세포주에서 배양액을 수집하여 ELISA를 수행함으로써 PTK7과의 반응성을 분석하였다. 분석 결과, PTK7과 결합력이 가장 우수한 9종의 단일클론 항체(PTK7 mAb #1, 6, 32, 39, 42, 43, 46, 49, 50)를 생산하는 세포주들을 선별하였다.

[0112] 2-2. 선별된 하이브리도마 세포주에서 PTK7 항체 9종 정제

[0113] 상기 실시예 2-1에서 선별된 각 세포주로부터 PTK7 항체를 정제하기 위해, PTK7 결합력이 우수한 인간 PTK7 단일클론 항체 9종을 분비하는 하이브리도마 세포주를 배양하였다. 각 하이브리도마 세포주를 무혈청 배지에서 배양하여 획득한 배양액에 페닐메탄설폰일 플루오라이드와 에틸렌디아민테트라아세트산을 각각 1 mM이 되도록 가하였다. 이 배양액에 황산암모늄을 가하여 50%까지 포화시켜 단백질을 침전시킨 뒤, 침전물들을 1 mM 페닐메탄설폰일 플루오라이드와 1 mM 에틸렌디아민테트라아세트산이 포함된 0.1 M Tris-HCl(pH8.0) 용액으로 용해시켰다. 용해시킨 시료들을 protein A/G 아가로오스 컬럼에 로딩하고, 0.1 M Tris-HCl(pH8.0) 용액에 이어서 10 mM Tris-HCl(pH8.0) 용액으로 세척한 후 0.1 M Glycine-HCl(pH 2.8)로 항체를 용출하였다. 용출한 항체에 용출 부피의 1/10 부피의 1 M Tris HCl(pH 8.0)을 추가하여 중화시켰고, 이어서 인산 완충 식염수로 투석하였다. 상기 방법에 따라 하이브리도마 세포주를 배양하여 정제한 단일클론 항체의 최종 양은 배양액 100 ml를 기준으로 0.64~2.5 mg임을 확인하였다.

[0115] 실시예 3. 식도편평세포암 세포에서 PTK7 단일클론 항체의 항암효과 분석

[0116] PTK7은 다양한 암에서 높은 발현을 보이고, 발암 및 전이 과정에 관여하는 것으로 공지되어 있음에 따라 PTK7은 항암 표적 분자로 주목받아 왔다. 이에, 본 발명자들은 먼저 식도편평세포암을 대상으로 상기 실시예 2에서 생산한 PTK7 단일클론 항체의 효과를 검증하고자 하였다.

[0118] 3-1. PTK7 단일클론 항체의 항암효과 분석

[0119] 본 발명자들은 이전 연구를 통해 식도편평세포암과 PTK7간의 상관관계를 확인한바 있다. 구체적으로, 식도편평세포암 세포인 TE-10과 TE-11에서 PTK7을 억제할 때 세포의 성장 억제, 세포의 이동 및 침윤이 감소하는 것을 확인하였다(Cancer Sci. 2013;104:1120-6). 또한 발암촉진 유전자인 EGFR이 과발현되어 있고 암저해 유전자인 p53이 손상되어 있는 식도편평세포암 세포인 KYSE-30에서 PTK7의 발현에 따른 발암 표현형을 분석한 결과, 상기 세포에서 PTK7을 억제할 때 세포의 성장 및 부착이 감소하였고, PTK7을 과발현시킨 경우에는 세포의 성장 및 부착이 증가하는 것을 확인하였다. 더욱이, 상기 세포에서 PTK7의 억제를 시 혈청에 의한 세포질 단백질의 티로신 인산화와 Erk, Akt 및 FAK의 인산화가 감소한 것을 확인하였다.

