



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년08월09일
(11) 등록번호 10-2430893
(24) 등록일자 2022년08월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/57407 (2013.01)
A61K 39/3955 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7037405(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2017년01월02일
심사청구일자 2021년12월22일
- (85) 번역문제출일자 2020년12월24일
- (65) 공개번호 10-2021-0002363
- (43) 공개일자 2021년01월07일
- (62) 원출원 특허 10-2018-7020013
원출원일자(국제) 2017년01월02일
심사청구일자 2019년12월10일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/050037
- (87) 국제공개번호 WO 2017/114976
국제공개일자 2017년07월06일
- (30) 우선권주장
15307189.9 2015년12월31일
유럽특허청(EPO)(EP)
16305139.4 2016년02월05일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
US20110085986 A1
WO2011083091 A2
KR1020130028049 A

- (73) 특허권자
프로가스트린 에 캔서스 에스.에이 알.엘.
룩셈부르크, 엘-1450 룩셈부르크, 코테 드이치,
11
- (72) 발명자
프뢰르 알렉산더
프랑스, 34000 몽펠리에, 24 뒤 데 라 카발레리에
- (74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 식도암을 검출 및 치료하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 식도암의 시험관내 진단 방법, 및 식도암의 예방 또는 치료를 위한 조성물 및 방법에 관한 것이며, 여기서 상기 조성물은 프로가스트린에 결합하는 항체를 포함하며 상기 방법은 프로가스트린에 결합하는 항체의 사용을 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/26 (2013.01)

G01N 33/57488 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/70 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

G01N 2333/595 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서의 식도암의 시험관내 진단 방법으로서,

- a) 상기 대상체로부터의 생물학적 샘플을 적어도 하나의 프로가스트린-결합 분자와 접촉시키는 단계; 및
- b) 상기 샘플에서 프로가스트린에 대한 상기 프로가스트린-결합 분자의 결합을 검출하는 단계로서, 상기 결합은 상기 대상체에서 식도암의 존재를 나타내는 것인, 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 b)는 프로가스트린의 농도를 결정하는 것을 추가로 포함하고, 상기 생물학적 샘플 속 적어도 10 pM, 적어도 20 pM, 적어도 30 pM 또는 적어도 40 pM의 프로가스트린의 농도는 상기 대상체에서 식도암의 존재를 나타내는 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 식도암은 전이성인, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

- c) 기준 샘플에서 프로가스트린의 기준 농도를 결정하는 단계;
- d) 상기 생물학적 샘플 속 프로가스트린의 농도를 상기 프로가스트린의 기준 농도와 비교하는 단계; 및
- e) 단계 d)의 비교로부터 식도암의 존재를 결정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 기준 샘플은 건강한 대상체로부터 단리된 생물학적 샘플인, 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 단계 b)의 프로가스트린의 농도가 단계 c)의 프로가스트린의 기준 농도보다 높은 경우, 식도암이 존재하는 것인, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 식도암의 제2 진단 검사를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 8

환자에서 식도암 치료의 효능을 모니터링하는 방법으로서,

- a) 치료 전에 상기 환자로부터 수득된 제1 생물학적 샘플에서 프로가스트린의 농도를 측정하는 단계로서,
 - 상기 제1 생물학적 샘플을 적어도 하나의 프로가스트린-결합 분자와 접촉시키는 단계, 및
 - 제1 샘플 속 프로가스트린에 대한 상기 프로가스트린-결합 분자의 결합을 측정하는 단계를 포함하는, 단계; 및
- b) 치료 후에 상기 환자로부터 수득된 제2 생물학적 샘플에서 프로가스트린의 농도를 측정하는 단계로서,
 - 상기 제2 생물학적 샘플을 적어도 하나의 프로가스트린-결합 분자와 접촉시키는 단계, 및
 - 제2 샘플 속 프로가스트린에 대한 상기 프로가스트린-결합 분자의 결합을 측정하는 단계를 포함하는, 단계; 및

c) 단계 a)의 프로가스트린의 농도와 단계 b)의 프로가스트린의 농도를 비교하는 단계를 포함하고, 제2 샘플 속 프로가스트린의 농도보다 더 높은 제1 샘플 속 프로가스트린의 농도는 치료가 효과적이었음을 나타내는 것인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로가스트린-결합 분자는 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 프로가스트린-결합 분자는 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 N-말단 항-프로가스트린 모노클로날 항체 및 C-말단 항-프로가스트린 모노클로날 항체 중에서 선택되는 것인, 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 2 또는 서열번호 3에 포함되는 에피토프에 결합하는 것인, 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 프로가스트린에 결합하는 상기 항체는 하기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 모노클로날 항체인, 방법:

- 서열번호 4, 5 및 6의 아미노산 서열 각각의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 중 적어도 하나, 적어도 둘, 또는 셋을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 7, 8 및 9의 아미노산 서열 각각의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 중 적어도 하나, 적어도 둘, 또는 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는, 모노클로날 항체;
- 서열번호 10, 11 및 12의 아미노산 서열 각각의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 중 적어도 하나, 적어도 둘, 또는 셋을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 13, 14 및 15의 아미노산 서열 각각의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 중 적어도 하나, 적어도 둘, 또는 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는, 모노클로날 항체;
- 서열번호 16, 17 및 18의 아미노산 서열 각각의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 중 적어도 하나, 적어도 둘, 또는 셋을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 19, 20 및 21의 아미노산 서열 각각의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 중 적어도 하나, 적어도 둘, 또는 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는, 모노클로날 항체;
- 서열번호 22, 23 및 24의 아미노산 서열 각각의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 중 적어도 하나, 적어도 둘, 또는 셋을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 25, 26 및 27의 아미노산 서열 각각의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 중 적어도 하나, 적어도 둘, 또는 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는, 모노클로날 항체;
- 서열번호 28, 29 및 30의 아미노산 서열 각각의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 중 적어도 하나, 적어도 둘, 또는 셋을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 31, 32 및 33의 아미노산 서열 각각의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 중 적어도 하나, 적어도 둘, 또는 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는, 모노클로날 항체; 및
- 서열번호 34, 35 및 36의 아미노산 서열 각각의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 중 적어도 하나, 적어도 둘, 또는 셋을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 37, 38 및 39의 아미노산 서열 각각의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 중 적어도 하나, 적어도 둘, 또는 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는, 모노클로날 항체.

청구항 14

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 프로가스트린에 대한 상기 프로가스트린-결합 분자의 결합은 형광 활성화 세포 분류(FACS), 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사면역측정법(RIA), 웨스턴 블롯 또는 면역조직화학(IHC)에 의해 검출되거나 측정되는, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 프로가스트린에 대한 상기 프로가스트린-결합 분자의 결합은 효소-결합 면역흡착검정(ELISA) 또는 방사면역측정법(RIA)에 의해 검출되거나 측정되는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 프로가스트린의 제1 부분에 결합하는 제1 분자 및 프로가스트린의 제2 부분에 결합하는 제2 분자와 접촉되는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 제1 분자는 프로가스트린의 C-말단 부분에 결합하고, 상기 제2 분자는 프로가스트린의 N-말단 부분에 결합하는, 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 제1 분자는 항-프로가스트린 모노클로날 항체이고, 상기 제2 분자는 항-프로가스트린 폴리클로날 항체인, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈청 및 혈장 중에서 선택되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 시험관내 진단, 암의 예방 및 치료에 관한 것이며, 보다 특히 식도암의 시험관내 진단 방법, 및 식도암의 예방 또는 치료를 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 프로가스트린-결합 분자, 특히 항-hPG 항체를 포함하며, 한편 본 발명에 따른 방법은 프로가스트린-결합 분자, 특히 항-hPG 항체의 사용을 포함한다.

배경 기술

[0002] 식도암은 인후와 위 사이의 관상부에서, 식도 세포로부터 발생하며, 여덟 번째로 가장 흔한 암으로서 기재되어 있으며, 여성보다 남성에게서 더 많이 발병하며 국가마다 비율이 상당히 다르다.

[0003] 식도암의 가장 흔한 두 가지 유형은 식도 편평 세포 암종 및 식도 선암종이다. 다수의 더 희귀한 아형이 또한 공지되어 있다. 편평 세포 암종은 식도의 상피 세포로부터 발생하며, 한편 선암종은 식도 하부에 존재하는 선 세포로부터 발생한다.

[0004] 임상 진단은 내시경 검사에서 통상적으로 수행되는 생검에 기초한다. 이 질병의 불량한 결과는 특히 조기 징후 및 증상의 부재로 인해, 특히 늦은 진단으로 인한 것이다. 지금까지, 식도암의 광범위한 임상 실시로 번역된 분자 바이오마커는 없다 (Kaz *et al*, Cancer Letters, 2014). 치료는 암의 진행에 달려 있으며, 통상적으로 작게 국소화된 종양의 수술, 또는 화학 요법 (가능하게는 방사선 요법과 조합하여)을 포함한다.

[0005] 따라서, 식도암의 예방 또는 치료를 위한 신규한 조성물 및 방법이 여전히 필요하므로, 식도암의 신속하며, 신뢰성 있고 비용 효율이 높은 진단을 가능하게 하는 방법이 여전히 필요하다.

[0006] 이것이 본 발명의 목적이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 이제 대상체로부터의 생물학적 샘플에서 프로가스트린의 검출을 포함하는, 식도암의 시험관내 진단 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 샘플 중의 프로가스트린의 양을 결정하여, 프로가스트린의 정량을 가능하게 한다. 또한, 본 발명은 프로가스트린에 결합하는 항체를 포함하는, 식도암의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 조성물, 및 단독으로 또는 식도암에 대한 임의의 다른 공지된 예방 또는 치료 방법과 조합하여, 프로가스트린에 결합하는 항체를 포함하는 조성물의 사용을 포함하는, 식도암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 101 아미노산 펩티드 (아미노산 서열 참조: AAB19304.1)인 인간 프리-프로가스트린(pre-progastrin)은, 가스트린 유전자의 1차 번역 생성물이다. 프로가스트린은 프리프로가스트린으로부터 최초의 21 아미노산 (신호 펩티드)의 절단에 의해 형성된다. 프로가스트린의 80 아미노산쇄는 효소를 몇몇 생물학적으로 활성인 가스트린 호르몬 형태, 즉 가스트린 34 (G34) 및 글리신-확장된 가스트린 34 (G34-Gly) (프로가스트린의 아미노산 38-71을 포함한다), 및 가스트린 17 (G17) 및 글리신-확장된 가스트린 17 (G17-Gly) (프로가스트린의 아미노산 55-71을 포함한다)로 절단 및 변형시킴으로써 추가로 프로세싱된다.

[0009] 항-인간 프로가스트린 (항-hPG) 모노클로날 항체 및 진단 또는 요법을 위한 그의 용도가 하기 문헌에 기재되어 있다: 결장 직장암의 경우 WO 2011/083 088, 유방암의 경우 WO 2011/083 090, 췌장암의 경우 WO 2011/083 091, 결장 직장 및 위장암의 경우 WO 2011/116 954, 및 간 병리학의 경우 WO 2012/013 609 및 WO 2011/083089.

도면의 간단한 설명

[0010] 도면의 간단한 설명

도 1: 식도암 환자 (n=12) 및 대조군 환자 (n=103)에서의 프로가스트린의 중앙 혈장 농도 - 양방(two-tailed) 맨 휘트니 검정(Mann Whitney test), *** p<0.001

도 2: 초저 유착 조건(ultra-low adherent condition) 하에 대조군 (CT Hz) 또는 항-PG 인간화 항체 (PG Hz)로 처리한 후 형성된 OE33 구체의 수 - 양방 t-검정, * p<0.05.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명은 본원에 주어진 상세한 설명 및 단지 예시로 제시되고 본 발명의 의도된 범위를 제한하지 않는 첨부 도면으로부터 더욱 완전히 이해될 것이다.

[0012] 제1 측면에서, 본 발명은 대상체로부터의 생물학적 샘플에서 프로가스트린을 검출하는 단계를 포함하는, 식도암의 존재 위험의 시험관내 평가 방법에 관한 것이다. 샘플 중의 프로가스트린의 존재는 식도암의 존재 위험이 있음을 나타낸다.

[0013] 따라서, 제1 실시양태에서, 본 발명은,

[0014] a) 대상체로부터의 생물학적 샘플을 적어도 하나의 프로가스트린-결합 분자와 접촉시키는 단계, 및

[0015] b) 상기 샘플에서 프로가스트린에 대한 상기 프로가스트린-결합 분자의 결합을 검출하는 단계이며, 여기서 상기 결합이 식도암의 존재 위험을 나타내는 것인 단계

[0016] 를 포함하는, 상기 대상체에서 식도암의 존재 위험을 평가하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이다.

[0017] 프로가스트린-결합 분자의 결합은 통상의 기술자에게 이용 가능한 다양한 검정에 의해 검출될 수 있다. 비록 검정을 수행하기 위한 임의의 적합한 수단이 본 발명 내에 포함되긴 하지만, 특히 FACS, ELISA, RIA, 웨스턴-블롯 및 IHC를 언급할 수 있다.

[0018] 바람직한 실시양태에서, 대상체에서 식도암의 존재 위험의 시험관내 평가를 위한 본 발명에 따른 방법은,

[0019] a) 상기 생물학적 샘플을 적어도 하나의 프로가스트린-결합 분자와 접촉시키는 단계;

[0020] b) 상기 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 농도를 결정하는 단계이며, 여기서 상기 생물학적 샘플에서 적어도 10 pM의 프로가스트린의 농도가 식도암의 존재 위험을 나타내는 것인 단계를 포함한다.

[0021] 일단 샘플에 존재하는 프로가스트린의 농도가 결정되면, 결과를 시험 샘플과 유사한 방식으로, 그러나 식도암을 앓지 않는 것으로 알려진 개체(들)로부터 수득한 대조군 샘플(들)의 것들과 비교할 수 있다. 프로가스트린의 농도가 시험 샘플에서 상당히 더 상승되어 있는 경우, 그것이 유래된 대상체가 식도암을 가질 가능성이 증가한다고 결론 지을 수 있다.

