



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월10일

(11) 등록번호 10-1510753

(24) 등록일자 2015년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/30 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7009345(분할)

(22) 출원일자(국제) 2007년06월07일

심사청구일자 2014년04월09일

(85) 번역문제출일자 2014년04월09일

(65) 공개번호 10-2014-0047176

(43) 공개일자 2014년04월21일

(62) 원출원 특허 10-2008-7029660

원출원일자(국제) 2007년06월07일

심사청구일자 2012년06월07일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/013587

(87) 국제공개번호 WO 2007/146172

국제공개일자 2007년12월21일

(30) 우선권주장

60/811,850 2006년06월07일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Tumor Biology, 1997, Vol.18, pp.175-187.

(73) 특허권자

바이오올라이언스 씨.브이.

네덜란드 암스텔담 1077 즈엑스 스트라빈스키관 3105

(72) 발명자

린, 룡-화

미국 캘리포니아 94022 로스 알토스 # 9 그리핀 로드 150

린, 리웬

대만 112 타이페이 페이토우 시-파이 로드 섹션 2 넘버 319 9에프

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

송봉식, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 28 항

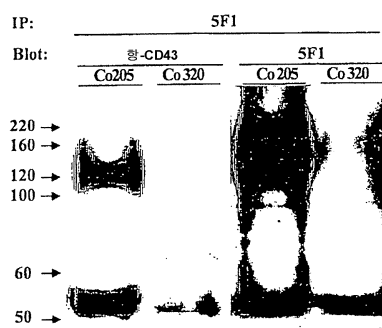
심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 암세포 상에서 발현되는 CD-43 및 CEA 상의 에피토프를 함유하는 탄수화물을 인식하는 항체 및 이를 이용하는 방법

(57) 요약

본 발명은 비조혈성 암세포 상에서 발현하는 CD43 및 CEA 상의 에피토프에 특이적으로 결합하나, 백혈구 또는 Jurkat 세포에 의하여 발현되는 CD43에 특이적으로 결합하지 않는 신규의 항체를 제공하며, 이는 세포독소 결합 및 면역 효과기 기능의 부재하에 비조혈성 암세포의 세포 표면 상의 에피토프에 결합한 후 비조혈성 암세포의 세포자멸사를 유도할 수 있으며, 여기서 에피토프는 탄수화물 구조를 포함하고, 항체와 에피토프의 결합은 Le^a 구조, Le^a-락토오스 구조, LNDFH II 구조, 또는 LNT 구조를 포함하는 탄수화물에 의하여 억제된다. 이와 함께, 본 발명은 또한 본원의 항체의 진단 및 치료적 용도를 제공한다.

대표도



(72) 발명자

린, 시-야오

대만 114 타이페이 네이후 리산 스트리트 라인 105
넘버 1 7에프

리, 슈-후아

대만 타이페이 충-산 디스트릭트 치-후 로드 라인
120 넘버 9 6에프

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

개체 내 비조혈성 암 진단용 단클론성 항체로서,

단클론성 항체는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열로부터의 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열로부터의 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 단클론성 항체.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 항체는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열로부터의 중쇄 가변 영역 서열, 및 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열로부터의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단클론성 항체.

청구항 9

개체 내 비조혈성 암 진단용 단클론성 항체로서,

단클론성 항체는 SEQ ID NO:3의 아미노산 서열로부터의 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 서열, 및 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열로부터의 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단클론성 항체.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 항체는 SEQ ID NO:3의 아미노산 서열로부터의 중쇄 가변 영역 서열, 및 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열로부터의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단클론성 항체.

청구항 11

개체 내 비조혈성 암 진단용 단클론성 항체로서,

단클론성 항체는 SEQ ID NO:5의 아미노산 서열로부터의 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 서열, 및 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열로부터의 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단클

론성 항체.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 항체는 SEQ ID NO:5의 아미노산 서열로부터의 중쇄 가변 영역 서열, 및 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열로부터의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단클론성 항체.

청구항 13

개체 내 비조혈성 암 진단용 단클론성 항체로서,

항체는 SEQ ID NO:7의 아미노산 서열로부터의 중쇄 가변 영역 서열, 및 SEQ ID NO:8의 아미노산 서열로부터의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단클론성 항체.

청구항 14

제 7 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 비조혈성 암세포는 사람 직장결장암 세포, 사람 췌장암 세포, 사람 위암 세포, 사람 난소암 세포, 사람 식도암 세포, 또는 사람 자궁내막암 세포인 것을 특징으로 하는 단클론성 항체.

청구항 15

제 7 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 인간화 항체인 것을 특징으로 하는 단클론성 항체.

청구항 16

제 7 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 키메라 항체인 것을 특징으로 하는 단클론성 항체.

청구항 17

제 7 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 인간 항체인 것을 특징으로 하는 단클론성 항체.

청구항 18

제 7 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 표지(label)에 접합되어 있는 것을 특징으로 하는 단클론성 항체.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 라벨은 효소, 형광 분자, 화학발광 분자, 방사성 분자, 및 바이오틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단클론성 항체.