- [0120] 이에, 본 발명자들은 상기 이전 연구 결과들을 토대로, 식도편평세포암 세포주인 KYSE-30에 본 발명에 따른 상기 9종의 PTK7 단일클론 항체를 처리할 경우 상기와 같은 항암효과가 나타나는지 여부를 분석하였다. 이를 위해, 먼저 상기 KYSE-30 세포에 실시예 2에서 생산한 9종의 PTK7 단일클론 항체를 3 μ g/ml 또는 10 μ g/ml의 농도로 처리하여 10% 소 태아 혈청에 의해 유도된 세포의 성장 정도를 MTT 실험법을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 각 항체를 3 μ g/ml의 농도로 처리한 경우에는 46>43>32>42>50>39>6>49>1의 순서로 상기 세포의 성장을 저해하는 효과가 나타났고, 10 μ g/ml 농도에서는 46>50>42>32>43>39>49>6>1의 순서로 나타나는 것을 확인하였다.
- [0121] 또한, KYSE-30 세포에 9종의 PTK7 단일클론 항체를 3 μ g/ml 또는 10 μ g/ml의 농도로 처리한 후, 1 μ g/ml rat tail collagen으로 코팅된 96-well 플레이트에서 1% 소 태아 혈청 존재 시 세포의 부착 정도를 분석하였다. 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 각 항체를 3 μ g/ml의 농도로 처리한 경우에는 46>32>50>43>42>6>49>39>1의 순서로 상기 세포의 부착을 억제하는 효과가 나타났고, 10 μ g/ml 농도에서는 50>46>32>42>43>6>39>1>49의 순서로 부착 억제 효과가 나타났다. 상기 결과들을 종합할 때, KYSE-30 세포의 성장과 부착 억제 측면에서는 PTK7 단일클론 항체 32, 42, 43, 46, 50에 의한 중화 능력이 우수한 것을 알 수 있었다.
- [0122] 이에 더하여, KYSE-30 세포에서 9종의 PTK7 단일클론 항체를 3 μ g/ml로 처리한 후 혈청에 의한 티로신 인산화와 Akt와 Erk의 인산화를 분석한 결과, 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이 역시 항체 32, 42, 43, 46, 50에 의한 중화 능력이 우수함을 확인하였다.
- [0124] **3-2. PTK7 단일클론 항체의 FGFR1 인산화 억제 효과 분석**
- [0125] 본 발명자들은 또한 이전 연구를 통해 식도편평세포암 세포에서 PTK7은 FGFR1과 결합하고 이를 활성화하여 발암 표현형 및 발암 신호전달을 촉진하는 것을 확인하였다(FASEB J., 2019;33:12960-71). 이에, 본 발명에 따른 PTK7 단일클론 항체가 PTK7에 의한 FGFR1의 인산화를 억제하는 효과를 나타내는지 여부를 확인하고자 하였다.
- [0126] 이를 위해, FGFR1을 발현시킨 HEK293 세포에 9종의 PTK7 단일클론 항체를 3 μ g/ml 또는 10 μ g/ml의 농도로 처리한 후 10 ng/ml acidic FGF에 의해 유도된 FGFR1 인산화의 저해 정도를 분석하였다. 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 각 항체를 3 μ g/ml의 농도로 처리한 경우에는 HEK293 세포에서 FGFR1 인산화를 저해하는 순서가 32>50>6>43>42>1>46>49>39로 나타났고, 항체를 10 μ g/ml의 농도로 처리한 경우에는 32>50>42>46>43>39>6>1>49의 순서로 나타났다. HEK293 세포에서 FGFR1을 과발현시킨 후 FGFR1의 인산화를 분석하였을 때, 낮은 농도의 PTK7 항체에 의한 저해 효과는 PTK7 중화항체 32, 42, 43, 50의 경우에 KYSE-30 세포에서 혈청에 의한 발암 표현형 및 신호전달 분석 결과와 유사했으나, PTK7 중화항체 46의 경우에는 효능이 낮은 편으로 관찰되었다. 그러나 PTK7 항체를 높은 농도로 처리한 경우의 효과는 다른 분석의 결과와 동일하게 PTK7 중화항체 32, 42, 43, 46, 50이 우수한 중화 능력을 보이는 것을 확인하였다.
- [0128] **실시예 4. 삼중음성유방암 세포에서 PTK7 단일클론 항체의 항암효과 분석**
- [0129] 본 발명자들은 이전 연구를 통해 삼중음성유방암 세포에서 PTK7의 발현에 따른 발암 표현형 변화를 분석하였다. 구체적으로, Estrogen receptor 양성(ER+) 유방암 세포주와 basal A, basal B, luminal type의 삼중음성유방암 세포주들 각각에서 PTK7 발현수준 분석한 결과 모든 세포주에서 PTK7 발현이 관찰되었으나 ER+ 유방암 세포주에 비하여 삼중음성유방암 세포주에서 PTK7 발현이 높은 것으로 나타났다. 이 결과에 근거하여, 삼중음성유방암 세포 중에서 마우스에 이종이식 연구에 많이 활용된 MDA-MB-231 세포를 대상으로 PTK7 발현 변화에 따른 발암 표현형과 신호전달 과정의 변화를 분석하였다. 상기 세포에서 PTK7을 녹다운시켰을 때, 소 태아 혈청에 의하여 유도된 세포의 성장, 콜라겐(collagen) 또는 피브로넥틴(fibronectin)이 코팅된 배양접시에서 세포 부착, 세포 이동, 세포 침윤이 감소하였다. 또한, 다른 삼중음성유방암 세포인 MDA-MB-436 및 MDA-MB-453 세포에서도 PTK7 녹다운에 의해 세포의 성장이 저해되었으며, 발암 신호전달에 중요한 역할을 하는 FAK, Akt, ERK의 인산화가 감소하였다. 이러한 결과를 통해 삼중음성유방암 세포에서 PTK7의 녹다운이 공통적으로 발암 표현형 및 신호전달 과정을 억제한다는 것을 알 수 있었다.
- [0130] 이에, 본 발명자들은 상기 결과들을 토대로, 삼중음성유방암 세포주인 MDA-MB-231에 본 발명에 따른 상기 9종의 PTK7 단일클론 항체를 처리할 경우 상기와 같은 항암효과가 나타나는지 여부를 분석하였다. 이를 위해, 먼저 상기 MDA-MB-231 세포에 상기 실시예 2에서 생산한 9종의 PTK7 단일클론 항체를 상기 실시예 3-1과 동일한 방법으로 3 μ g/ml 또는 10 μ g/ml의 농도로 처리하여 소 태아 혈청에 의해 유도된 세포의 성장 정도를 분석하였다. 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 각 항체를 3 μ g/ml의 농도로 처리한 경우에는 42>50>32>43>6>46>39>1>49의 순서로 상기 세포의 성장을 저해하는 효과가 나타났고, 10 μ g/ml 농도에서는 42>50>32>46>43>6>39>1>49의 순서

로 나타나는 것을 확인하였다.

[0131] 또한, 상기 실시예 3-1과 동일하게 MDA-MB-231 세포에 9종의 PTK7 단일클론 항체를 3 μ g/ml 또는 10 μ g/ml의 농도로 처리한 후 소 태아 혈청에 의해 유도된 세포의 부착 정도를 분석하였다. 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 각 항체를 3 μ g/ml의 농도로 처리한 경우에는 32>50>42>46>43>1>49>6>39의 순서로 상기 세포의 부착을 억제하는 효과가 나타났고, 10 μ g/ml 농도에서는 42>46>43>50>32>6>49>1>39의 순서로 부착 억제 효과가 나타났다.

[0132] 이에 더하여, MDA-MB-231 세포에 9종의 PTK7 단일클론 항체를 3 μ g/ml로 처리한 후 티로신 인산화와 Akt와 Erk의 인산화를 분석한 경우에도 도 9에서 볼 수 있는 바와 같이 PTK7 단일클론 항체 32, 42, 43, 46, 50에 의한 중화 능력이 우수하게 나타난 것을 확인하였다.

[0133] 상기 결과를 종합할 때, 식도편평세포암 세포에서의 결과와 같이 삼중음성유방암 MDA-MB-231 세포에서도 세포 성장 및 부착, 발암 신호전달 과정을 억제하는 효과적 측면에서 항체 32, 42, 43, 46, 50이 우수한 것을 확인하였다. 따라서 상기 9종의 PTK7 단일클론 항체 중 32, 42, 43, 46, 및 50을 항암 효과가 우수한 PTK7 중화 단일클론 항체로 선정하였다.