[0022] 따라서, 보다 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 방법은,

[0023] c) 기준 샘플에서 프로가스트린의 기준 농도를 결정하는 추가의 단계,

- [0024] d) 상기 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 농도를 프로가스트린의 상기 기준 농도와 비교하는 추가의 단계,
- [0025] e) 단계 d)의 비교로부터, 식도암의 존재 위험을 평가하는 추가의 단계
- [0026] 를 포함한다.
- [0027] 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은,
- [0028] a) 대상체로부터의 생물학적 샘플을 적어도 하나의 프로가스트린-결합 분자와 접촉시키는 단계, 및
- [0029] b) 상기 샘플에서 프로가스트린에 대한 상기 프로가스트린-결합 분자의 결합을 검출하는 단계이며, 여기서 상기 결합이 상기 대상체에서 식도암의 존재를 나타내는 것인 단계를 포함하는,
- [0030] 상기 대상체에서 식도암을 진단하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0031] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은,
- [0032] a) 상기 생물학적 샘플을 적어도 하나의 프로가스트린-결합 분자와 접촉시키는 단계,
- [0033] b) 상기 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 수준 또는 농도를 결정하는 단계이며, 여기서 상기 생물학적 샘플에서 적어도 10 pM의 프로가스트린의 농도가 상기 대상체에서 식도암의 존재를 나타내는 것인 단계
- [0034] 를 포함하는, 상기 대상체에서 식도암의 시험관내 진단 방법에 관한 것이다.
- [0035] 본 발명에 따른 방법의 보다 특정한 실시양태에서, 상기 생물학적 샘플 중의 적어도 10 pM, 적어도 20 pM, 적어도 30 pM의 프로가스트린의 농도는 상기 대상체에서 식도암의 존재를 나타낸다.
- [0036] 보다 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 방법은,
- [0037] c) 기준 샘플에서 프로가스트린의 기준 농도를 결정하는 추가의 단계,
- [0038] d) 상기 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 농도를 프로가스트린의 상기 기준 수준 또는 농도와 비교하는 추가의 단계,
- [0039] e) 단계 d)의 비교로부터, 식도암의 존재를 진단하는 추가의 단계
- [0040] 를 포함한다.
- [0041] 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은,
- [0042] a) 대상체로부터의 생물학적 샘플을 적어도 하나의 프로가스트린-결합 분자와 접촉시키는 단계, 및
- [0043] b) 상기 샘플에서 프로가스트린에 대한 상기 프로가스트린-결합 분자의 결합을 검출하는 단계이며, 여기서 상기 결합이 상기 대상체에서 전이된 식도암의 존재를 나타내는 것인 단계
- [0044] 를 포함하는, 상기 대상체에서 전이된 식도암을 진단하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0045] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은,
- [0046] a) 대상체로부터의 생물학적 샘플을 적어도 하나의 프로가스트린-결합 분자와 접촉시키는 단계,
- [0047] b) 상기 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 수준 또는 농도를 생화학적 검정에 의해 결정하는 단계이며, 여기서 상기 생물학적 샘플에서 적어도 10 pM 초과인 프로가스트린의 농도가 상기 대상체에서 전이된 식도암의 존재를 나타내는 것인 단계
- [0048] 를 포함하는, 상기 대상체의 생물학적 샘플로부터, 상기 대상체에서 전이된 식도암의 시험관내 진단 방법에 관한 것이다.
- [0049] 본 발명에 따른 방법의 보다 특정한 실시양태에서, 상기 생물학적 샘플에서 적어도 10 pM, 적어도 20 pM, 적어도 30 pM, 적어도 40 pM 또는 적어도 50 pM의 프로가스트린의 농도는 상기 대상체에서 전이된 식도암의 존재를 나타낸다.
- [0050] 보다 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 방법은,
- [0051] c) 기준 샘플에서 프로가스트린의 기준 농도를 결정하는 추가의 단계,
- [0052] d) 상기 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 농도를 프로가스트린의 상기 기준 수준 또는 농도와 비교하는 추가

의 단계,

- [0053] e) 단계 d)의 비교로부터, 전이된 식도암의 존재를 진단하는 추가의 단계
- [0054] 를 포함한다.
- [0055] 특정한 실시양태에서, 본 발명은 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 농도의 결정 및 수득된 상기 값을 기준 샘플 중의 프로가스트린의 농도와 비교하는 것을 포함하는, 대상체에서 식도암의 시험관내 진단 방법에 관한 것이다.
- [0056] 보다 특정한 실시양태에서, 본 발명에 따른 식도암 진단 방법에서, 상기 대상체의 생물학적 샘플을 적어도 하나의 프로가스트린-결합 분자와 접촉시키며, 여기서 상기 프로가스트린-결합 분자는 항체, 또는 그의 항원-결합 단편이다.
- [0057] 표현 "대상체에서 식도암의 존재 위험의 평가"는 기준 대상체 또는 값과 비교시, 주어진 대상체가 식도암을 앓을 상대 확률의 결정을 나타낸다. 본 발명에 따른 방법은 임상 조사, 생검 및 식도암의 공지된 바이오마커 수준의 결정과 같은 다른 방법 또는 지표와 함께, 상기 위험의 평가에서 도구를 나타낸다.
- [0058] 특정한 실시양태에 따르면, 본 발명은 식도암의 적어도 하나의 임상 증상을 나타내는 대상체로부터의 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 농도의 결정을 포함하는, 식도암의 시험관내 진단 방법에 관한 것이다. 식도암의 임상 증상은 체중 감소, 연하통 또는 연하 곤란, 기침, 소화불량 및 속 쓰림을 포함한다.
- [0059] 또 다른 특정한 실시양태에 따르면, 본 발명은 암 및/또는 전이의 적어도 하나의 임상 증상을 나타내는 대상체로부터의 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 농도의 결정을 포함하는, 식도암의 시험관내 진단 방법에 관한 것이다.
- [0060] 따라서, 본 발명에 따른, 식도암의 시험관내 진단 방법은 진단 과정 내에 도구로서 간주될 수 있다.
- [0061] 보다 특정한 실시양태에서, 본 발명은 상기 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 농도의 결정 및 식도암의 공지된 바이오마커의 결정을 포함하는, 대상체에서 식도암의 시험관내 진단 방법에 관한 것이다.
- [0062] 용어 "프로가스트린"은 포유동물의 프로가스트린 펩티드, 특히 인간 프로가스트린을 나타낸다. 의심의 여지 없이, 어떠한 명시 없이도, 표현 "인간 프로가스트린"은 서열 서열식별번호(SEQ ID No.): 1의 인간 PG를 지칭한다. 인간 프로가스트린은 특히, 상기에 언급된 생물학적으로 활성인 가스트린 호르몬 형태에 존재하지 않는 N-말단 및 C-말단 도메인을 포함한다. 바람직하게는, 상기 N-말단 도메인의 서열은 서열식별번호: 2로 표시된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 C-말단 도메인의 서열은 서열식별번호: 3으로 표시된다.
- [0063] 본 발명에 따른 방법에서, 프로가스트린의 농도의 결정은 생화학의 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 공지된 임의의 방법에 의해 수행된다.
- [0064] 바람직하게는, 샘플 중의 프로가스트린의 수준을 결정하는 것은 상기 샘플을 프로가스트린-결합 분자와 접촉시키고 프로가스트린에 대한 상기 프로가스트린-결합 분자의 결합을 측정하는 것을 포함한다.
- [0065] 발현 수준을 단백질 수준에서 측정할 때, 이는 특히, 예를 들어 항체와 같은 특이적 프로가스트린-결합 분자를 사용하여, 특히 비오틴화 또는 다른 균등 기술을 사용한 세포막 염색과 같은 널리 공지된 기술을 사용하여 수행할 수 있으며, 이어서 특이적 항체로의 면역 침전, 웨스턴 블롯, ELISA 또는 ELISPOT, 효소-결합 면역흡착 검정(enzyme-linked immunosorbant assay) (ELISA), 방사면역측정법(radioimmunoassay) (RIA), 면역조직화학(IHC), 면역형광법 (IF), 항체 마이크로어레이, 또는 조직 마이크로어레이 (면역조직화학에 커플링됨)를 사용하여 수행할 수 있다. 다른 적합한 기술은 FRET 또는 BRET, 단일 또는 다중 여기 과정을 사용하며 적합화된 광학 방법 중 임의의 것, 예컨대 전기 화학적 방법 (전압 측정 및 전류 측정 기술), 원자력 현미경, 및 무선 주파수 방법(radio frequency method), 예를 들어 다극성 공명 분광법(multipolar resonance spectroscopy), 형광, 발광, 화학발광, 흡광도, 반사율, 투과율, 및 복굴절 또는 굴절률의, 공초점 및 비공초점 검출 (예를 들어, 표면 플라즈몬 공명, 타원편광법(ellipsometry), 공진 거울법(resonant mirror method), 그레이팅 커플러 웨이브 가이드 방법(grating coupler waveguide method) 또는 간섭계법), 세포 ELISA, 유동 세포 계측법, 방사성 동위원소, 자기 공명 영상화, 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동 (SDS-PAGE)에 의한 분석; HPLC-질량 분광학; 액체 크로마토그래피/질량 분석법/질량 분석법 (LC-MS/MS))을 적용하는 단세포 현미경 또는 조직화학 방법을 포함한다. 이들 모든 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며 여기에서 더 상세히 설명할 필요는 없다. 이들 다양한 기술을 사용하여 프로가스트린 수준을 측정할 수 있다.

- [0066] 상기 방법은 특히, 면역-검출에 기초한 방법, 웨스턴 블롯에 기초한 방법, 질량 분석법에 기초한 방법, 크로마토그래피에 기초한 방법, 및 유동 세포 계측법에 기초한 방법 중에서 선택될 수 있다. 비록 검정을 수행하기 위한 임의의 적합한 수단이 본 발명 내에 포함되긴 하지만, FACS, ELISA, RIA, 웨스턴-블롯 및 IHC와 같은 방법은 본 발명의 방법을 수행하는데 특히 유용하다.
- [0067] 보다 특정한 실시양태에서, 본 발명에 따른, 식도암의 시험관내 진단 방법은 대상체로부터의 생물학적 샘플을, 바람직하게는 RIA 및 ELISA 중에서 선택된 기술에 기초하여, 면역효소 검정을 사용하여, 프로가스트린 결합 분자와 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0068] 본원에서 사용된 바와 같은 "생물학적 샘플"은, 예를 들어, 식도암 단백질, 폴리뉴클레오티드 또는 전사물의, 핵산 또는 폴리펩티드를 함유하는 생물학적 조직 또는 체액의 샘플이다. 이러한 샘플은 프로가스트린의 발현 수준을 결정하게 할 수 있어야 한다. 프로가스트린은 분비된 단백질로 공지되어 있다. 따라서 프로가스트린 단백질의 수준을 결정하기 위한 바람직한 생물학적 샘플은 생물학적 체액을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 "생물학적 체액"은 생물학적 기원의 물질을 포함하는 임의의 체액을 의미한다. 본 발명에서 사용하기에 바람직한 생물학적 체액은 동물, 예를 들어 포유동물, 바람직하게는 인간 대상체의 체액을 포함한다. 체액은 혈액, 혈장, 혈청, 림프액, 뇌척수액 (CSF), 타액, 땀 및 소변을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 체액일 수 있다. 바람직하게는, 상기 바람직한 액체 생물학적 샘플은 혈액 샘플, 혈장 샘플 또는 혈청 샘플과 같은 샘플을 포함한다. 보다 바람직하게는, 생물학적 샘플은 혈액 샘플이다. 실제로, 이러한 혈액 샘플은 환자로부터 완전히 무해한 혈액 수집에 의해 수득될 수 있으며, 따라서 대상체가 종양을 발병할 위험을 비침습적으로 평가할 수 있게 한다.
- [0069] 본원에서 사용된 바와 같은 "생물학적 샘플"은, 암이 고형암인 경우, 검사할 환자의 고형암 샘플을 또한 포함한다. 이러한 고형암 샘플은 통상의 기술자가 본 발명의 바이오마커 수준의 임의의 유형의 측정을 수행할 수 있게 한다. 일부 경우에, 본 발명에 따른 방법은 환자로부터 고형암 샘플을 취하는 예비 단계를 추가로 포함할 수 있다. "고형암 샘플"이란, 종양 조직 샘플을 지칭한다. 심지어 암 환자에서도, 종양의 부위인 조직은 종양이 아닌 건강한 조직을 여전히 포함한다. 따라서 "암 샘플"은 환자로부터 취한 종양 조직으로 제한하여야 한다. 상기 "암 샘플"은 생검 샘플이거나 외과적 절제 요법으로부터 취한 샘플일 수 있다.
- [0070] 생물학적 샘플은 진핵 생물, 가장 바람직하게는 포유동물, 또는 조류, 파충류, 또는 어류로부터 전형적으로 수득된다. 실제로, 본원에 기재된 방법에 적용될 수 있는 "대상체"는 인간, 개, 고양이, 소, 염소, 돼지(pig), 가축화된 돼지(swine), 양 및 원숭이를 포함한 포유류의 동물 ; 또는 조류; 파충류; 또는 어류중 임의의 것일 수 있다. 바람직하게는, 대상체는 인간이며; 인간 대상체는 "환자"로서 알려져 있을 수 있다.
- [0071] "생물학적 샘플을 수득한다"는 것이란, 본원에서 본 발명에서 기재된 방법에서 사용하기 위한 생물학적 샘플을 수득하는 것을 의미한다. 가장 흔히, 이는 동물로부터의 세포의 샘플을 제거함으로써 행할 것이나, 이전에 단리된 세포 (예를 들어, 또 다른 사람에 의해, 또 다른 시간에, 및/또는 또 다른 목적으로 단리됨)를 사용함으로써, 또는 본 발명의 방법을 생체내에서 수행함으로써 또한 완수할 수 있다. 치료 또는 결과 이력을 갖는 기록 조직이 특히 유용할 것이다.
- [0072] 이 샘플은 수득할 수 있고, 필요하다면 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다. 특히, 샘플은 절식 대상체로부터 취해야만 한다는 것이 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다.
- [0073] 프로가스트린의 농도의 결정은 공지된 부피의 샘플 중의 프로가스트린의 양의 결정에 관한 것이다. 프로가스트린의 농도는 기준 샘플에 대해 상대적으로, 예를 들어 비율 또는 백분율로서 표시될 수 있다. 또한, 상기 농도는 상기 농도의 결정에 사용된 방법에 따라, 신호의 강도 또는 국소화로서 표시될 수 있다. 바람직하게는, 샘플 중의 화합물의 농도는 상기 샘플 중의 관련 화합물의 총 농도의 정규화 후에 표시되며, 예를 들어, 단백질의 수준 또는 농도는 샘플 중의 단백질의 총 농도의 정규화 후에 표시된다.
- [0074] 바람직하게는, 상기 대상체가 식도암을 앓을 위험은 상기 생물학적 샘플에서 측정된 프로가스트린의 수준을 기준 수준과 비교함으로써 결정된다.
- [0075] 본원에서 사용된 바와 같은, 용어 "기준 수준"은 기준 샘플에서 고려 중인 식도암 마커, 즉 프로가스트린의 발현 수준을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같은, "기준 샘플"은 질환이 없는 것으로 알려진 대상체, 바람직하게는 둘 이상의 대상체로부터 또는, 대안적으로, 일반 집단으로부터 수득된 샘플을 의미한다. 프로가스트린의 적합한 기준 발현 수준은 몇몇 적합한 대상체에서 상기 마커의 발현 수준을 측정함으로써 결정될 수 있으며, 이러한 기준 수준은 특정 대상체 집단에 맞게 조정될 수 있다. 기준값 또는 기준 수준은 절대값; 상대값; 상한치

