



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0122159
(43) 공개일자 2015년10월30일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-7023982</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2014년02월26일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2015년09월02일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/KR2014/001567</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2014/133316
국제공개일자 2014년09월04일</p> <p>(30) 우선권주장
1020130020547 2013년02월26일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)</p> <p>(72) 발명자
권형주
충청북도 청주시 상당구 중흥로 70, 306-1204(용암동, 용암현대3차아파트)</p> <p>(74) 대리인
양부현</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 TM4SF5에 대한 항체 또는 이를 포함하는 항암 조성물

(57) 요약

본 발명은 TM4SF5에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 및 이의 용도를 제공한다. 본 발명의 항체는 중앙특이항원 TM4SF5에 높은 친화력으로 결합하며, 이를 발현하는 암세포의 성장, 전이 및 침윤을 현저히 억제하므로, TM4SF5를 발현하는 다양한 암의 진단, 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

C07K 16/30 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열목록 제19서열의 CDRH1, 서열목록 제20서열의 CDRH2 및 서열목록 제21서열의 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및

서열목록 제22서열의 CDRL1, 서열목록 제23서열의 CDRL2 및 서열목록 제24서열의 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 TM4SF5(transmembrane 4 superfamily member 5 protein)에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변영역은 서열목록 제25서열 또는 제29서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은 서열목록 제26서열 또는 제30서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 항체는 다음의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편:

- (i) 서열목록 제25서열의 중쇄 가변영역 및 서열목록 제26서열의 경쇄 가변영역; 또는
- (ii) 서열목록 제29서열의 중쇄 가변영역 및 서열목록 제30서열의 경쇄 가변영역.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 항체는 하이브리도마 세포(기탁번호: KCLRF-BP-00291)에 의하여 생산된 것을 특징으로 하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 Fab 단편, F(ab') 단편, F(ab')₂ 단편 또는 Fv 단편인 것을 특징으로 하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 항체는 단일클론 항체, 다중클론 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체인 것을 특징으로 하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 항체는 기능성 분자와 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 기능성 분자는 화학물질, 방사성핵종, 세포독소, 사이토킨 또는 케모킨인 것을 특징으로 하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 CDR 아미노산 서열 내에 보존적 아미노산 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 11

기탁번호 KCLRF-BP-00291인 하이브리도마 세포에 의하여 생산된 항체의 CDR을 포함하는 TM4SF5(transmembrane 4 superfamily member 5 protein)에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 12

TM4SF5(transmembrane 4 superfamily member 5 protein)에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주(기탁번호: KCLRF-BP-00291).

청구항 13

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 핵산분자는 서열목록 제27서열 또는 제31서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 15

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산분자.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 핵산분자는 서열목록 제28서열 또는 제32서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 17

제 13 항의 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자, 제 15 항의 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자, 또는 상기

핵산분자 모두를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 18

제 17 항의 재조합 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 19

제 18항의 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는 TM4SF5(transmembrane 4 superfamily member 5 protein)에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법.

청구항 20

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 사용하여 시료 내의 TM4SF5 단백질의 존재여부를 확인하는 방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 상기 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 림프액 또는 척수액인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

(a) 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 상기 암은 간암, 대장암, 췌장암, 폐암, 위암, 직장암, 연부조직육종(soft-tissue sarcoma), 결장암, 십이지장 유두부 상피암(carcinoma of the papilla vateri), 비내분비 폐종양(nonendocrine lung tumor) 및 기관지 유암종(bronchial carcinoid tumor)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 24

제 22 항에 있어서, 상기 조성물은 암세포의 전이 또는 침윤을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 25

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 TM4SF5 단백질 검출용 키트.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 상기 키트는 암 진단용 키트인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 27

제 26 항에 있어서, 상기 암은 간암, 대장암, 췌장암, 폐암, 위암, 직장암, 연부조직육종(soft-tissue sarcoma), 결장암, 십이지장 유두부 상피암(carcinoma of the papilla vateri), 비내분비 폐종양(nonendocrine lung tumor) 및 기관지 유암종(bronchial carcinoid tumor)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 28

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 약제학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법.

청구항 29

제 28 항에 있어서, 상기 암은 간암, 대장암, 췌장암, 폐암, 위암, 직장암, 연부조직육종(soft-tissue sarcoma), 결장암, 십이지장 유두부 상피암(carcinoma of the papilla vateri), 비내분비 폐종양(nonendocrine lung tumor) 및 기관지 유암종(bronchial carcinoid tumor)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2013년 2월 26일에 출원된 대한민국 특허출원 제2013-0020547호에 대한 우선권주장을 수반하는 2014년 2월 26일에 출원된 국제출원의 국내단계 진입 출원으로, 이 출원의 전체 내용은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0002] 본 발명은 TM4SF5(transmembrane 4 superfamily member 5 protein)에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 이를 코딩하는 핵산 분자, 재조합 벡터, 형질전환체와 이로부터 항체를 제조하는 방법, 및 상기 항체의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 인간 암에서 TM4SF5(transmembrane 4 superfamily member 5 protein)의 mRNA 발현은, 췌장암, 연부조직육종(soft tissue sarcoma), 위암, 십이지장 유두부 상피암(carcinoma of the papilla vateri) 및 대장암에서 관찰되었다(Muller-Pillasch F, *et al. Gene* 208,25-30(1998)). TM4SF5는 유도된 형태학적 신장 및 상피세포의 중간엽 세포로의 전환(epithelial-mesenchymal transition)을 통하여 간세포암(hepatocellular carcinoma, HCC) 형성에 중요한 역할을 하고, *인 비트로*에서 비정상적인 세포 성장 및 *인 비보*에서 종양 형성을 야기한다(Lee SA, *et al. J Clin Invest* 118,1354-1366(2008); Lekishvili T, *et al. J Cell Sci* 121,685-694(2008)). TM4SF5과 인테그린 $\alpha 2$ 사이의 세포 외 상호작용에 의한 콜라겐 타입 I 환경에서 인테그린 $\alpha 2$ 기능을 억제하는 경우 TM4SF5 발현-유도된 조절되지 않은 세포 증식 및 신생혈관형성이 일어난다는 사실이 보고되었다(Lee SA, *et al. Carcinogenesis* 30,1872-1879(2009)). TM4SF5를 타겟팅 하는 합성 억제제인 TSAHC(4'-(p-toluenesulfonyl-amido)-4-hydroxychalcone)는 *인 비트로* 및 *인 비보*에서 HCC 성장 및 전이를 억제하였다(Lee SA, *et al. Hepatology* 49,1316-1325(2009)). 이러한 사실들은, HCC 형성에서 TM4SF5의 역할이 HCC 치료 약물 개발을 위한 신규한 분자적 타겟임을 보여준다.

[0004] HCC는 전 세계적으로 가장 흔한 암 중의 하나이고, 특히 아시아와 사하라 사막 이남의 아프리카(sub-Saharan Africa)에서 널리 발병하였다. 대부분의 HCC의 발달은 이형성 결절(dysplastic nodule), 초기 HCC, 고분화도 HCC, 및 중간 및 저분화도 HCC를 포함하는 다단계 과정인 것으로 알려져 있다(Forner A, *et al. Lancet* 379,1245-1255(2012)).

[0005] 대장암은 전 세계에서 세 번째로 흔한 암이고, 개발도상국 보다 선진국에서 더 흔한 암이다. 대장암에서 가장 흔한 돌연변이 유전자는 Wnt-APC-β-카테닌 신호전달경로와 관련된 APC, β-카테닌, AXIN1, AXIN2, TCF7L2 또는 NKD1이다(Korinek V, *et al.* *Science* 275,1784-1787(1997); Khan NP, *et al.* *Mol Cell Biochem* 355,149-155(2011); Folsom AR, *et al.* *Diabetes Care* 31,905-909(2008); Guo J, *et al.* *PLoS One* 4, e7982(2009)).

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 암을 진단, 예방 및 치료할 수 있는 항체를 개발하기 위하여 연구 노력하였다. 그 결과, 중앙 특이항원인 TM4SF5에 대하여 높은 친화력으로 결합하는 신규한 항체 및 그의 항원 결합 단편을 제조하고, 암세포의 성장, 전이 및 침윤에 대한 상기 항체의 우수한 억제 활성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 TM4SF5에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 하이브리도마 세포에 의하여 생산된 항체의 CDR을 포함하는 TM4SF5에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자를 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자를 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 핵산분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 시료 내 TM4SF5의 존재 여부를 확인 또는 검출하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 TM4SF5 단백질 검출용 키트를 제공하는 데 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 암의 예방 또는 치료방법을 제공하는 데 있다.

[0020] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0021] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제19서열의 CDRH1, 서열목록 제20서열의 CDRH2 및 서열목록 제21서열의 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열목록 제22서열의 CDRL1, 서열목록 제23서열의 CDRL2 및 서열목록 제24서열의 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 TM4SF5에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0022] 본 발명자들은 암을 진단, 예방 및 치료할 수 있는 항체를 개발하기 위하여 연구 노력하였다. 그 결과, 중앙 특이항원인 TM4SF5에 대하여 높은 친화력으로 결합하는 신규한 항체 및 그의 항원 결합 단편을 제조하고, 암세포의 성장, 전이 및 침윤에 대한 상기 항체의 우수한 억제 활성을 확인하였다.

[0023] 이하, 하기에서 상세히 설명한다.

[0024] I. 항-TM4SF5 항체 및 그의 항원 결합 단편

[0025] 본 발명의 항체는 TM4SF5에 대하여 특이적 결합능을 갖는다.

- [0026] 본 명세서에서, TM4SF5를 언급하면서 사용되는 용어, "항체(antibody)"는 TM4SF5에 대한 특이 항체로서, TM4SF5의 특정 에피토프에 대해 특이적으로 결합하며, 완전한 항체 형태뿐만 아니라 항체 분자의 항원 결합 단편(항체 단편)을 포함한다.
- [0027] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 디설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1($\gamma 1$), 감마2($\gamma 2$), 감마3($\gamma 3$), 감마4($\gamma 4$), 알파1($\alpha 1$) 및 알파2($\alpha 2$)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.
- [0028] 항체 분자의 항원 결합 단편 또는 항체 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab')₂, F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(C_{H1})을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 C_{H1} 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 PCT 국제 공개특허출원 WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 및 WO 88/09344에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 단쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수도 있다.
- [0029] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명에서 항체는 Fab 형태이거나 완전한 항체 형태이다. 또한, 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 또는 엡실론(ϵ) 중의 어느 한 이소타입으로부터 선택될 수 있다. 하나의 특정예에서 불변영역은 감마1(IgG1), 감마2(IgG2), 감마 3(IgG3) 또는 감마 4(IgG4)이고, 다른 특정예에서 불변영역은 IgG2a 아이소타입이다. 경쇄 불변영역은 카파 또는 람다 형일 수 있다. 하나의 특정예에서 상기 경쇄 불변영역은 카파 형이다.
- [0030] 본 명세서에서 사용되는 용어, "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 V_H 및 3 개의 불변영역 도메인(C_{H1}, C_{H2} 및 C_{H3})을 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어, "경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인(V_L) 및 불변영역 도메인(C_L)을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.
- [0031] 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열목록 제19서열의 CDRH1, 서열목록 제20서열의 CDRH2 및 서열목록 제21서열의 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함한다.
- [0032] 본 명세서에서, 용어 "CDR(complementarity determining region)"은 면역글로블린 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역(hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다(Kabat *et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)). 중쇄(CDRH1, CDRH2 및 CDRH3) 및 경쇄(CDRL1, CDRL2 및 CDRL3)에는 각각 3개의 CDRs이 포함되어 있다. CDR은 항체가 항원 또는 에피토프에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공한다.
- [0033] 본 발명의 항체 또는 항체 단편의 범위에는 CDR 영역에 보존적 아미노산 치환을 갖는 변이체가 포함된다. 또한, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은, TM4SF5를 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서 첨부한 서열목록에 기재된 아미노산 서열의 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

- [0034] 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스(hydrophobic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신(+4.5); 발린(+4.2); 루이신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스테인(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글라이신(-0.4); 쓰레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 타이로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).
- [0035] 단백질의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유했을 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 일특정예에서는 ± 2 이내, 다른 특정예에서는 ± 1 이내, 또 다른 특정예에서는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [0036] 한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌(+3.0); 라이신(+3.0); 아스파르테이트(+3.0 ± 1); 글루타메이트(+3.0 ± 1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글라이신(0); 쓰레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5 ± 1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 루이신(-1.8); 아이소루이신 (-1.8); 타이로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4).
- [0037] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu 및 Asp/Gly 간의 교환이다.
- [0038] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 항체 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인 하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인 된 서열을 분석한 경우에, 바람직하게는 최소 61%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 열라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 열라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* (1981) 2:482 Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* (1970) 48:443; Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* (1988) 24: 307-31; Higgins and Sharp, *Gene* (1988) 73:237-44; Higgins and Sharp, *CABIOS* (1989) 5:151-3; Corpet *et al. Nuc. Acids Res.* (1988) 16:10881-90; Huang *et al. Comp. Appl. BioSci.* (1992) 8:155-65 및 Pearson *et al. Meth. Mol. Biol.* (1994) 24:307-31에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul *et al. J. Mol. Biol.* (1990) 215:403-10)은 NCBI 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 항체는 서열목록 제25서열 또는 제29서열의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함한다.
- [0040] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 항체는 다음의 경쇄 CDR 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 추가적으로 포함한다: 서열목록 제22서열을 포함하는 CDRL1, 서열목록 제23서열을 포함하는 CDRL2 및 서열목록 제24서열을 포함하는 CDRL3.
- [0041] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 항체는 서열목록 제26서열 또는 제30서열의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함한다.
- [0042] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 항체는 다음의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 포함한다: (i) 서열목록 제25서열의 중쇄 가변영역 및 서열목록 제26서열의 경쇄 가변영역; 또는 (ii) 서열목록 제29서열의 중쇄 가변영역 및 서열목록 제30서열의 경쇄 가변영역.
- [0043] 본 발명의 항체는 단일클론 항체, 다중클론 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fvs(scFV), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 다이설파이드-결합 Fvs(sdFV) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 그리고 상기 항체들

의 에피토프-결합 단편 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 본 발명에 따르면, 본 발명의 항체는 다양한 형태의 항체로 제조될 수 있다. 예를 들어, 하기의 실시예에 기재된 바와 같이, 본 발명의 항체는 Fab 항체로 제조될 수 있고, 또한 Fab 항체에 얻은 경쇄 및 중쇄 가변영역을 이용하여 사람 유래의 불변영역과 재조합함으로써 완전한(whole) 형태의 항체를 제공할 수도 있다.

[0045] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 항체는 단일클론 항체이다. 용어 "단일클론 항체"는, 실질적으로 동일한 항체 집단에서 수득한 단일 분자 조성의 항체분자를 의미하며, 단일클론 항체는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다.

[0046] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 항체는 하이브리도마 세포(기탁번호: KCLRF-BP-00291)에 의하여 생산된 항체이다.

[0047] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 항체는 기탁번호 KCLRF-BP-00291인 하이브리도마 세포에 의하여 생산된 항체의 CDR을 포함한다. 상기 하이브리도마 세포는 2013년 2월 18일에 한국세포주은행에 기탁되어 기탁번호 KCLRF-BP-00291을 부여받았다.

[0048] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 항체는 기능성 분자와 결합되어 있다. 상기 기능성 분자의 예로는, 화학물질, 방사성핵종, 세포독소, 사이토킨 또는 케모킨을 들 수 있으며, 이에 대한 자세한 설명은 하기에 기재되어 있다.

[0049] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 항체는 종양특이항원으로 알려진 TM4SF5 단백질에 결합하여 이의 활성을 감소/억제/제거시킴으로써 암을 치료할 수 있다.

[0050] II. 핵산 분자 및 재조합 벡터

[0051] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 항-TM4SF5 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

[0052] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 항-TM4SF5 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

[0053] 본 명세서에서 사용되는 용어, "핵산 분자"는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, (1990) 90:543-584). 본 발명의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자의 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.

[0054] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자는 서열목록 제27서열 또는 제31서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자는 서열목록 제28서열 또는 제32서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0055] 본 발명의 핵산 분자는 상기한 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 90%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다.

[0056] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 본 발명의 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자; 및/또는 (b) 본 발명의 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0057] 본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터; 코즈미드 벡터; 그리고 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다.

[0058] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 벡터에서 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자 및 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자는 프로모터와 작동적으로 결합(operatively linked)되어 있다.

[0059] 본 명세서에서 사용되는 용어, "작동적으로 결합된"은 핵산 발현조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전

사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.

[0060] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 벡터는 다음의 핵산분자를 포함한다: (i) 서열목록 제27서열의 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자 및 서열목록 제28서열의 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자; 또는 (ii) 서열목록 제31서열의 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자 및 서열목록 제32서열의 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자.

[0061] 본 발명의 재조합 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0062] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL^λ프로모터, pR^λ프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주세포로서 *E. coli*(예컨대, HB101, BL21, DH5α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C. *J. Bacteriol.* 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터(pL^λ프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D. *Ann. Rev. Genet.* 14:399-445(1980))가 조절부위로서 이용될 수 있다. 숙주세포로서 바실러스 균이 이용되는 경우, 바실러스 슈린겐시스의 독소단백질 유전자의 프로모터(*Appl. Environ. Microbiol.* 64:3932-3938(1998); *Mol. Gen. Genet.* 250:734-741(1996)) 또는 바실러스균에서 발현 가능한 어떠한 프로모터라도 조절부위로서 이용될 수 있다.

[0063] 본 발명의 재조합 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pCL, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지(예: λgt4○λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

[0064] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 벡터는 도 17에 도시된 개열지도로 갖는 재조합 발현 벡터이다.

[0065] 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터, β-액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 폴로니 바이러스의 프로모터 엡스타인바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0066] 본 발명의 재조합 벡터는 그로부터 발현되는 항체의 정제를 용이하게 하기 위하여 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은, 예컨대 글루타민 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA); 말토스 결합 단백질(NEB, USA); FLAG(ABI, USA); 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA), Pre-S1, c-Myc와 같은 태그 서열; OmpA, PelB와 같은 선도서열 등이 있다. 또한, 본 발명의 벡터에 의해 발현되는 단백질이 항체이기 때문에 정제를 위한 추가적인 서열 없이도, 발현된 항체는 단백질 A 컬럼 등을 통하여 용이하게 정제할 수 있다.