[0135] 실시예 5. PTK7 단일클론 항체에 의한 혈관신생 신호전달 억제 분석

[0136] 본 발명자들은 PTK7의 발현에 따른 혈관내피세포의 관 형성 및 *in vivo* 혈관신생 변화, 이의 분자적 기전을 규명한다. 구체적으로, PTK7은 인간 제대 혈관내피세포(human umbilical vascular endothelial cells; HUVEC)에서 발현되며, 마트리젤(matrigel) 표면상의 혈관 형성(capillary-like tube formation) 과정에서 발현이 증가하였다. 반면에 PTK7의 기능을 억제하면 VEGF에 의하여 유도된 혈관내피세포의 이동이 감소하고, *in vitro* 및 *in vivo* 혈관 신생이 저해되는 것을 확인하였다(Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008;371:793-8). 또한, 인간 제대 혈관내피세포에서 PTK7은 VEGF의 수용체 중 하나인 kinase insert domain receptor(KDR)를 올리고머화(oligomerization)하여 활성화를 촉진하여 KDR 인산화를 증가시키고, 혈관 내피 세포의 이동, *in vitro* 및 *in vivo* 혈관 신생을 촉진하였다(Biochim. Biophys. Acta, 2015;1853:2251-60). 그러나 PTK7이 고농도로 존재할 경우에는 KDR을 감싸서 KDR의 활성을 저해할 수 있음을 알 수 있었다.

[0137] 이에, 본 발명자들은 상기 결과들을 토대로, KDR을 과발현하는 HEK293 (HEK293-KDR) 세포에서 VEGF에 의하여 유도된 KDR의 인산화와 세포 이동에 미치는 영향을 분석하였다. 보다 구체적으로, 상기 HEK293-KDR 세포에 상기 실시예 4에서 최종 선별한 5종의 PTK7 단일클론 항체를 3 μ g/ml 또는 10 μ g/ml의 농도로 처리하여 10 ng/ml VEGF에 의하여 유도된 KDR 인산화 정도를 분석하였다. 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 KDR 인산화를 저해하는 순서는 3 μ g/ml의 항체를 처리했을 때 32>42>50>43>46의 순서였고, 10 μ g/ml의 항체를 처리했을 때 42>32>50>43>46의 순서로 나타남을 확인하였다.

[0138] 이에 더하여, 상기 결과들을 토대로 HEK293-KDR 세포에 5종의 중화 단일클론 항체를 5 μ g/ml의 농도로 가하여 VEGF에 의하여 유도된 세포 이동 저해 효과를 분석하였으며, 세포 이동은 wound healing 방법으로 측정하였다. 그 결과, 도 11에서 볼 수 있는 바와 같이 세포 이동을 저해하는 순서는 42>32>43>50>46으로 나타남을 알 수 있었다.

[0139] 이상의 결과를 종합하여 볼 때, PTK7 중화항체 46은 낮은 농도에서 식도편평세포암 세포와 삼중음성유방암 세포의 성장 저해능이 우수하지 못하였고(실시예 3-2, 실시예 4 참조), 혈관신생 신호전달의 저해 및 세포 이동의 저해 효과도 가장 낮았다(실시예 5). 따라서, 항암 및 항 혈관신생 효능이 우수한 PTK7 중화항체로 32, 42, 43, 50의 4종을 최종 선정하였다.

[0141] 실시예 6. PTK7 중화 단일클론 항체의 상보성 결정 영역(CDR)에 대한 서열 분석

[0142] 항체 즉, 면역글로불린(Immunoglobulin; Ig)의 중쇄(heavy chain)와 경쇄(light chain)의 초가변영역(hypervariable region)의 아미노산 서열을 상보성 결정 영역(complementary determining region; CDR)이라고 한다. Ig의 CDR 서열은 항체가 항원에 결합하는 데 중요한 접촉 잔기를 제공하며, 중쇄와 경쇄에는 각각 3개의 CDR이 존재한다.

[0143] 이에, 본 발명자들은 상기 실시예 결과들을 통해 최종 선정한 4종의 PTK7 중화 단일클론 항체의 CDR 서열을 조사하기 위해, 상기 항체를 분비하는 하이브리도마 세포에서 total RNA를 분리하고, oligo-dT₁₅와 random hexamer로 cDNA를 합성한 후, Ig의 초가변영역을 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트에 증폭시키고, PCR 산물을 클로닝하여 각 클론에 대한 서열을 확인하고, IGBLAST Tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)을 사용하

여 CDR 염기서열과 아미노산 서열을 분석하였다. 상기 분석을 통해 도출된 본 발명에 따른 4종의 PTK7 중화 단일클론 항체의 CDR 아미노산 서열을 하기 표 1에 나타내었으며, 전체 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역에 대한 아미노산 서열정보는 도 12에 나타내었다.

표 1

[0145]

PTK7 mAb	Part	아미노산 서열(N-C)	서열번호
#32	CDR1_VH	GFDFSRYW	1
	CDR2_VH	INPDSSTI	2
	CDR3_VH	ARAYYIYFDY	3
	CDR1_VL	QSLLYSSNQKNY	4
	CDR2_VL	WAS	5
	CDR3_VL	QQYYSYPWT	6
#42	CDR1_VH	GYTFTNYG	7
	CDR2_VH	INTYTGEPI	8
	CDR3_VH	AREEVGFPI	9
	CDR1_VL	QSLVHSNGNTY	10
	CDR2_VL	KVS	11
	CDR3_VL	SQSTHVPWT	12
#43	CDR1_VH	GFNIKDTY	13
	CDR2_VH	IDPANGNT	14
	CDR3_VH	ARGDANYGAY	15
	CDR1_VL	ESVDNYGISF	16
	CDR2_VL	AAS	17
	CDR3_VL	QQSKEVPLT	18
#50	CDR1_VH	GFDFSRYW	19
	CDR2_VH	INPDSSTI	20
	CDR3_VH	ARMELLWYFDV	21
	CDR1_VL	QSLLYSSNQKNY	22
	CDR2_VL	WAS	23
	CDR3_VL	QQYYSYPWT	24

실시예 7. PTK7 중화 단일클론 항체의 항원 결합 부위 분석

상기 실시예 5에서 최종적으로 선발한 4종의 PTK7 중화 단일클론 항체가 각각 항원인 sPTK7에 결합하는 부위를 분석하였다.

PTK7의 세포의 부위는 7개의 Ig loop을 가지는데(J. Biochem., 1996;119(2):235-9), 최종 선정된 4종의 PTK7 중화 단일클론 항체가 항원인 sPTK7에 결합하는 부위(Ig loop)를 분석하기 위하여, C-말단 His tag을 갖는 PTK7의 세포의 부위 전체(PTK7-Ext-His; Ala31-Gln703 + hexa-His)와 PTK7의 세포의 부위 중 일부를 갖는 mutant polypeptide인 PTK7-Ig15-His (Ala31-Gly528 + hexa-His), PTK7-Ig14-His (Ala31-Ala409 + hexa-His), PTK7-Ig13-His (Ala31-Leu344 + hexa-His), PTK7-Ig24-His (Ala31-Gln37 + Trp123-Ala409 + hexa-His), PTK7-Ig34-His (Ala31-Gln37 + Asp221-Ala409 + hexa-His)를 제작, 발현 및 정제하였다.