또는 하한치를 갖는 값; 값의 범위; 평균값; 중앙값, 평균값 또는 특정한 대조군 또는 기준선 값과 비교한 값일 수 있다. 기준값은 개개의 샘플 값, 예를 들어, 검사할 대상체로부터, 그러나 보다 이른 시점에서 샘플로부터 수득된 값 등에 기초할 수 있다. 기준값은 예컨대 연대순 연령 매칭 군의 대상체의 집단으로부터의 다수의 샘플에 기초하거나, 검사할 샘플을 포함하거나 포함하지 않는 샘플의 풀(pool)에 기초할 수 있다.

[0076] 유리하게는, "기준 수준"은 암과 관련하여 공지된 특정한 상태를 가진 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 수득한, 미리 결정된 프로가스트린 수준이다. 특정한 실시양태에서, 단계 (b)에서 시험 샘플과 비교하기 위해 사용된 기준 수준은 건강한 대상체로부터의 생물학적 샘플, 또는 암을 앓고 있는 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 수득할 수 있었을 수 있으며; 기준 발현 프로파일은 건강한 대상체의 생물학적 샘플의 풀로부터 또는 암을 갖는 대상체로부터의 샘플의 풀로부터 또한 수득할 수 있다는 것이 이해된다.

[0077] 본 발명의 방법의 특정한 실시양태에서, 기준 샘플은 임의의 암으로부터, 바람직하게는 임의의 병상으로부터 면제된 대상체로부터 수집한다. 환자로부터 수집한 생물학적 샘플의 본질에 따라, 기준 샘플은 상기 생물학적 샘플의 동일한 본질의 생물학적 샘플이 될 것이라는 것이 이해되어야 한다.

[0078] 프로가스트린의 수준은 프로가스트린-결합 분자, 바람직하게는 프로가스트린을 인식하는 항체에 의해 결합되는 프로가스트린의 양을 결정함으로써 본 발명의 방법에서 결정된다.

[0079] "프로가스트린-결합 분자"란, 본원에서 프로가스트린에 결합하나, 가스트린-17 (G17), 가스트린-34 (G34), 글리신-확장된 가스트린-17 (G17-Gly), 또는 글리신-확장된 가스트린-34 (G34-Gly)에 결합하지 않는 임의의 분자를 지칭한다. 본 발명의 프로가스트린-결합 분자는 임의의 프로가스트린-결합 분자, 예를 들어, 항체 분자 또는 수용체 분자 동일 수 있다. 바람직하게는, 프로가스트린-결합 분자는 항-프로가스트린 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다.

[0080] 특정한 실시양태에 따르면, 본 발명은 식도암의 적어도 하나의 임상 증상을 나타내는 대상체로부터의 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 농도의 결정을 포함하는, 식도암의 시험관내 진단 방법에 관한 것이다.

[0081] 또 다른 특정한 실시양태에 따르면, 본 발명은 암 및/또는 전이의 적어도 하나의 임상 증상을 나타내는 대상체로부터의 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 농도의 결정을 포함하는, 식도암의 시험관내 진단 방법에 관한 것이다.

[0082] "결합", "결합하다" 등이란, 항체, 또는 그의 항원 결합 단편이 생리적 조건 하에 비교적 안정적인 항원과 복합체를 형성한다는 것으로 의도된다. 두 분자가 결합하는지를 결정하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, 평형 투석, 표면 플라즈몬 공명 등을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 상기 항체, 또는 그의 항원-결합 단편은 BSA 또는 카세인과 같은 비특이적 분자에 결합하는 그의 친화도보다 적어도 2배 더 큰 친화도로 프로가스트린에 결합한다. 보다 특정한 실시양태에서, 상기 항체, 또는 그의 항원-결합 단편은 프로가스트린에만 결합한다.

[0083] 특정한 실시양태에서, 본 발명에 따른 식도암의 진단 방법에서, 대상체로부터의 생물학적 샘플을 적어도 하나의 프로가스트린-결합 분자와 접촉시키며, 여기서 프로가스트린에 대한 상기 분자의 친화도는, 상기에 기재된 바와 같은 방법에 의해 결정된 바와 같이, 적어도 100 nM, 적어도 90 nM, 적어도 80 nM, 적어도 70 nM, 적어도 60 nM, 적어도 50 nM, 적어도 40 nM, 적어도 30 nM, 적어도 20 nM, 적어도 10 nM, 적어도 5 nM, 적어도 100 pM, 적어도 10 pM, 또는 적어도 1 pM이다.

[0084] 특정한 실시양태에서, 본 발명은 대상체로부터의 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 농도의 검출을 포함하며, 여기서 상기 생물학적 샘플을 항-hPG 항체, 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 것인, 식도암의 진단 방법에 관한 것이다.

[0085] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "항체"는 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 항체 (또는 "면역글로불린")은 디설피드 결합에 의해 상호 연결된 적어도 2개의 중 (H) 쇠 및 2개의 경 (L) 쇠를 포함하는 당단백질로 이루어진다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (또는 도메인) (본원에서 HCVR 또는 VH로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3을 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 LCVR 또는 VL로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인, CL을 포함한다. VH 및 VL 영역은 항원의 에피토프를 결합하는데 주로 기여하며, 프레임워크 영역 (FR)으로 칭해지는 더 보존되는 영역이 산재해 있는, "상보성 결정 영역" (CDR) 또는 "초가변 영역"으로 칭해지는 초가변성의 영역으로 더 세분될 수 있다. 항체의 경쇄 및 중쇄 내에 CDR을 동정하며 그의 서열을 결정하는 방법은 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 의심의 여지 없이, 반대되는 어떠한 명시도 본문에 없는 경우,

표현 CDR은 IMGT에 의해 정의된 바와 같이 항체의 중쇄 및 경쇄의 초가변 영역을 의미하며, 여기서 IMGT 특유의 넘버링은 프레임워크 영역 및 상보적 결정 영역의 표준화된 한계 결정, CDR1-IMGT: 27 내지 38, CDR2를 제공한다.

[0086] IMGT 특유의 넘버링은 항원 수용체,쇄 유형, 또는 종이 무엇이든간에 가변 도메인을 비교하기 위해 정의되어 있다 [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommie, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. IMGT 특유의 넘버링에서, 보존 아미노산은 항상 동일한 위치, 예를 들어 시스테인 23 (제1(1st)-CYS), 트립토판 41 (보존(CONSERVED)-TRP), 소수성 아미노산 89, 시스테인 104 (제2(2nd)-CYS), 페닐알라닌 또는 트립토판 118 (J-PHE 또는 J-TRP)을 갖는다. IMGT 특유의 넘버링은 프레임워크 영역의 한계 결정 (FR1-IMGT: 위치 1 내지 26, FR2-IMGT: 39 내지 55, FR3-IMGT: 66 내지 104 및 FR4-IMGT: 118 내지 128) 및 상보성 결정 영역의 한계 결정: CDR1-IMGT: 27 내지 38, CDR2-IMGT: 56 내지 65 및 CDR3-IMGT: 105 내지 117을 제공한다. 갭(gap)은 비점유 위치를 나타내므로, CDR-IMGT 길이 (괄호 안에 표시되고 점에 의해 분리됨, 예를 들어 [8.8.13])는 중대한 정보가 된다. IMGT 특유의 넘버링은 IMGT 플리에 데 페홀러(Colliers de Perles)로서 나타낸 2D 그래픽 표시(graphical representation) [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], 및 IMGT / 3D구조-DB에서의 3D 구조 [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)]에서 사용된다.

[0087] 각각의 VH 및 VL은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되며, 하기 순서: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4로 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 배열된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포 (예를 들어 이펙터 세포) 및 고전적인 보체계의 제1 성분 (C1q)을 포함한, 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 항체는 상이한 아이소형 (즉, IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM)일 수 있다.

[0088] 보다 특정한 실시양태에서, 상기 프로가스트린-결합 항체, 또는 그의 항원-결합 단편은 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 키메라 항체, 단일쇄 항체, 낙타화(camelized) 항체, IgA1 항체, IgA2 항체, IgD 항체, IgE 항체, IgG1 항체, IgG2 항체, IgG3 항체, IgG4 항체 및 IgM 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0089] "폴리클로날 항체"는 하나 이상의 다른, 동일하지 않은 항체 중에서 또는 하나 이상의 다른, 동일하지 않은 항체의 존재하에 생성된 항체이다. 일반적으로, 폴리클로날 항체는 동일하지 않은 항체를 생성하는 몇몇 다른 B-림프구의 존재하에 B-림프구로부터 생성된다. 통상적으로, 폴리클로날 항체는 면역화 동물로부터 직접 취득된다.

[0090] 용어 "모노클로날 항체"는 거의 균질한 항체 집단으로부터 발생하는 항체를 나타내며, 여기서 집단은 최소한의 비율로 발견될 수 있는 소수의 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고 동일한 항체를 포함한다. 모노클로날 항체는 하이브리도마와 같은 단세포 클론의 성장으로부터 발생하며, 한 클래스 및 서브클래스의 중쇄 및 한 유형의 경쇄를 특징으로 한다.

[0091] 항체의 "항원-결합 단편"이란 표현에 의해, 상기 항체의 표적 (일반적으로 항원으로도 지칭됨), 일반적으로 동일한 에피토프에 결합하는 능력을 보유하며, 항체의 아미노산 서열의, 적어도 5개의 인접 아미노산 잔기, 적어도 10개의 인접 아미노산 잔기, 적어도 15개의 인접 아미노산 잔기, 적어도 20개의 인접 아미노산 잔기, 적어도 25개의 인접 아미노산 잔기, 적어도 40개의 인접 아미노산 잔기, 적어도 50개의 인접 아미노산 잔기, 적어도 60개의 인접 아미노산 잔기, 적어도 70개의 인접 아미노산 잔기, 적어도 80개의 인접 아미노산 잔기, 적어도 90개의 인접 아미노산 잔기, 적어도 100개의 인접 아미노산 잔기, 적어도 125개의 인접 아미노산 잔기, 적어도 150개의 인접 아미노산 잔기, 적어도 175개의 인접 아미노산 잔기, 또는 적어도 200개의 인접 아미노산 잔기의 아미노산 서열을 포함하는, 임의의 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질을 나타내도록 의도된다.

[0092] 특정한 실시양태에서, 상기 항원-결합 단편은 그것이 유래되는 항체의 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 여전히 바람직한 실시양태에서, 상기 항원 결합 단편은 그것이 유래되는 항체의 2, 3, 4 또는 5개의 CDR, 보다 바람직하게는 6개의 CDR을 포함한다.

[0093] "항원-결합 단편"은, 제한 없이, Fv, scFv (단일쇄의 경우 sc), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc 단편 또는 디아바디, 또는 무질서화 펩티드 예컨대 XTEN (확장된 재조합 폴리펩티드) 또는 PAS 모티프와의 융합 단백질, 또는 그의 반감기가 화학적 변형, 예컨대 폴리(알킬렌) 글리콜 예컨대 폴리(에틸렌) 글리콜의 첨가 ("폐길화

(PEGylation)") (Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG 또는 Fab'-PEG로 칭해지는 폐길화 단편) (폴리(에틸렌) 글리콜의 경우 "PEG")에 의해, 또는 리포솜 내에서의 혼입에 의해 증가될 것인 임의의 단편으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 상기 단편은 본 발명에 따른 항체의 특징적인 CDR 중 적어도 하나를 갖는다. 바람직하게는, 상기 "항원-결합 단편"은 이들이 유래되는 항체의 중 또는 경 가변 쇄의 부분 서열로 구성되거나 상기 부분 서열을 포함할 것이며, 상기 부분 서열은, 표적과 관련하여, 그것이 유래되는 항체의 친화도의, 바람직하게는 적어도 1/100과 동등, 보다 바람직한 방식으로는 적어도 1/10과 동등한 충분한 친화도, 및 그것이 유래되는 항체와 동일한 결합 특이성을 보유하기에 충분하다.