[0067] 한편, 본 발명의 재조합 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카나마이신, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

[0068] 본 발명의 항체를 발현하는 벡터는, 경쇄와 중쇄가 하나의 벡터에서 동시에 발현되는 벡터 시스템이거나 또는 경쇄와 중쇄를 각각 별도의 벡터에서 발현시키는 시스템 모두 가능하다. 후자의 경우, 두 벡터는 동시 형질전환(co-transformation) 및 표적 형질전환(targeted transformation)을 통하여 숙주세포로 도입된다. 동시 형질전환은 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 각각의 벡터 DNA를 동시에 숙주세포로 도입한 뒤 경쇄와 중쇄를 모두 발현하

는 세포를 선별하는 방법이다. 표적 형질전환은 경쇄(또는 중쇄)를 포함하는 벡터로 형질전환 된 세포를 선별하고 경쇄를 발현하는 선별된 세포를 중쇄(또는 경쇄)를 포함하는 벡터로 다시 형질전환 하여 경쇄 및 중쇄 모두를 발현하는 세포를 최종적으로 선별하는 방법이다. 하기의 실시예에서는, 경쇄(V_L 및 C_L)와 중쇄(V_H 및 C_H)가 하나의 벡터에서 동시에 발현되는 벡터 시스템을 이용하여 항체를 제조하였다.

[0069] III. 형질전환체

[0070] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 재조합 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다. 일 구체예에서, 상기 숙주세포는 재조합 벡터로 형질전환된 세포이다.

[0071] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 쉐렌겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*)(예를 들면, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)(예를 들면, 스태필로코쿠스 카르노수스(*Staphylococcus carnosus*))와 같은 원핵 숙주세포를 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0072] 상기 벡터의 적합한 진핵세포 숙주세포는 아스페르길러스 속(*Aspergillus species*)과 같은 진균, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*) 및 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)와 같은 효모, 그 밖의 하등 진핵세포, 곤충-유래 세포와 같은 고등 진핵생물의 세포, 그리고 식물 또는 포유동물로부터 유래한 세포를 이용할 수 있다.

[0073] 본 명세서에서, 숙주세포로의 "형질전환" 및/또는 "형질감염"은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘($CaPO_4$) 침전, 염화칼슘($CaCl_2$) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로 박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설펀이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나, 이로 제한되지 않는다.

[0074] IV. 항-TM4SF5 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법

[0075] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 본 발명의 숙주세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 숙주세포에서 항-TM4SF5 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 발현시키는 단계를 포함하는 항-TM4SF5 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공한다.

[0076] 상기 항체 제조에서 숙주세포의 배양은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양과정은 당업자라면 선택되는 균주에 따라 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 이러한 다양한 배양 방법은 다양한 문헌(예를 들면, James M. Lee, *Biochemical Engineering*, Prentice-Hall International Editions, 138-176)에 개시되어 있다. 세포 배양은, 세포의 성장방식에 따라 현탁배양과 부착배양, 배양방법에 따라 회분식, 유가식 및 연속배양식의 방법으로 구분된다. 배양에 사용되는 배지는 특정한 균주의 요구조건을 적절하게 만족시켜야 하다.

[0077] 동물세포 배양은 상기 배지는 다양한 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 사용될 수 있는 탄소원의 예는, 포도당, 자당, 유당, 과당, 말토오스, 전분 및 셀룰로오스와 같은 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유 및 코코넛유와 같은 지방, 팔미트산, 스테아린산 및 리놀레산과 같은 지방산, 글라이세롤 및 에탄올과 같은 알코올, 그리고 아세트산과 같은 유기산을 포함한다. 이들 탄소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원의 예는, 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액(CSL) 및 대두밀과 같은 유기 질소원 및 요소, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄과 같은 무기 질소원을 포함한다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로로서, 인산이수소칼륨, 인산수소이칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 또한, 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 포함할 수 있다. 그 외에, 아미노산, 비타민, 및 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다.

[0078] 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배양물의 호기상태를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 20℃ 내지 45℃, 바람직하게는 25℃ 내지 40℃이다.

- [0079] 숙주세포를 배양하여 수득한 항체는 정제하지 않은 상태로 사용될 수 있으며 추가로 다양한 통상의 방법, 예를 들면 투석, 염 침전 및 크로마토그래피 등을 이용하여 고순도로 정제하여 사용될 수 있다. 그 중에서 크로마토그래피를 이용하는 방법이 가장 많이 사용되며, 컬럼의 종류와 순서는 항체의 특성, 배양방법 등에 따라 이온 교환 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등에서 선택할 수 있다.
- [0080] V. 암의 예방 또는 치료
- [0081] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상기 항-TM4SF5 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0082] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 약제학적 조성물을 약제학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0083] 상기 항체는 TM4SF5에 높은 친화도로 결합하여 TM4SF5를 발현하는 암의 성장, 침윤 및 전이를 억제할 수 있으므로 항체 단독 또는 통상의 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 암의 예방 및 치료에 사용가능하다.
- [0084] 본 명세서에서 사용되는 용어, "예방"은 본 발명의 항체의 투여로 암을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 암의 발전의 억제, 암의 경감 또는 암의 제거를 의미한다.
- [0085] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 암은 TM4SF5를 발현하는 암이고, 이러한 암의 예로는 간암, 대장암, 췌장암, 폐암, 위암, 직장암, 연부조직육종(soft-tissue sarcoma), 결장암, 십이지장 유두부 상피암(carcinoma of the papilla vateri), 비내분비 폐종양(nonendocrine lung tumor) 및 기관지 유암종(bronchial carcinoid tumor) 등을 들 수 있다.
- [0086] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0087] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한 약제학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0088] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-100 mg/kg이다. 본 명세서에서 용어, "약제학적 유효량"은 암을 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0089] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0090] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [0091] 본 발명의 항체는 항체-기능성 분자 결합체 형태로 생체내로 투입하여 암의 치료에 이용할 수 있다. 상기 기능성 분자는 화학치료제, 방사성핵종, 면역치료제, 사이토킨, 케모킨, 세포독소, 생물작용제 및 효소 저해물질 등을 포함한다. 본 발명의 항체 또는 그의 단편과 커플링 시키기기에 바람직한 기능성 분자는 화학물질, 방사성핵종, 사이토킨 또는 케모킨이다. 상기 화학물질은 항암제이고, 예를 들면 아시바이신, 아클라루비신, 아코다졸, 아크로나이신, 아도젤레신, 알라노신, 알테스루킨, 알로푸리놀 소듐, 알트레타민, 아미노글루테티미드,

아모나파이드, 암플리젠, 암사크린, 안드로겐스, 안구이딘, 아피디콜린 글리시네이트, 아사레이, 아스파라기나 아제, 5-아자시티딘, 아자티오프린, 바실러스 칼레테-구에린(BCG), 베이커스 안티폴, 베타-2-디옥시티오구아노신, 비스안트렌 HC1, 블레오마이신 설페이트, 불서판, 부티오닌 설펡시민, BWA773U82, BW 502U83/HC1, BW 7U85 메실레이트, 세라세미드, 카르베티머, 카르보플라틴, 카르무스틴, 클로람부실, 클로로퀴녹살린-설펡나미드, 클로로조토신, 크로모마이신 A3, 시스플라틴, 클라드리빈, 코르티코스테로이드, 코리너박테리움 파르툼, CPT-11, 크리스나톨, 사이클로사이티딘, 사이클로포스포미드, 사이타라빈, 사이템베나, 다비스 말리에이트, 데카르바진, 닥티노마이신, 다우노루바이신 HC1, 디아자유리딘, 텍스라족산, 디언하이드로 갈락티톨, 디아지쿠온, 디브로모 들시톨, 디데민 B, 디에틸디티오카르바메이트, 디클라이코알데하이드, 다이하이드로-5-아자사이틴, 독소루비신, 에치노마이신, 데다트렉세이트, 에델포신, 에플롤니틴, 엘리웃스 용액, 엘사미트루신, 에피루비신, 에소루비신, 에스트라머스틴 포스페이트, 에스트로젠, 에타나다졸, 에티오포스, 에토펡사이드, 파드라졸, 파자라빈, 펜레티 나이드, 필그라스티, 피나스테라이드, 플라본 아세트산, 플록스유리딘, 플루다라빈 포스페이트, 5'-플루오로우라실, Fluosol™, 플루타미드, 갈륨 나이트레이트, 겐사이타빈, 고세레린 아세테이트, 헤프설팜, 헥사메틸렌 비스아세트아미드, 호모하링토닌, 하이드라진 설페이트, 4-하이드록시안드로스테네디온, 하이드로지우레아, 이다루비신 HC1, 이포스포미드, 4-이포메아놀, 이프로플라틴, 이소트레티노인, 류코보린 칼슘, 류프로라이드 아세테이트, 레바미솔, 리포즘 다우노루비신, 리포즘 포집 독소루비신, 로머스틴, 로니다민, 마이탄신, 메클로레타민 하이드로클로라이드, 멜팔란, 메노가틸, 메르바론, 6-머캅토펡린, 메스나, 바실러스 칼레테-구에린의 메탄올 추출물, 메토펡렉세이트, N-메틸포름아미드, 미페프리스톤, 미토구아존, 마이토마이신-C, 미토펡, 미톡산트론 하이드로클로라이드, 모노사이트/마크로파지 콜로니-자극 인자, 나빌론, 나폭시딘, 네오펡지노스타틴, 옥트레오타이드 아세테이트, 오르마플라틴, 옥살리플라틴, 파크리탁셀, 팔라, 펜토스타틴, 피페라진디온, 피포브로만, 피라루비신, 피리트렉심, 피록산트론 하이드로클로라이드, PIXY-321, 플리카마이신, 포르피머 소듐, 프레드니무스틴, 프로카르바진, 프로게스틴스, 파이라조프린, 라족산, 사르그라모스틴, 세무스틴, 스피로게르마늄, 스피로무스틴, 스트렙토나이그린, 스트렙토조신, 술로페너르, 수라민 소듐, 타목시펜, 탁소레레, 테가푸르, 테니포사이드, 테레프탈아미딘, 테록시론, 티오구아닌, 티오펡, 티미딘 인젝션, 티아조프린, 토포테칸, 토레미펜, 트레티노인, 트리플루오페라진 하이드로클로라이드, 트리플루리딘, 트리메트렉세이트, TNF(tumor necrosis factor), 우라실 머스타드, 빈블라스틴 설페이트, 빈크리스틴 설페이트, 빈데신, 비노렐빈, 빈줄리딘, Yoshi 864, 조루비신, 사이토신아라비노시드, 에토펡시드, 멜파란, 탁소셀, 탁솔 및 이들의 혼합물이나, 이에 한정되지 않는다.

[0092] VI. TM4SF5 단백질 검출 방법 및 암 진단

[0093] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 사용하여 시료 내의 TM4SF5 단백질의 존재 여부를 확인(검출)하는 방법을 제공한다.

[0094] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 TM4SF5 단백질 검출용 키트를 제공한다.

[0095] 본 발명의 항체는 생물학적 시료에 적용되어 TM4SF5 단백질을 검출할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어, "생물학적 시료"란 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 림프액, 척수액, 조직 부검 시료(뇌, 피부, 림프절, 척수 등), 세포 배양 상등액, 파열된 진핵세포 및 세균 발현계 등을 들 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0096] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 생물학적 시료로서 세포는 암세포이다.

[0097] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 키트는 암 진단용 키트이다. 본 발명의 키트는 생물학적 시료를 조작하거나 조작하지 않은 상태로 본 발명의 항체와 반응시킴으로써 암의 발병여부를 확인하기 위한 용도로 사용될 수 있다.

[0098] 생물학적 시료에서 TM4SF5 단백질의 검출은, 비색법(colormetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 또는 섬광계수법(scintillation counting method)을 이용한 항원-항체 복합체 형성의 검출을 통하여 수행할 수 있다. 본 명세서상의 "검출"은 항원-항체 복합체를 검출하기 위한 것으로 여러 가지 표지체를 사용하여 실시할 수 있다. 표지체의 구체적인 예로는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자 또는 방사성 동위원소를 포함한다.

[0099] 검출 표지체로서 사용되는 효소로는 아세틸콜린에스테라제, 알칼라인 포스포타제, β -D-갈락토시다제, 호스래디

쉬 퍼옥시다제 및 β -라타마제 등을 포함하며, 형광물로는 플루오레세인, Eu^{3+} , Eu^{3+} 킬레이트 또는 크립테이트 등을 포함하며, 리간드로는 바이오틴 유도체 등을 포함하며, 발광물로는 아크리디늄 에스테르 및 이소루미놀 유도체 등을 포함하며, 미소입자로는 콜로이드 금 및 착색된 라텍스 등을 포함하며, 방사성 동위원소로는 ^{57}Co , ^3H , ^{125}I 및 ^{125}I -볼톤(Bonton) 헌터(Hunter) 시약 등을 포함한다.

[0100]

본 발명의 일구현예에 따르면, 항원-항체 복합체를 효소면역흡착법(ELISA)을 이용하여 검출할 수 있다. 효소면역흡착법에는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 이차항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다. 본 발명의 항체는 검출 표지를 가질 수 있으며, 검출표지를 가지지 않을 경우는 본 발명의 항체를 포획할 수 있고 검출 표지를 가지는 또 다른 항체를 처리하여 확인할 수 있다.

발명의 효과

[0101]

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0102]

(i) 본 발명은 TM4SF5에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 및 이의 용도를 제공한다.

[0103]

(ii) 본 발명의 항체는 종양특이항원 TM4SF5에 높은 친화력으로 결합하며, 이를 발현하는 암세포의 성장, 전이 및 침윤을 현저히 억제하므로, TM4SF5를 발현하는 다양한 암의 진단, 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0104]

도 1은 항-TM4SF5 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 스크리닝을 보여준다. (도 1a) 4마리의 BALB/c 마우스에 hTM4SF5 펩타이드를 복강 내 투여하여 면역화 하였다. 혈청을 채취하고, 전체 IgG를 ELISA 키트로 분석하였다. (도 1b) hTM4SF5 펩타이드 면역화 된 마우스의 지라세포를 사용한 세포-융합 실험의 초기 스크리닝에 대한 ELISA 결과이다. (도 1c) 도 1b의 6개의 하이브리도마(화살표)를 단일클론항체의 생산을 위하여 선별하였다. (도 1d) 도 1c의 6개의 하이브리도마(화살표)를 복수 생성을 위하여 BALB/c 마우스에 복강 내 투여하였다. 상기 복수를 ELISA로 스크리닝 하여 hTM4SF5 펩타이드에 대한 특정 항체를 분비하는 하이브리도마를 검출하였다. (도 1e) 복수 생성을 위하여 2D4-18 하이브리도마 클론을 7마리의 BALB/c 마우스에 복강 내 투여하였다. 혈청(도 1a), 하이브리도마 배양 상청액(도 1b 및 1c) 및 복수(도 1d 및 1e)를 모은 후, 펩타이드 특이적 전체 IgG의 타이터와 양을 ELISA 키트로 분석하였다.

도 2는 마우스 하이브리도마 세포주 2D4-18이 투여된 마우스의 복수로부터 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18을 정제한 결과를 보여준다. 마커, 복수 및 정제된 단일클론항체를 SDS-PAGE로 분리하고, 쿠마시브릴리언트블루로 염색하였다.

도 3은 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 결합 친화도를 보여준다. A: hTM4SF5에 대한 결합 친화도, B: mTM4SF5에 대한 결합 친화도.

도 4는 HCC 조직에서 TM4SF5의 발현을 보여준다. A: 정상 간 조직, B: >75%, 74-50% 및 49-11% TM4SF5가 발현된 HCC 조직의 예. 스케일 바 = 왼쪽 200 μm , 오른쪽 50 μm .

도 5a 및 5b는 대장암 조직에서 TM4SF5의 발현을 보여준다. A: 정상 대장 조직, B: >75%, 74-50%, 49-11% 및 <10% TM4SF5가 발현된 대장암 조직의 예, C: 전이된 간암을 갖는 세 대장암 환자의 대장암 조직 및 간 전이 조직. 스케일 바 = 왼쪽 200 μm , 오른쪽 50 μm .

도 6은 HCC 세포 및 대장암 세포 성장에 대한 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 억제 효과를 보여준다. (도 6a) HCC 세포주 및 대장암 세포주에서 TM4SF5 mRNA의 발현을 보여준다. (도 6b) HCC 세포주의 성장에 대한 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 효과를 보여준다. 각 바는 세 번의 실험의 mean $\pm$ SD로 표현되었다. **P < 0.01(vs 정상 IgG 대조군). (도 6c) 대장암 세포의 성장에 대한 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 효과를 보여준다. 각 바는 세 번의 실험의 mean $\pm$ SD로 표현되었다. **P < 0.01(vs 정상 IgG 대조군).

도 7은 HCC 세포의 이동 및 침윤에 대한 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 효과를 보여준다. A: 이동 분석,

B: 침윤 분석, C: 상처 치료 분석. 스케일 바 = 200 μ m.

도 8은 대장암 세포의 이동 및 침윤에 대한 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 효과를 보여준다. A: 이동 분석, B: 침윤 분석, C: 상처 치료 분석. 스케일 바 = 200 μ m.

도 9는 HCC 종양 조직에서 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 생체 내 분포를 보여준다. (도 9a) 마우스를 절개하고 마우스 생체내의 항체의 위치를 실시간 IVIS 이미징 시스템 200을 사용하여 관찰하였다(위쪽 패널). 종양 조직을 떼어내고 마우스의 왼쪽에 놓았다(아래쪽 패널), (도 9b) 공초점 현미경으로 종양 조직을 관찰한 결과이다. 스케일 바 = 20 μ m.

도 10은 이종이식 마우스 모델에서 HCC 종양 성장에 대한 투여된 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 치료효과를 보여준다. A: HCC 종양 조직의 사진, B: 종양 부피, C: 종양 무게, D: 체중, E: 종양 조직에서 TM4SF5의 발현을 나타내며, TM4SF5 양성 부위는 갈색으로 표시되었고, 스케일 바 = 20 μ m를 나타낸다.

도 11은 동종이식 마우스 모델에서 HCC 종양 성장에 대한 투여된 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 치료효과를 보여준다. A: HCC 종양 조직의 사진, B: 종양 부피, C: 종양 무게, D: 체중, E: 종양 조직에서 TM4SF5의 발현을 나타내며, TM4SF5 양성 부위는 갈색으로 표시되었고, 스케일 바 = 20 μ m를 나타낸다.

도 12는 이종이식 마우스 모델에서 대장암 성장에 대한 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 치료효과를 보여준다. A: 대장암 조직의 사진, B: 종양 부피, C: 종양 무게, D: 체중, E: 종양 조직에서 TM4SF5의 발현을 나타내며, TM4SF5 양성 부위는 갈색으로 표시되었고, 스케일 바 = 20 μ m를 나타낸다.