청구항 20

제 18 항에 있어서, 표지는 ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , 플루오레세인 이소토시아네이트(FITC), 로다민, 탄탄족 포스포르, 피코에리스린(PE), 홍당무 퍼옥시다아제, β -갈락토시다아제, 루시페라아제, 알카라인 포스파타아제, 글루코스 산화효소, 글루코스-6-포스페이트 디하이드로게나아제, 알콜 디하이드로게나아제, 말레이트 디하이드로게나아제, 페니실리나아제 및 루시페라아제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단클론성 항체.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

단클론성 항체를 포함하는 개체 내 비조혈성 암 진단용 키트로서,

단클론성 항체는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열로부터의 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열로부터의 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 28

제 27 항에 있어서, 항체는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열로부터의 중쇄 가변 영역 서열, 및 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열로부터의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 29

단클론성 항체를 포함하는 개체 내 비조혈성 암 진단용 키트로서,

단클론성 항체는 SEQ ID NO:3의 아미노산 서열로부터의 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 서열, 및 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열로부터의 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 30

제 29 항에 있어서, 항체는 SEQ ID NO:3의 아미노산 서열로부터의 중쇄 가변 영역 서열, 및 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열로부터의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 31

단클론성 항체를 포함하는 개체 내 비조혈성 암 진단용 키트로서,

단클론성 항체는 SEQ ID NO:5의 아미노산 서열로부터의 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 서열, 및 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열로부터의 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 32

제 31 항에 있어서, 항체는 SEQ ID NO:5의 아미노산 서열로부터의 중쇄 가변 영역 서열, 및 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열로부터의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 33

단클론성 항체를 포함하는 개체 내 비조혈성 암 진단용 키트로서,

항체는 SEQ ID NO:7의 아미노산 서열로부터의 중쇄 가변 영역 서열, 및 SEQ ID NO:8의 아미노산 서열로부터의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 34

제 27 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항에 있어서, 비조혈성 암세포는 사람 직장결장암 세포, 사람 췌장암 세포, 사람 위암 세포, 사람 난소암 세포, 사람 식도암 세포, 또는 사람 자궁내막암 세포인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 35

제 27 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 인간화 항체인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 36

제 27 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 키메라 항체인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 37

제 27 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 인간 항체인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 38

제 27 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 표지(label)에 접합되어 있는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 39

제 38 항에 있어서, 라벨은 효소, 형광 분자, 화학발광 분자, 방사성 분자, 및 바이오틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 40

제 38 항에 있어서, 표지는 ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , 플루오레세인 이소토시아네이트(FITC), 로다민, 란탄족 포스포르, 피코에리스린(PE), 홍당무 퍼옥시다아제, β -갈락토시다아제, 루시페라아제, 알카라인 포스파타아제, 글루코스 산화효소, 글루코스-6-포스페이트 디하이드로게나아제, 알콜 디하이드로게나아제, 말레이트 디하이드로게나아제, 페니실리나아제 및 루시페라아제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 비조혈성 종양 또는 암세포에서 발현되는 CD43 및 암배아 항원(CEA) 상의 에피토프를 함유하는 탄수화물을 인식하는 신규의 단클론성 항체에 관한 것이다. 이러한 항체는 세포독소 접합 및 면역 효과기 기능의 부재하에 이러한 비조혈성 종양 또는 암세포 내에서 세포 사멸(예컨대, 세포자멸사)을 유도하는 특성을 보유한다. 이러한 단클론성 항체는 진단제 및 치료제로서 유용하다.

배경 기술

[0002]

고도의 시알산화 분자인 CD43(시아로포린 또는 류코시아린)는 115,000 내지 135,000 범위의 분자량을 지닌 모든 T 세포 및 혈소판을 유도하는 대부분의 인간 백혈구 상에서 높은 수준으로 발현한다. CD43 발현은 X 염색체-유관 퇴행성 면역결핍 질환인 비스코트-올드리치 증후군을 보유한 남성의 T 세포 상에서 결함이 있다(Remold-O'Donnell et al. (1987) Blood 70(1):104-9; Remold-O'Donnell et al. (1984) J. Exp. Med. 159:1705-23).

[0003]

기능성 연구는 항-CD43 단클론성 항체는 말초 혈액 T 림프구의 증식(Mentzer et al. (1987) J. Exp. Med. 1:165 (5):1383-92; Park et al. (1991) Nature, 350:706-9)과 단핵구의 활성화(Nong et al. (1989) J. Exp. Med. 1:170(1):259-67)을 자극한다는 것을 입증하였다. 단클론성 항-CD43 항체 L11는 T 세포가 림프절 및 폐이러 판 HEV에 결합하는 것을 차단한다. 항체 L11는 혈액으로부터 조직화된 2차 림프 조직으로의 T 세포 관의유출을 억제한다(McEvoy et al. (1997) J. Exp. Med. 185:1493-8). CD43 분자를 인식하는 단클론성 항체는 고밀도로 CD34를 발현하는 직계 마커-음성 골수 조혈 전구 세포(HPCs)(Bazil et al. (1996) Blood, 87(4): 1272-81.) 및 인간 T-림프모구 세포(Brown et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:27686-95)의 세포자멸사를 유도한다. 최근의 연구는 추가적으로 CD43이 인간 T 세포 상에서 E-셀렉틴의 리간드로서 기능한다는 사실을 입증하였다(Matsumoto et al. (2005) J. Immunol. 175:8042-50; Fuhlbrigge et al. (2006) Blood, 107:1421-6).