[0094] 또 다른 특정한 실시양태에서, 본 발명에 따른 식도암의 진단 방법에서, 대상체로부터의 생물학적 샘플을 프로가스트린에 결합하는 항체와 접촉시키며, 여기서 상기 항체는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 공지된 면역화 방법에 의해 수득하였으며, 여기서 상기 항체는 아미노산 서열이 프로가스트린의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 것인 펩티드를 면역원으로서 사용함으로써 수득하였다. 보다 특히, 상기 면역원은 다음 중에서 선택된 펩티드를 포함한다:

[0095] · 아미노산 서열이 전장 프로가스트린, 특히 서열식별번호: 1의 전장 인간 프로가스트린의 아미노산 서열을 포함하거나 그로 이루어진 것인 펩티드,

[0096] · 아미노산 서열이 프로가스트린, 특히 서열식별번호: 1의 전장 인간 프로가스트린의 아미노산 서열의 일부에 상응하는 것인 펩티드,

[0097] · 아미노산 서열이 프로가스트린의 N-말단 부분의 아미노산 서열의 일부 또는 전부에 상응하는 것인 펩티드, 특히 아미노산 서열: SWKPRSQQPDAPLG (서열식별번호: 2)을 포함하는 또는 그로 이루어진 펩티드, 및

[0098] · 아미노산 서열이 프로가스트린의 C-말단 부분의 아미노산 서열의 일부 또는 전부에 상응하는 것인 펩티드, 특히 아미노산 서열: QGPWLEEEEEEAYGWDFGRRSAEDEN (서열식별번호: 3)을 포함하는 또는 그로 이루어진 펩티드,

[0099] · 아미노산 서열이 프로가스트린의 C-말단 부분의 아미노산 서열의 일부에 상응하는 것인 펩티드, 특히 프로가스트린의 아미노산 71-80에 상응하는 아미노산 서열 FGRRSAEDEN (서열식별번호: 40)을 포함하는 펩티드.

[0100] 통상의 기술자는 이러한 면역화가, 원하는 바와 같이, 폴리클로날 또는 모노클로날 항체를 생성하는데 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 이들 유형의 항체 각각을 수득하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 따라서 통상의 기술자는 임의의 주어진 항원에 대한 폴리클로날 및/또는 모노클로날 항체를 생성하는 방법을 용이하게 선택하며 이행할 것이다.

[0101] 인간 프로가스트린 (N-말단 선단)의 아미노산 서열 1-14에 상응하는, 아미노산 서열 "SWKPRSQQPDAPLG"을 포함하는 면역원을 사용함으로써 생성된 모노클로날 항체의 예는 하기 표 1 내지 표 4에 기재된 바와 같이, mAb3, mAb4, mAb16, 및 mAb19 및 mAb20으로서 표시된 모노클로날 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다른 모노클로날 항체는, 비록 이들 항체가 프로가스트린에 실제로 결합하는지는 명확하지 않긴 하지만, 기재되어 있다 (WO 2006/032980). 에피토프 매핑의 실험 결과는 mAb3, mAb4, mAb16, 및 mAb19 및 mAb20이 상기 hPG N-말단 아미노산 서열 내의 에피토프에 특이적으로 결합한다는 것을 나타낸다. 서열식별번호: 2로 표시되는 프로가스트린의 N-말단 내에 에피토프를 특이적으로 인식하는 폴리클로날 항체가 관련 기술분야에 기재되어 있다 (예를 들어, WO 2011/083088 참조).

표 1

하이브리도마 칩 착물	mAb	아미노산 서열		서열식별번호
6B5B11C10	mAb3	VH CDR 1	GYIFTSYW	서열식별번호: 4
		VH CDR 2	FYPGNSDS	서열식별번호: 5
		VH CDR 3	TRRDSPQY	서열식별번호: 6
		VL CDR 1	QSIVHSNGNTY	서열식별번호: 7
		VL CDR 2	KVS	서열식별번호: 8
		VL CDR 3	FQGSHPFT	서열식별번호: 9

표 2

[0103]

하이브리도마 칩 착물	mAb	아미노산 서열		서열식별번호
20D2C3G2	mAb4	VH CDR 1	GYTFSSW	서열식별번호: 10
		VH CDR 2	FLPGSGST	서열식별번호: 11
		VH CDR 3	ATDGNYDWFAY	서열식별번호: 12
		VL CDR 1	QSLVHSSGVTY	서열식별번호: 13
		VL CDR 2	KVS	서열식별번호: 14
		VL CDR 3	SQSTHVPPT	서열식별번호: 15

표 3

[0104]

하이브리도마 칩 착물	mAb	아미노산 서열		서열식별번호
1E9D9B6	mAb16	VH CDR 1	GYTFTSY	서열식별번호: 16
		VH CDR 2	INPSNGGT	서열식별번호: 17
		VH CDR 3	TRGGYYPFDY	서열식별번호: 18
		VL CDR 1	QSLDSDGKTY	서열식별번호: 19
		VL CDR 2	LVS	서열식별번호: 20
		VL CDR 3	WQGTHSPYT	서열식별번호: 21

표 4

[0105]

하이브리도마 칩 착물	mAb	아미노산 서열		서열식별번호
1B3B4F11	mAb19	VH CDR 1	GYSITSDYA	서열식별번호: 22
		VH CDR 2	ISFSGYT	서열식별번호: 23
		VH CDR 3	AREVNYGDSYHFDY	서열식별번호: 24
		VL CDR 1	SQHRTYT	서열식별번호: 25
		VL CDR 2	VKKDGS	서열식별번호: 26
		VL CDR 3	GVGDAIKQSVFV	서열식별번호: 27

[0106]

인간 프로가스트린의 아미노산 서열 55-80에 상응하는 아미노산 서열 "QGPWLEEEEEAYGWDMDFGRRSAEDEN", (프로가스트린의 C-말단 부분)을 포함하는 면역원을 사용함으로써 생성될 수 있는 모노클로날 항체의 예는 하기 표 5 및 표 6에서 mAb8 및 mAb13으로서 표시된 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 에피토프 매핑의 실험적 결과는 mAb13이 상기 hPG C-말단 아미노산 서열 내에 에피토프에 특이적으로 결합함을 나타낸다.

표 5

[0107]

하이브리도마 칩 착물	mAb	아미노산 서열		서열식별번호
1C10D3B9	mAb8	VH CDR 1	GFTFTTYA	서열식별번호: 28
		VH CDR 2	ISSGGTYT	서열식별번호: 29
		VH CDR 3	ATQGNYSLDF	서열식별번호: 30
		VL CDR 1	KSLRHTKGITF	서열식별번호: 31
		VL CDR 2	QMS	서열식별번호: 32
		VL CDR 3	AQNLELPLT	서열식별번호: 33

표 6

[0108]

하이브리도마 칩 착물	mAb	아미노산 서열		서열식별번호
2C6C3C7	mAb13	VH CDR 1	GFIFSSYG	서열식별번호: 34
		VH CDR 2	INTFGDRT	서열식별번호: 35
		VH CDR 3	ARGTGY	서열식별번호: 36

		VL CDR 1	QSLLDSDGKTY	서열식별번호: 37
		VL CDR 2	LVS	서열식별번호: 38
		VL CDR 3	WQGFHPQT	서열식별번호: 39

- [0109] 다른 예는 서열식별번호: 40의 아미노산 서열을 포함하는 면역원을 사용함으로써 생성된 항-hPG 모노클로날 및/또는 폴리클로날 항체를 포함한다.
- [0110] 보다 특정한 실시양태에서, 본 발명에 따른 방법에서 상기 생물학적 샘플을 항-hPG 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키며, 여기서 상기 항-hPG 항체는 N-말단 항-hPG 항체 및 C-말단 항-hPG 항체 중에서 선택된다.
- [0111] 용어 "N-말단 항-hPG 항체" 및 "C-말단 항-hPG 항체"는 각각 hPG의 N-말단 부분에 위치한 아미노산을 포함하는 에피토프 또는 hPG의 C-말단 부분에 위치한 아미노산을 포함하는 에피토프에 결합하는 항체를 나타낸다. 바람직하게는, 용어 "N-말단 항-hPG 항체"는 서열이 서열식별번호: 2로 표시되는 프로가스트린의 도메인에 위치한 에피토프에 결합하는 항체를 지칭한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 용어 "C-말단 항-hPG 항체"는 서열이 서열식별번호: 3으로 표시되는 프로가스트린의 도메인에 위치한 에피토프에 결합하는 항체를 지칭한다.
- [0112] 용어 "에피토프"는 항체에 의해 결합되는 항원의 영역이다. 에피토프는 구조적 또는 기능적으로서 정의될 수 있다. 기능적 에피토프는 일반적으로 구조적 에피토프의 부분 집합이며, 상호 작용의 친화도에 직접 기여하는 그러한 아미노산들을 갖는다. 에피토프는 또한 입체형태적일 수 있다. 특정 실시양태에서, 에피토프는 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 기, 또는 술폰닐 기와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 그루핑인 결정 인자를 포함할 수 있으며, 특정 실시양태에서, 특정의 3차원 구조적 특징, 및/또는 특정의 하전 특징을 가질 수 있다. 항체에 의해 결합된 에피토프의 결정은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 공지된, 임의의 에피토프 매핑 기술에 의해 수행될 수 있다. 에피토프는 단백질의 아미노산 서열 내에 순차적으로 위치한 상이한 아미노산을 포함할 수 있다. 에피토프는 단백질의 아미노산 서열 내에 순차적으로 위치하지 않은 아미노산을 또한 포함할 수 있다.
- [0113] 특정한 실시양태에서, 상기 항체는 다음으로 이루어진 군에서 선택된 모노클로날 항체이다:
- [0114]
 - 각각 서열 서열식별번호: 4, 5 및 6과의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 4, 5 및 6의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 중쇄, 및 각각 서열 서열식별번호: 7, 8 및 9와의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 7, 8 및 9의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는 모노클로날 항체,
- [0115]
 - 각각 서열 서열식별번호: 10, 11 및 12와의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 10, 11 및 12의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 중쇄, 및 각각 서열 서열식별번호: 13, 14 및 15와의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 13, 14 및 15의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는 모노클로날 항체,
- [0116]
 - 각각 서열 서열식별번호: 16, 17 및 18과의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 16, 17 및 18의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 중쇄, 및 각각 서열 서열식별번호: 19, 20 및 21과의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 19, 20 및 21의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는 모노클로날 항체,
- [0117]
 - 각각 서열 서열식별번호: 22, 23 및 24와의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 22, 23 및 24의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 중쇄, 및 각각 서열 서열식별번호: 25, 26 및 27과의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 25, 26 및 27의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는 모노클로날 항체,

- [0118] · 각각 서열 서열식별번호: 28, 29 및 30과의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 28, 29 및 30의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 중쇄, 및 각각 서열 서열식별번호: 31, 32 및 33과의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 31, 32 및 33의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는 모노클로날 항체, 및
- [0119] · 각각 서열 서열식별번호: 34, 35 및 36과의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 34, 35 및 36의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 중쇄, 및 각각 서열 서열식별번호: 37, 38 및 39와의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 37, 38 및 39의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는 모노클로날 항체.
- [0120] 본원에서 사용된 바와 같이, 두 서열의 핵산 또는 아미노산 간의 "백분율 동일성" 또는 "% 동일성"은 최적 정렬 후에 수득된, 비교될 두 서열 간의 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기의 백분율을 의미하며, 이 백분율은 순전히 통계적이며 두 서열 간의 차이는 그의 길이에 따라 무작위로 분포한다. 2개의 핵산 또는 아미노산 서열의 비교는 전통적으로 서열을 최적으로 정렬한 후 서열을 비교함으로써 수행되며, 상기 비교는 세그먼트에 의해 또는 "정렬 창"을 사용함으로써 수행가능하다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은 직접(by hand) 비교하는 것 이외에, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0121] 기준 아미노산 서열과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 나타내는 아미노산 서열의 경우, 바람직한 예는 기준 서열을 함유하는 것들, 특정 변형, 특히 적어도 하나의 아미노산의 결실, 첨가 또는 치환, 말단절단 또는 확장을 포함한다. 하나 이상의 연속 또는 비연속 아미노산의 치환의 경우에, 치환된 아미노산이 "등가" 아미노산에 의해 대체되는 치환이 바람직하다. 여기서, 표현 "등가 아미노산"은 구조 아미노산 중 하나를 치환할 가능성이 있으나 상응하는 항체 및 구체에가 이하에 정의된 것들 중 하나의 생물학적 활성을 변형시키지 않는 임의의 아미노산을 나타내고자 한다.
- [0122] 등가 아미노산은 치환되는 아미노산과의 그의 구조적 상동성에 따라 또는 생성될 가능성이 있는 다양한 항체 간의 생물학적 활성의 비교 시험의 결과에 따라 결정될 수 있다.
- [0123] 또 다른 특정한 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 사용된 항체는 인간화 항체이다.
- [0124] 본원에서 사용된 바와 같이, 표현 "인간화 항체"는 비인간 기원의 항체로부터 유래된 CDR 영역을 함유하는 항체를 의미하며, 항체 분자의 다른 부분은 하나 또는 수개의 인간 항체로부터 유래된다. 게다가, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 공지된 기술에 따라, 골격 세그먼트 잔기의 일부 (프레임워크의 경우 FR이라 칭해짐)는 결합 친화도를 보존하도록 변형될 수 있다 (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986). 인간화의 목표는 항체의 완전한 항원 결합 친화도 및 특이성을 유지하면서, 인간에게 도입하기 위한, 무인 항체와 같은 이중 항체의 면역원성을 감소시키는 것이다.
- [0125] 본 발명의 인간화 항체 또는 그의 단편은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 기술에 의해 제조될 수 있다 (예컨대, 예를 들어, 문헌 [Singer et al., J. Immun., 150:2844-2857, 1992]에 기재된 것들). 이러한 인간화 항체는 시험관내 진단 또는 생체내 예방적 및/또는 치료적 치료를 수반하는 방법에서 그의 사용에 바람직하다. 또한, 다른 인간화 기술들이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 실제로, 항체는 CDR-그래프팅(grafting) (EP 0 451 261; EP 0 682 040; EP 0 939 127; EP 0 566 647; US 5,530,101; US 6,180,370; US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,639,641; US 6,054,297; US 5,886,152; 및 US 5,877,293), 베어링(veneering) 또는 리서피싱(resurfacing) (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., 1991, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498; Studnicka G. M. et al., 1994, Protein Engineering 7(6): 805-814; Roguska M.A. et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 91:969-973), 및 쇠 셔플링(chain shuffling) (미국 특허 번호 5,565,332)을 포함한 여러 가지의 기술을 사용하여 인간화시킬 수 있다. 인간 항체는 파지 디스플레이법을 포함한, 관련 기술분야에 공지된 여러 가지의 방법에 의해 제조될 수 있다. 또한, 미국 특허 번호 4,444,887, 4,716,111, 5,545,806, 및 5,814,318; 및 국제 특허 출원 공개 번호 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, 및 WO 91/10741참조.
- [0126] 보다 특정한 실시양태에서, 상기 항체는,