도 13은 동종이식 마우스 모델에서 대장암 성장에 대한 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 치료효과를 보여준다. A: 대장암 조직의 사진, B: 종양 부피, C: 종양 무게, D: 체중, E: 종양 조직에서 TM4SF5의 발현을 나타내며, TM4SF5 양성 부위는 갈색으로 표시되었고, 스케일 바 = 20 μ m를 나타낸다.

도 14는 이종이식 대장암 모델에서 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 폐 전이 억제 효과를 보여준다. A 및 B: 폐의 사진, C: 종양 무게, D: 체중.

도 15는 하이브리도마 세포 클론 2D4-18로부터 분리된 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 cDNA 서열(2D4-18)을 보여준다. A: 중쇄 가변 도메인의 서열, B: 경쇄 가변 도메인의 서열을 나타내며, 예측된 아미노산 서열을 cDNA 서열 아래에 기재하였다.

도 16은 하이브리도마 세포 클론 2D4-18로부터 분리된 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 cDNA 서열(2D4-18(1))을 보여준다. A: 중쇄 가변 도메인의 서열, B: 경쇄 가변 도메인의 서열을 나타내며, 예측된 아미노산 서열을 cDNA 서열 아래에 기재하였다.

도 17은 발현 벡터 pFabE-2D4-18 및 pFabE-2D4-18(1)의 맵(A) 및 발현 벡터로부터 발현되는 예측된 단백질 구조(B)를 보여준다.

도 18은 *E. coli*에서 재조합 Fab-2D4-18의 소규모 생산을 보여준다. A: 환원된 전체 세포 용해물, B: 비-환원된 전체 세포 용해물.

도 19는 *E. coli*에서 재조합 Fab-2D4-18의 생산 및 정제를 보여준다. A: 환원된 단백질 샘플, B: 비-환원된 단백질 샘플.

도 20은 *E. coli*에서 재조합 Fab-2D4-18(1)의 생산 및 정제를 보여준다. A: SDS-PAGE 결과, B: 웨스턴 블랏팅 결과.

도 21은 재조합 Fab-2D4-18의 결합 친화도를 보여준다.

도 22는 HCC 세포의 성장에 대한 재조합 Fab-2D4-18의 억제 효과를 보여준다.

도 23은 HCC 세포의 성장에 대한 재조합 Fab-2D4-18(1)의 억제 효과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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

[0105]

- [0106] 실시예
- [0107] 실험재료 및 실험방법
- [0108] 마우스 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 생산
- [0109] 암컷 BALB/c 마우스에 10일 간격으로 4차례 hTM4SF5 펩타이드(¹³⁸NRTLWDRCEAPPRV¹⁵¹)를 복강 내 투여하였다. 면역화 된 비장으로부터 지라세포(Splenocytes)를 얻은 후, 표준 하이브리도마 기술(Yokoyama WM, *et al. Curr Protoc Immunol* Chapter 2, Unit 2.5(2006))에 따라 40% (w/v) 폴리에틸렌글리콜의 존재 하에서 HAT-sensitive SP2/0 마우스 골수종 세포와 융합하였다. 하이브리도마 세포의 배양 상청액을 hTM4SF5 펩타이드에 대한 결합을 확인하기 위하여 ELISA로 테스트하고, 양성 하이브리도마 세포를 스크리닝 하였다. ELISA-양성 하이브리도마 세포군을 서브클로닝 한 다음, 복수를 생성시키기 위하여 BALB/c 마우스 복강에 주사하였다. 단백질 A 컬럼 크로마토그래피(Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 항-TM4SF5 단일클론항체(2D4-18)를 복수액으로부터 정제하였다.
- [0110] ELISA
- [0111] 각 투여 전 및 최종 투여 10일 후에 마우스를 희생시켜 혈청을 얻었다. 전체 IgG 타이터 및 양을 확인하기 위하여, 96-웰 면역플레이트(Nalgen Nunc International)를 5 µg/ml hTM4SF5 펩타이드로 코팅하고, 1% BSA를 함유하는 0.05% PBST로 두 시간 동안 블락하였다. 블락킹 용액을 제거한 후, 배양 상청액 100 µl를 첨가하고 상온에서 두 시간 동안 인큐베이션 한 다음 PBST로 세척하고, HRP(horseradish peroxidase)-결합된 항-IgG 항체와 같은 검출항체와 함께 2시간 동안 인큐베이션 하였다. TMB 기질 용액으로 비색분석법을 개발하고, Spectra Max 250 마이크로플레이트 리더를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0112] SPR(Surface plasmon resonance) 분석
- [0113] 인간 및 마우스 TM4SF5에 결합하는 항-hTM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 친화도를 Biacore T100(Biacore)을 사용하여 25℃에서 측정하였다. 스트렙토아비딘이 코팅된 CM4 센서 칩의 각 흐르는 세포 표면에서 비오티나 펩타이드를 포획(capture)하였다. 비오티나 음성 대조군으로 사용하였다. 2-32 nM 농도의 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18을 30 ml/분의 유동속도로 주입하였다. 데이터는 Biacore Bia 평가 소프트웨어(version 3.0)를 사용하여 평가하였다.
- [0114] 조직 마이크로어레이 및 면역조직화학
- [0115] 하기 어레이를 사용하였다: 간암 조직(A204 및 A204(II)), 대장암 조직(A203(VII)) 및 대장암 조직-간 전이(A203 III). 간암 조직 어레이는 각 슬라이드상의 샘플들에 상응하는 4개 또는 8개의 비-종양(non-neoplastic) 및 다양한 히스토타입(histotypes)의 똑같은 HCC 조직 코어로 구성되었다. 대장암 조직 어레이(A203(VII))는 각 슬라이드상의 샘플들에 상응하는 8개의 비-종양 및 다양한 히스토타입의 똑같은 대장암 조직 코어로 구성된 45개의 케이스를 포함하였다. 상응하는 대장 정상 조직을 갖는 대장암 조직-간 전이(18 케이스)는 각 슬라이드상의 샘플들에 상응하는 18개의 비-종양 및 각 암 케이스 유래의 4개의 스팟들로 이루어졌다. 슬라이드를 자일렌에서 탈파라핀화 하고, 재수화한 다음 메탄올에서 신선한 0.3% 과산화수소를 15분 동안 처리하였다. 조직 어레이를 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18로 염색하였다.
- [0116] 세포 배양
- [0117] Huh-7, Hep3B 및 SNU-761과 같은 인간 HCC 세포주, 및 HT-29 및 LoVo와 같은 인간 대장암 세포주, 및 마우스 대장암 세포주 CT-26은 한국세포주은행에서 얻었다. 마우스 간암 세포주 BNL-HCC는 ATCC로부터 얻었다. Hep3B, BNL-HCC 및 CT-26 세포를 10% 소태아혈청(FBS; Hyclone), 2 mM 글루타민, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신이 함유된 DMEM에서 관리하였다. 다른 세포주들은 10% FBS, 25 mM HEPES, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신이 함유된 RPMI 1640 배지에서 관리하였다. 모든 세포들을 95% 공기 및 5% CO₂에서 37℃의 온도로 배양하였다.
- [0118] TM4SF5 mRNA 발현의 검출
- [0119] TM4SF5 발현을 분석하기 위하여 RT-PCR 및 FACS 분석을 실시하였다. 전체 RNA를 RNeasy Mini 키트(Qiagen)를 사용하여 추출하고, cDNA를 합성하였다. 다음의 프라이머 세트를 사용하여 표준 PCR 반응을 25사이클 실시하였다: 마우스 GAPDH(서열목록 제1서열 및 서열목록 제2서열, 501bp); 마우스 TM4SF5(서열목록 제3서열 및 서열목록 제4서열, 174bp); 인간 β-액틴(서열목록 제5서열 및 서열목록 제6서열, 500bp); 인간 TM4SF5(서열목록

제7서열 및 서열목록 제8서열, 408bp).

[0120] *MTT 분석*

[0121] 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)을 5일 동안 처리한 암세포의 성장을 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich) 용액을 사용한 MTT 분석으로 확인하였다. MTT 용액을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 37°C 에서 4시간 동안 인큐베이션 하였다. 배지를 제거한 후, 포르마잔 결정체를 DMSO에서 용해하였다. 발색현상을 분광광도계 595 nm(참조 파장 650 nm)에서 모니터링 하였다.

[0122] *세포 이동 및 침윤 분석*

[0123] $8 \mu\text{m}$ 공극을 갖는 트랜스-웰 챔버(Corning Costar)를 분석에 사용하였다. 이동 분석을 위하여, 트랜스-웰 챔버 막의 아래쪽 면을 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 젤라틴으로 코팅하였다. 침윤 분석을 위하여, 챔버 막의 윗면과 아랫면을 $1.2 \text{ mg}/\text{mL}$ 의 마트리젤(BD Biosciences) 및 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 젤라틴으로 각각 코팅하였다. 세포(Huh-7 또는 CT-26)를 정상 IgG 또는 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18이 포함된 무혈청 배지에서 현탁하고(5×10^4 세포/ mL), 트랜스-웰의 맨 위에 분주하였다. 5% FBS를 함유하는 RPMI 배지를 아래쪽 챔버에 놓았다. 12시간 인큐베이션 후, 필터의 아래 표면상의 침윤 세포(invaded cells)를 4% 파라포름알데히드로 30분 동안 고정하고, 0.005% 크리스탈 바이올렛으로 30분 동안 염색한 다음 현미경으로 카운팅 하였다.

[0124] *상처 치료(Wound-healing) 분석*

[0125] 상처 치료 분석을 위하여, 1×10^6 세포(Huh-7 또는 CT-26)를 6-웰 플레이트에 분주하고, 혈청 포함 배지에서 하룻밤 동안 배양한 다음 피펫 끝을 이용하여 단일층에 상처를 유발하였다. 정상 IgG 또는 항-hTM4SF5 단일클론항체 2D4-18($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)를 지시된 시간 동안 처리하였다. 세포를 4% 파라포름알데히드로 30분 동안 고정하고, 김자액으로 30분 동안 염색하였다.

[0126] *동물*

[0127] 4주령 수컷 BALB/cAnNCri-nu/nu 마우스 및 BALB/c 마우스(Central Lab, Animal, Inc)를 무특이 병원체 환경(specific-pathogen-free condition)에서 유지 관리하였다. 동물연구에 대한 모든 절차는 NVRQS(National Veterinary Research & Quarantine Service)의 실험실 동물의 사육 및 이용에 따라 실시하였다. 마우스를 줄레틸 50+럼폰 마취 후 희생시켰다.

[0128] *간세포암 마우스 모델*

[0129] 30마리의 BALB/cAnNCri-nu/nu 마우스 및 30마리의 BALB/c 마우스의 등 오른쪽 측면(dorsal right flank)에 50% 마트리젤(BD biosciences)을 포함하는 5×10^6 Huh-7 세포 및 50% 마트리젤을 함유하는 5×10^6 BNL-HCC 세포를 각각 피하주사 하였다. 종양 직경이 5 mm에 도달했을 때, 마우스를 PBS, IgG 대조군 및 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 세 개의 처리 그룹(8마리 마우스/각 그룹)으로 임의적으로 분류하였다. 항체(2D4-18, 25 mg/kg)를 주마다 두 번씩 복강 내 주사하였다. 암세포 주입 후 6주 동안 4일 또는 7일 간격으로 종양 직경을 측정하고, 종양 부피를 폭² x 길이/2의 식에 따라 계산하였다. 종양 크기가 $\pm 2000 \text{ mm}^3$ 에 도달했을 때 BALB/cAnNCri-nu/nu 마우스를 희생시키고, 종양 무게를 측정하였다. 종양 세포 이식 10주 후에 BALB/c 마우스를 희생시키고, 종양 무게를 측정하였다.

[0130] *생체 내 분포 이미징(Biodistribution imaging in vivo)*

[0131] 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18 및 정상 마우스 IgG에 DyLight 750-형광(Molecular Probes)을 결합시키고, 제조사의 지시에 따라 정제하였다. $50 \mu\text{g}$ 의 DyLight 750-형광 라벨 된 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18 또는 DyLight 750-형광 라벨 된 정상 마우스 IgG를 BALB/c 마우스의 복강 내 투여하였다. 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 분포 프로파일을 지시된 시간 간격에서 실시간 IVIS 이미징 시스템 200(Xerogen Corp.)을 사용하여 형광으로 수량화 하였다. Living Image 2.50 소프트웨어(Xenogen Corp.)를 사용하여 데이터를 분석하였다. HCC 종양 조직에서 DyLight 750-형광 라벨 된 2D4-18 단일클론항체의 분포를 확인하게 위하여, 복강 내 투여 72시간 후 조직을 제거하였다. 조직을 동결하고 $4 \mu\text{m}$ 두께의 슬라이스로 절단하였다. 슬라이스를 SYTOX 녹색 염료(Invitrogen)로 염색하고, 샘플들을 LSM 510 META NLO로 스캔하였다.

[0132] *대장암 마우스 모델*

- [0133] 30마리의 BALB/cAnNCri-nu/nu 마우스 및 30마리의 BALB/c 마우스의 등 오른쪽 측면에 50% 마트리젤(BD biosciences)을 함유하는 5×10^6 HT-29 세포 및 50% 마트리젤을 함유하는 5×10^6 CT-26 세포를 각각 피하주사 하였다. 종양 직경이 5 mm에 도달했을 때, 마우스를 PBS, IgG 대조군 및 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18 처리군의 세 개의 처리 그룹(8마리 마우스/각 그룹)으로 임의적으로 분류하였다. 항체(2D4-18, 25 mg/kg)를 주마다 두 번씩 복강 내 주사하였다. 암세포 주입 후 30일 동안 2일 또는 5일 간격으로 종양 직경을 측정하고, 종양 부피를 폭² X 길이/2의 식에 따라 계산하였다. 종양 크기가 $\pm 2000 \text{ mm}^3$ 에 도달했을 때 BALB/cAnNCri-nu/nu 마우스를 희생시키고, 종양 무게를 측정하였다. 종양 세포 이식 18일 후에 BALB/c 마우스를 희생시키고, 종양 무게를 측정하였다.
- [0134] 폐 전이
- [0135] 전이성 암 동물 실험을 위하여, BALB/c 마우스에 2×10^5 마우스 CT-26 대장암 세포(PBS 대조군 n=8, 대장암 세포 n=36)를 꼬리 혈관으로 정맥 주사하였다. 5일째, 마우스를 PBS, IgG 대조군 및 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18 처리군의 세 그룹으로 분류하였다(각 그룹 당 n=12). 상기 항체(25 mg/kg)를 꼬리 혈관으로 주당 두 번씩 투여하였다. 20일째, 마우스를 희생시키고, 폐의 무게를 측정하였다.
- [0136] 조직학(Histology)
- [0137] 조직병리학적 검사를 위하여 종양 및 기관을 제거하고, 4% 포르말린 용액에서 하룻밤 동안 고정하고 파라핀에 포매한 다음, 5 μm 두께의 절편으로 절단하였다. 탈파라핀화 절편들을 H&E(hematoxylin and eosin)로 염색하였다.
- [0138] 면역조직화학
- [0139] TM4SF5의 발현을 확인하기 위하여, 2D4-18 단일클론항체로 시료를 염색하였다. 시료를 5 μm 두께의 섹션으로 절단하였다. 자일렌으로 탈파라핀 하고, 에탄올로 재수화한 후, 내재적 페록시다아제 활성을 0.3% 과산화수소 및 10% 메탄올로 PBS에서 블락한 다음, 0.2% Triton X-100(PBST)과 3% BSA(bovine serum albumin)을 함유하는 PBS에서 두 시간 동안 전-인큐베이션 하였다. 섹션들을 2D4-18 단일클론항체(1:400)를 함유하는 PBST에서 하룻밤 동안 4℃에서 인큐베이션 하고, 비오틴화 이차 항체와 함께 인큐베이션 하였다. 시료들을 스트렙타비딘-비오틴 페록시다아제와 반응시키고, 3',3'-diaminobenzidine(0.5 mg/ml) 및 과산화수소와 반응시킨 다음, H&E로 대비염색 하였다. 세척 후, 섹션들을 고정하고 탈수한 다음 커버슬립으로 덮어주었다. 모든 이미지를 Nikon Eclipse E-200 현미경(Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 확인하였다.
- [0140] 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 클로닝
- [0141] 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18을 생산하는 하이브리도마 세포(2D4-18)를 배양하고, 마우스 단일클론항체 아이소타이핑 키트(Dipstick format, Bibco BRL or Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 아이소타이핑(isotyping) 하였다. RNeasy Mini 키트(Qiagen)를 사용하여 전체 RNA를 하이브리도마 세포로부터 추출하고, cDNA를 합성하였다. 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인(V_H 및 V_L)의 서열을 클로닝하기 위하여, 상기 cDNA를 Vent 폴리머라아제(NEB) 및 다음의 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 중쇄 프라이머로 IGG2A(서열목록 제9서열) 및 5'MH2(서열목록 제10서열)를 사용하였다. 카파 체인 프라이머로 3'Kc(서열목록 제11서열) 및 5'Mk(서열목록 제12서열)를 사용하였다. 표준 PCR 반응을 25사이클 실시하였다. PCR 생성물을 pGEM-T 이지 벡터(Promega)로 직접 라이게이션 하였다. 클로닝 된 마우스 Ig 삽입물을 DNA 염기서열 분석법으로 분석하였다.
- [0142] 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 Fab 발현
- [0143] 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인(V_H 및 V_L)을 코딩하는 서열을 증폭하고, Sfi I 및 BstX I를 사용하여 각각 박테리아 발현벡터 FabE에 서브클로닝 하였다(Jeon *et al.* Mol. Immunol. 44: 827-836(2007); Kwon *et al.* Oncol. Rep. 18: 513-517(2007)). 사용한 프라이머 서열은 다음과 같다: V_H (391 bp, 서열목록 제13서열 및 서열목록 제14서열; 368 bp, 서열목록 제15서열 및 서열목록 제14서열, V_L (399 bp, 서열목록 제16서열 및 서열목록 제17서열; 381 bp, 서열목록 제18서열 및 서열목록 제17서열). 제한분석(restriction analysis)과 DNA 염기서열 분석을 통하여 재조합 발현 플라스미드(pFabE-2D4-18 및 pFabE-2D4-18(1))를 확인하였다. pFabE-2D4-18 및 pFabE-2D4-18(1) 플라스미드로 TG1 *E. coli* 세포를 형질전환하고, 재

조합 단백질의 발현을 항-PreS1 항체 및 항-His 항체를 사용한 웨스턴 블랏으로 소규모에서 최적화 및 확인하였다. 재조합 Fab(Fab-2D4-18 및 Fab-2D4-18(1))의 대규모 생산 및 정제를 위하여 500 ml 배양액에 0.5 mM IPTG를 처리하고, 18℃에서 16시간 동안 인큐베이션 하였다. 원심분리 하여 배양 상청액을 모으고, V_H-C_H 융합 단백질의 His 태그를 이용하여 적절히 접히고 조립된 Fab 단백질을 분리하기 위하여 Ni-NTA 친화성 컬럼(Clontech)에 적용하였다. 재조합 Fab가 결합된 컬럼을 10 mM 이미다졸(pH 8.0)로 희석하고, centricon(3,500xg, 4℃)을 사용하여 단백질 용액을 투석 및 농축하였다.