[0004]

흥미롭게도, 과학자들은 특정 비조혈성 종양 세포, 특히 직장결장 선암종은 세포 표면 상에서 CD43 분자를 발현

한다는 것을 밝혀내었다(Santamaria et al. (1996) Cancer Research, 56:3526-9; Baeckstrom et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:13688-92; Baeckstrom et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:11503-9; Sikut et al. (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun. 238:612-6). 결장 암종 세포주 내에서 발현되는 CD43 상의 글리칸(COLO 205)는 백혈구 CD43의 것과 다르다는 것이 알려져 있다(Baekstrom et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:11503-9). CD43의 과다 발현이 종양 억제 단백질 p53의 활성을 유발하고(Kadaja et al. (2004) Oncogene 23:2523-30), 부분적으로 p65 전사 활성의 억제를 통하여 NF-kappaB 표적 유전자의 서브셋을 억제한다고 알려졌으나(Laos et al. (2006) Int. J. Oncol. 28:695-704), 결장 종양발생에 있어서의 CD43의 일반적인 역할을 나타내는 직접적인 증거가 여전히 부족하다. 비조혈성 종양 세포 치료제로서 기존의 항-CD43 항체의 사용은 종양 및 면역 T 세포 둘다에 대한 강한 결합에 기인하여 실용적이지 못하다. 비-조혈 종양 또는 암세포 상에서 발현되는 CD43에 특이적으로 결합하나, 백혈구 또는 조혈 기원의 다른 세포 상에서 발현되는 CD43에는 결합하지 않는 항체를 생성하는 수요가 남아 있다. 이러한 항체는 CD43 발현 비조혈성 암 치료를 위한 치료제로서 유용할 수 있다.

[0005]

CEA는 세포의 첨단 표면에 국소화되는 것으로 보이는 다양한 선 상피 조직(예컨대 위장관, 호흡관, 및 비뇨생식관)에서 일반적으로 발현된다(Hammarstrom, S. (1999) Semin. Cancer Biol. 9, 67-81.). 이러한 조직에서 발생하는 종양에서는, 혈액으로의 단백질의 분비와 함께 첨단 멤브레인 도메인에서 전체 세포 표면으로 확장되는 CEA 발현 수준이 증가된다(Hammarstrom, S. (1999) Semin. Cancer Biol. 9, 67-81.). CEA의 과다 발현은 직장 결장암, 췌장암, 폐암, 위암, 간세포 암종, 유방암, 및 갑상선암을 포함하는 많은 종류의 암에서 관찰된다. 따라서, CEA는 종양 마커로서 사용되어 왔으며, 암 환자 혈액 내의 증가된 CEA의 양을 측정하는 면역학적 분석법은 암의 예후 및 관리에 있어서 오랫동안 임상적으로 활용되어 왔다(Gold P, et al. (1965) J. Expl. Med. 122:467-81; Chevinsky, A. H. (1991) Semin. Surg. Oncol. 7, 162-166; Shively, J. E. et al., (1985) Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2, 355-399).

[0006]

더욱 중요한 것은, CEA는 표적화 요법을 위한 잠재적으로 유용한 종양-유관 항원이 되어 왔다는 것이다(Kuroki M, et al. (2002) Anticancer Res 22:4255-64). 암 면역요법용 표적으로 CEA를 사용하는 두 주요 전략이 개발되었다. 일 방법은 항-CEA 항체에 의하여 CEA-발현 종양 세포에 대한 자살 유전자(산화질소 합성효소(iNOS) 유전자)(Kuroki M. et al., (2000) Anticancer Res. 20(6A):4067-71) 또는 아이소토프(Wilkinson R W. et al., (2001) PNAS USA 98, 10256-60, Goldenberg, D. M. (1991) Am. J. Gastroenterol., 86: 1392-1403, Olafsen T. et al., Protein Engineering, Design & Selection, 17, 21-27, 2004)의 특이적 표적화이다. 이 방법은 치료제, 예컨대 약제, 독신, 방사선헌종, 면역조절제 또는 사이토카인과 결합된 항체 또는 항체 절편에 확장되었다. 다른 방법은 특히 CEA-발현 종양 세포를 제거하기 위하여 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC) 또는 보체-의존성 세포독성(CDC)을 통하여 면역학적 세포용해 활성을 사용하는 것이다(Imakiire T et al., (2004) Int. J. Cancer: 108, 564-570). 이러한 방법은 종종 전신성 부작용을 유발하는 사이토카인 방출을 유도한다.

[0007]

본원에 개시된 모든 참고자료, 문헌 및 특허 출원은 일체성을 지니고 참고자료로서 본원에 포함되어 있다.