- [0127] · 각각 서열 서열식별번호: 4, 5 및 6과의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 4, 5 및 6의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 중쇄, 및 각각 서열 서열식별번호: 7, 8 및 9와의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 7, 8 및 9의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는 인간화 항체,
- [0128] · 각각 서열 서열식별번호: 10, 11 및 12와의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 10, 11 및 12의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 중쇄, 및 각각 서열 서열식별번호: 13, 14 및 15와의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 13, 14 및 15의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는 인간화 항체,
- [0129] · 각각 서열 서열식별번호: 16, 17 및 18과의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 16, 17 및 18의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 중쇄, 및 각각 서열 서열식별번호: 19, 20 및 21과의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 19, 20 및 21의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는 인간화 항체,
- [0130] · 각각 서열 서열식별번호: 22, 23 및 24와의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 22, 23 및 24의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 중쇄, 및 각각 서열 서열식별번호: 25, 26 및 27과의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 25, 26 및 27의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는 인간화 항체,
- [0131] · 각각 서열 서열식별번호: 28, 29 및 30과의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 28, 29 및 30의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 중쇄, 및 각각 서열 서열식별번호: 31, 32 및 33과의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 31, 32 및 33의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는 인간화 항체, 및
- [0132] · 각각 서열 서열식별번호: 34, 35 및 36과의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 34, 35 및 36의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 중쇄, 및 각각 서열 서열식별번호: 37, 38 및 39와의 최적 정렬 후 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 동일성을 가진 서열, 또는 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 37, 38 및 39의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3의, 적어도 하나, 우선적으로 적어도 둘, 우선적으로 셋을 포함하는 경쇄를 포함하는 인간화 항체
- [0133] 로 이루어진 군에서 선택된 인간화 항체이며,
- [0134] 여기서 상기 항체는 인간 항체로부터 유래된 경쇄 및 중쇄의 불변 영역을 또한 포함한다.
- [0135] 제1 실시양태에서, 본 발명에 따른 방법은 생물학적 샘플을 hPG의 에피토프 (상기 에피토프는 hPG의 C-말단 부분 내에 위치한다) 또는 hPG의 N-말단 부분 내에 위치한 에피토프에 결합하는 항-hPG 항체와 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0136] 보다 구체적 실시양태에서, 본 발명에 따른 방법은 생물학적 샘플을 hPG의 에피토프에 결합하는 항-hPG 항체와 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 에피토프는, hPG의 아미노산 10 내지 14, hPG의 아미노산 9 내지 14, hPG의 아미노산 4 내지 10, hPG의 아미노산 2 내지 10 및 hPG의 아미노산 2 내지 14에 상응하는 아미노산 서열 중에서 선택된, 프로가스트린의 N-말단 부분의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 hPG의 아미노산 서열은 서열식별번호: 1이다.

- [0137] 보다 구체적 실시양태에서, 본 발명에 따른 방법은 생물학적 샘플을 hPG의 에피토프에 결합하는 항-hPG 항체와 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 에피토프는, hPG의 아미노산 71 내지 74, hPG의 아미노산 69 내지 73, hPG의 아미노산 71 내지 80 (서열식별번호: 40), hPG의 아미노산 76 내지 80 및 hPG의 아미노산 67 내지 74에 상응하는 아미노산 서열 중에서 선택된, 프로가스트린의 C-말단 부분의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 hPG의 아미노산 서열은 서열식별번호: 1이다.
- [0138] 제1 실시양태에서, 본 발명에 따른 조성물은 프로가스트린의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 포함한 에피토프를 인식하는 항체를 포함한다.
- [0139] 보다 구체적 실시양태에서, 본 발명에 따른 조성물은 프로가스트린의 에피토프를 인식하는 항체를 포함하며 여기서 상기 에피토프는 프로가스트린의 N-말단 부분의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 상기 아미노산 서열은 hPG의 잔기 10 내지 14, hPG의 잔기 9 내지 14, hPG의 잔기 4 내지 10, hPG의 잔기 2 내지 10 또는 hPG의 잔기 2 내지 14를 포함할 수 있으며, 여기서 hPG의 아미노산 서열은 서열식별번호: 1이다.
- [0140] 보다 구체적 실시양태에서, 본 발명에 따른 조성물은 프로가스트린의 에피토프를 인식하는 항체를 포함하며 여기서 상기 에피토프는 프로가스트린의 C-말단 부분의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 상기 아미노산 서열은 hPG의 잔기 71 내지 74, hPG의 잔기 69 내지 73, hPG의 잔기 71 내지 80 (서열식별번호: 40), hPG의 잔기 76 내지 80, 또는 hPG의 잔기 67 내지 74를 포함할 수 있으며, 여기서 hPG의 아미노산 서열은 서열식별번호: 1이다.
- [0141] 본 발명에 따른 식도암의 시험관내 진단 방법의 특정한 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터의 생물학적 샘플을 프로가스트린의 제1 부분에 결합하는 제1 분자 및 프로가스트린의 제2 부분에 결합하는 제2 분자와 접촉시키는 단계를 포함한다. 보다 특정한 실시양태에서, 여기서 상기 프로가스트린-결합 분자는 항체이며, 대상체로부터의 생물학적 샘플을 프로가스트린의 제1 에피토프에 결합하는 항체 및 프로가스트린의 제2 에피토프에 결합하는 제2 항체와 접촉시킨다.
- [0142] 바람직한 실시양태에서, 식도암 진단을 위한 본 발명의 방법은 인간 대상체로부터의 생물학적 샘플에서 프로가스트린의 검출을 포함한다.
- [0143] 보다 바람직한 실시양태에서, 식도암 진단을 위한 본 발명의 방법은 인간 대상체로부터의 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 농도의 검출을 포함한다.
- [0144] 또 다른 특정한 실시양태에서, 식도암 진단을 위한 본 발명의 방법은 인간 대상체로부터의 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 농도의 검출을 포함하며, 여기서 상기 생물학적 샘플은 혈액, 혈청 및 혈장으로로부터 선택된다.
- [0145] 추가의 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 상기 대상체로부터의 샘플을 상기에 기재된 바와 같은 항-hPG 항체와 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 샘플 중의 상기 항-hPG 항체의 결합은 상기 대상체에서 식도암의 존재를 나타낸다.
- [0146] 보다 특정한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 상기 대상체로부터의 샘플을 상기에 기재된 바와 같은 항-hPG 항체와 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 샘플 중 10 pM 보다 우세한 프로가스트린의 농도는 상기 대상체에서 식도암의 존재를 나타낸다.
- [0147] 보다 바람직하게는, 본 발명의 방법은 상기 대상체로부터의 샘플을 상기에 기재된 바와 같은 항-hPG 항체와 접촉시키며, 여기서 상기 샘플 중 10 pM, 20 pM, 30 pM 또는 40 pM 보다 우세한 프로가스트린의 농도는 상기 대상체에서 식도암의 존재를 나타낸다.
- [0148] 보다 더 바람직하게는, 본 발명의 방법은 상기 대상체로부터의 샘플을 상기에 기재된 바와 같은 항-hPG 항체와 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 샘플 중 10 pM, 20 pM, 30 pM, 40 pM 보다 우세한 프로가스트린의 농도는 상기 대상체에서 전이된 식도암의 존재를 나타낸다.
- [0149] 또한, 본 발명은 식도암 치료 전 환자로부터 수득한, 식도암의 체액 또는 생검과 같은 제1 샘플 중의 프로가스트린의 농도를 결정한 다음에, 제1 샘플 중의 프로가스트린의 농도를 치료 후 동일한 환자로부터 수득한 제2 샘플 중의 프로가스트린의 농도와 비교함으로써, 여기서 상기 제1 샘플과 비교하여 상기 제2 샘플 중의 프로가스트린의 농도의 감소는 치료가 효과적이었음을 나타내는 것인, 화학요법, 생물학적 요법, 면역요법 또는 항체 요법과 같은, 환자에서 식도암 치료의 효능을 모니터링하는 방법에 관한 것이다.

- [0150] 특정한 실시양태에서, 본 발명에 따른 방법은 환자로부터 수득한 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 농도를 상기 샘플 중의 프로가스트린의 농도의 미리 결정된 값과 비교하는 것을 포함하며, 보다 특정한 실시양태에서, 상기 미리 결정된 값은 환자가 식도암이 없는 것으로 공지된 경우의 프로가스트린 농도 값, 식도암이 없는 집단에서의 값의 평균치(mean, 또는 average) 결정에 기초한 샘플 값의 평균치 중에서 선택된다.
- [0151] 특정한 실시양태에서, 식도암의 시험관내 진단을 위한 본 발명에 따른 방법은 상기 환자로부터의 샘플 중의 프로가스트린 농도의 결정 및 식도암의 제2 진단 검사를 포함한다. 보다 특정한 실시양태에서, 식도암의 시험관내 진단을 위한 본 발명에 따른 방법은 상기 환자로부터의 샘플 중의 프로가스트린 농도의 결정 및 식도암의 제2 진단 검사를 포함하며, 여기서
- [0152] 본 발명의 특정한 실시양태에서, 본 발명에 따른 방법은 식도암으로 치료 받았거나 치료 받고 있는 환자로부터의 샘플 중에서 시간에 따른 프로가스트린의 수준의 결정을 포함한다.
- [0153] 또 다른 측면에서, 본 발명의 주제는 프로가스트린-결합 항체, 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는, 식도암의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 조성물에 관한 것이다.
- [0154] 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 항체 조성물은 비경구, 척수강내, 피하, 정맥내, 근육내, 복강내, 주입 또는 볼루스 투여를 포함하나 이에 제한되지는 않는 여러 가지의 경로에 의한 투여를 위한 수성 현탁액을 포함하나 이에 제한되지는 않는 상이한 제형으로서 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 비경구 투여를 위해, 그리고 일부 구체적 실시양태에서, 주입에 의한 정맥내 주사를 위해 제제화된다.
- [0155] 특정한 실시양태에서, 본 발명에 따른, 식도암의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 조성물은 0.001 mg/kg 내지 약 250 mg/kg 범위의 본 발명의 항-프로가스트린 항체의 유효 용량을 포함하며, 이는 1회 투여로, 또는 간격을 두고 다수회 투여에 걸쳐 제공될 수 있다.
- [0156] 특정한 실시양태에서, 본 발명에 따른, 식도암의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 조성물은, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 키메라 항체, 단일쇄 항체, 낙타화 항체, IgA1 항체, IgA2 항체, IgD 항체, IgE 항체, IgG1 항체, IgG2 항체, IgG3 항체, IgG4 항체 및 IgM 항체 중에서 선택된 프로가스트린-결합 항체, 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 바람직하게는, 상기 항체는 상기에 기재된 것들이다. 보다 바람직하게는, 상기 항체는 인간화 항체이다.
- [0157] 보다 특정한 실시양태에서, 본 발명에 따른, 식도암의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 조성물은, 상기에 기재된 바와 같은 방법에 의해 결정된 바와 같이, 적어도 5000 nM, 적어도 500 nM, 100 nM, 80 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 7 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0.5 nM, 0.1 nM, 50 pM, 10 pM, 5 pM, 1 pM, 또는 적어도 0.1 pM의 프로가스트린에 대한 친화도를 갖는 프로가스트린-결합 항체, 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다.
- [0158] 보다 더 특정한 실시양태에서, 식도암의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 조성물은 프로가스트린-결합 항체를 포함하며, 여기서 상기 프로가스트린-결합 분자, 또는 그의 항원-결합 단편은 중화 항체이다.
- [0159] 표현 "중화 항-PG 항체"는 PG에 결합하며 PG-의존성 신호 전달을 차단하여, 종양 세포에서, 특히 식도 종양 세포에서의 PG-유도 반응의 억제를 결과하는 항체를 나타낸다. 식도 세포의 PG-유도 반응을 억제하는 것은 세포 분화의 억압, 세포 사의 억압, 및/또는 세포 증식의 자극에 의해 매개될 수 있다.
- [0160] 또 다른 특정한 실시양태에서, 식도암의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 조성물은 프로가스트린-결합 항체를 포함하며, 여기서 상기 프로가스트린-결합 분자, 또는 그의 항원-결합 단편은 인간화 항체이다.
- [0161] 특정한 실시양태에서, 식도암의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 조성물은 프로가스트린-결합 항체를 포함하며, 여기서 상기 프로가스트린-결합 분자, 또는 그의 항원-결합 단편은 세포독성 분자에 접합된다.
- [0162] 또 다른 특정한 실시양태에서, 환자에 대한 식도암의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 조성물은 프로가스트린-결합 항체를 포함하며, 여기서 상기 환자는 본 발명에 따른 방법에 의해 식도암으로 진단 받았으며, 여기서 프로가스트린의 농도는 기준 샘플 중에서 보다 상기 환자로부터의 생물학적 샘플에서 더 높다.
- [0163] 보다 특정한 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 식도암의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 조성물에 관한 것이며, 여기서 상기 프로가스트린-결합 항체, 또는 그의 항원-결합 단편은, N-말단 항-프로가스트린 항체 및 C-말단 항-프로가스트린 항체 중에서 선택된다.
- [0164] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 식도암의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 조성물, 및 제약상

허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 식도암의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 제약 조성물은 상기에 기재된 바와 같은 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다.