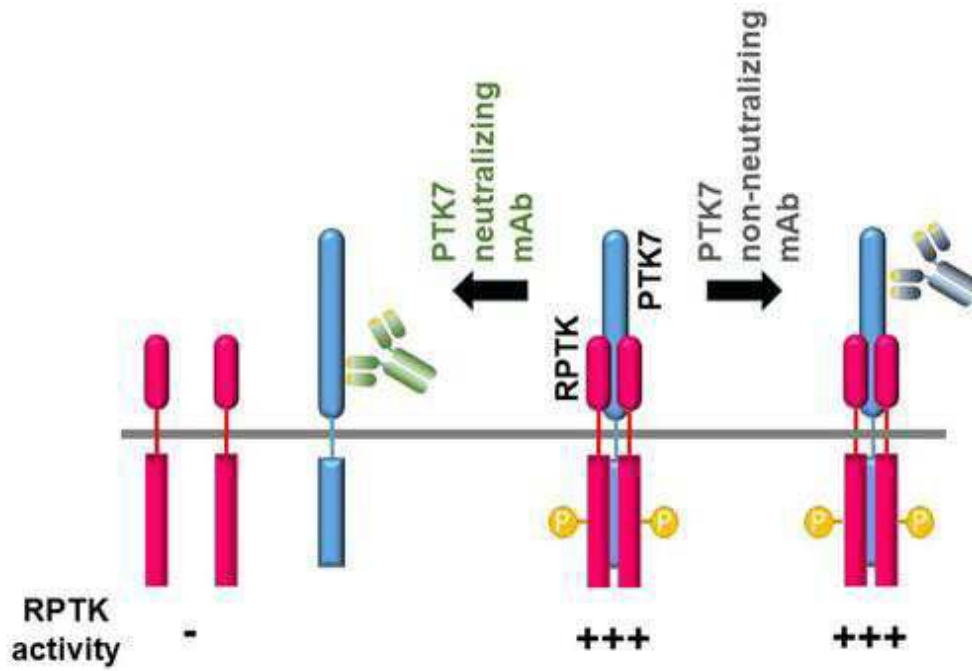
6종의 PTK7 세포의 부위(PTK7-Ext-His, PTK7-Ig15-His, PTK7-Ig14-His, PTK7-Ig13-His, PTK7-Ig24-His, PTK7-Ig34-His)와 각각의 PTK7 중화 항체를 각각 결합시킨 뒤 면역침전하여 PTK7 세포의 부위와 PTK7 중화 항체의 결합 여부를 western blotting으로 분석하였다.

그 결과, 도 13에서 나타난 바와 같이, PTK7 중화 항체 #43은 PTK7-Ext-His, PTK7-Ig15-His, PTK7-Ig14-His, PTK7-Ig13-His, PTK7-Ig24-His와 결합하였으나 PTK7-Ig34에는 결합하지 않았으므로, Ig2 부위(Trp123-Ala220)를 인식함을 알 수 있었고, PTK7 중화 항체 #32, #42, #50은 PTK7-Ext-His와 결합하였으나, 다른 절편과는 결합하지 않았으므로, Ig67 부위(Arg529-Gln703)를 인식함을 알 수 있었다.

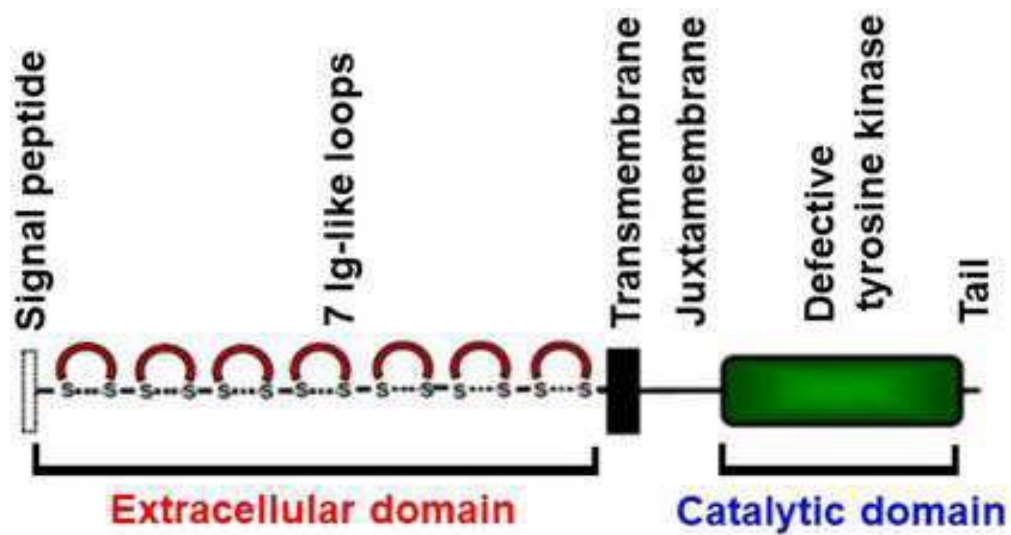
상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