[0144] 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 재조합 Fab의 간세포암 세포에 대한 기능성 효과

[0145] 세포의 성장을 측정하기 위하여 MTT 분석을 상기에서 설명한 방법에 따라 실시하였다. 5일 동안 2D4-18 단일클론항체의 재조합 Fab(10 μ g/ml)가 처리된 암세포(Hep3B 및 Huh-7)의 성장을 MTT 분석으로 확인하였다.

[0146] 항-TM4SF5 단일클론항체 재조합 Fab의 결합 친화도

[0147] 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 재조합 Fab의 hTM4SF5에 대한 친화도를 Biacore T100(Biacore)을 사용하여 25℃에서 측정하였다. 비오틴화 펩타이드를 스트렙타비딘으로 코팅된 CM4 센서 칩의 각 흐르는 세포 표면상에서 포획하였다. 비오틴을 음성대조군으로 사용하였다. 100-1,600 nM 농도범위의 2D4-18 단일클론항체의 재조합 Fab를 30 ml/분의 유동속도로 주입하였다. 데이터는 Biacore Bia 평가 소프트웨어(version 3.0)를 사용하여 분석하였다.

[0148] 실험결과

[0149] 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 생산

[0150] 4차례 면역화 후, 마우스 혈청에서의 hTM4SF5 펩타이드에 대한 항체의 타이터 곡선을 ELISA로 얻었다(도 1a). 마지막 접종 3일 후, 가장 높은 항체 타이터(hTM4SF5-4)를 갖는 마우스로부터 비장을 얻고, 비장세포를 SP2/0 골수종 세포와 융합하였다. 14일 후, hTM4SF5 펩타이드에 대한 특정 항체를 분리하는 하이브리도마 세포를 스크리닝 하기 위하여 ELISA로 상청액을 분석하였다. 스크리닝을 통하여 hTM4SF5와 반응하는 6개의 하이브리도마 세포(2D4, 2E3, 2G2, 4B6, 4C4 및 4D11)를 분리하였다(도 1b). 서브클로닝 후, 단일클론항체 생산에 대하여 상기 6개의 하이브리도마 세포를 추가적으로 분석하였다(도 1c). 6개의 하이브리도마 클론(4개의 2D4 파생물 및 2개의 4C4 파생물(derivative))을 선별하고, BALB/c 마우스에 복강 내 투여 하여 복수를 제조하였다. hTM4SF5 펩타이드에 대한 특정 항체를 높은 수준으로 분리하는 하이브리도마를 검출하기 위하여 ELISA로 복수를 스크리닝 하였다. 최종적으로, 단일클론항체(2D4-18)를 생산하는 하나의 하이브리도마 클론을 선별하였다(도 1d). 상기 하이브리도마 세포는 한국세포주은행에 2013년 2월 18일자로 기탁번호 KCLRF-BP-00291로 기탁하였다. 7마리의 BALB/c 마우스에 상기 클론을 복강 내 투여한 경우, 모든 복수에서 항-hTM4SF5 펩타이드 특이적 항체 2D4-18이 생산되었다(도 1e). 단백질 A 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 복수액으로부터 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18을 정제하였다(99% 이상의 순도; 도 2). 항체의 아이소타입은 IgG2a였다.

[0151] 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 친화도

[0152] 표면플라즈몬공명 바이오센서를 사용하여 TM4SF5 타겟팅 mAb(2D4-18)의 결합 친화력을 정량적으로 측정하였다. 그 결과, 상기 mAb(2D4-18)는 마우스 TM4SF5 뿐만 아니라, 인간 TM4SF5와도 2 nM 미만의 Kd값으로 반응하였다(도 3). 이러한 결과는, 본 발명의 단일클론항체 2D4-18을 TM4SF5 단백질 검출에 유용하게 사용할 수 있음을 보여준다.

[0153] 간세포암 및 대장암에서 TM4SF5의 발현

[0154] 노던 블랏 및 RT-PCR에 의한 mRNA 발현에 근거하여 대장암, 췌장 종양 및 간세포암에서 TM4SF5가 발현됨이 보고되었다. 따라서, 항-TM4SF5 단일클론항체2D4-18로 면역조직화학 염색을 하여 인간 HCC 시료에서 TM4SF5의 발현을 확인하였다. 도 4의 B 및 표 1에 나타난 바와 같이, 모든 HCC 조직에서 TM4SF5가 발현되었다(종양 세포의 11% 이상에서 염색). 70개의 HCC 시료들의 분석은, HCC의 31%는 종양 세포의 75% 이상에서 TM4SF5가 발현되었고, HCC의 46% 및 23%는 각각 종양 세포의 74-50% 및 49-11%에서 TM4SF5가 발현되었음을 보여주었다(표 1).

표 1

HCC tissue sections (AccuMax Array)	n	TM4SF5 positive (%)	No.(%) cases staining TM4SF5			
			>75%	74-50%	49-11%	<10%
A204	35	100	10(28)	16(46)	9(26)	0(0)
A204II	35	100	12(34)	16(46)	7(20)	0(0)
total	70	100	22(31)	32(46)	16(23)	0(0)

[0155]

[0156]

또한, 도 5 및 표 2에 나타난 바와 같이, 대장암 조직의 대부분에서 TM4SF5 발현이 확인되었다(98%, 종양 세포의 11% 이상에서 염색). 63개의 대장암 시료의 분석은, 대장암 조직의 44%는 종양 세포의 75% 이상에서 TM4SF5가 발현되었고, 대장암 조직의 37% 및 17%는 각각 종양 조직의 74-50% 및 49-11%에서 TM4SF5가 발현되었음을 보여주었다. 간 전이를 갖는 모든 대장암 환자는 간암 조직뿐만 아니라, 대장암 조직에서 TM4SF5 양성 염색을 보였다(도 5b).

표 2

Colon tissue sections (AccuMax Array)	n	TM4SF5 positive (%)	No.(%) cases staining TM4SF5			
			>75%	74-50%	49-11%	<10%
A203III	18	100	12(67)	5(30)	1(0.5)	0(0)
A203VII	45	100	16(36)	18(40)	10(22)	1(2)
total	63	100	28(44)	23(37)	11(17)	1(2)

[0157]

[0158]

간세포암 세포 및 대장암 세포에 대한 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 기능성 효과

[0159]

RT-PCR에 의한 mRNA 수준에서, HCC 세포(Hep3B, Huh-7 및 SNU-761) 및 대장암 세포(HT-29, LoVo 및 CT-26)에서 TM4SF5의 발현이 검출되었다(도 6a). 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 세포성장 억제에 대한 효과를 확인하기 위하여 MTT 분석을 실시하였다. HCC 세포인 Hep3B 세포 및 Huh-7 세포의 성장은 항체 처리에 의하여 상당히 지연되었다(도 6b).

[0160]

또한, 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 대장암 세포의 성장에 대한 효과를 확인하였다. 대장암 세포인 HT-29, LoVo 및 CT-26 세포의 성장은 항체 처리에 의하여 지연되었다(도 6c).

[0161]

이러한 결과는, 본 발명의 단일클론항체 2D4-18이 HCC 세포 및 대장암 세포 등의 암세포에 항-증식 효과를 나타냄을 보여준다.

[0162]

항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 HCC 세포 및 대장암 세포의 이동에 미치는 효과

[0163]

TM4SF5를 포함하는 테트라스판닌(tetraspanin) 슈퍼패밀리는 세포 이동/침윤 및 종양 세포 운동성의 중심인 인테그린-매개 신호전달경로를 초래한다. 따라서, 세포 이동 및 침윤에 대한 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 영향을 조사하였다. 도 7(A 및 B)과 도 8(A 및 B)에 나타난 바와 같이, TM4SF5를 발현하는 세포의 이동 및 침윤은 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 처리에 의하여 상당히 감소하였다.

[0164]

또한, 상처 치료 분석을 실시하였다. 도 7(C) 및 8(C)에 나타난 바와 같이, 상처 부위까지의 Huh-7 세포 및 CT-26 세포의 이동은 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 처리에 따라 매우 감소되었다.

- [0165] 이러한 결과는, 항-TM4SF5 단일클론항체(2D4-18)-매개된 TM4SF5 타겟팅이 HCC 세포 및 대장암 세포 등의 암세포에서 세포 이동을 억제시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0166] *HCC 종양에 대한 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 타겟팅*
- [0167] HCC 종양에 대한 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 타겟팅을 평가하기 위하여, 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18 및 정상 마우스 IgG에 DyLight 750-형광을 결합하고, 종양이 생긴 BALB/c 마우스에 복강 내 투여하였다. 72시간 후, DyLight 750-라벨 된 항체의 분포를 형광의 전체 프로톤 흐름(프로톤/초)를 측정하여 확인하였다. 도 9a에 나타난 바와 같이, DyLight 750-라벨 된 항-TM4SF5 단일클론항체는 종양에 위치하였으나, DyLight 750-라벨 된 정상 IgG는 마우스에서 검출되지 않았다. 종양 조직을 분석한 결과, 많은 종양 세포가 DyLight 750-라벨 된 항-TM4SF5 항체 2D4-18로 염색이 되어 있었다(도 9b). 반면, DyLight 750-라벨 된 정상 IgG가 투여된 마우스에서는 어떠한 라벨도 발견할 수 없었다.
- [0168] 이러한 결과는, 본 발명의 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18이 TM4SF5를 발현하는 종양 세포를 인 비보에서 타겟팅 할 수 있음을 나타낸다.
- [0169] *항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18은 이종이식 마우스 모델에서 HCC 종양의 성장을 억제한다.*
- [0170] 이종이식 마우스 모델을 사용하여 HCC 세포의 성장에 대한 TM4SF5를 타겟팅하는 단일클론항체 2D4-18의 인 비보 효과를 확인하고자 하였다. 먼저, 누드마우스에 Huh-7 세포를 정맥 투여하고, 종양이 자랄 수 있게 하였다. 종양 직경이 5 mm에 도달한 경우, 마우스에 정상 마우스 IgG 또는 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18을 주 당 두 번 복강 내 투여하였다. 종양 부피 및 무게에 근거하여, 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18은 정상 마우스 IgG에 비하여 HCC 종양의 진행을 약화시켰다(도 10의 A-C). 항체 처리는 체중에는 영향을 미치지 않았다(도 10의 D). HCC 종양 조직에서 TM4SF5의 발현을 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18로 면역염색 하여 확인하였다(도 10의 E).
- [0171] 이종이식 실험 분석은, HCC 종양 세포를 타겟팅 하는 항-TM4SF5 단일클론 항체 2D4-18이 인 비보에서 종양의 성장을 감소시키는데 있어 충분함을 보여준다.
- [0172] *항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18은 동종이식 마우스 모델에서 HCC 종양의 성장을 억제한다.*
- [0173] 동종이식 마우스 모델에서 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 HCC 종양 발생에 대한 효과를 확인하기 위하여, 정상 BALB/c 배아 간세포주 BNL CL2로부터 유래된 화학적으로 형질전환 된 마우스 간세포주인 마우스 BNL 1ME A.7R.1 HCC 세포주(BNL-HCC 세포)를 사용하였다. 도 11의 A-C에 나타난 바와 같이, 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 처리는 정상 마우스 IgG 처리된 대조군에 비하여 HCC 종양의 진행을 상당히 억제시켰다. 상기 항체 처리는 체중에 영향을 미치지 않았다(도 11의 D). HCC 종양 조직에서 TM4SF5의 발현을 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18로 면역염색 하여 재차 확인하였다(도 11의 E).
- [0174] *항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18은 이종이식 마우스 모델에서 대장암의 성장을 억제한다.*
- [0175] 이종이식 마우스 모델을 사용하여 대장암 세포의 성장에 대한 TM4SF5를 타겟팅하는 단일클론항체 2D4-18의 인 비보 효과를 확인하고자 하였다. 먼저, 누드마우스에 HT-29 세포를 정맥 투여하고, 종양이 자랄 수 있게 하였다. 종양 직경이 5 mm에 도달한 경우, 마우스에 정상 마우스 IgG 또는 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18을 주 당 두 번 복강 내 투여하였다. 종양 부피 및 무게에 근거하여, 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18은 정상 마우스 IgG에 비하여 대장암의 진행을 약화시켰다(도 12의 A-C). 항체 처리는 체중에는 영향을 미치지 않았다(도 12의 D). 대장암 조직에서 TM4SF5의 발현을 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18로 면역염색 하여 재차 확인하였다(도 12의 E).
- [0176] 이종이식 실험 분석은, 대장암 세포를 타겟팅 하는 항-TM4SF5 단일클론 항체 2D4-18이 인 비보에서 종양 성장을 감소시킬 수 있음을 보여준다.
- [0177] *항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18은 동종이식 마우스 모델에서 대장암의 성장을 억제한다.*
- [0178] 동종이식 마우스 모델에서 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 대장암 발달에 대한 효과를 확인하기 위하여, 마우스 CT-26 세포를 사용하였다. 도 13의 A-C에 나타난 바와 같이, 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 처리는 대장암의 진행을 상당히 억제시켰다. 상기 항체의 처리는 체중에 영향을 미치지 않았다(도 13의 D). 대장암 조직에서 TM4SF5의 발현을 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18로 면역염색 하여 재차 확인하였다(도 13의 E).

- [0179] 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18은 동종이식 마우스 모델에서 대장암의 전이를 억제한다.
- [0180] 전이성 암에 대한 실험을 위하여, BALB/c 마우스에 마우스 CT-26 대장암 세포를 정맥 투여하고, PBS, IgG 대조군 또는 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18을 투여하였다. 도 14의 A-C에 나타난 바와 같이, 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18은 폐암의 발생을 억제하였다. 2D4-18 단일클론항체의 처리는 CT-26 세포의 투여에 의하여 유도된 체중 손실을 억제하였다(도 14의 D).
- [0181] 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18의 가변 도메인 클로닝
- [0182] 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18을 생산하는 하이브리도마 세포(2D4-18)로부터 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 코딩하는 cDNA를 클로닝 하였다. DNA 염기서열분석으로 확인한 서열을 도 15(2D4-18) 및 16(2D4-18(1))에 나타내었다.
- [0183] 항-TM4SF5 단일클론항체 2D4-18 유래의 재조합 Fab의 발현
- [0184] *E. coli*에서 재조합 Fab의 발현을 위하여 발현 벡터 pFabE를 사용하였다. 상기 pFabE는 κ 경쇄의 불변 도메인(C_L)과 중쇄의 하나의 불변 도메인(C_{H1}), 및 중쇄 및 경쇄 가변 도메인(V_L 및 V_H)이 각각 삽입되는 두 개의 클로닝 부위 *Bst*X I과 *Sfi* I을 포함한다. 2D4-18의 V_L 및 V_H 서열의 연속적인 서브클로닝을 통하여 재조합 발현 플라스미드 pFabE-2D4-18 및 pFabE-2D4-18(1)을 제작하였다(도 17의 A). 상기 재조합 플라스미드는 대장균에서 LacZ 프로모터의 조절 하에서 V_L - C_L 융합 단백질과 V_H - C_{H1} 융합 단백질을 바이-시스트로닉(bi-cistronic) 방식으로 발현시킨다. V_L - C_L 융합 단백질은 N-말단 OmpA 태그 및 C-말단 Pre-S1 태그를 포함하나, V_H - C_{H1} 융합 단백질은 N-말단 PelB 태그 및 C-말단 His 태그를 포함한다(도 17의 B). V_L - C_L 융합 단백질과 V_H - C_{H1} 융합 단백질은 모두 분리를 위한 선도서열(leader sequence)을 가지고 있어, 배양 상청액으로 분리되고, 자가-조립(self-assembled)되어 다이머 단백질인 Fab가 제조된다(Jeon YE, *et al. Mol Immunol* 44,827-836(2007); Kwon YS, *et al. Oncol Rep* 18,513-517(2007)). 먼저, 10 ml 소규모(small scale) 배양을 실시하고, 재조합 V_L - C_L 융합 단백질과 V_H - C_{H1} 융합 단백질의 발현을 항-PreS1 항체 및 항-His 항체를 사용한 전체 세포 용해물의 웨스턴 블랏을 통하여 확인하였다(도 18). 또한, IPTG를 이용한 재조합 Fab의 발현 조절의 온도조건이 23℃ 보다 18℃가 더 바람직함을 확인하였다(도 18). 이후, *E. coli*의 대규모 배양을 실시하고, Ni-NTA 친화도 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 배양 상청액으로부터 2D4-18의 재조합 Fab-2D4-18 및 Fab-2D4-18(1)을 정제하였다(도 19 및 20). 도 19의 A에 나타난 바와 같이, 환원 조건 및 웨스턴 블랏 분석에서 SDS-PAGE는 정제된 Fab-2D4-18 단백질이 두 개의 폴리펩타이드(재조합 중쇄 및 경쇄)로 이루어졌으며, 상기 두 개의 폴리펩타이드를 항-His 항체 및 항-Pre-S1 항체로 각각 검출할 수 있음을 보여주었다. 비-환원 조건에서, 주 단백질 밴드는 55 kDa 미만의 분자량에서 발견되었고, 이러한 분자량은 재조합 Fab의 예상된 크기와 일치하였다(도 19의 B). 도 20의 A에 나타난 바와 같이, 환원 조건 및 비-환원 조건에서 SDS-PAGE는 정제된 Fab-2D4-18(1) 단백질이 두 개의 폴리펩타이드(재조합 중쇄 및 경쇄)로 이루어졌으며, 주 단백질 밴드는 55 kDa 미만의 분자량에서 발견되었다. 웨스턴 블랏 분석에서 정제된 Fab-2D4-18(1) 단백질이 두 개의 폴리펩타이드(재조합 중쇄 및 경쇄)로 이루어졌으며, 상기 두 개의 폴리펩타이드를 항-His 항체로 각각 검출할 수 있음을 보여주었다. 비-환원 조건에서, 주 단백질 밴드는 55 kDa 미만의 분자량에서 발견되었고, 이러한 분자량은 재조합 Fab의 예상된 크기와 일치하였다(도 20의 B). Fab의 기능성의 추가적인 확인을 위하여, Biacore를 사용하여 재조합 Fab-2D4-18의 결합 친화도를 정량적으로 측정하였다. 그 결과, Fab는 0.15 μ M 미만의 Kd값으로 인간 TM4SF5와 반응하였다(도 21).
- [0185] 간세포암 세포에 대한 항-TM4SF5 단일클론항체(2D4-18) 재조합 Fab의 기능성 효과
- [0186] 세포 성장에 대한 재조합 Fab-2D4-18 및 Fab-2D4-18(1)의 효과를 조사하기 위하여, MTT 분석을 실시하였다. HCC 세포인 Hep3B 세포 및 Huh-7 세포의 성장은 항체 처리에 의하여 상당히 지연되었다(도 22 및 23). 이러한 결과는, 항-TM4SF5 항체 2D4-18의 재조합 Fab 단백질이 항-증식 효과를 가지고 있음을 의미한다.
- [0187] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0188]