- [0165] 보다 특정한 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 식도암의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 조성물, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이며, 여기서 상기 항-프로가스트린 항체는 0.001 mg/kg 내지 250 mg/kg의 용량으로, 그리고 바람직하게는 적어도 0.005 mg/kg, 적어도 0.01 mg/kg, 적어도 0.05 mg/kg, 적어도 0.1 mg/kg, 적어도 0.5 mg/kg, 적어도 1 mg/kg, 적어도 5 mg/kg, 적어도 10 mg/kg, 적어도 50 mg/kg 또는 적어도 100 mg/kg의 용량으로 투여된다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른, 식도암의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 조성물, 및 항암 치료 분자를 포함하는 파트(부품, part)의 키트에 관한 것이다.
- [0166] 실제로, 본원에 기재된 바와 같은 항-PG 모노클로날 항체로의 치료는 다른 요법과 조합될 수 있거나, 다른 요법에 보조적일 수 있다. 다른 요법의 비제한적인 예는 화학요법 치료, 방사선 요법, 외과적 절제술, 및 항체 요법을 포함한다.
- [0167] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른, 식도암의 예방 또는 치료에서 사용하기 위한 조성물, 및 화학요법 분자, 표적 요법 분자 중에서 선택된 항암 요법 분자를 포함하는 파트의 키트에 관한 것이다.
- [0168] 특정한 실시양태에서, 본 발명은 동시, 순차적 또는 개별 투여를 위한, 본 발명에 따른 식도암의 치료를 위한 조성물 및 화학요법 분자를 포함하는, 파트의 키트에 관한 것이다. 이 목적에 유용한 화학요법 분자는 플레이트 길항제, 퓨린 길항제, 피리미딘 길항제, DNA 알킬화 분자, DNA 가교-결합 약물, 항생제, 백금 착물, 프로테아좀 억제제, 유사 분열 방추체 저해제, 토포이소머라제 억제제, 티로신 키나제 억제제 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0169] 또 다른 특정한 실시양태에서, 본 발명은 동시, 순차적 또는 개별 투여를 위한, 본 발명에 따른 조성물, 및 또 다른 표적 요법 분자를 포함하는 조성물의 파트의 키트에 관한 것이다. 이러한 표적 요법 분자는 EGFR을 표적으로 하는 항체, 예컨대 세톡시맵 또는 파니투무맵, VEGF를 표적으로 하는 항체, 예컨대 베바시주맵, HER2를 표적으로 하는 항체, 예컨대 트라스투주맵 또는 퍼르투주맵, PD-1 및 PDL-1을 표적으로 하는 항체, 예컨대 캄브롤리주맵, CTLA-4를 표적으로 하는 항체, 예컨대 이필리무맵, EGFR을 표적으로 하는 소분자 약물, 예컨대 에를로티닙, BRAF를 표적으로 하는 소분자 약물, 예컨대 베무라페닙 또는 다브라페닙, VEGF를 표적으로 하는 재조합 융합 단백질, 예컨대 아플리베르셉트(Aflibercept)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0170] 또 다른 특정한 측면에서, 본 발명은 식도암의 진단을 위한, 프로가스트린-결합 항체, 또는 그의 항원-결합 단편의 용도에 관한 것이다.
- [0171] 또 다른 특정한 측면에서, 본 발명은 식도암의 예방 또는 치료를 위한, 프로가스트린-결합 항체, 또는 그의 항원-결합 단편의 용도에 관한 것이다.
- [0172] 보다 특정한 측면에서, 본 발명은 환자에 대한 식도암의 예방 또는 치료를 위한, 프로가스트린-결합 항체, 또는 그의 항원-결합 단편의 용도에 관한 것이며, 여기서 상기 환자의 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 농도가 결정되었으며 기준 생물학적 샘플의 프로가스트린의 농도보다 더 높다.
- [0173] 보다 특정한 측면에서, 본 발명은 전이를 나타내는 환자에 대한 식도암의 예방 또는 치료를 위한, 프로가스트린-결합 항체, 또는 그의 항원-결합 단편의 용도에 관한 것이다.
- [0174] 보다 더 특정한 측면에서, 본 발명은 환자에 대한 식도암의 예방 또는 치료를 위한, 프로가스트린-결합 항체, 또는 그의 항원-결합 단편의 용도에 관한 것이며, 여기서 상기 환자는 전이를 나타내며 여기서 상기 환자의 생물학적 샘플 중의 프로가스트린의 농도가 결정되었으며 기준 생물학적 샘플의 프로가스트린의 농도보다 더 높다.
- [0175] 조합이 구성되는 구성 성분은 조합의 최대 효능을 획득하기 위해 동시에, 개별적으로 또는 순차적으로 투여될 수 있으며; 각각의 투여가 급속 투여에서 연속 재관류까지 그의 지속시간이 다를 수 있다.
- [0176] 본원에서 사용된 바와 같이, "동시 투여"는 단일 및 특유의 제약 형태로 본 발명에 따른 조성물의 두 화합물의 투여를 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "개별 투여"는 동시에, 구별되는 제약 형태로 본 발명에 따른 조성물의 두 화합물의 투여를 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "순차적 투여"는 각각 구별되는 제약 형태로, 본 발명에 따른 조성물의 두 화합물의 연속 투여를 지칭한다.
- [0177] 본원에서 사용된 바와 같은, "치료학적 유효량"은 질환의 증상을 예방, 완화, 감소 또는 개선하거나 치료 받고

있는 환자의 생존을 연장시키는데 효과적인, 화합물의 (또는 화합물들의) 최소 농도 또는 양을 지칭한다.

[0178] 본 발명의 실시양태의 특징은 이하에 실시예에 대한 하기 상세한 설명으로부터 더 명백해질 것이다.

[0180] **실시예**

[0181] **실시예 1: 폴리클로날 항체를 사용한 혈장 프로가스트린 농도의 검출**

[0182] 혈장 프로가스트린 수준을 2종의 특이적 항-프로가스트린 항체를 사용하여 ELISA에 의해 정량하였고; 포획 항체를 플레이트의 웰 상에 코팅하였으며, 한편 발현(revelation) 항체를 사용하여 프로가스트린을 검출하고 신호의 발현을 매개하였다.

[0183] 본 실시예에서, 정량은, 반응이 빛을 방출하는 기질을 사용하여, 포획 항체에 의해 보유된 항원에 결합된 항체의 발광 양에 비례하는 값을 할당하게 하는 ELISA 방법에 기초하였다.

[0184] **물질**

[0185] 시약 및 장치를 표 7에 열거하였다:

표 7

명칭	제공자	제품 번호
플레이트 맥시소르프(MaxiSORP) 화이트 넝크(white Nunc), 96 웰	더처(Dutscher)	# 055221
탄산나트륨 / 중탄산나트륨	시그마(Sigma)	# 21851
DPBS 1X	론자(Lonza)	# P04-36500
트윈-20	바이오솔브(Biosolve)	# 20452335
BSA	유로메텍스(Euromede x)	# 04-100-810-C
스트랩타비딘-HRP	피어스(Pierce) (써모(Thermo))	# 21130
슈퍼시그널(SuperSignal) ELISA 랩토(Femto) 최대 민감도 기질	피어스(써모)	# 37074
항-프로가스트린 폴리클로날 항체	유로겐텍(Eurogentec)	/

[0187] 토끼를 표준 프로토콜에 따라, N-말단 프로가스트린 (서열식별번호: 2)으로 또는 hPG의 아미노산 71 내지 80에 상응하며 서열 FGRRSAEDEN (서열식별번호: 40)을 갖는 C-말단 프로가스트린으로 면역화시킴으로써 폴리클로날 항체를 수득하였다.

[0188] 이 검정에서 사용된 프로가스트린에 대한 폴리클로날 항체의 결합 특성은 다음과 같다: 전장 프로가스트린에 결합하는, G34-Gly, G34, G17-Gly, G17에 대한 결합의 부재.

[0189] 96 웰 플레이트를 100 ml의 밀리큐 워터(MilliQ water)에 한 캡슐의 내용물을 용해시킴으로써 탄산염 - 중탄산 나트륨, 50 mM pH 9.6의 용액을 제조함으로써 코팅하였다. 프로가스트린 FGRRSAEDEN (서열식별번호: 40)의 C-말단을 사용함으로써 수득한 폴리클로날 항체에 상응하는 포획 항체 (3 µg/ml)의 용액을 탄산염 완충제에서 제조하였다. 100 마이크로리터의 항체 용액을 각각의 웰에 첨가하고 16시간 동안 (하룻밤) 4°C에서 인큐베이션하였다. 그 다음에 플레이트를, 항체 용액을 제거하고 300 µl 1X PBS / 0.1% 트윈-20으로 3회 세척한 다음에, 웰당 200 µl의 차단 완충제 (1X PBS / 0.1% 트윈-20 / 0.1 % BSA)를 첨가함으로써 차단하고, 22°C에서 2시간 인큐베이션하였다. 그 다음에 차단 완충제를 제거하고, 웰을 300 µl 1X PBS / 0.1% 트윈-20으로 3회 세척하였다.

[0190] 혈장 희석을 다음과 같이 수행하였다: 혈장을 1/2, 1/5 및 1/10로 희석하여, 순수하게 사용하였다. 희석액을 1X PBS / 0.1% 트윈 20 / 0.1% BSA 중의 순수한 혈장으로부터 제조하였다.

[0191] 대조군 시험, 알려진 농도의 프로가스트린 존재하에 ELISA의 경우, 프로가스트린을 다음과 같이 제조하였다: 스톡 재조합 PG (이. 콜라이(E. coli)에서 생성된 전장 인간 프로가스트린 및 글루타티온 아가로스/태그(Tag) 제거 (Tev)/IMAC 카운터(Counter) 정제/투석으로 정제된 친화도, 프랑스 파리 소재의 인스티투트 파스퇴르 (Institut Pasteur)로부터)를 0.45 mg/ml (45 µM)의 농도로, 삼중으로 제조하였다. 프로가스트린 농도의 범위를 다음과 같이 제조하였다:

- [0192] · 용액 A: 사전 희석 1/10, 2 μ l의 스톡 + 18 μ l의 완충제
- [0193] · 용액 B: 사전 희석 1/100, 10 μ l의 A + 90 μ l의 완충제
- [0194] · 용액 C: 사전 희석 1/1000, 10 μ l의 B + 90 μ l의 완충제
- [0195] · 용액 D: 500 pM, 5,55 μ l의 C + 494.5 μ l의 희석제
- [0196] · 용액 E: 250 pM, 250 μ l의 D + 250 μ l의 희석제
- [0197] · 용액 F: 100 pM, 200 μ l의 E + 300 μ l의 희석제
- [0198] · 용액 G: 50 pM, 250 μ l의 F + 250 μ l의 희석제
- [0199] · 용액 H: 25 pM, 200 μ l의 G + 200 μ l의 희석제
- [0200] · 용액 I: 10 pM, 100 μ l의 H + 150 μ l의 희석제

[0201] 제조합 PG의 범위는 선형이며 따라서 사용되는 항체에 따라 다소 광범위할 수 있다.

[0202] 시험 샘플의 제조를 위해, 대략 500 μ l의 각각의 샘플을 결과의 분석 (그리고 필요한 경우 확인) 때까지 따로 떼어 보관하였다. 100 μ l의 각각의 지점의 범위 및/또는 혈장을 1/2, 1/5 및 1/10로 희석하여, 순수하게 검정하고, 플레이트 상에서 22°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다.

[0203] 시험의 발현을 위해, 플레이트를 300 μ l 1X PBS / 0.1% 트윈-20으로 3회 세척하였다. 폴리클로날 토끼 항-프로가스트린 항체의 용액 (여기서 상기 항체는 비오틴에 0.5 μ g/ml로 커플링된, 면역원으로서 프로가스트린의 N-말단 부분을 사용함으로써 획득되었다)을 1X PBS / 0.1% 트윈-20 / 0.1% BSA에 희석함으로써 제조하였다. 100 μ l의 이 용액을 각각의 웰에 첨가하였다. 인큐베이션을 22°C에서 1시간 동안 실시하였다. 스트렙타비딘-HRP로의 발현은 검출 항체를 제거하고 300 μ l 1X PBS / 0.1% 트윈-20으로 3회 세척한 다음에, 1X PBS / 0.1% 트윈-20 / 0.1% BSA에서 희석된 20 ng / ml에서 스트렙타비딘-HRP의 용액을 제조함으로써 수행하였으며, 여기서 100에 더하여 100 μ l의 이 용액을 각각의 웰에 첨가한 후에, 22°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0204] 검출은 스트렙타비딘-HRP를 제거하고 300 μ l 1X PBS / 0.1% 트윈-20으로 3회 세척한 다음에, 웰당 100 μ l의 화학발광 기질 용액을 첨가하는 것으로 이루어졌다. 기질 용액은 동등한 부피의 두 용액 슈퍼시그널 ELISA 펜토 키트, 20 ml + 20 ml를 사용 전 30분 혼합함으로써 제조하고 어두운 곳에서 실온에서 보관하였다. 어두운 곳에서 실온에서 5분 인큐베이션 후 발광을 판독하였다.

[0205] 각각의 조건에 대해, 시험을 삼중으로 수행하였고 범위의 결과는 프로가스트린 농도에 따른 발광 변화를 나타내는 그래프로써 제시하였다. 각각의 혈장 희석에 대해, 프로가스트린의 농도는 상응하는 범위 (1/10로 희석된 샘플의 경우 1/10 범위)의 선형 회귀선의 방정식을 사용하여 결정하였다.