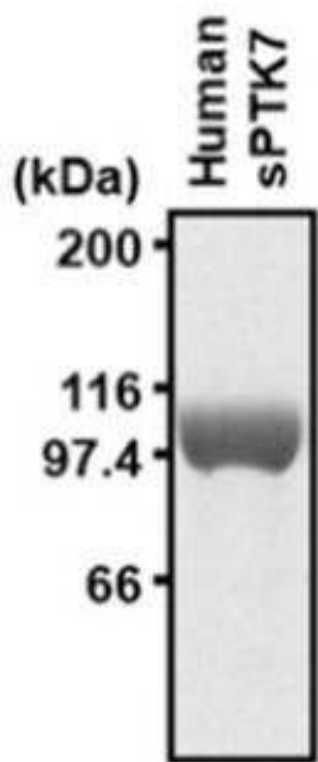
도면1



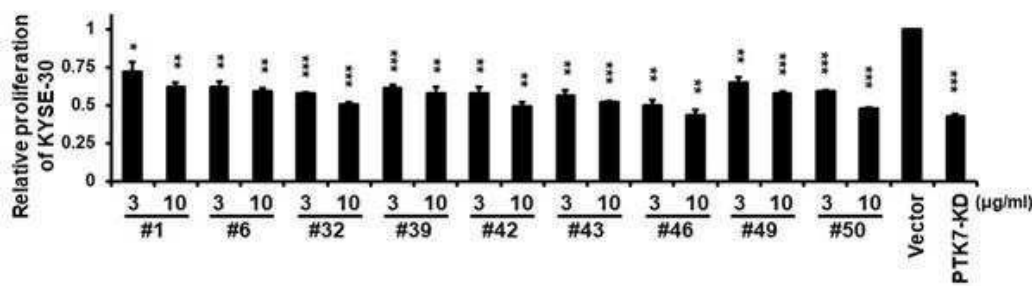
도면2a



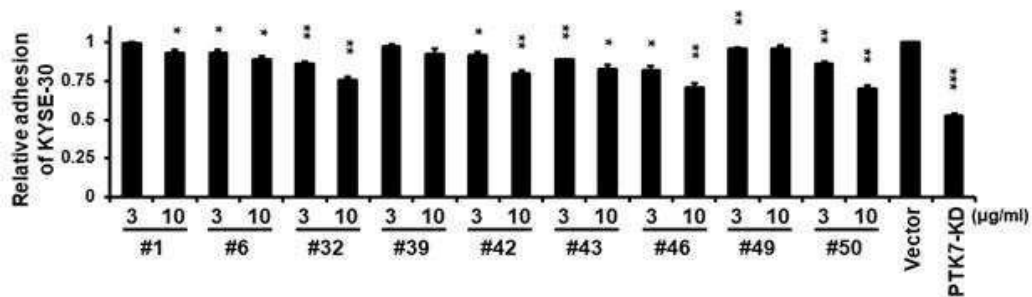
도면2b



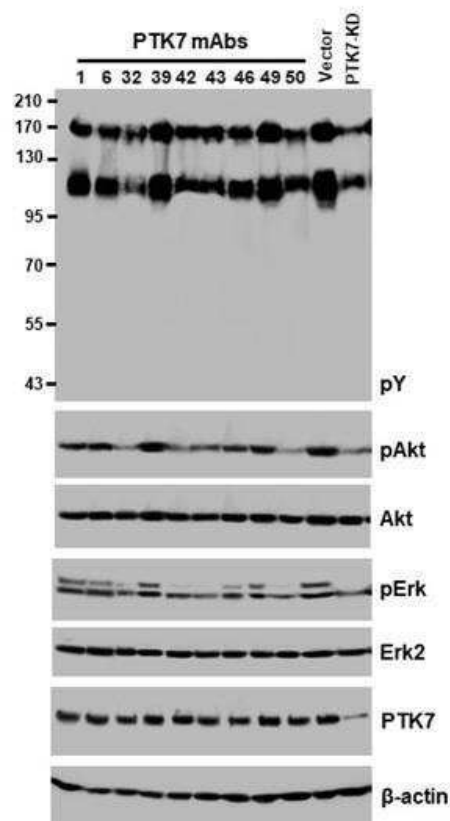
도면3



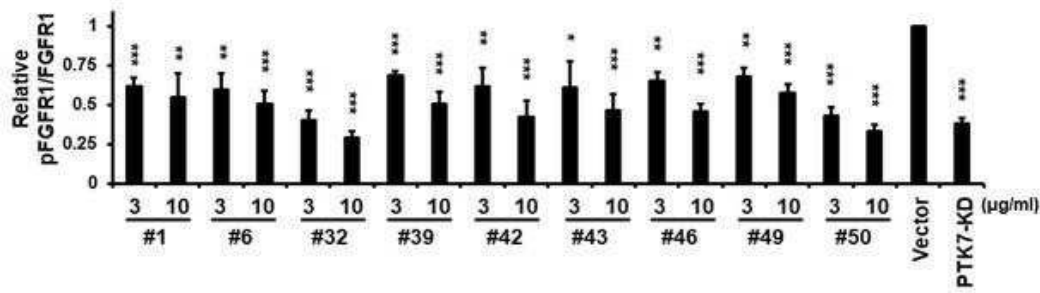
도면4



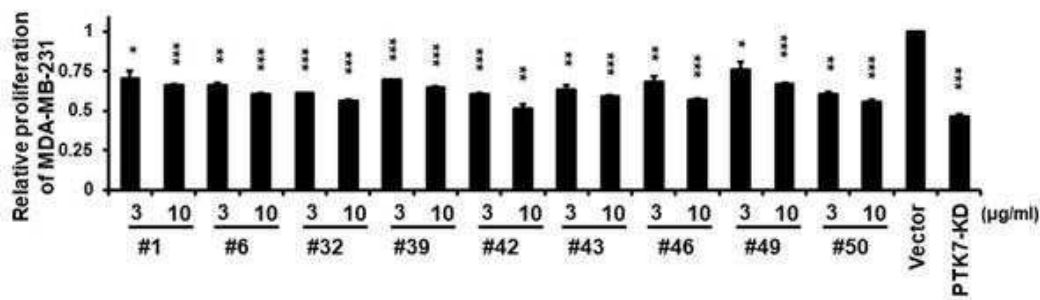
도면5



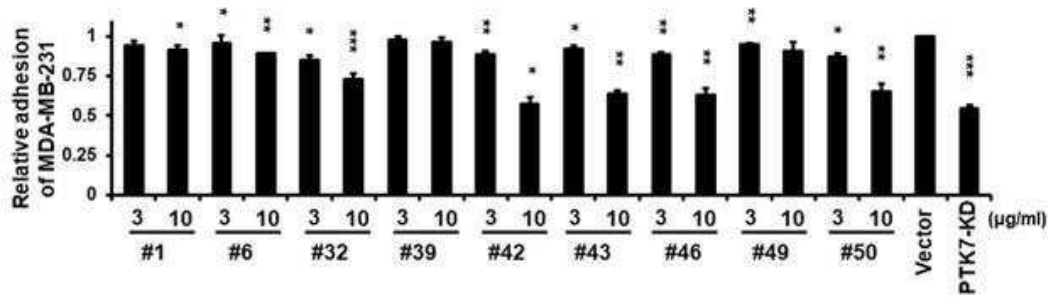
도면6



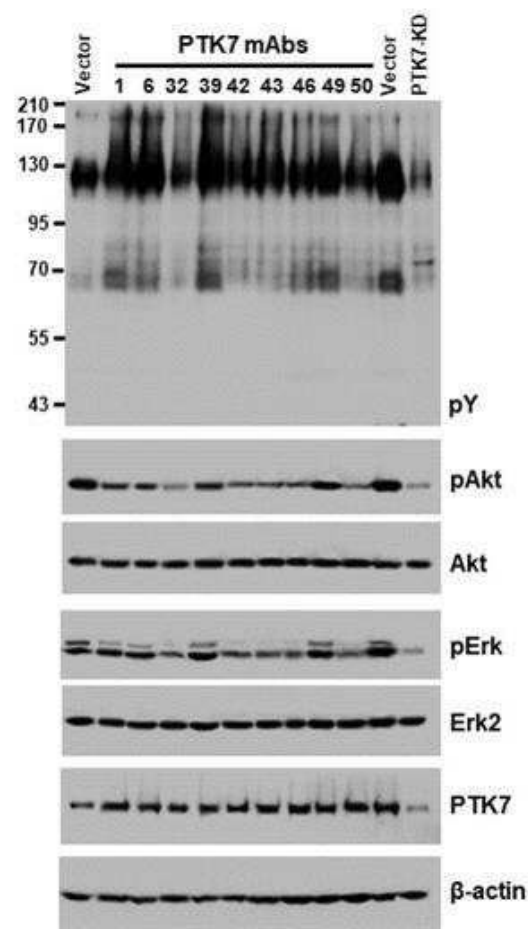
도면7



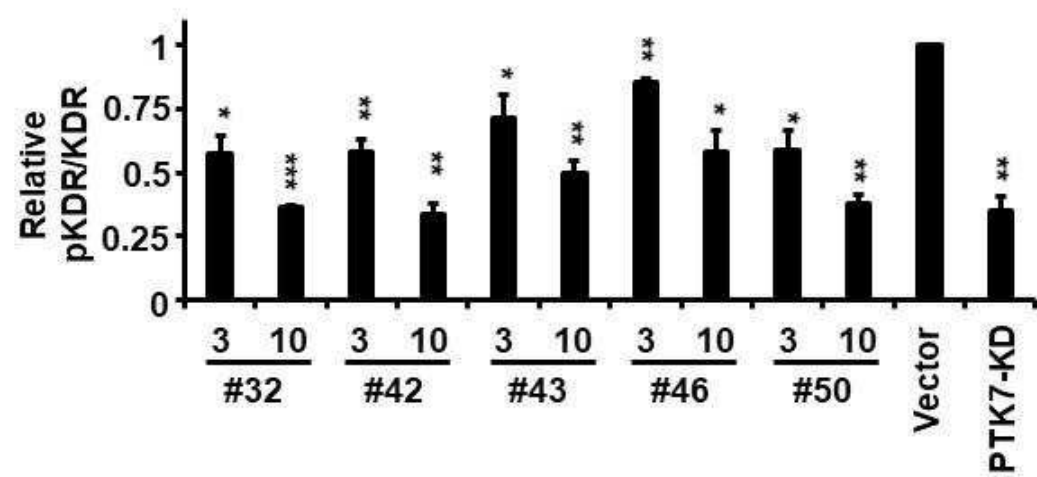
도면8



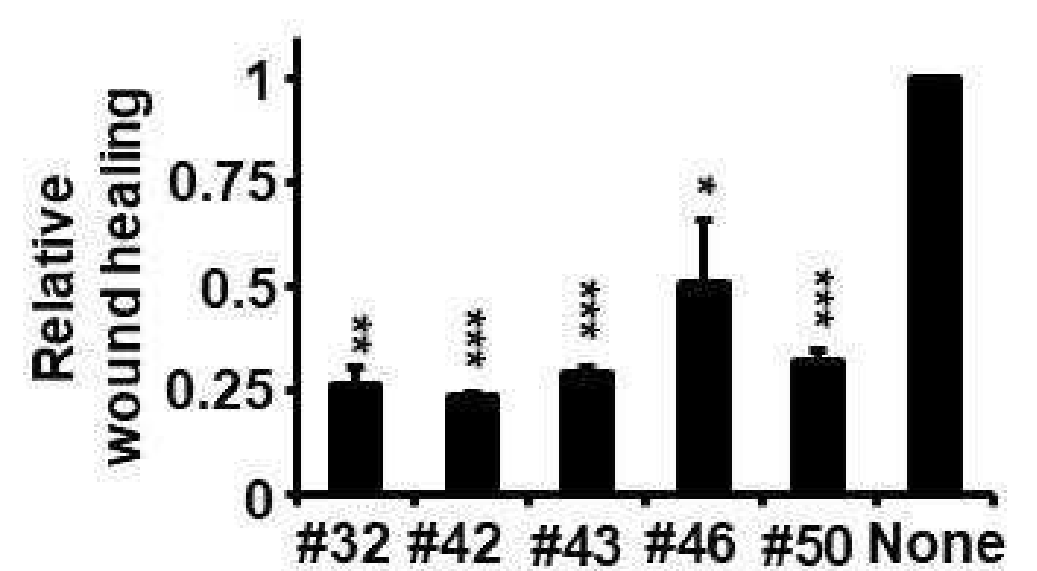
도면9



도면10



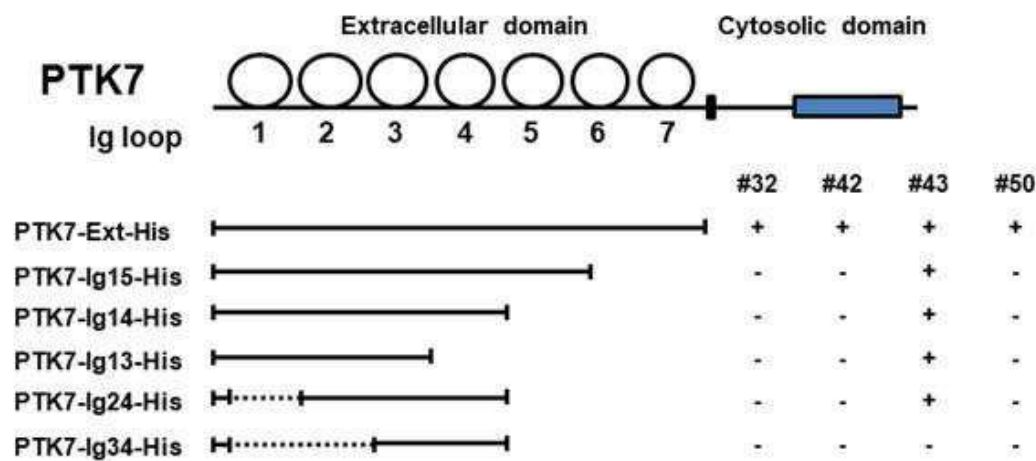
도면11



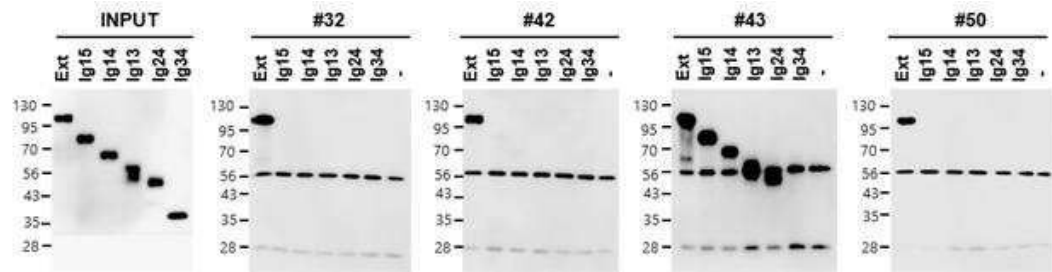
도면12

아이노산 서열							
	FR1_VH	CDR1_VH	FR2_VH	CDR2_VH	FR3_VH	CDR3_VH	FR4_VH
#32	EVNLLSGGGGLVPGGSLKSCAAS	GFDFSRYY	MNWYRQAPGKGLEWIGE	INFSSTI	NYTPSLKDKFSSRDNAKNTLYLGMSKVRSEDTALYYC	ARAYYYFDY	WGQGTILTVSS
#42	QIQLVQSGPELKKPGGETYKSCAS	GYFTTNG	MWVYQAPGKGLWAGW	INTYTGP	TYADDFKGRFAFSLETSASTAYLGMSKVNEDATYFC	AREEVGFPPY	WGQGTILTVSA
#43	EVLQQSGADLVKPGASVKLSCTAS	GFNKDTY	IHWVKRPEGGLEWIGR	IDPANKT	KYDPKPGGKATITADTSNTAYLGFSLSLTSEDTAVYYC	ARGDANYGAY	WGQGTILTVSA
#50	EVNLLSGGGGLVPGGSLKSCAAS	GFDFSRYY	LSWYRQAPGKGLEWIGE	INFSSTI	NYTPSLKDKFSSRDNAKNTLYLGMSKVRSEDTALYYC	ARMELLWYFDV	WGAGTTITVSS
	FR1_VK	CDR1_VK	FR2_VK	CDR2_VK	FR3_VK	CDR3_VK	FR4_VK
#32	DVMSQSPSLAVSVGGKVTMSCKSS	QSLYSSNGKNY	LAWYQKPGQSPKLLIY	WAS	IRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTSSVKAEDLAVYYC	GGYYSYPWT	FGGGTKLEIK
#42	DVMTQSPSLSPVSLGDQASISCRSS	QSLVHSGNTY	LYWYLQKPGQSPKLLIY	KVS	NRFSQVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYFC	SQSTMPWT	FGGGTKLEIK
#43	DVLTQSPASLAVSLQQRATISCRAS	ESVDNYGSF	MNWFQKPGQSPKLLIY	AAS	NCRSGVPARFSGSGSGTDFTSLNHFMEDDTAMFC	QGSKEVPKT	FGAGTKLEIK
#50	DVMSQSPSLAVSVGGKVTMSCKSS	QSLYSSNGKNY	LAWYQKPGQSPKLLIY	WAS	TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTSSVKAEDLAVYYC	GGYYSYPWT	FGGGTKLEIK

도면13a



도면13b



서열목록

- <110> Osong Medical Innovation Foundation
- UIF (UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION), YONSEI UNIVERSITY