발명의 내용

[0008]

발명의 개요

[0009]

본 발명의 일 특징으로, 본 발명은 비조혈성 암세포에 의하여 발현되는 CD43 및 CEA 상의 에피토프에 특이적으로 결합하나, 백혈구(예컨대, 인간 말초 T 세포) 또는 Jurkat 세포(림프모구 백혈병 세포)에 의하여 발현되는 CD43에는 특이적으로 결합하지 않는 신규의 항체를 제공한다. 항체에 결합하는 에피토프는 탄수화물을 포함한다. 이러한 항체는 항체에 대한 세포독소 결합 및 면역 효과기 기능의 부재하에 이러한 비조혈성 암세포 내에서 세포 사멸을 유도할 수 있다.

[0010]

본 발명은 비조혈성 암세포에 의하여 발현되는 CD43 및/또는 CEA 상의 에피토프에 특이적으로 결합하나, 백혈구 또는 Jurkat 세포에 의하여 발현되는 CD43에는 특이적으로 결합하지 못하며, 세포독소 결합 및 면역 효과기 기능의 부재하에 비조혈성 암세포의 세포 표면 상에서 발현되는 에피토프에 결합한 후 비조혈성 암세포의 세포사멸을 유도할 수 있는 항체를 제공하며, 여기서 에피토프는 탄수화물을 포함하고, 항체와 에피토프의 결합은 Le^a 구조, Le^a-락토오스 구조, LNDFH II 구조, 또는 LNT 구조를 포함하는 탄수화물에 의하여 억제된다. 본 발명의 일 실시상태에서, 항체에 결합하는 에피토프는 푸코오스 민감성이다.

[0011]

비조혈성 암세포는 직장결장 암 및 위 암을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0012]

본 발명의 일 실시상태에서, 본원의 항체는 단클론성 항체이다. 본 발명의 일 실시상태에서, 본원의 항체는 뮤

린, 인간, 인체적응형, 또는 키메라 항체이다.

- [0013] 본 발명의 일 실시상태에서, 비조혈성 암세포의 세포 표면에 발현되는 에피토프에 결합하는 본원의 항체는 암세포의 수를 감소시키거나, 및/또는 암세포의 성장 또는 증식을 억제한다. 예를 들어, 항체의 존재하에 세포수의 감소 또는 세포 성장의 억제는 항체의 부재하에 세포수의 감소 또는 세포 성장의 억제에 비하여 최소한 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 65%, 약 75%, 또는 그 이상이다.
- [0014] 본 발명의 일 실시상태에서, 본원의 항체는 비조혈성 암세포에 의하여 발현되는 CD43 및 CEA의 세포의 도메인 상의 입체구조 에피토프를 인식하며, 여기서, 입체구조 에피토프는 트리펩타이드, N'-Trp-Pro-Ile-C'에 의하여 형성된 구조와 동등한 물리 및 화학적 특성을 지닌 구조를 포함한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 본원의 항체는 폴리펩타이드의 N-말단에서 아미노산 서열 N'-Trp-Pro-Ile-C'를 포함하는 폴리펩타이드에 결합한다.
- [0015] 본 발명의 일 실시상태에서, 본원의 항체는 비조혈성 암세포의 세포 표면에 존재하는 에피토프에 결합하기 위하여, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁한다.
- [0016] 본 발명의 일 실시상태에서, 본원의 항체는 비조혈성 암세포의 세포 표면에 존재하는 에피토프에 결합하기 위하여, SEQ ID NO:3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁한다.
- [0017] 본 발명의 일 실시상태에서, 본원의 항체는 비조혈성 암세포의 세포 표면에 발현되는 에피토프에 결합하기 위하여 SEQ ID NO:5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁한다.
- [0018] 본 발명의 일 실시상태에서, 항체는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 항체는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0019] 본 발명의 일 실시상태에서, 항체는 SEQ ID NO:3의 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 항체는 SEQ ID NO:3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0020] 본 발명의 일 실시상태에서, 항체는 SEQ ID NO:5의 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 항체는 SEQ ID NO:5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0021] 본 발명의 일 실시상태에서, 항체는 SEQ ID NO:7의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 SEQ ID NO:8의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 인체적응형 항체이다.
- [0022] 본 발명의 다른 특징으로서, 본 발명은 중쇄 및/또는 경쇄, 또는 본원의 항체의 절편을 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다. 본 발명은 본원의 어떠한 항체에서 유도된 폴리펩타이드를 제공하며, 여기서 폴리펩타이드는 비조혈성 암세포에 의하여 발현되는 CD43 및 CEA 상의 에피토프에 특이적으로 결합하나, 백혈구 또는 Jurkat 세포에 의하여 발현되는 CD43에는 특이적으로 결합하지 않으며, 세포독소 접합 및 면역 효과기 기능의 부재하에 비조혈성 암세포의 세포 표면에 발현된 CD43에 결합한 후 비조혈성 암세포의 세포자멸사를 유도할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 특징으로서, 본 발명은 본원의 어떠한 항체 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 본 발명은 또한 본원의 어떠한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터(예컨대 발현 벡터)를 제공한다. 본 발명은 또한 본원의 어떠한 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0024] 본 발명의 다른 특징으로서, 본 발명은 본원의 어떠한 항체 또는 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시상태에서, 항체 또는 폴리펩타이드는 약제와 결합된다. 본 발명의 일 실시상태에서, 약제는 치료제(예컨대, 방사성 모이어티, 세포독소, 및 화학치료제)이다. 본 발명의 일 실시상태에서, 약제는 표지(예컨대, 효소, 형광 분자, 및 바이오틴)이다.
- [0025] 본 발명은 또한 본원의 어떠한 항체 또는 폴리펩타이드, 또는 항체 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레