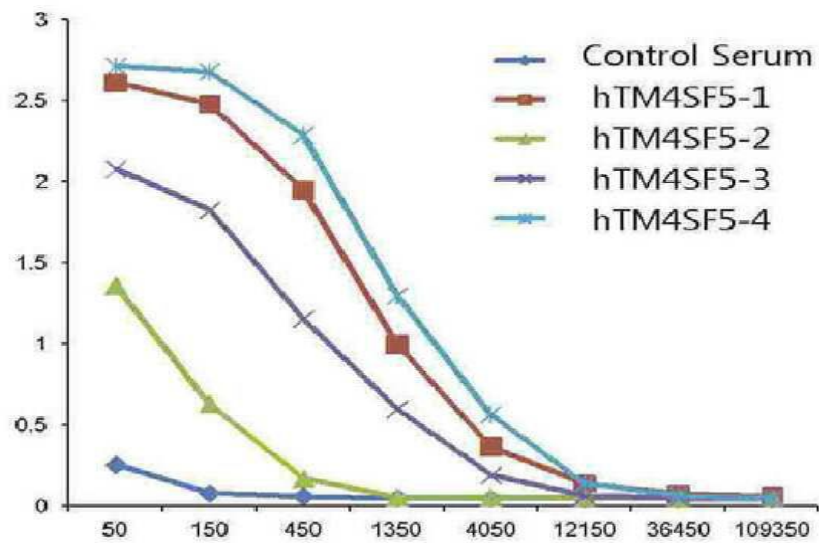
기탁기관명 : 한국세포주연구재단

수탁번호 : KCLRFBP00291

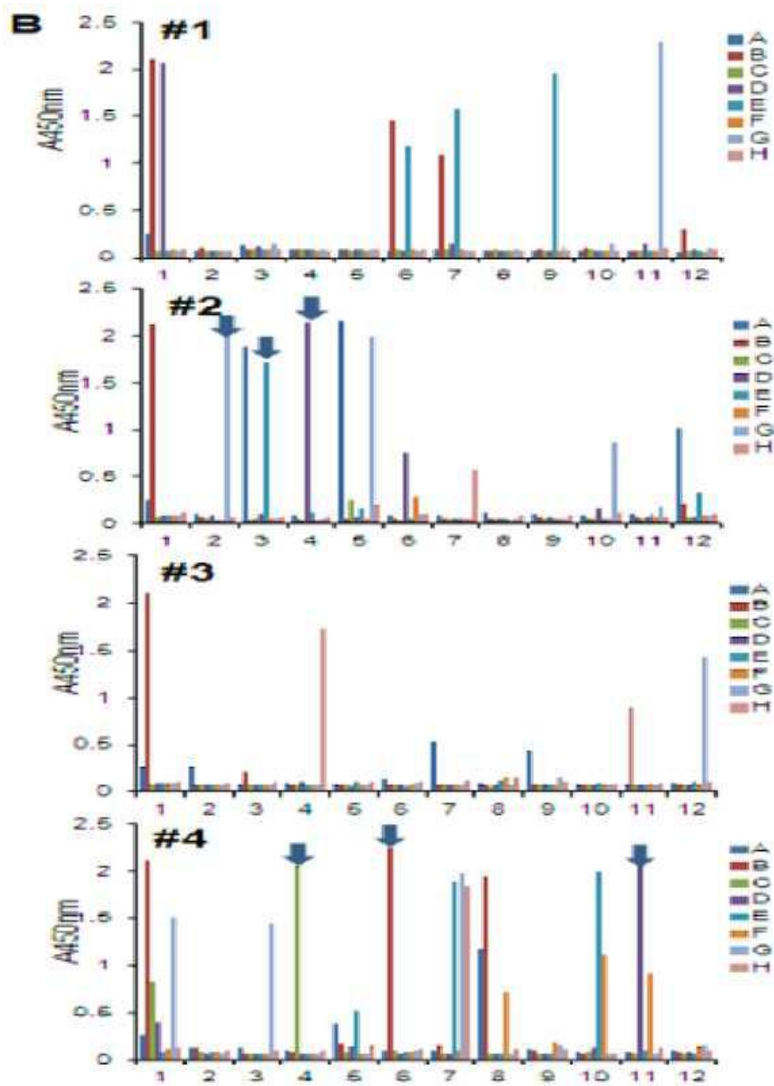
수탁일자 : 20130218

도면

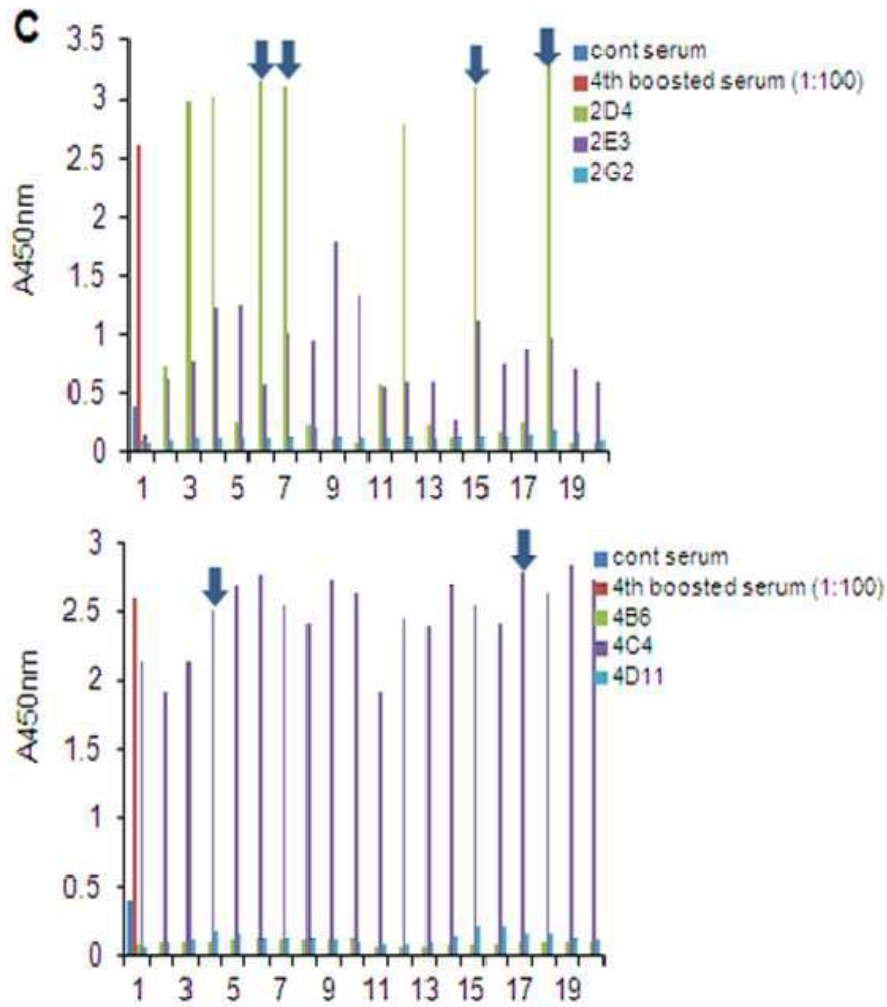
도면1a



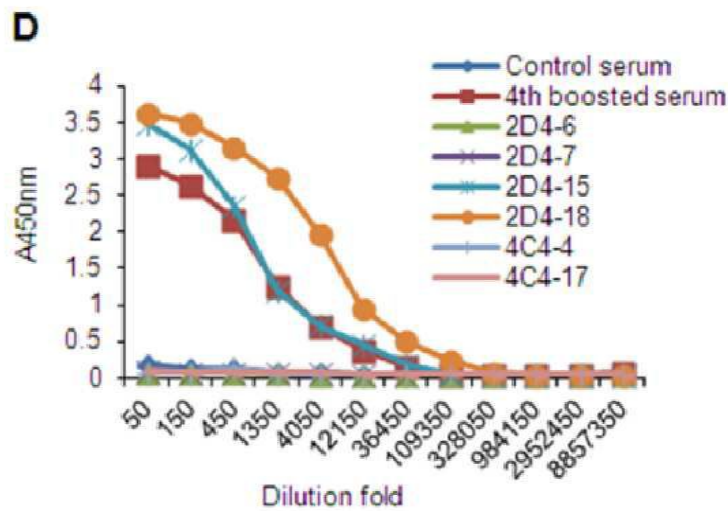
도면1b



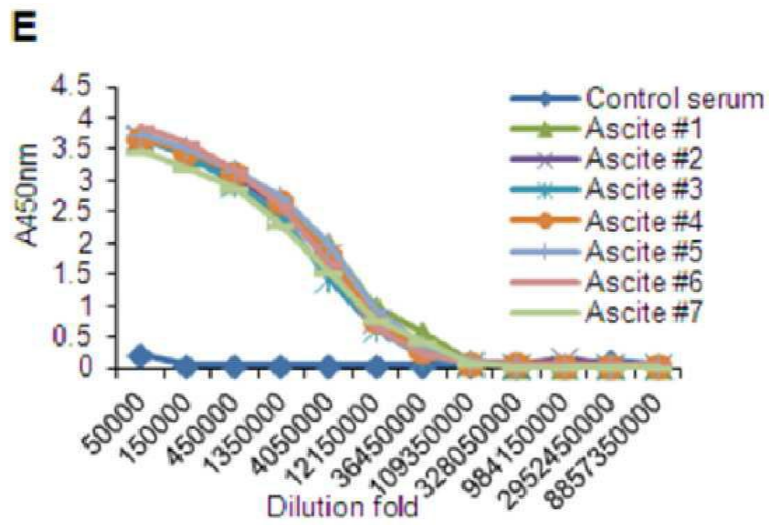
도면1c



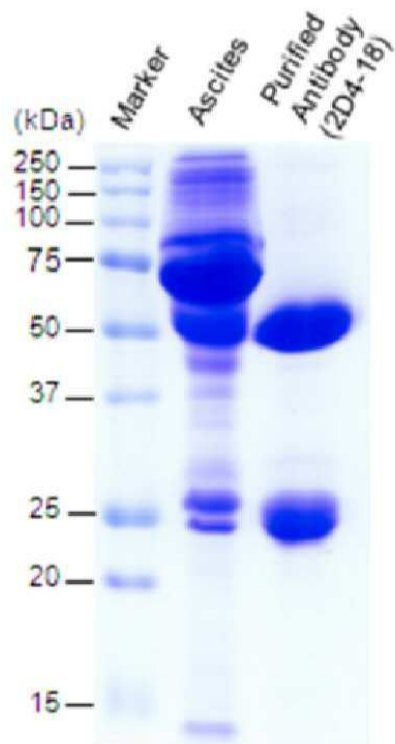
도면1d



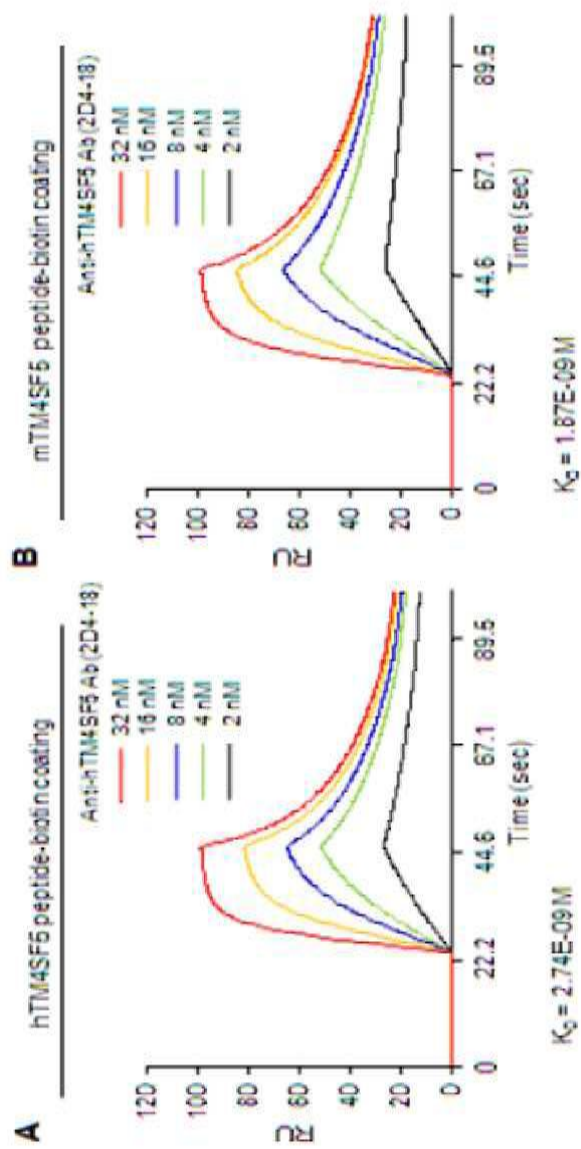
도면1e



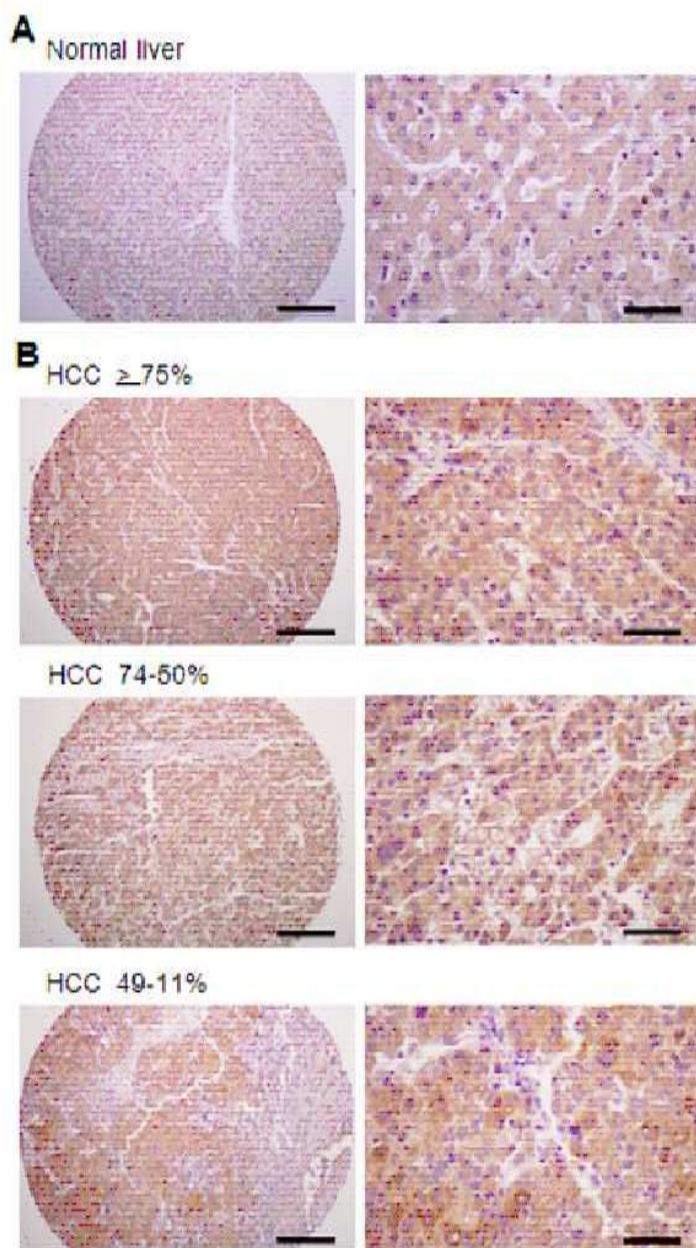
도면2



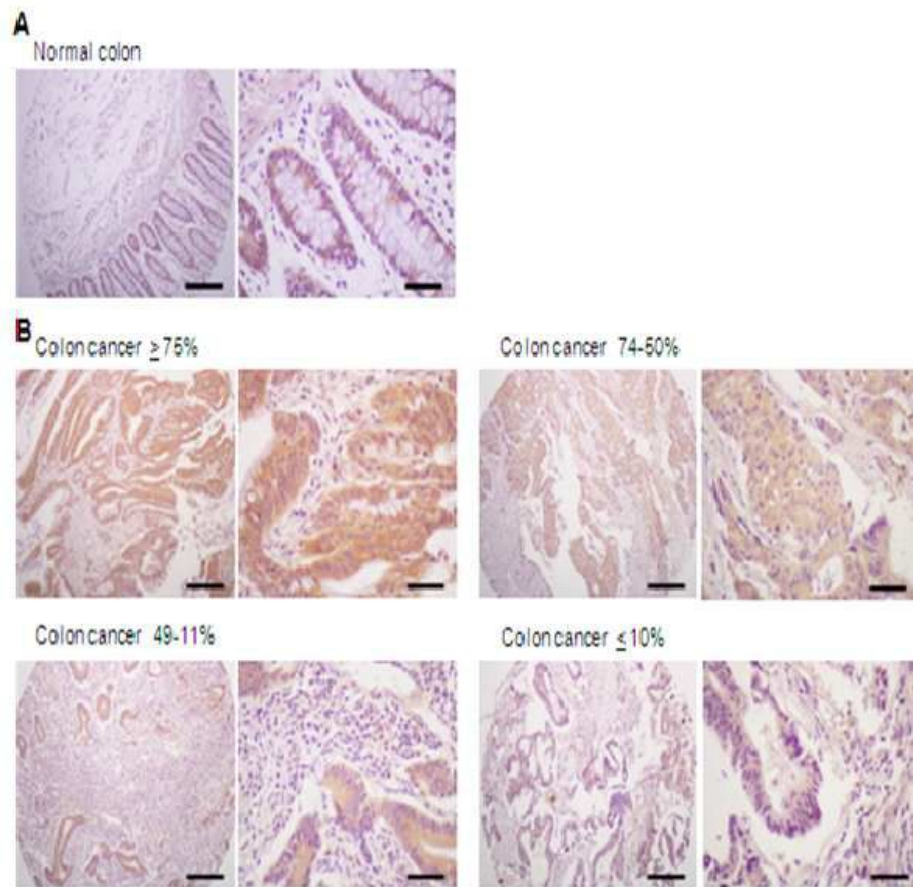
도면3



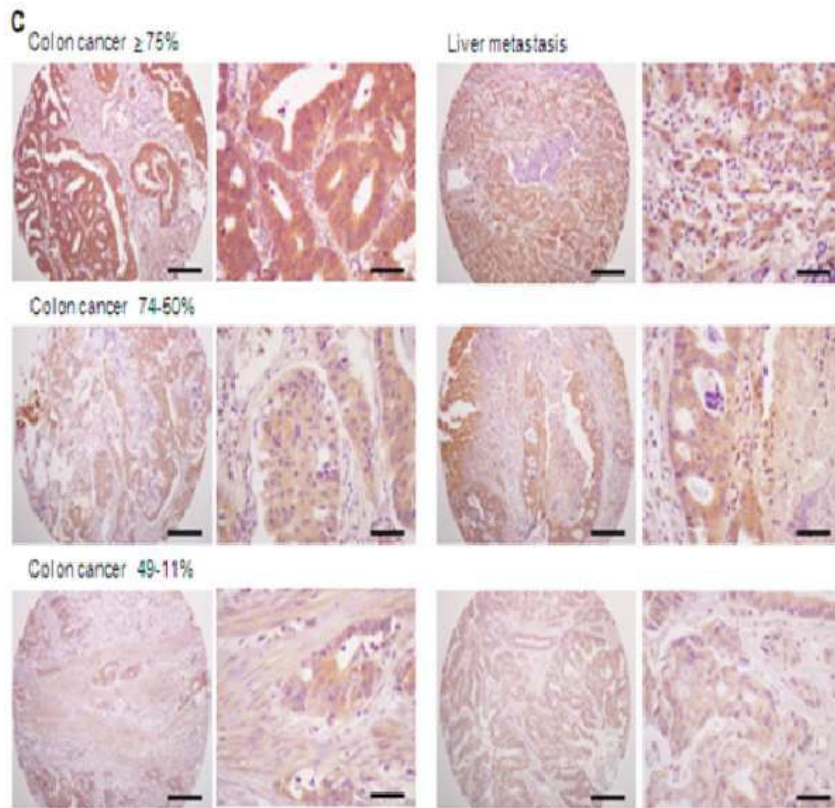
도면4



도면5a



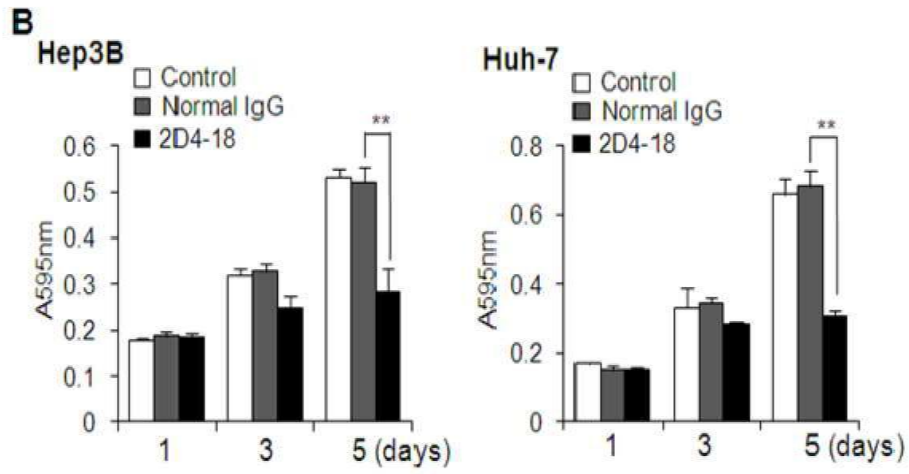
도면5b



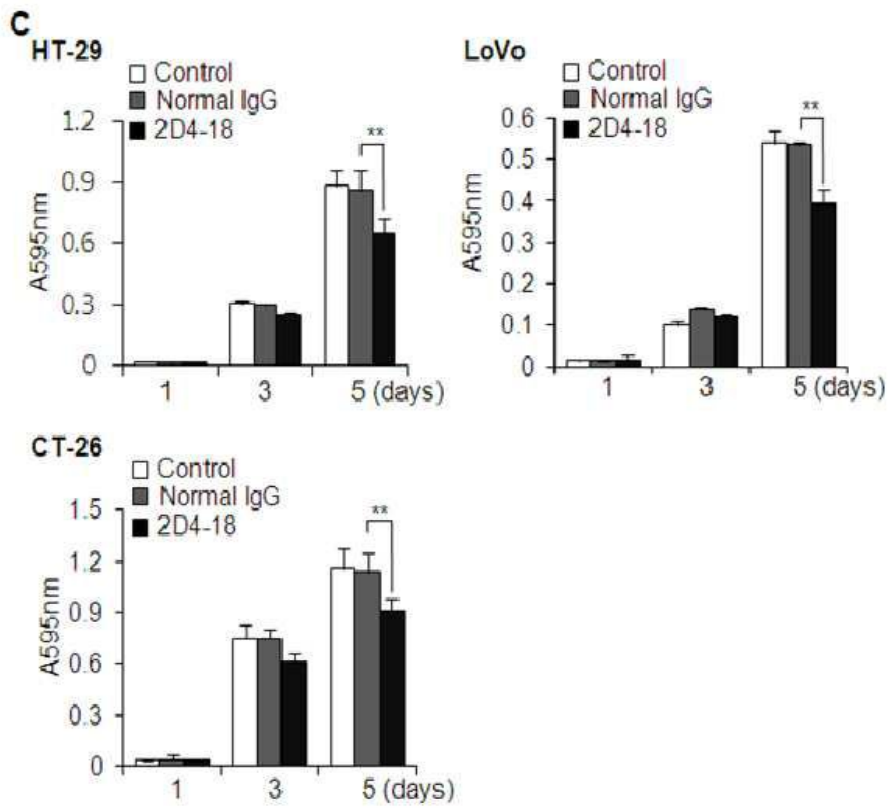
도면6a



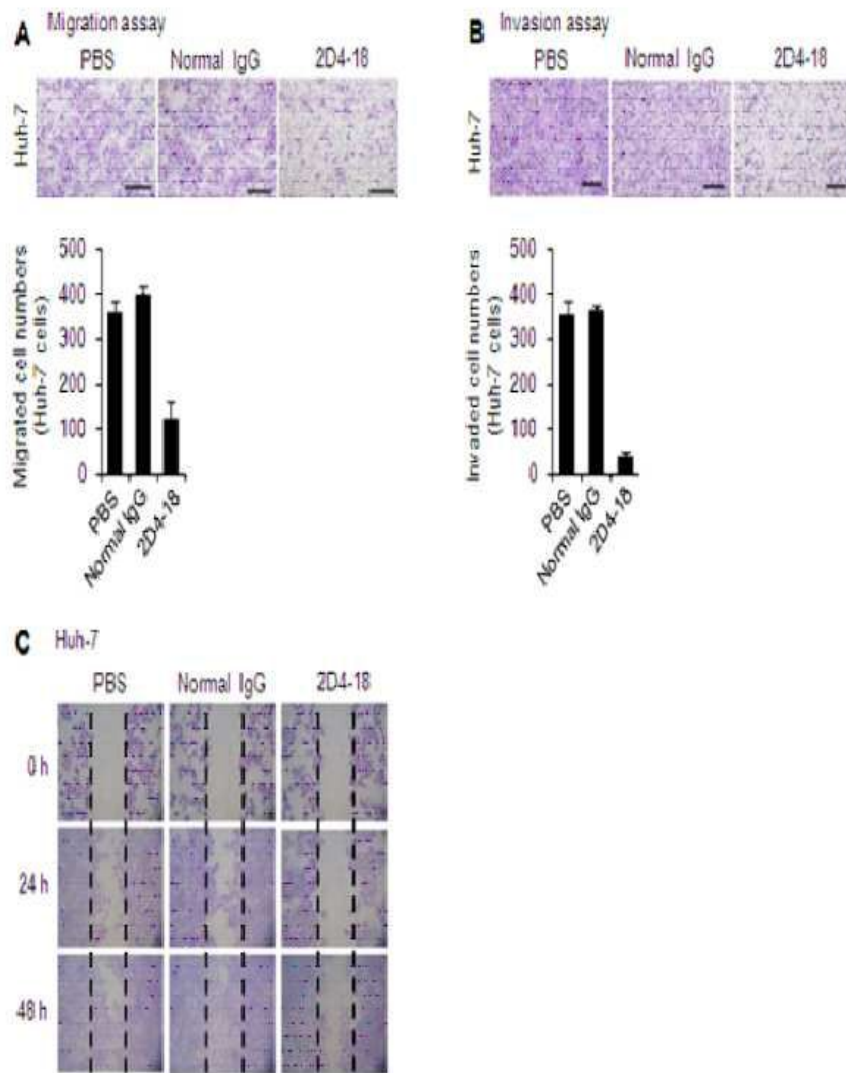
도면6b



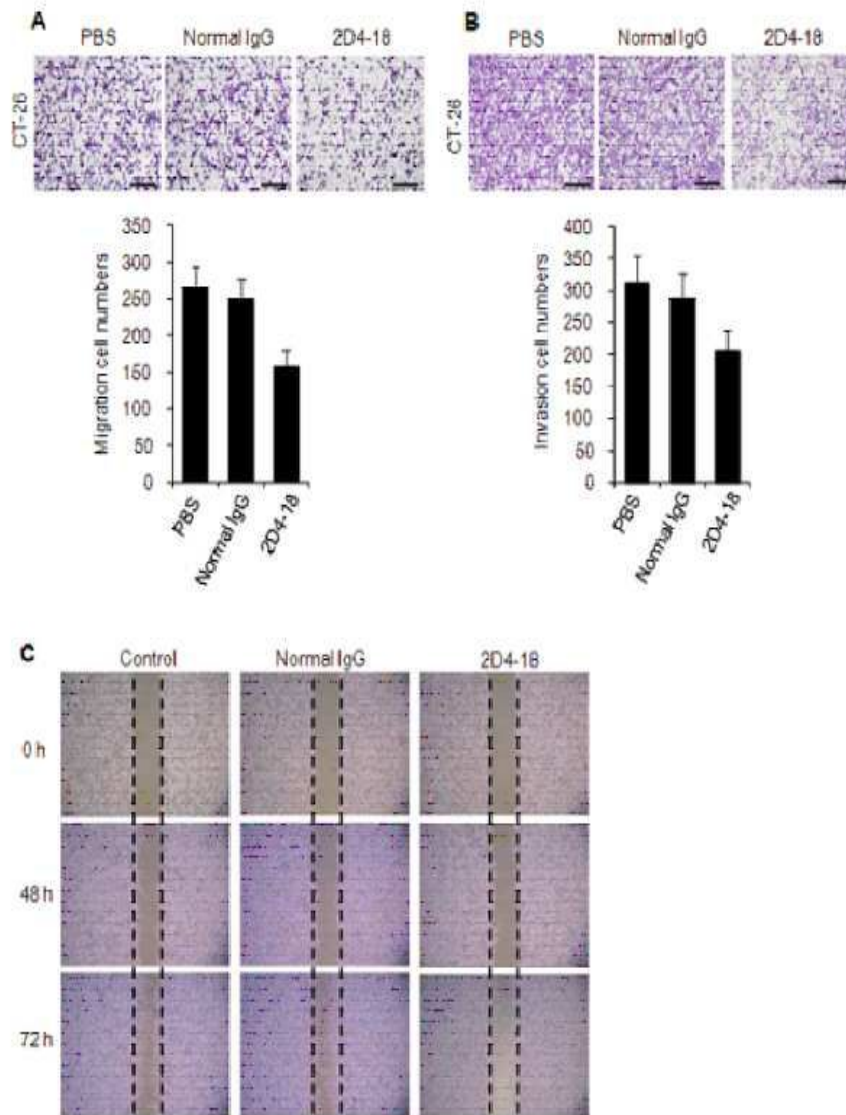
도면6c



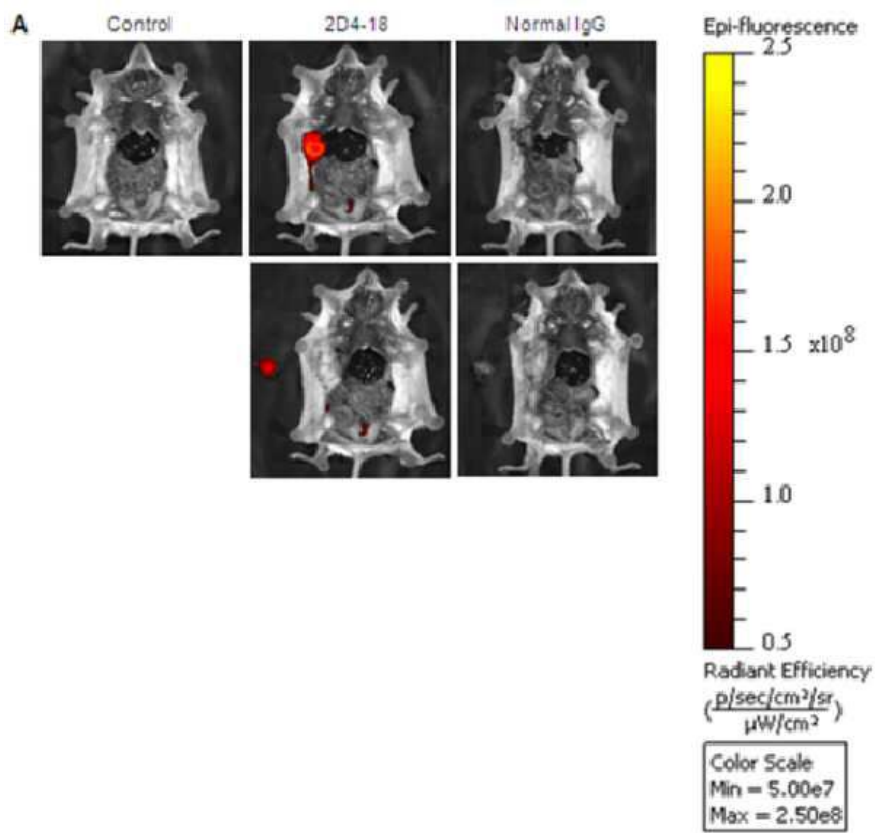
도면7