- <120> PTK7-specific antibodies and thier use thereof
- <130> PD20-102-P1
- <150> KR 10-2020-0088476
- <151> 2020-07-16
- <160> 44
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> #32_CDR1_VH
- <400> 1

Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Trp

1 5

```

<210>    2
<211>    8
<212>    PRT
<213>
>    Artificial Sequence
<220><223>    #32_CDR2_VH
<400>    2
Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile
    1          5
<210>    3
<211>    11
<212>    PRT
<213>    Artificial Sequence
<220><223>    #32_CDR3_VH
<400>    3
Ala Arg Ala Tyr Tyr Ile Tyr Tyr Phe Asp Tyr
    1          5          10
<210>    4
<211>    12
<212>    PRT
<213>    Artificial Sequence
<220><223>    #32_CDR1_VL
<400>    4
Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr
    1          5          10

<210>    5
<211>    3
<212>    PRT
<213>    Artificial Sequence
<220><223>    #32_CDR2_VL
<400>    5
Trp Ala Ser
    1
<210>    6

```

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #32_CDR3_VL
 <400> 6
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #42_CDR1_VH
 <400> 7
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
 1 5
 <210>
 > 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #42_CDR2_VH
 <400> 8
 Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro
 1 5
 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #42_CDR3_VH
 <400> 9
 Ala Arg Glu Glu Val Gly Phe Pro Tyr
 1 5
 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #42_CDR1_VL

<400> 10

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 11

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #42_CDR2_VL

<400> 11

Lys Val Ser

1

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #42_CDR3_VL

<400> 12

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #43_CDR1_VH

<400> 13

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr

1 5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #43_CDR2_VH

<400> 14

Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr

1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #43_CDR3_VH

<400> 15

Ala Arg Gly Asp Ala Asn Tyr Gly Ala Tyr

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #43_CDR1_VL

<400> 16

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe

1 5 10

<210> 17

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #43_CDR2_VL

<400> 17

Ala Ala Ser

1

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #43_CDR3_VL

<400> 18

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Leu Thr

1 5
 <210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>

> #50_CDR1_VH

<400> 19
 Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Trp

1 5
 <210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #50_CDR2_VH

<400> 20
 Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile

1 5
 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #50_CDR3_VH

<400> 21
 Ala Arg Met Glu Leu Leu Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10
 <210> 22
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #50_CDR1_VL

<400> 22
 Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 23

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #50_CDR2_VL

<400> 23

Trp Ala Ser

1

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #50_CDR3_VL

<400> 24

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #32_VH

<400> 25

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Tyr Tyr Ile Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 26
 <211> 113

 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #32_VL
 <400> 26

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

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

 <210> 27
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> #42_VH

<400> 27

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Glu Val Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ala