오타이드의 유효량, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 일 실시 상태에서, 항체 또는 폴리펩타이드는 치료제에 결합된다. 본 발명의 일 실시 상태에서, 조성물은 복강내, 정맥, 피하, 및 근육내 주사, 및 다른 형태의 투여 예컨대 경구, 점막, 흡입 경로, 설하적 경로 등에 의한 투여용으로 제형화될 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 실시 상태에서, 조성물은 하나 이상의 본 발명의 항체, 또는 하나의 본 발명의 항체와 하나 이상의 다른 항-암 항체 또는 다른 항-암제를 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 다른 특징으로서, 본 발명은 항체 또는 폴리펩타이드의 생산을 가능하게 하는 조건하에서 이들의 숙주 세포 또는 자손을 배양하는 단계를 포함하는 본원의 항체 또는 폴리펩타이드의 생성 방법을 제공하며, 숙주 세포는 항체 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 발현 벡터를 포함한다. 본 발명의 일 실시 상태에서, 이 방법은 항체 또는 폴리펩타이드를 분리정제하는 단계를 추가로 포함한다.

[0028] 본 발명의 다른 특징으로서, 본 발명은 적합한 세포 내에서 (단일 경쇄 또는 중쇄로서 개별적으로 발현되거나, 또는 경쇄 및 중쇄 모두가 하나의 벡터로부터 발현되는) 항체를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드의 발현에 의하여 본원의 어떠한 항체를 생성하는 방법을 제공하며, 일반적으로 대상 항체 또는 폴리펩타이드를 회수하는 단계 및/또는 분리하는 단계를 포함한다.

[0029] 본 발명의 다른 특징으로서, 본 발명은 암세포와 본원의 항체 또는 폴리펩타이드가 접촉하는 단계를 포함하는, 세포 표면 상의 에피토프를 발현하는 비조혈성 암세포 내의 세포자멸사를 유도하는 방법을 제공한다. 본 발명의 일 실시 상태에서, 암세포는 개별적이다.

[0030] 본 발명의 다른 특징으로서, 본 발명은 본원의 항체 또는 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체 내의 비조혈성 암을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 항체 또는 폴리펩타이드는 개체 내의 암세포에 결합한다. 본 발명의 일 실시 상태에서, 암은 직장결장암, 췌장암, 위암, 또는 폐암이다.

[0031] 본 발명의 다른 특징으로서, 본 발명은 본원의 항체 또는 폴리펩타이드의 일정량, 및 다른 항암제의 일정량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체 내의 비조혈성 암을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서, 항체 또는 폴리펩타이드는 개체 내의 암세포에 결합하고, 항체 또는 폴리펩타이드 및 결합된 항암제는 개체 내의 암의 효과적인 치료를 제공한다.

[0032] 본 발명의 다른 특징으로서, 본 발명은 본원의 항체 또는 폴리펩타이드를 포함하는, 개체 내의 비조혈성 암을 치료하는 키트를 제공한다. 이러한 키트는 암 치료를 위하여 개체에 항체 또는 폴리펩타이드를 투여하기 위한 설명서를 추가로 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명의 다른 특징으로서, 본 발명은 시료를 본원의 항체 또는 폴리펩타이드에 접촉하는 단계; 및 항체 또는 폴리펩타이드와 시료 내의 세포의 결합의 존재 또는 부재 또는 그 수준을 검출하는 단계를 포함하여, 비조혈성 암을 검출하거나 또는 진단하는 방법, 치료를 위하여 비조혈성 암을 보유한 환자를 확인하는 방법, 또는 비조혈성 암의 진행을 모니터링하는 방법을 제공한다. 항체 및 시료 내의 세포 사이의 결합의 존재는 시료가 암세포를 함유할 수 있고, 및/또는 암을 보유한 개체가 본원의 항체로 치료될 수 있다는 것을 의미한다. 이 방법은 대조구와 결합하는 수준을 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명의 다른 특징으로서, 본 발명은 본원의 항체 또는 폴리펩타이드, 및 이 항체 또는 폴리펩타이드와 시료 내의 세포의 결합을 검출하는 시약을 포함하는, 비조혈성 암의 검출 또는 진단, 치료를 위한 비조혈성 암을 보유한 개체의 확인, 또는 비조혈성 암의 진행의 모니터링을 위한 키트를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 5F1의 표적 단백질의 확인 결과를 나타낸다. COLO 205 용해물(레인 1 및 3) 또는 COLO 320 용해물(레인 2 및 4)로부터의 5F1 면역친화도 컬럼의 용출액 내의 단백질을 시판되는 항-CD43 항체 AF2038 (레인 1 및 2) 또는 항체 5F1 (레인 3 및 4)으로 면역블롯하였다.

도 2A는 세 암세포 주에 결합하는 항체 5F1의 흐름 세포 분석의 결과를 나타낸다: 직장결장 암세포(COLO 205 및 DLD-1), 및 위 암세포(NCI-N87).