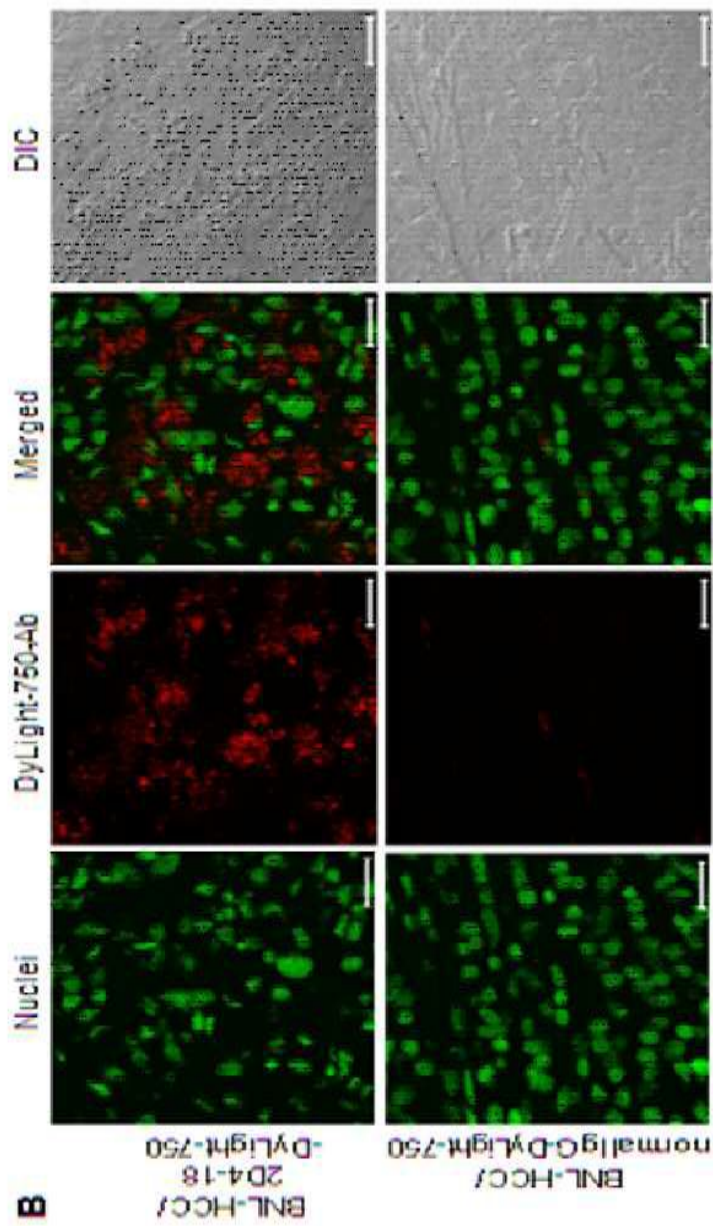
도면8



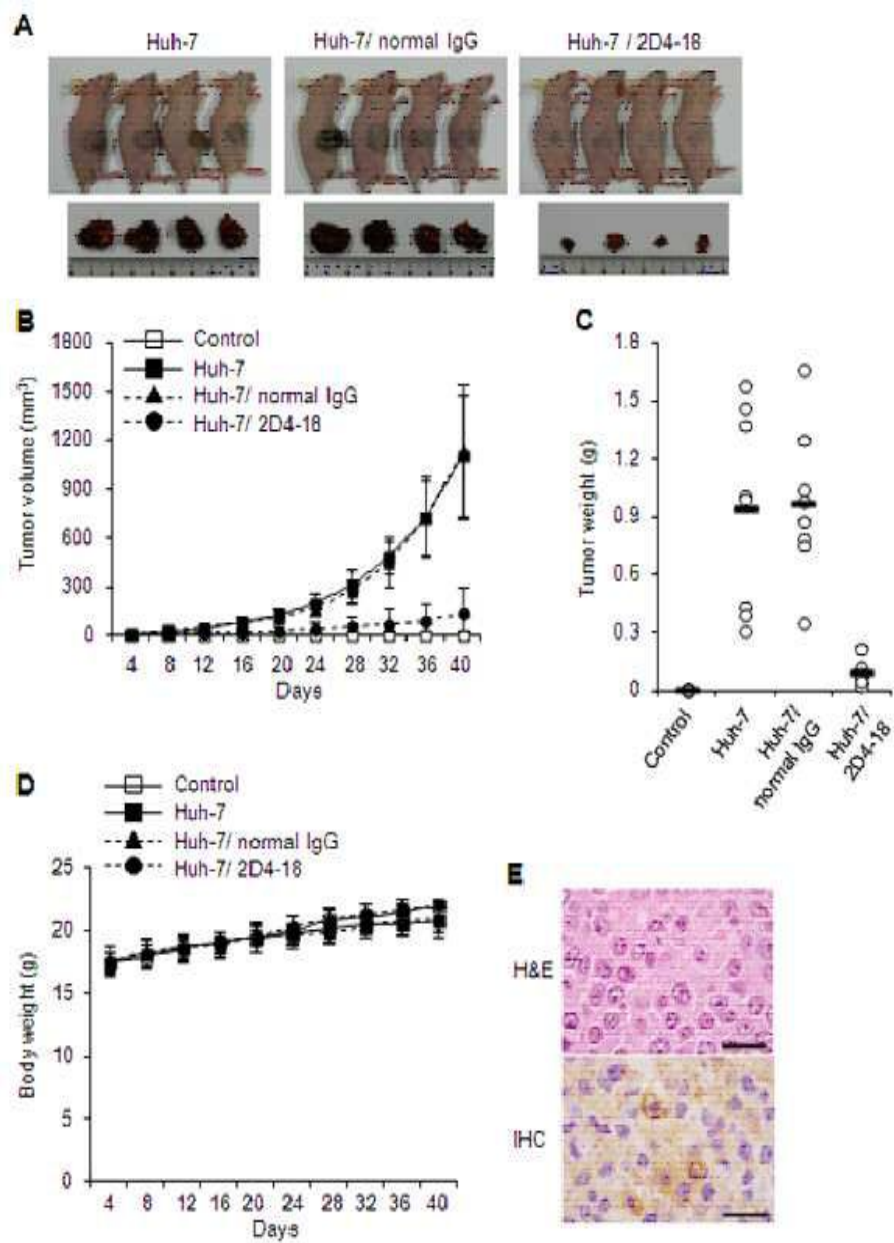
도면9a



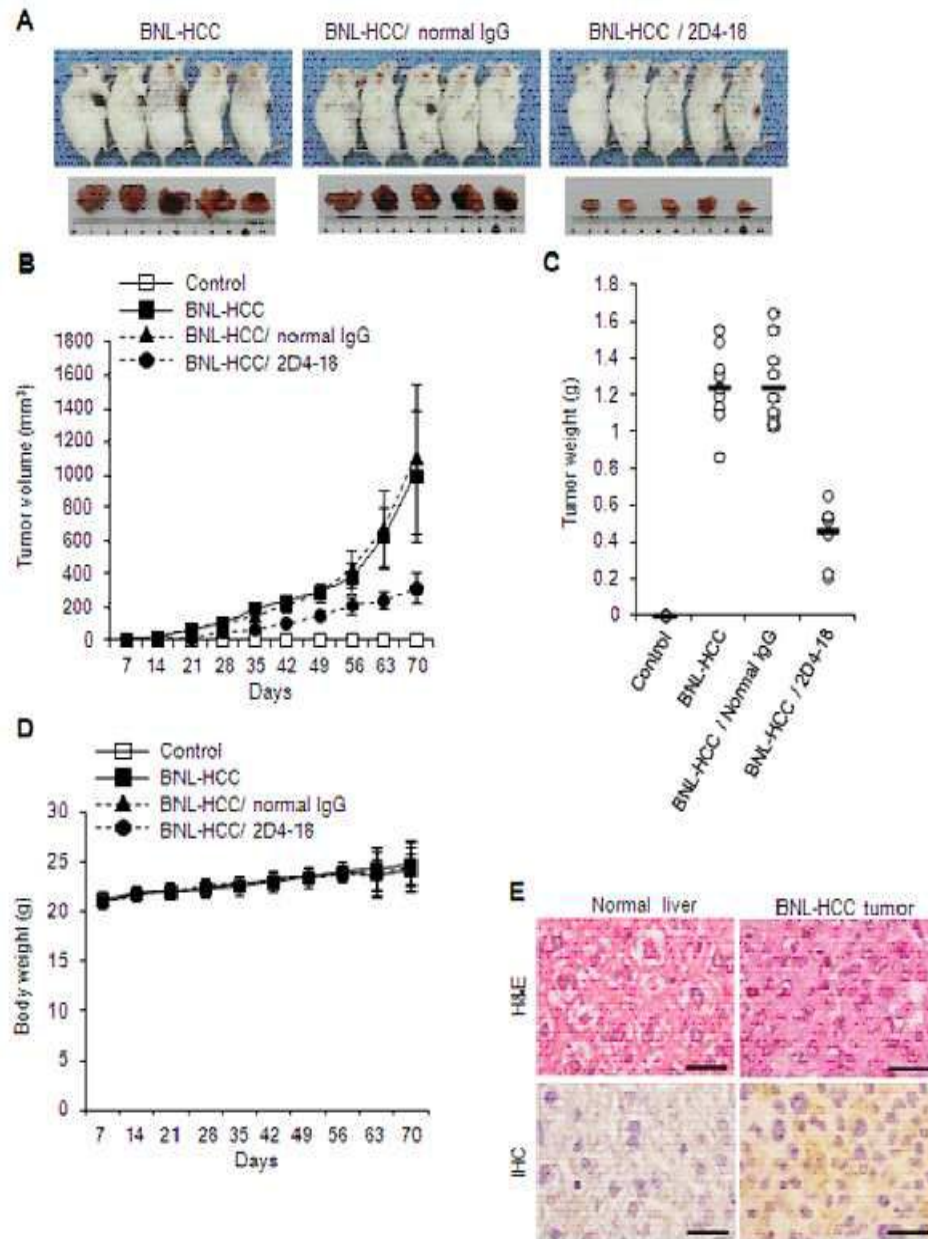
도면9b



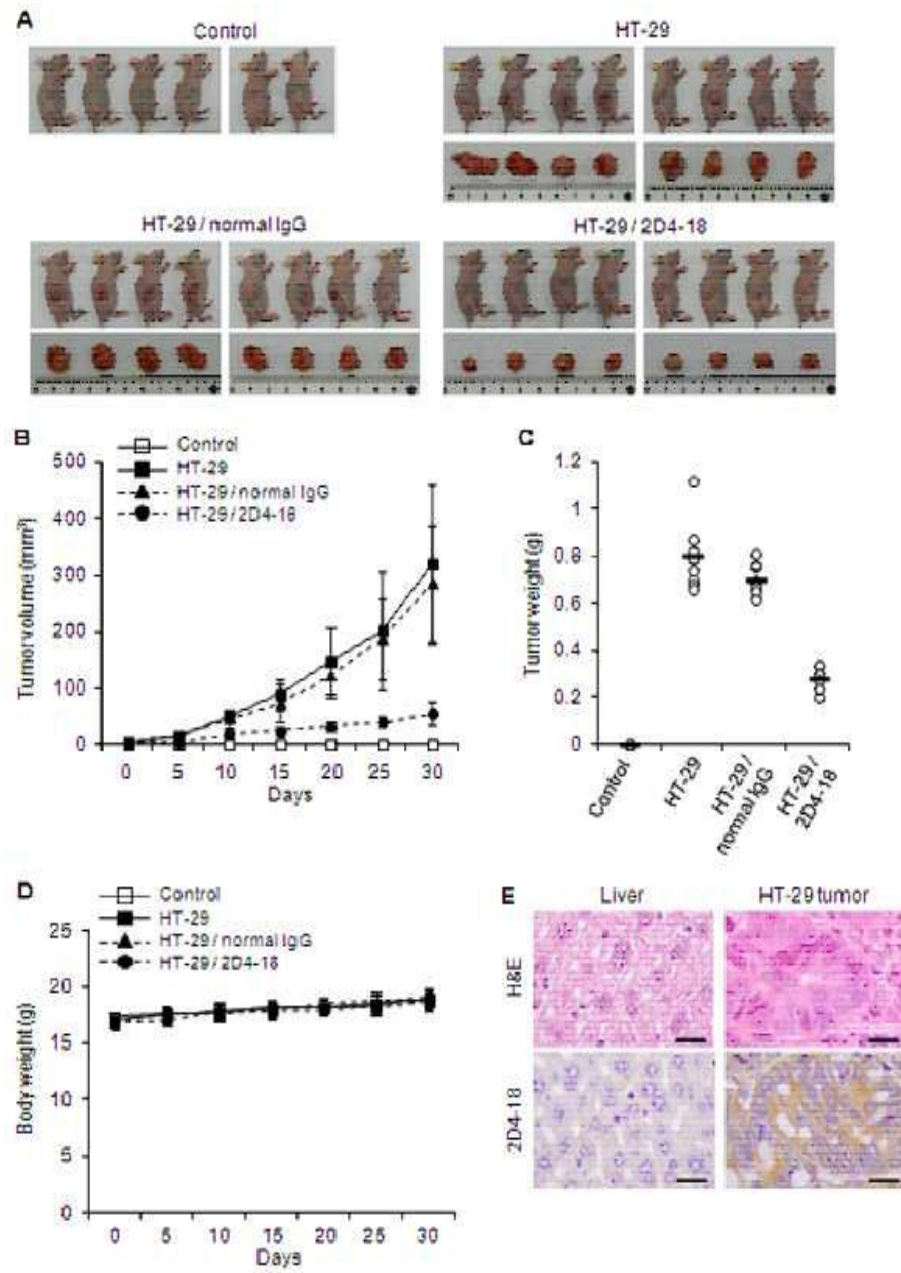
도면10



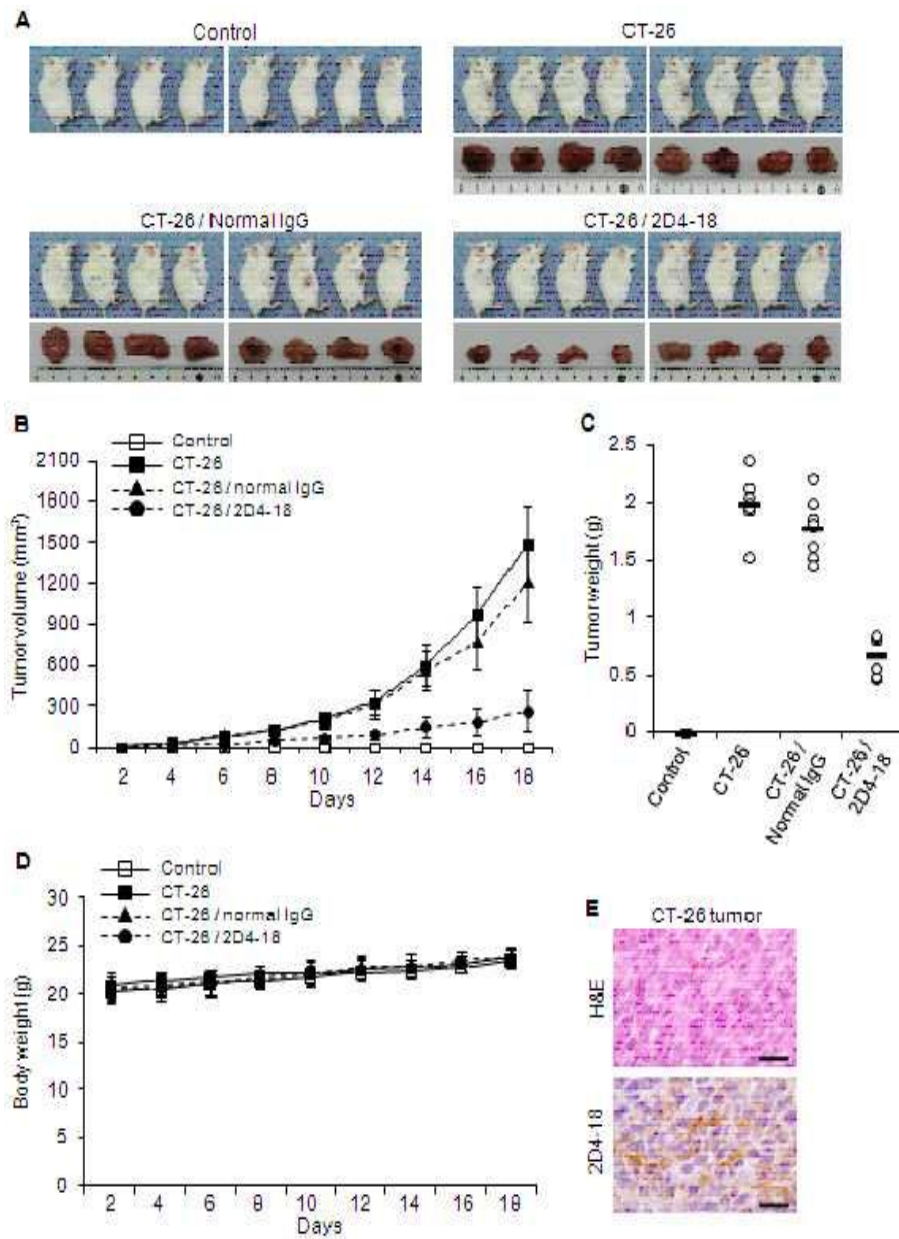
도면11



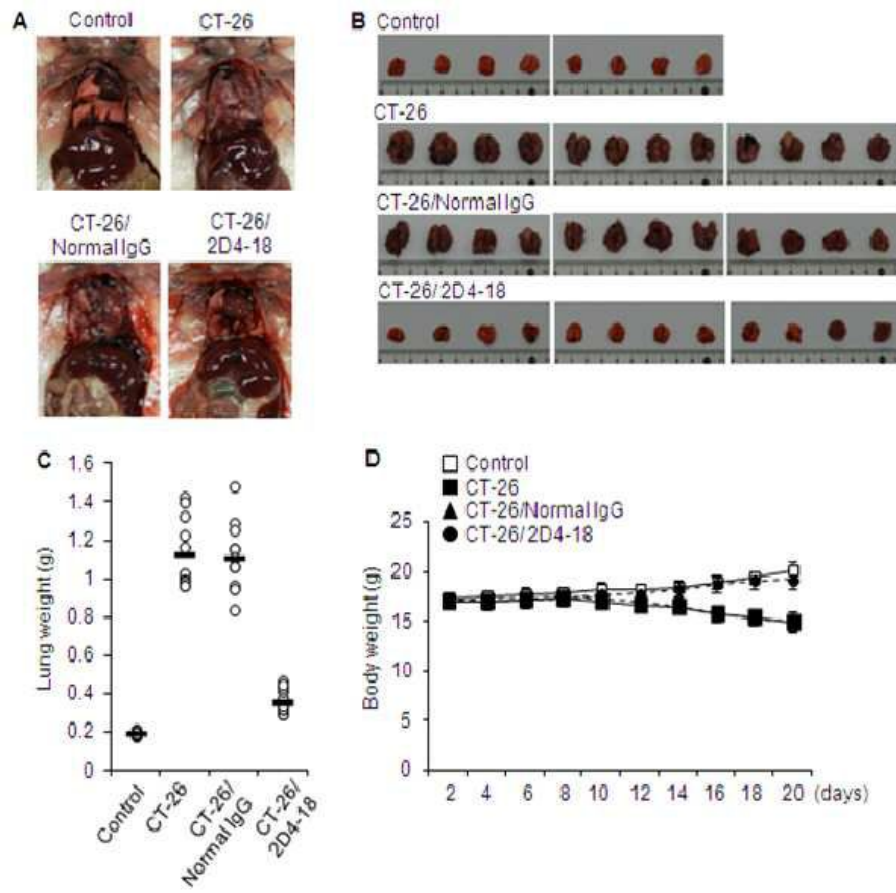
도면12



도면13



도면14



도면15

A

2D4-18 variable domain of heavy chain (V_H)

```

gggagacttagtgaagcctggagggtccctgaaaactctcctgtgcagcctctggattcact
G D L V K P G G S L K L S C A A S G F T
ttcagtagctatggcatgtcttgggttcgccagactccagacaagaggctggagtgggtc
F S S Y G M S W V R Q T P D K R L E W V
gaaaccattagtagtggtggtggttacacctactatccagacagtggtgaaggggogatto
A T I S S G G G Y T Y Y P D S V K G R F
accatctccagagacaatgccaagaacacctgtacctgcaaatgcgcagttotgaagtct
T I S R D N A K N T L Y L Q M R S L K S
gaggacacagccatgtattactgtgcaagacatgagggtttacgacgtactactttgac
E D T A M Y Y C A R H E G F T T Y Y F D
tactggggccaaggcaccactctcacagttctcctcag
Y W G Q G T T L T V S S

```

B

2D4-18 variable domain of light chain kappa (V_L)

```

ctctccctgcctgtcagttctggagatcaagcctccatctcttgcagatctagtcagagc
L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S
attttacatagttctggaaacacctatttagaatggtacctgcagaaaccaggccagttct
I L H S S G N T Y L E W Y L Q K P G Q S
ccaaagctcctgatctacaaagtttccaaacgattttctgggtcccagacaggttcagt
P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S
ggcagtggtatcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtgagggtgaggatctg
G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L
ggagttttattactgctttcaaggttcacatgttccattcacgttcgggtcggggacaaag
G V Y Y C F Q G S H V P F T F G S G T K
ttggaaataaaaacggg
L E I K R