[0206] 방법 및 결과

[0207] 식도암을 갖는 환자 (n=12)에서 프로가스트린의 중앙 혈장 농도는 42.3 pM이며, 한편 대조군 환자 (n=103)에서 프로가스트린의 중앙 혈장 농도는 0 pM이었다 (도 1). 이들 데이터는 식도암을 가진 환자가 건강한 대조군 개체와 비교하여 그의 혈장 중의 프로가스트린의 더 높은 농도를 갖는다는 것을 입증한다.

[0208] 이들 데이터는 식도암을 가진 환자가 건강한 대조군 개체와 비교하여 그의 혈장 중의 프로가스트린의 더 높은 수준을 갖는다는 것을 입증한다.

[0209] **실시예 2: 모노클로날 항-프로가스트린 항체를 사용한 프로가스트린 농도의 검출**

[0210] 닝크 맥시소프 96-웰 플레이트의 웰은 제1 프로가스트린-특이적 항체로 다음과 같이 코팅하였다. 프로가스트린의 카르복시-말단 영역에 특이적인 항-프로가스트린 모노클로날 항체를 밀리큐 워터 중의 50 mM, pH 9.6 탄산나트륨/중탄산나트륨 완충제의 용액 중에서 3 μ g/ml의 농도로 희석하였다.

[0211] 그 다음에 총 100 μ l의 항체 용액을 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 첨가하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 결합 후, 항체 용액을 웰로부터 제거한 다음에, 이를 100 μ l 세척 완충제 (1X PBS / 0.1% 트윈-20)으로 3회 세척하였다. 그 다음에 총 100 μ l 차단 완충제 (1X PBS / 0.1% 트윈-20 / 0.1% BSA)를 각각의 웰에 첨가하고 22°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음에 차단 완충제를 제거하고 웰을 세척 완충제로 3회 세척하였다. 환자로부터 단리된 혈장 또는 혈청 샘플을 100 μ l의 부피로 일련의 희석, 전형적으로 1:1, 1:2, 1:5 및 1:10 희석으로 웰에 첨가한 다음에, 22°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 혈장 또는 혈청 샘플을 이중으로

분석하였다.

- [0212] 또한, 검정은 두 개의 표준 곡선을 포함하였다. 제1 표준 곡선은 제조합 프로가스트린의 희석액을 사용하여 웰 당 1 ng, 0.5 ng, 0.25 ng, 0.1 ng, 0.05 ng, 0.01 ng, 및 0 ng의 최종 양으로 제조하였다. 음성 대조군으로서 역할을 하는 제2 표준 곡선은 시험 샘플과 동일한 희석율, 즉 1:1, 1:2, 1:5 및 1:10으로 차단 완충제에서 희석된 프로가스트린-음성 인간 혈청으로부터 제조하였다. 대안적으로, 혈장 샘플을 검정하는 경우, 음성 대조군으로서 역할을 하는 제2 표준 곡선은 시험 샘플과 동일한 희석율, 즉 1:1, 1:2, 1:5 및 1:10으로 차단 완충제에서 희석된 프로가스트린-음성 인간 혈청으로부터 제조하였다.
- [0213] 혈장 또는 혈청 샘플과의 인큐베이션이 완료된 후, 웰 내용물을 제거하고 웰을 100 μ l/웰의 세척 완충제로 3회 세척한 후, 다음과 같이, 프로가스트린에 특이적인 제2 항체를 사용하여 제1 항체에 결합된 프로가스트린을 검출하였다.
- [0214] 프로가스트린의 아미노-말단 영역에 특이적인 비오틴-커플링된 항-프로가스트린 모노클로날 항체를 항체에 따라 0.1 내지 10 μ l g/ml의 농도로 차단 완충제에 희석하였다. 그 다음에 총 100 μ l의 항체 용액을 각각의 웰에 첨가하고, 22°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0215] 2차 항체 결합이 완료된 후, 플레이트를 세척 완충제, 100 μ l/웰로 3회 세척한 후, 100 μ l의 스트렙타비딘-HRP의 용액 (차단 완충제 중 25 ng/ml)을 각각의 웰에 첨가하고, 22°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 스트렙타비딘-HRP 용액으로 인큐베이션을 완료한 후, 플레이트를 세척 완충제, 100 μ l /웰로 3회 세척하였다. 그 후, 피어스 슈퍼시그널 ELISA 랩토 최대 민감도 화학발광 기질 키트를 사용하여 제조한 100 μ l의 화학발광 기질을 웰당 첨가하고, 어두운 곳에서 실온에서 5분 동안 인큐베이션한 다음에, 루미노미터 상에서 판독하였다.
- [0216] 루미노미터 판독에 기초하여, 선형 회귀 분석을 사용하여 표준 곡선 데이터에 상응하는 선의 방정식을 유도하였다. 이 방정식을 사용하여, 다양한 환자 샘플에서 프로가스트린의 농도를 계산하였다.
- [0217] 프로가스트린의 중앙 혈장 농도는 식도암을 갖는 환자에서 계산되고 대조군 환자의 혈장 중의 프로가스트린의 중앙 혈장 농도와 비교하였다. 이들 데이터는 식도암을 가진 환자가 건강한 대조군 개체와 비교하여 그의 혈장 중의 프로가스트린의 상승된 수준을 가졌다는 것을 입증한다.

실시예 3: 암 세포주에 대한 항-hPG 항체의 중화 활성

3.1. 항-hPG 모노클로날 항체의 중화 활성

- [0220] TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 및 OE33은 프로가스트린을 생산하고 분비하는, 식도암을 연구하는데 일반적으로 사용되는 세포주이다. PG에 대한 모노클로날 항체를 이들 상이한 세포주에서 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 시험하였다. 각각의 TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 및 OE33 세포주로부터의 세포의 생존은 상이한 항-hPG 모노클로날 항체를 사용하여 시험하였다.
- [0221] 각각의 실험에 대해, 50,000개의 세포를 태아 송아지 혈청을 함유하는 배지에서 6-웰 플레이트 내로 시딩하고 8 시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 밤새 혈청-결핍화시켰으며, 시딩 후 24시간 (시간 "T0")에서 시작하여, 세포를, 1 내지 20 μ g/ml의 모노클로날 대조군 항체 (모노클로날 항체 항-푸로마이신)(CT mAb)로, 또는 1 내지 20 μ g/ml 항-hPG mAb (여기서 상기 mAb는 C-말단 항-hPG 모노클로날 항체 또는 N-말단 항-hPG 모노클로날 항체이다)로, 태아 송아지 혈청의 부재하에, 48시간 동안 12시간마다 육중으로 처리하였다.
- [0222] 상기 mAb는 다음 중에서 선택된 C-말단 항-hPG 항체:
- [0223] - 아미노산 서열 서열식별번호: 28, 29 및 30의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄, 및 아미노산 서열 서열식별번호: 31, 32 및 33의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체,
- [0224] - 아미노산 서열 서열식별번호: 34, 35 및 36의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄, 및 아미노산 서열 서열식별번호: 37, 38 및 39의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체,
- [0225] 또는 다음 중에서 선택된 N-말단 항-hPG 항체이다:
- [0226] - 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 4, 5 및 6의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄, 및 아미노산 서열 서열식별번호: 7, 8 및 9의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄를 포함하는 모노클로날 항체,
- [0227] - 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 10, 11 및 12의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄, 및 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 13, 14 및 15의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체,

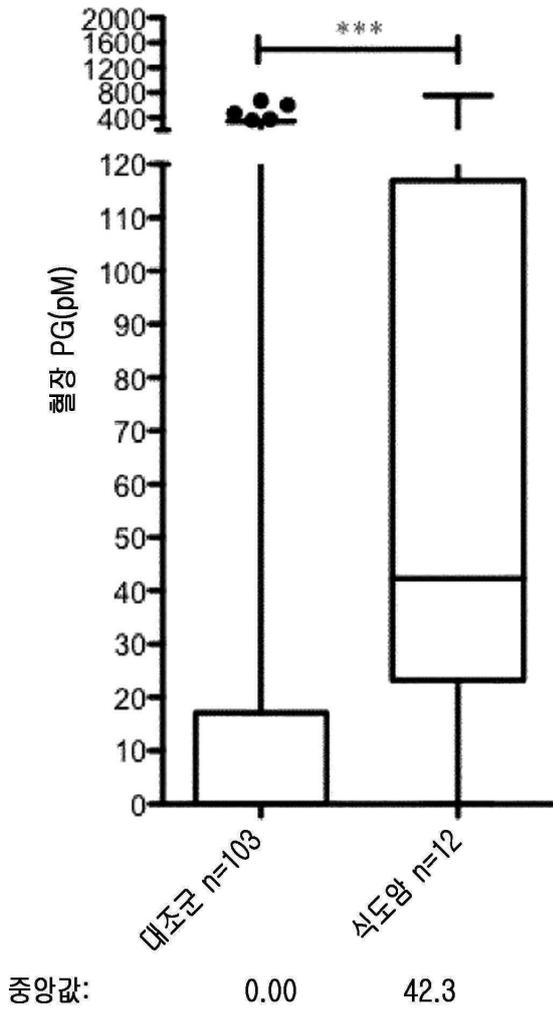
- [0228] - 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 16, 17 및 18의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄, 및 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 19, 20 및 21의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체,
- [0229] - 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 22, 23 및 24의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄, 및 각각 아미노산 서열 서열식별번호: 25, 26 및 27의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체.
- [0230] T0에서의 세포 수를 각각의 실험에 대해, 대조군 웰에서 계수하였다.
- [0231] 구체적으로, 대조군 및 항-hPG mAb-처리된 웰 둘 다에서 살아 있는 세포의 수는 48시간에서 계수한 다음에, 각각의 세포 카운트와 T0에서 결정된 세포 카운트 간의 차이를 계산하였다. 그 다음에, 항-hPG mAb-처리된 세포의 결과적인 수를 대조군 mAb-처리된 세포의 수의 백분율로서 표시하였다.
- [0232] 항-hPG 모노클로날 항체로의 처리는 대조군 항체로의 처리와 비교하여 세포 수를 감소시켰다. 터키 사후 검정 (Tukey post-hoc test)을 이용한 일원 분산 분석(one-way ANOVA)을 사용하여 통계적 유의성을 결정하였다: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, 및 *** = $p < 0.001$. 각각의 세포주에서, 항-hPG 항체는 세포 생존을 감소시켰다.
- [0233] **3.2. 세포 생존에 대한 항-hPG 인간화 항체의 중화 활성**
- [0234] PG에 대한 인간화 항체를 TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 및 OE33 세포주의 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 시험하였다. 각각의 TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 및 OE33 세포주로부터의 세포의 생존은 상이한 항-hPG 인간화 항체를 사용하여 시험하였다.
- [0235] 각각의 실험에 대해, 50,000개의 세포를 태아 송아지 혈청을 함유하는 배지에서 6-웰 플레이트 내로 시딩하고 8 시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 밤새 혈청-결핍화시켰으며, 시딩 후 24시간 (시간 "T0")에서 시작하여, 세포를, 1 내지 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 인간화 대조군 항체 (항-인간 FcG1, 바이오엑셀(BioXCell)로부터)(CT Hz)로, 또는 1 내지 20 $\mu\text{g/ml}$ 항-hPG Hz (여기서 상기 Hz는 C-말단 항-hPG 인간화 항체 또는 N-말단 항-hPG 인간화 항체이다)로, 태아 송아지 혈청의 부재하에, 48시간 동안 12시간마다 육중으로 처리하였다. T0에서의 세포 수를 각각의 실험에 대해, 대조군 웰에서 계수하였다.
- [0236] 구체적으로, 대조군 및 항-hPG Hz-처리된 웰 둘 다에서 살아 있는 세포의 수는 48시간에서 계수한 다음에, 각각의 세포 카운트와 T0에서 결정된 세포 카운트 간의 차이를 계산하였다. 그 다음에, 항-hPG Hz-처리된 세포의 결과적인 수를 대조군 mAb-처리된 세포의 수의 백분율로서 표시하였다.
- [0237] 항-hPG Hz 항체로의 처리는 대조군 항체로의 처리와 비교하여 세포 수를 감소시켰다. 터키 사후 검정을 이용한 일원 분산 분석을 사용하여 통계적 유의성을 결정하였다: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, 및 *** = $p < 0.001$. 각각의 세포주에서, 항-hPG 항체는 세포 생존을 감소시켰다.
- [0238] **3.3. 암 줄기 세포 빈도에 대한 항-hPG 모노클로날 항체의 중화 활성**
- [0239] PG에 대한 모노클로날 항체를 극단 한계 희석 검정(Extreme Limiting Dilution Assay) (ELDA)을 사용하여 TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 및 OE33 세포주에서 암 줄기 세포 (CSC) 빈도를 감소시키는 그의 능력에 대해 시험하였다. 각각의 TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 및 OE33 세포주로부터의 CSC 빈도를 상이한 항-hPG 모노클로날 항체를 사용하여 시험하였다.
- [0240] 각각의 실험에 대해, 세포를 FACS 아리아 유동 세포 계측기(FACS Aria flow cytometer)를 사용하여 웰당 고정된 세포 농도에서 초저 유착 (ULA) P96 (96-웰 플레이트)에 시딩하고, 웰당 1 내지 500개의 세포의 다양한 농도를 사용하였다. 상기 세포를 M11 배지를 사용하여 ULA 플레이트에서 최대 11일 동안 배양하고 (Macari et al, Oncogene, 2015), 실시예 3.1.에 개시된 바와 같이, 1 내지 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 모노클로날 대조군 항체 (모노클로날 항체 항-푸로마이신)(CT mAb)로, 또는 1 내지 20 $\mu\text{g/ml}$ 항-hPG mAb (여기서 상기 mAb는 C-말단 항-hPG 모노클로날 항체 또는 N-말단 항-hPG 모노클로날 항체이다)로, 3 또는 4일마다 처리하였다.
- [0241] 구체적으로, 인큐베이션 단계의 말에, 위상차 현미경으로 플레이트를 관찰하고 세포의 농도당 양성 웰의 수를 평가하였다. 마지막으로, ELDA 웹툴(webtool) ([http://www.bioinf.wehi.edu.au/software/eldda/](http://www.bioinf.wehi.edu.au/software/ellda/))을 사용하여 각각의 처리 군의 CSC 빈도를 계산하고 군 간의 임의의 통계적 차이를 시험하였다 (변형된 카이-자승 검정(Chi-square test)).
- [0242] 항-hPG 모노클로날 항체로의 처리는 대조군 항체로의 처리와 비교하여 CSC 빈도를 감소시켰다.
- [0243] **3.4. 암 줄기 세포 빈도에 대한 항-hPG 인간화 항체의 중화 활성**