도 2B는 정상 내피 세포 (HUVEC), 정상(배아) 폐 세포 (MRC-5), 정상 유선 상피 세포(MCF-10A), 정상 직장결장 세포(CCD841-CoN), 활성화 T 림프구(7일간 활성화), 또는 정상 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에 결합하는 항체 5F1

의 흐름 세포 분석의 결과를 나타낸다.

도 3은 항체 5F1 또는 9E10 (항-myc 항체), 또는 조절 배지의 존재하에 6, 24, 및 48 시간의 배양 후 COLO 205 세포의 세포질 내의 뉴클레오솜의 평균 강화를 나타낸다.

도 4는 항체 5F1, 9E10, 또는 아지드와 함께 시험관 내에서 72시간 동안 배양 후 WST-1 분석에 의하여 측정된 COLO 205의 세포 성장 결과를 나타낸다.

도 5는 WST-1 분석에 의하여 측정된 세포 성장의 결과를 나타낸다. 직장결장 암종 세포 COLO 205 및 정상 직장결장 세포주 CCD841-CoN는 모두 미처리되거나, 또는 9E10, 5F1("m133-5F1"), 또는 0.5% 아지드와 함께 배양되었다.

도 6은 다양한 농도의 5F1(0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 ug/ml), 9E10(64 ug/ml) 또는 0.5% 아지드로 배양한 후 COLO 205 세포의 MTT 염색 결과를 나타낸다.

도 7은 SCID 마우스 내의 인간 COLO 205 종양에 대한 항체 5F1 ("m133-5F1")의 (종양 크기에 대한) 생체 내 효과를 나타낸다. 항체 5F1(500 ug/주사), 또는 대조구 항체 9E10(500 ug/주사), 또는 PBS(미처리)는 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 및 17 일에서 주입되었다.

도 8은 SCID 마우스 내의 인간 COLO 205 종양에 대한 화학제 5FU/LV와 항체 5F1의 (종양 크기에 대한) 생체 내 효과를 나타낸다. 5FU/LV는 COLO 205 세포의 접종 후 격일로 25 mg/kg의 4회 투약량으로 정맥 주사하였다. 항체 5F1는 종양 이식 7일 후 3주간 주 2회 0, 6.25 mg/kg, 12.5 mg/kg, 및 25 mg/kg으로 복막 내 투여하였다.

도 9A는 COLO 205 세포에 결합하는 키메라 항체 5F1의 흐름 세포분석의 결과를 나타낸다. 도 9B는 조절 배지(미처리), 아지드화 나트륨(0.5%), 마우스 항체 5F1(m5F1, 2-32 ug/ml), 또는 키메라 항체 5F1(c5F1, 2-32 ug/ml)와 함께 COLO 205 세포의 배양 후 아넥신 V 및 PI 양성 세포의 백분율을 나타낸다.

도 10은 다양한 항체와 함께 배양한 후 세포자멸성 세포 사멸에 대한 COLO 205 및 NCI-N87 세포의 염색 결과이다. COLO 205 및 NCI-N87 세포는 대조구, 9E10(30 ug/ml), m5F1 (10 ug/ml), 또는 m5F1 (30 ug/ml)와 함께 밤샘(overnight) 배양하였다. 그 다음 세포를 YO-PRO-1(A)로 염색하거나 또는 아넥신-V & PI(B)와 결합하였다. 각 조건의 염색 백분율을 막대 그래프로 나타내었다.

도 11은 m5F1이 COLO 205 세포 상에서 발현되는 재조합 인간 CEA(rhCEA)에 결합하나, COS-7 세포 상에서 발현되는 rhCEA는 인식하지 못한다는 것을 나타낸다. 도 11A에서, 발현 플레그-태그된 인간 CEA를 발현하는 COLO 205의 세포 용해물을 항-플레그 항체 M2로 면역침전 시켰으며, 면역침전된 단백질로 SDS-PAGE를 하였으며, 그 다음 NC 페이퍼로 전이된다. NC 페이퍼는 적시한 바와 같이 항-플레그 M2, m5F1, 51-41, 138-10, 또는 CEA/Ab-3와 함께 배양된다. 도 11B에서, 플레그-태그된 인간 CEA를 발현하는 COS-7 세포(+) 또는 CEA 미발현 COS-7 세포(-)의 세포 용해물을 항-플레그 항체 M2로 면역침전하였으며, 면역침전된 단백질로 SDS-PAGE를 하였으며, 그 다음 NC 페이퍼로 전이된다. NC 페이퍼는 적시한 바와 같이 항-플레그 M2, m5F1, 또는 CEA/Ab-3과 함께 배양된다.

도 12는 m5F1은 COLO 205 세포 상에서 발현되는 재조합 CD43(rhCD43)에 결합하나, COS-7 세포 상에서 발현되는 rhCD43를 인식하지 못한다는 것을 나타낸다. 도 12A에서, 단백질 A 세파로스 비드로 분리정제된 COLO 205 세포에 의하여 발현된 가용성 CD43로 SDS-PAGE를 하였으며, NC 페이퍼로 전이시켰고, NC 페이퍼를 항체 m5F1, 51-14 또는 138-10으로 웨스턴 블롯하였다. 도 12B에서, hCD43, hCD43/myc-His, 또는 미전달감염된 세포로 전달감염된 COS-7 세포의 세포 용해물로 SDS-PAGE를 하였으며, NC 페이퍼로 전이시켰고, NC 페이퍼를 항-CD43(MEM59) (좌측 패널) 또는 m5F1(우측 패널)로 웨스턴 블롯하였다.