115

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #42_VL

<400> 28

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 29

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #43_VH

<400> 29

Glu Val Leu Leu Gln Gln Ser Gly Ala Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Asp Ala Asn Tyr Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 30

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #43_VL

<400> 30

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr

20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

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

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His

65 70 75 80

Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys

85 90 95

Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 31

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #50_VH

<400> 31

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Glu Leu Leu Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #50_VL

<400> 32

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<

210> 33

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> #32_VH

<400> 33

gaggtgaagc ttctcgagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc cctgaaactc	60
tcctgtgcag cctcaggatt cgattttagt agatactgga tgaattgggt ccggcaggct	120
ccagggaaag ggctagaatg gattggagaa attaatccag atagcagtac gataaactat	180
acgccatctc taaaggataa attcatcctc tccagagaca acgcaaaaaa tacgctgtac	240
ctgcaaatga gcaaagttag atctgaggac acagcccttt attactgtgc aagagcctac	300
tatatatact actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca	354

<210> 34

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> #32_VL

<400> 34

gacattgtga tgcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact	60
atgagttgca agtccagtc gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc	120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtcctct aaactgctga ttacttgggc atccattagg	180
gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc	240
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat	300
ccgtggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaa	339

<210> 35

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> #42_VH

<400> 35

cagatccagt tggcgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc	60
tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct	120
ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct aacttgaga gccaacatat	180
gctgatgact tcaaggagc gtttccttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat	240
ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtgc aagagaggag	300
gtaggatttc cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca	348

<210> 36
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #42_VL
 <400> 36
 gatgttgtga tgacccaaag tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagta gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta ttatactgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtctt caaccgattt 180
 tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg agcctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttccg 300
 tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 37
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #43_VH
 <400> 37
 gaggtttctt tgcagcagtc tggggcagac ctgttgaagc caggggcctc agtcaagttg 60
 tcctgcacag ctcttggtt caacattaaa gacacctata tacactgggt gaagcagagg 120
 cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat 180
 gaccgaagt tccagggcaa ggccactata acagcagaca catcctcaa cacagcctac 240
 ctgcagttca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc tagaggggat 300
 gctaactacg gtgcttactg gggccaaggg actctgggtc ctgtctctgc a 351

<210> 38
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #43_VL
 <400> 38
 gacattgtgc tgacccaate tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactggttc 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatcaa ccaaagatcc 180

ggggtccttg ccaggttttag tggcagtgagg tctgggacag acttcagcct caacatccat 240
cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgctc 300
acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa 333

<210> 39
<211> 354
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> #50_VH

<400> 39
gaggtgaatc ttctcgagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctcaggatt cgatttttagt agatactggc tgagttgggt ccggcaggct 120
ccagggaaag ggctagaatg gattggagaa attaatccag atagcagtac gataaactat 180
acgccatctc taaaggataa attcatcatc tccagagaca acgccaacaaa tacgctgtac 240
ctgcaaatga gcaaagttag atctgaggac acagcccttt attactgtgc aagaatggag 300
ttactctggt acttcgatgt ctggggcgca gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 40
<211> 339
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> #50_VL

<400> 40
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctactgtgtg cagttggaga gaaggttact 60
atgagctgca agtccagtc gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagctctct aaactgtga tttactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 300
ccgtggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaa 339

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PTK7 extracellular domain_forward primer

<400> 41
aaaagctcaa gttcacacca 20

<210> 42
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PTK7 extracellular domain_reverse primer
<400> 42
gctctagatc aatgatgatg atgatgatgc tggatcatct tgtaggg 47

<210> 43
<211> 98
<212> PRT
<213> lg loop(lg2, Trp123-Ala220)

<400> 43
Trp Ile Glu Ala Gly Pro Val Val Leu Lys His Pro Ala Ser Glu Ala
1 5 10 15
Glu Ile Gln Pro Gln Thr Gln Val Thr Leu Arg Cys His Ile Asp Gly
20 25 30
His Pro Arg Pro Thr Tyr Gln Trp Phe Arg Asp Gly Thr Pro Leu Ser
35 40 45
Asp Gly Gln Ser Asn His Thr Val Ser Ser Lys Glu Arg Asn Leu Thr
50 55 60
Leu Arg Pro Ala Gly Pro Glu His Ser Gly Leu Tyr Ser Cys Cys Ala
65 70 75 80
His Ser Ala Phe Gly Gln Ala Cys Ser Ser Gln Asn Phe Thr Leu Ser
85 90 95
Ile Ala

<210> 44
<211> 175
<212> PRT
<213> lg loop(lg67, Arg529-Gln703)
<400> 44

Arg	Glu	Lys	Pro	Thr	Ile	Lys	Trp	Glu	Arg	Ala	Asp	Gly	Ser	Ser	Leu
1				5				10					15		
Pro	Glu	Trp	Val	Thr	Asp	Asn	Ala	Gly	Thr	Leu	His	Phe	Ala	Arg	Val
			20					25					30		
Thr	Arg	Asp	Asp	Ala	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Ile	Ala	Ser	Asn	Gly	Pro
			35					40					45		
Gln	Gly	Gln	Ile	Arg	Ala	His	Val	Gln	Leu	Thr	Val	Ala	Val	Phe	Ile
		50					55						60		
Thr	Phe	Lys	Val	Glu	Pro	Glu	Arg	Thr	Thr	Val	Tyr	Gln	Gly	His	Thr
		65				70				75					80
Ala	Leu	Leu	Gln	Cys	Glu	Ala	Gln	Gly	Asp	Pro	Lys	Pro	Leu	Ile	Gln
				85					90					95	
Trp	Lys	Gly	Lys	Asp	Arg	Ile	Leu	Asp	Pro	Thr	Lys	Leu	Gly	Pro	Arg
				100					105					110	
Met	His	Ile	Phe	Gln	Asn	Gly	Ser	Leu	Val	Ile	His	Asp	Val	Ala	Pro
			115						120					125	
Glu	Asp	Ser	Gly	Arg	Tyr	Thr	Cys	Ile	Ala	Gly	Asn	Ser	Cys	Asn	Ile
		130					135						140		
Lys	His	Thr	Glu	Ala	Pro	Leu	Tyr	Val	Val	Asp	Lys	Pro	Val	Pro	Glu
		145				150				155					160
Glu	Ser	Glu	Gly	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Tyr	Lys	Met	Ile	Gln	
				165					170					175	