- [0244] · 구체 형성 검정(Sphere formation assay)
- [0245] PG에 대한 인간화 항체를 구체 형성 검정을 사용하여 FLO-1, OE19 및 OE33 세포주에서 암 줄기 세포 (CSC) 빈도를 감소시키는 그의 능력에 대해 시험하였다.
- [0246] 각각의 실험에 대해, 200개의 세포를 24-웰 초저 유착 (ULA)에서 시딩하였다. 상기 세포를 M11 배지를 사용하여 ULA 플레이트에서 최대 10일 동안 배양하고 (Macari et al, Oncogene, 2015), 20 µg/ml의 인간화 대조군 항체 (항-인간 FcG1, 바이오엑스셀로부터)(CT Hz)로, 또는 20 µg/ml 항-hPG Hz (PG Hz) (여기서 상기 Hz는 C-말단 항-hPG 인간화 항체 또는 N-말단 항-hPG 인간화 항체이다)로, 3 또는 4일마다 처리하였다.
- [0247] 구체적으로, 인큐베이션 단계의 말에, 웰을 명시야 현미경 검사법에 의해 촬영하고, 사진을 분석하고 평균 직경이 25 µm 초과인 구체를 계수하였다.
- [0248] 항-hPG 인간화 항체로의 처리는 대조군 항체로의 처리와 비교하여 CSC 빈도를 감소시켰다.
- [0249] · 극단 한계 회석 검정
- [0250] PG에 대한 인간화 항체를 극단 한계 회석 검정 (ELDA)을 사용하여 TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 및 OE33 세포주에서 암 줄기 세포 (CSC) 빈도를 감소시키는 그의 능력을 시험하였다. 각각의 TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 및 OE33 세포주로부터의 CSC 빈도를 상이한 항-hPG 인간화 항체를 사용하여 시험하였다.
- [0251] 각각의 실험에 대해, 세포를 FACS 아리아 유동 세포 계측기를 사용하여 웰당 고정된 세포 농도에서 초저 유착 (ULA) P96 (96-웰 플레이트)에 시딩하고, 웰당 1 내지 500개의 세포의 다양한 농도를 사용하였다. 상기 세포를 M11 배지를 사용하여 ULA 플레이트에서 최대 11일 동안 배양하고 (Macari et al, Oncogene, 2015), 1 내지 20 µg/ml의 인간화 대조군 항체 (항-인간 FcG1, 바이오엑스셀로부터)(CT Hz)로, 또는 1 내지 20 µg/ml 항-hPG Hz (여기서 상기 Hz는 C-말단 항-hPG 인간화 항체 또는 N-말단 항-hPG 인간화 항체이다)로, 3 또는 4일마다 처리하였다.
- [0252] 구체적으로, 인큐베이션 단계의 말에, 위상차 현미경으로 플레이트를 관찰하고 세포질 농도당 양성 웰의 수를 평가하였다. 마지막으로, ELDA 웹툴 ([http://www.bioinf.wehi.edu.au/software/eldda/](http://www.bioinf.wehi.edu.au/software/ellda/))을 사용하여 각각의 처리 군의 CSC 빈도를 계산하고 군 간의 임의의 통계적 차이를 시험하였다 (변형된 카이-자승 검정).
- [0253] 항-hPG 인간화 항체로의 처리는 대조군 항체로의 처리와 비교하여 CSC 빈도를 감소시켰다.
- [0254] **3.5. WNT/β-카테닌 경로에 대한 항-hPG 모노클로날 항체의 증화 활성**
- [0255] TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 및 OE33은 프로가스트린을 생산하고 분비하는, 식도암을 연구하는데 일반적으로 사용되는 세포주이다. 널리 공지된 WNT/β-카테닌 경로 표적 유전자인 단백질 서바이빈(survivin)의 발현을 판독으로서 사용하여, PG에 대한 모노클로날 항체를 이들 상이한 세포주에서의 WNT/β-카테닌 경로를 억제하는 그의 능력에 대해 시험하였다. 각각의 TE-1, TE-4, TE-6 및 KYSE30 세포주로부터의 서바이빈 발현을 상이한 항-hPG 모노클로날 항체를 사용하여 시험하였다.
- [0256] 각각의 실험에 대해, 50,000개의 세포를 태아 송아지 혈청을 함유하는 배지에서 6-웰 플레이트 내로 시딩하고 8 시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 밤새 혈청-결핍화시켰으며, 시딩 후 24시간에서 시작하여, 세포를, 1 내지 20 µg/ml의 모노클로날 대조군 항체 (모노클로날 항체 항-류포마이신)(CT mAb)로, 또는 1 내지 20 µg/ml 항-hPG mAb (여기서 상기 mAb는 C-말단 항-hPG 모노클로날 항체 또는 N-말단 항-hPG 모노클로날 항체이다)로, 태아 송아지 혈청의 부재하에, 72시간 동안 12시간마다 사중으로 처리하였다.
- [0257] 구체적으로, 72시간의 처리 후, 세포를 수확하고 총 단백질을 RIPA 완충제를 사용하여 추출하였다. 그 다음에, CT mAb 또는 항-hPG mAb 처리된 세포로부터의 동등한 양의 단백질을 항-서바이빈 항체 (모노클로날 항체, 셀 시그널링(Cell Signaling)으로부터 #2802) 및 항-액틴 항체를 로딩 대조군 (모노클로날 항체, 시그마로부터 #A4700)으로서 사용하여 웨스턴 블롯에 적용하였다. 신진(Syngene)으로부터의 GBOX 화학 시스템을 사용하여 정량을 수행하였다.
- [0258] 항-hPG 모노클로날 항체로의 처리는 대조군 항체로의 처리와 비교하여 서바이빈 발현을 감소시켰다. 쌍형성되지 않은 스튜던트 T-검정(unpaired Student's T-test)을 사용하여 통계적 유의성을 결정하였다: * = p<0.05, ** = p<0.01, 및 *** = p<0.001.
- [0259] **3.6. WNT/β-카테닌 경로에 대한 항-hPG 인간화 항체의 증화 활성**

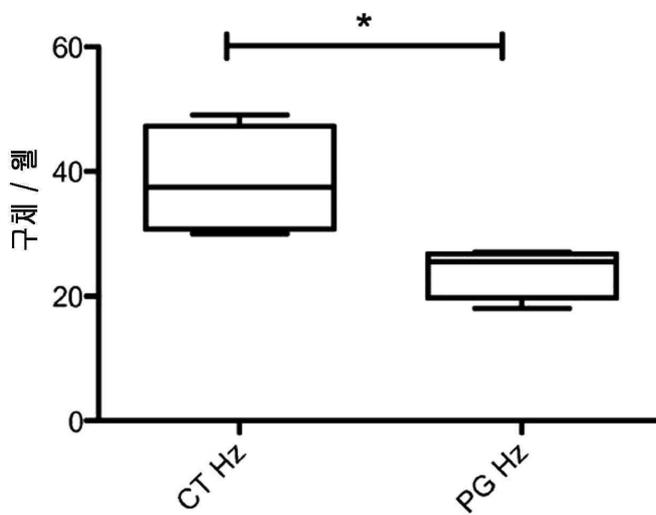
- [0260] 널리 공지된 WNT/ β -카테닌 경로 표적 유전자인 단백질 서바이빈의 발현을 관독으로서 사용하여, PG에 대한 인간화 항체를 TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 및 OE33 세포주에서의 WNT/ β -카테닌 경로를 억제하는 그의 능력에 대해 시험하였다. 각각의 TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 및 OE33 세포주로부터의 서바이빈 발현을 상이한 항-hPG 인간화 항체를 사용하여 시험하였다.
- [0261] 각각의 실험에 대해, 50,000개의 세포를 태아 송아지 혈청을 함유하는 배지에서 6-웰 플레이트 내로 시딩하고 8 시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 밤새 혈청-결핍화시켰으며, 시딩 후 24시간에서 시작하여, 세포를, 1 내지 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 인간화 대조군 항체 (항-인간 FcG1, 바이오엑스셀로부터)(CT Hz)로, 또는 1 내지 20 $\mu\text{g/ml}$ 항-hPG Hz (여기서 상기 Hz는 C-말단 항-hPG 인간화 항체 또는 N-말단 항-hPG 인간화 항체이다)로, 태아 송아지 혈청의 부재하에, 72시간 동안 12시간마다 사중으로 처리하였다.
- [0262] 구체적으로, 72시간의 처리 후, 세포를 수확하고 총 단백질을 RIPA 완충제를 사용하여 추출하였다. 그 다음에, CT Hz 또는 항-hPG Hz 처리된 세포로부터의 동등한 양의 단백질을 항-서바이빈 항체 (모노클로날 항체, 셀 시그널링으로부터 #2802) 및 항-액틴 항체를 로딩 대조군 (모노클로날 항체, 시그마로부터 #A4700)으로서 사용하여 웨스턴 블롯에 적용하였다. 신진으로부터의 GBOX 화학 시스템을 사용하여 정량을 수행하였다.
- [0263] 항-hPG 인간화 항체로의 처리는 대조군 항체로의 처리와 비교하여 서바이빈 발현을 감소시켰다. 쌍형성되지 않은 스튜던트 T-검정을 사용하여 통계적 유의성을 결정하였다: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, 및 *** = $p < 0.001$.
- [0264] 서지 참고문헌
- [0265] Kaz *et al*, Cancer Letters, 2014 Jan 28;342(2):193-9. "*Epigenetic biomarkers in esophageal cancer.*"

도면

도면1



도면2



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> PROGASTRINE ET CANCERS S.A R.L.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTING AND TREATING ESOPHAGEAL CANCER

<130> IPA180697-FR

<140> PCT EP2017/050037

<141> 2017-01-02

<150> EP 15307189.9

<151> 2015-12-31

<150> EP 16305139.4

<151> 2016-02-05

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SITE

<222> (1)..(80)

<223> Human progastrin

<400> 1

Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly Thr Gly

1 5 10 15

Ala Asn Arg Asp Leu Glu Leu Pro Trp Leu Glu Gln Gln Gly Pro Ala

20 25 30

Ser His His Arg Arg Gln Leu Gly Pro Gln Gly Pro Pro His Leu Val

35 40 45

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

50 55 60

Ala Tyr Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn

65 70 75 80

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Amino acids 1-14, N-terminal extremity of human progastrin

<400> 2

Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly

1 5 10

<210> 3

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Amino acids 55-80, C-terminal extremity of human progastrin

<400> 3

Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp

1 5 10 15

Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn

 20 25

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 6B5B11C10 CDR-H1

<400> 4

Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 6B5B11C10 CDR-H2

<400> 5

Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 6B5B11C10 CDR-H3

<400> 6

Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr

1 5

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 6B5B11C10 CDR-L1

<400> 7

Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 8

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 6B5B11C10 CDR-L2

<400> 8

Lys Val Ser

1

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223>

6B5B11C10 CDR-L3

<400> 9

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 20D2C3G2 CDR-H1

<400> 10

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Trp

1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 20D2C3G2 CDR-H2

<400> 11

Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr

1 5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 20D2C3G2 CDR-H3

<400> 12

Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 20D2C3G2 CDR-L1

<400> 13

Gln Ser Leu Val His Ser Ser Gly Val Thr Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 20D2C3G2 CDR-L2

<400> 14

Lys Val Ser

1

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 20D2C3G2 CDR-L3

<400

> 15

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1E9D9B6 CDR-H1

<400> 16

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr

1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1E9D9B6 CDR-H2

<400> 17

Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1E9D9B6 CDR-H3

<400> 18

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1E9D9B6 CDR-L1

<400> 19

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr

1 5 10

<210> 20

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1E9D9B6 CDR-L2

<400> 20

Leu Val Ser

1

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1E9D9B6 CDR-L3

<400> 21

Trp Gln Gly Thr His Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1B3B4F11 CDR-H1

<400> 22

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala

1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1B3B4F11 CDR-H2

<400> 23

Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr

1 5

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1B3B4F11 CDR-H3

<400> 24

Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1B3B4F11 CDR-L1

<400> 25

Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr

1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1B3B4F11 CDR-L2

<400> 26

Val Lys Lys Asp Gly Ser His

1 5

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1B3B4F11 CDR-L3

<400> 27

Gly Val Gly Asp Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val

1 5 10

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1C10D3B9 CDR-H1

<400> 28

Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr Ala

1 5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1C10D3B9 CDR-H2

<400> 29

Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr

1 5

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1C10D3B9 CDR-H3

<400> 30

Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe

1 5 10

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1C10D3B9 CDR-L1

<400> 31

Lys Ser Leu Arg His Thr Lys Gly Ile Thr Phe

1 5 10

<210> 32

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1C10D3B9 CDR-L2

<400> 32

Gln Met Ser

1

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1C10D3B9 CDR-L3

<400> 33

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 2C6C3C7 CDR-H1

<400> 34

Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Gly

1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 2C6C3C7 CDR-H2

<400> 35

Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr

1 5

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 2C6C3C7 CDR-H3

<400> 36

Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr

1 5

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 2C6C3C7 CDR-L1

<400> 37

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr

1 5 10

<210> 38

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 2C6C3C7 CDR-L2

<400> 38

Leu Val Ser

1

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 2C6C3C7 CDR-L3

<400> 39

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr

1 5

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Amino acids 71-80 of progastrin

<400> 40

Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn

1

5

10