도 13은 m5F1 항체가 푸코오스 의존성 글리코-에피토프를 인식한다는 것을 나타낸다. COLO 205 세포에 의하여 발현되는 rhCEA는 0, 0.01, 0.03, 0.1 mU의 α -1 $\rightarrow$ (2,3,4)-푸코시다아제로 처리되었다. 처리 후, 단백질로 SDS-PAGE를 하였으며, 그 다음 쿠마시 블루로 염색하거나(우측 패널) 또는 m5F1 항체로 웨스턴 블롯하였다.

도 14는 루이스^a-락토오스(Le^a-락토오스), 루이스^b-락토오스(Le^b-락토오스), 루이스^x-락토오스(Le^x-락토오스), 락토오스, 루이스^y(Le^y), 시알릴-루이스^x (시알릴-Le^x), 루이스^a(Le^a), 락토-N-테트라오스(LNT), 및 렉토-N-디푸코헥사오스 II(LNDFH II)의 구조를 나타낸다.

도 15는 COLO 205 세포에 결합하는 m5F1, 138-10, 및 51-41를 경쟁시키기 위하여 올리고사카라이드를 첨가하는 결합 억제 분석법의 결과를 나타낸다. 올리고사카라이드(LNDFH II, LNT, sLe(x), Le(y), 락토오스, Le(x)-락토

오스, Le(b)-락토오스, Le(a)-락토오스, 또는 Le(a); 각각 1 mM)를 2×10^5 COLO 205 세포를 함유한 다른 웰에 첨가하고, 항체(138-10, 51-41, 또는 m5F1)를 첨가하거나 또는 대조구로서 항체를 첨가하지 않는다. 항체와 COLO 205 세포의 결합은 흐름 세포 분석으로 측정하였다. 각 항체의 올리고사카라이드에 의한 결합 억제도는 도면 내의 형광 평균값으로 측정된 억제 백분율로 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 발명의 상세한 설명

[0037] 정의

"항체"는 면역글로블린 분자의 가변 영역 내에 위치한 최소한 하나의 항원 인식 부위를 통하여 표적, 예컨대 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질, 폴리펩타이드, 등에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로블린 분자이다. 본원에서 사용되는 경우, 이 용어는 무손상 다클론성 또는 단클론성 항체뿐만 아니라 이들의 절편(예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단일 사슬(ScFv), 이들의 돌연변이, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 항원 인식 부위를 포함하는 면역글로블린 분자의 모든 변형 입체구조를 포괄한다. 항체는 모든 클래스의 항체, 예컨대 IgG, IgA, 또는 IgM (또는 이들의 서브-클래스), 및 특정 클래스일 필요가 없는 항체를 포함한다. 이들의 중쇄의 불변 도메인의 항체 아미노산 서열을 기준으로, 면역글로블린은 서로 다른 클래스에 할당된다. 5개의 주요 면역글로블린 클래스가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이며, 이들 중 수종은 하위클래스(아이스타입), 예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2으로 더 세분화된다. 면역글로블린의 다른 클래스에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 알파, 델타, 입실론, 감마, 및 뮤로 명명되었다. 다른 클래스의 면역글로블린의 서브유닛 구조 및 3차원 입체구조는 잘 알려져 있다.

[0039] 본 발명의 항체는 이중특이적, 다중특이적, 단일-사슬, 및 키메라 및 최소한 하나의 항체의 CDR 영역에 의하여 부여되는 폴리펩타이드에 의한 친화도를 지닌 인체적응형 분자를 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 항체는 항체 중쇄의 가변 도메인이거나 또는 항체 경쇄의 가변 도메인인 단일 도메인 항체를 포함할 수 있다. Holt et al., Trends Biotechnol., 21:484-490, 2003. 6개 중 3개의 항체의 자연 발생적 상보성 결정 영역을 함유하는, 항체 중쇄의 가변 도메인이나 또는 항체 경쇄의 가변 도메인을 포함하는 도메인 항체를 포함하는 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 예컨대, 문헌 Muyldermans, Rev. Mol. Biotechnol., 74:277-302, 2001를 참고한다.

[0040] 본원에서 사용되는 경우, "단클론성 항체"는 실질적으로 동종인 항체의 항체, 즉, 소량으로 존재하는 가능한 자연발생적 돌연변이를 제외하고는 일치하는 집단을 포함하는 개별 항체를 의미한다. 단클론성 항체는 일반적으로 고도로 특이적이며, 단일 항원 부위를 지향한다. 더욱이, 일반적으로 다른 결정기(에피토프)를 지향하는 다른 항체를 포함하는, 다클론성 항체 제조와 대비하여, 각 단클론성 항체는 항원 상의 단일 결정기를 지향한다. 변형인 "단클론"은 항체의 실질적으로 동종인 집단으로부터 획득한 항체의 특성을 의미하며, 어떠한 특정 방법에 의하여 항체의 생산에 필요한 것으로 해석되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 단클론성 항체는 하이브리도마 방법(Kohler and Milstein, 1975, Nature, 256:495), 또는 재조합 DNA 방법(미국 특허 제 4,816,567호)에 의하여 생산될 수 있다. 단클론성 항체는 예를 들어, 문헌 McCafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554에 설명된 기법을 사용하여 생성된 파지 라이브러리로부터 분리될 수 있다.