```

도면16

A

2D4-18(1) variable domain of heavy chain (V_H)

cagggtccagctggagcagtcctgg
Q V Q L E Q S G

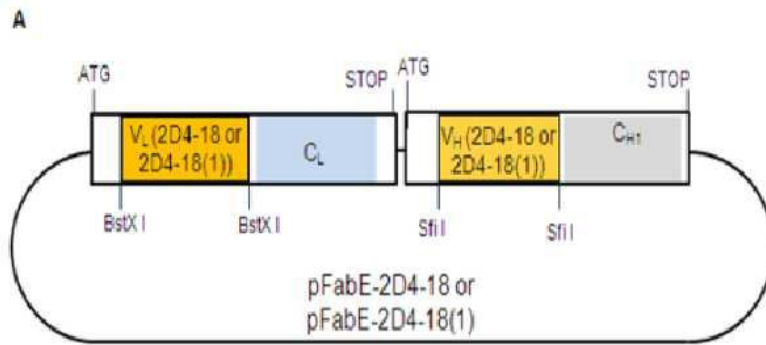
gggagacttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcagcctctggattcact
G D L V K P G G S L K L S C A A S G F T
ttcagtagctatggcatgtcttgggttcg ccagactccagacaagaggctggagtggttc
F S S Y G M S W V R Q T P D K R L E W V
gcaaccattagtagtggtggtggttacacctactatccagacagtggtgaaggggcgattc
A T I S S G G G Y T Y Y P D S V K G R F
accatctccagagacaatgccaagaacacccctgtacctgcaaatgogcagtcctgaagtct
T I S R D N A K N T L Y L Q M R S L K S
gaggacacagccatgtattactgtgcaagacatgagggctttacgaogtaactactttgac
E D T A M Y Y C A R H E G F T T Y Y F D
tactgggggccaaggcaccactctccagtcctcag
Y W G Q G T T L T V S S

B

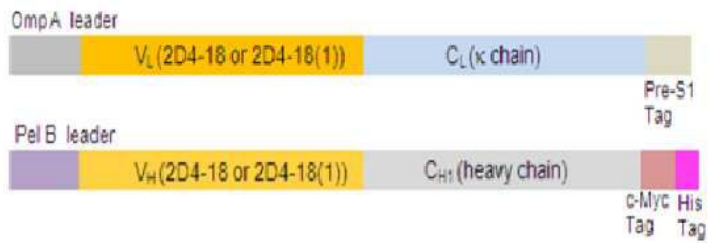
2D4-18(1) variable domain of light chain kappa (V_L)

gatattgtgatgacccagtcctcca
D I V M T Q S P
ctctccctgcctgtcagtccttggagatcaagcctccatctcttgcagatctagtcagagc
L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S
attttacatagttotggaaaacacctatttagaatggtaacctgcagaaaaccaggccagtc
I L H S S G N T Y L E W Y L Q K P G Q S
ccaaagctcctgatctacaaagtttccaaacogattttotgggggtcccagacaggttcagtc
P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S
ggcagtggtatcagggacagattttcacactcaagatcagcagagtgagggtgaggatctg
G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L
ggagttttattactgctttccagggttcacatgtttccattccagttcggtctgggggacaaag
G V Y Y C F Q G S H V P F T F G S G T K
ttggaaataaaaacggg
L E I K R

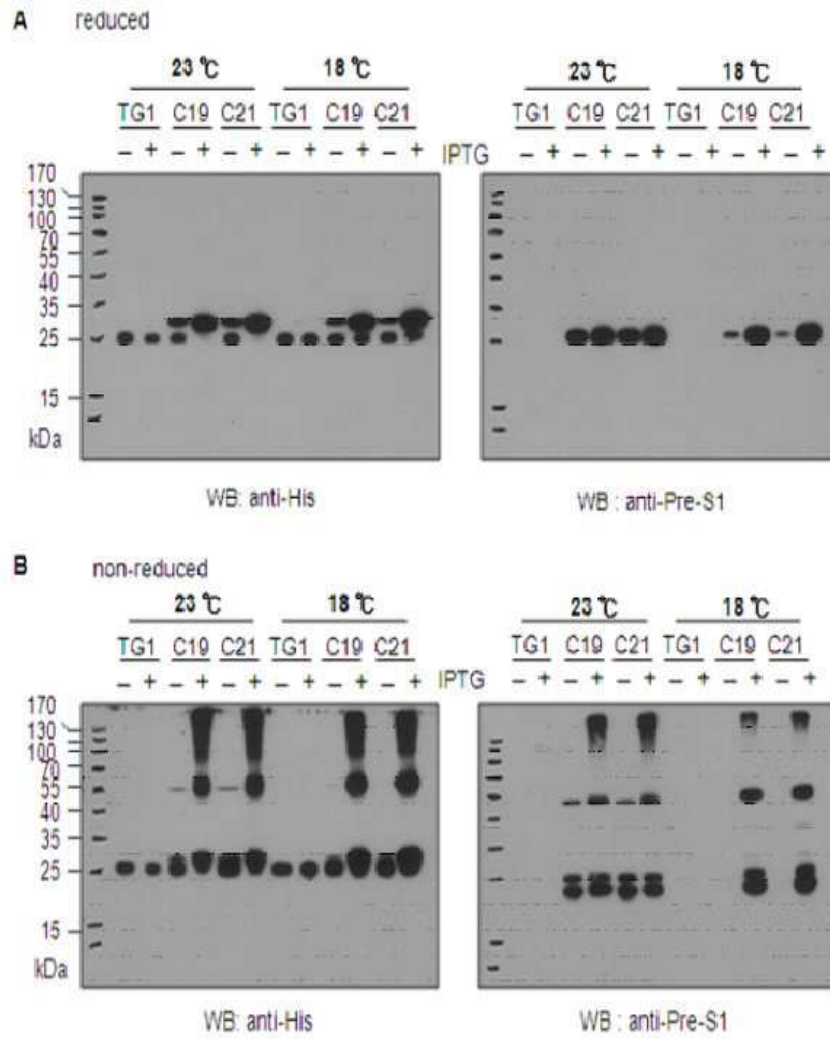
도면17



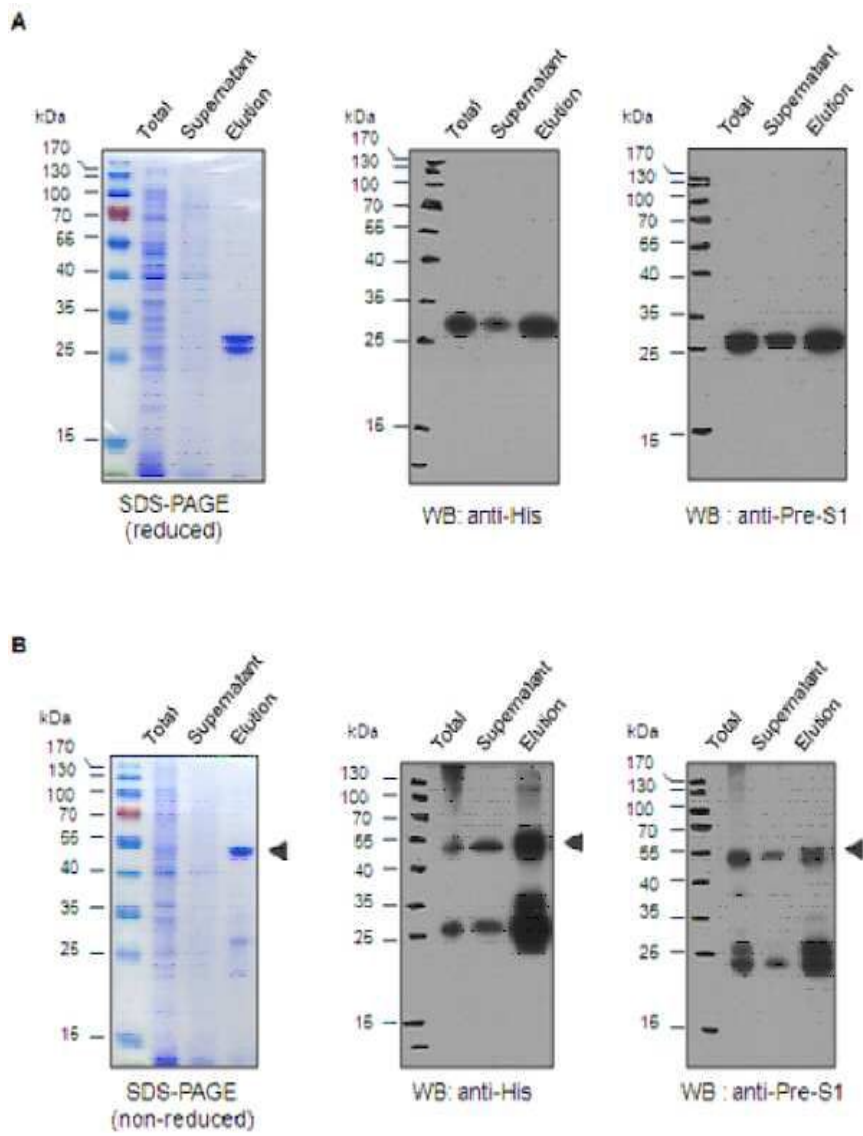
B



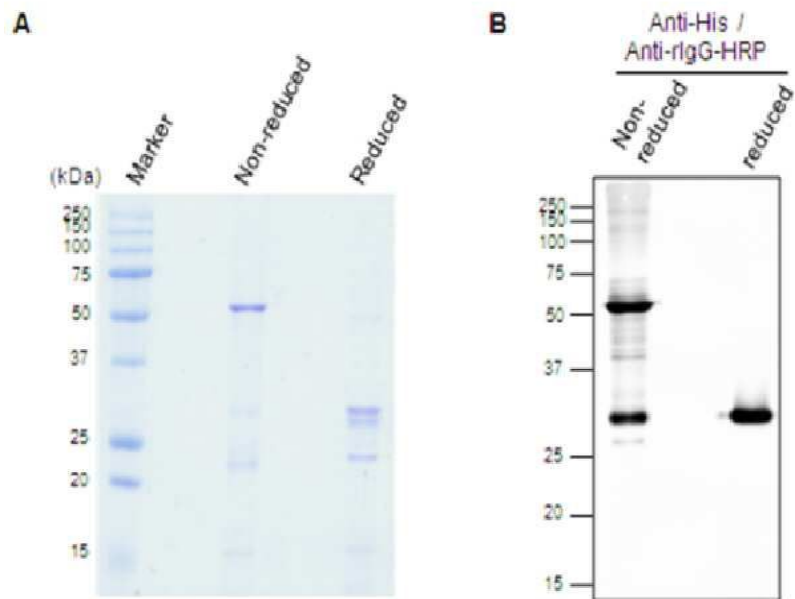
도면18



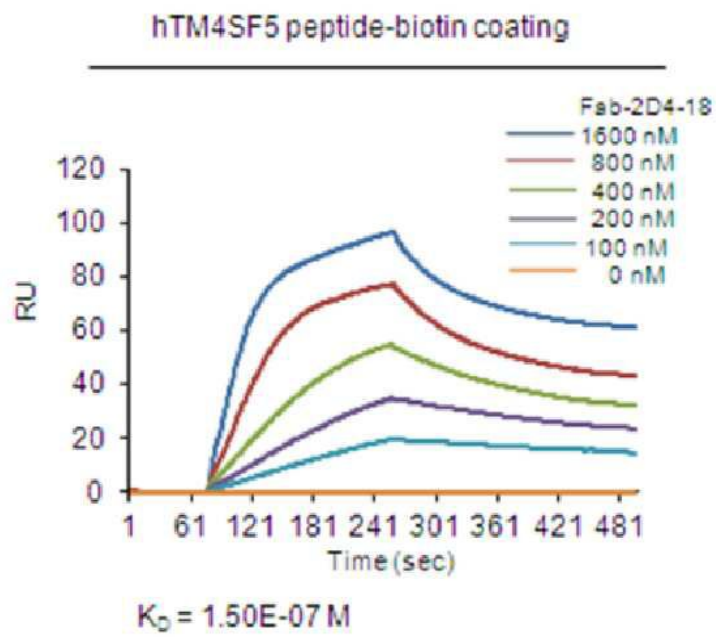
도면19



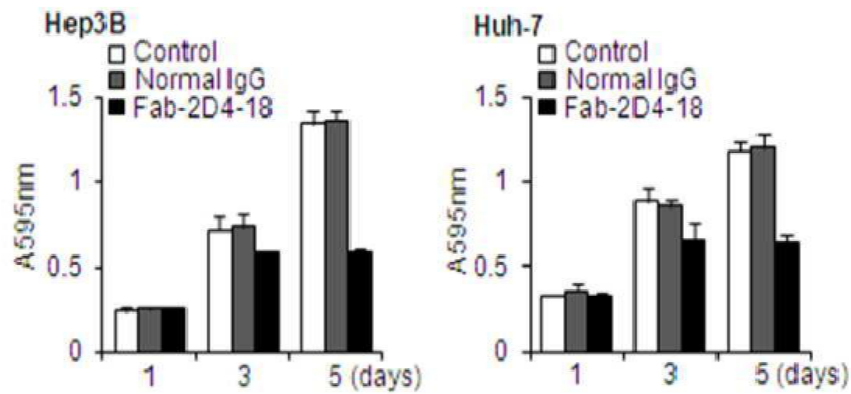
도면20



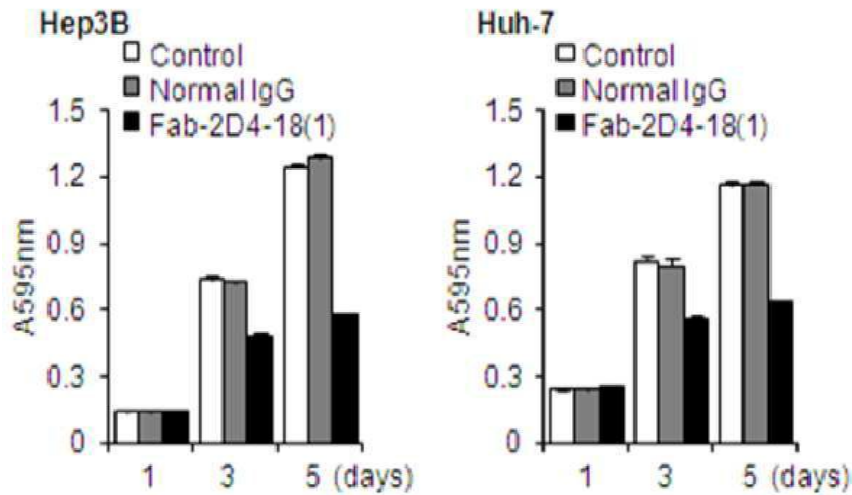
도면21



도면22



도면23



서열목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation Hallym University
- <120> Antibodies against TM4SF5 and Anticancer compositions comprising the same
- <130> PI150023
- <150> KR10-2013-0020547
- <151> 2013-02-26
- <160> 32
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for mouse GAPDH

<400> 1

atgggtgaagg tcggtgtgaa cg

22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for mouse GAPDH

<400> 2

gttgtcatgg atgatcttgg cc

22

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for mouse TM4SF5

<400> 3

cgcttacttg cgaaatgaca

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for mouse TM4SF5

<400> 4

tttcctgcaa tcgccacaca

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for human beta-actin

<400> 5

gggtcagaag gattcctatg

20

<210> 6

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for human beta-actin
 <400> 6
 ccttaatgtc acgcacgatt t 21

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for human TM4SF5
 <400> 7
 agcttgcaag tctggctcat 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for human TM4SF5
 <400> 8
 gctggatccc acacagtact 20

<210> 9
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IGG2A primer
 <400> 9
 ggaagatctc ttgaccaggc atcctagagt ca 32

<210> 10
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5'MH2 primer
 <400> 10

cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg	35
<210> 11	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 3'Kc primer	
<400> 11	
ggtgcatgcg gatacagttg gtgcagcatc	30
<210> 12	
<211> 32	
<212>	
> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 5'Mk primer	
<400> 12	
gggagctcga yattgtgmts acmcarwctm ca	32
<210> 13	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer for VH	
<400> 13	
ggcccagccg gccatggccc aggtccagct ggagcag	37
<210> 14	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer for VH	
<400> 14	
ggccgtgctg gccgaggaga ctgtgagagt	30
<210> 15	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> forward primer for VH(1)
 <400> 15
 ggcccagccg gccatggcgg ggagacttag tgaagcc 37
 <210> 16
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for VL
 <400> 16
 ccattgcagt ggcactggct ggtttcgcta ccgtagcaca ggcagccgat attgtgatga 60
 cccag 65
 <210> 17
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for VL
 <400> 17
 ccaccgtact ggcccgtttt atttcaa 28
 <210> 18
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for VL(1)
 <400> 18
 ccattgcagt ggcactggct ggtttcgcta ccgtagcaca ggcagccctc tccctgcctg 60
 60
 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDRH1
 <400> 19
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH2

<400> 20

Ile Ser Ser Gly Gly Gly Tyr Thr

1 5

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH3

<400> 21

Ala Arg His Glu Gly Phe Thr Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL1

<400> 22

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL2

<400> 23

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 24

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDRL3
 <400> 24

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr

1 5

<210> 25

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variable domain of heavy chain

<400> 25

Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala

1 5 10 15

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr

20 25 30

Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly

35 40 45

Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg

50 55 60

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Arg Ser Leu Lys Ser

65 70 75 80

Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Glu Gly Phe Thr Thr

85 90 95

Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 26

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variable domain of light chain

<400> 26

Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg

1 5 10 15

Ser Ser Gln Ser Ile Leu His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp

20 25 30

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

35 40 45

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu

65 70 75 80

Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly

85 90 95

Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 27

<211> 338

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> variable domain of heavy chain

<400>

27

gggagactta gtgaagcctg gagggtcct gaaactctcc tgtgcagcct ctggattcac 60

tttcagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca gacaagaggc tggagtgggt 120

cgcaaccatt agtagtggtg gtggttacac ctactatcca gacagtgtga aggggcgatt 180

caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg caaatgcgca gtctgaagtc 240

tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag acatgagggc tttagcacgt actactttga 300

ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctcag 338

<210> 28

<211> 316

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> variable domain of light chain

<400> 28

ctctccctgc ctgtcagtc tggagatcaa gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc	60
attttacata gttctggaaa cacctattta gaatggtacc tgcagaaacc aggccagtc	120
ccaaagctcc tgaictacaa agtttccaac cgattttctg gggicccaga caggttcagt	180
ggcagtgat caggacaga tttcacactc aagatcagca gaggaggc tgaggatctg	240
ggagtttatt actgctttca aggttcacat gttccattca cgttcggctc ggggacaaag	300
ttggaaataa aacggg	316

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variable domain of heavy chain (1)

<400> 29

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

<210> 30

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variable domain of light chain (1)

<400> 30

Asp Ile 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 Ile Leu His Ser

20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu 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 Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95

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

100 105 110

Arg

<210> 31

<211> 361

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> variable domain of heavy chain (1)

<400> 31

caggctccagc tggagcagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtgggta cacctactat 180

ccagacagtg tgaaggggcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatgc gcagctctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagacatgag 300

ggctttacga cgtactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 360

g 361

<210> 32

<211> 340

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> variable domain of light chain (1)

<400> 32

gatattgtga tgaccagtc tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc	60
atctcttgca gatctagtca gagcatttta catagttctg gaaacaccta tttagaatgg	120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt	180
tctgggggcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc	240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcca	300
ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaacggg	340