[0041] 본원에서 사용되는 경우, "키메라 항체"는 제1 종으로부터의 가변 영역 또는 가변 영역의 일부 및 제2 종으로부터의 불변 영역을 보유한 항체를 의미한다. 무손상 키메라 항체는 두 카피의 키메라 경쇄 및 두 카피의 키메라 중쇄를 포함한다. 키메라 항체의 생산은 당해 기술 분야에 공지되어 있다(Cabilly et al. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3273-3277; Harlow and Lane (1988), Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory). 일반적으로, 이러한 키메라 항체에서, 경쇄와 중쇄의 가변 영역은 포유류 1 종으로부터 유도된 항체의 가변 영역을 모사하며, 불변 부분은 다른 종에서 유도된 항체의 서열과 동종이다. 이러한 키메라 항체의 하나의 분명한 장점은 예를 들어, 가변 영역은 예를 들어, 인간 세포 제조에서 유도된 불변 영역과 조합하여 즉시 사용가능한 비 인간 숙주 유기체의 하이브리도마 또는 B 세포를 사용하는 공지의 공급원으로부터 간편하게 유도될 수 있다는 것이다. 가변 영역을 간편하게 제조할 수 있으며, 특이성이 이의 공급원으로부터 영향을 받지 않으나, 항체가 주입되는 경우 비인간 공급원의 불변 영역보다 인간의 불변 영역은 인간 대상체로부터의 면역 반응을 덜 유발시키게 된다. 그러나, 이 정의는 이러한 특정 예시에 한정되지 않는다.

[0042] "분리" 항체는 이의 자연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 것이다.

- [0043] 본원에서 사용되는 경우, "실질적으로 순수"는 최소한 50% 순수 (즉, 오염원 부재), 더욱 바람직하게는 최소한 90 % 순수, 더욱 바람직하게는 최소한 95% 순수, 더욱 바람직하게는 최소한 98% 순수, 더욱 바람직하게는 최소한 99% 순수한 물질을 의미한다.
- [0044] 본원에서 사용되는 경우, "인체적응형" 항체는 비인간 면역글로블린으로부터 유도된 최소 서열을 함유하는 특이적 키메라 면역글로블린, 면역글로블린 사슬, 또는 이들의 절편(예컨대 Fv, Fab, Fab1, F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원-결합 서열)인 비인간(예컨대 뮤린) 항체의 형태이다. 대부분의 경우, 인체적응형 항체는 인간 면역글로블린(수용자 항체)이며, 수용자의 상보성 결정 영역(CDR)의 잔기는 바람직한 특이성, 친화도, 및 용량을 지니는 비인간 중(공여자 항체) 예컨대 마우스, 랫트, 또는 래빗의 CDR의 잔기로 대체되었다. 예컨대, 인간 면역글로블린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는 대응하는 비인간 잔기에 의하여 대체되었다. 더욱이, 인체적응형 항체는 수용자 항체나 도입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서는 발견할 수 없으나 항체 성능을 추가적으로 정제 및 최적화하기 위하여 포함되는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인체적응형 항체는 최소한 하나, 일반적으로 둘인 가변 도메인의 실질적으로 모두를 포함하게 되며, 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비인간 면역글로블린의 것에 대응하며, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로블린 컨센서스 서열의 것이다. 인체적응형 항체는 최소한 면역글로블린 불변 영역 또는 도메인(Fc)의 부분, 일반적으로 인간 면역글로블린의 부분을 포함하는 것이 최적이다. 항체는 WO 99/58572에서 설명된 바와 같이 변형된 Fc 영역을 보유할 수 있다. 인체적응형 항체의 다른 형태는 하나 이상의 CDR (1, 2, 3, 4, 5, 6)를 보유하며, 이들은 원 항체에 대하여 변형되었으며, 원 항체의 하나 이상의 CDR "로부터 유도된" 하나 이상의 CDR로 명명된다.
- [0045] 본원에서 사용되는 경우, "인간 항체"는 인간에 의하여 생산된 항체의 것에 대응하는 아미노산 서열을 보유하며, 및/또는 공지되었거나 본원에서 개시된 인간 항체를 제조하기 위한 기법 중의 하나를 사용하여 제조된다. 이 인간 항체의 정의는 최소한 하나의 인간 중쇄 폴리펩타이드 또는 최소한 하나의 인간 경쇄 폴리펩타이드를 포함하는 항체를 포함한다. 이러한 하나의 예는 뮤린 경쇄 및 인간 중쇄 폴리펩타이드를 포함하는 항체이다. 인간 항체는 공지된 다양한 기법을 사용하여 생산될 수 있다. 일 실시상태에서, 인간 항체는 파지 라이브러리로부터 선택되며, 여기서 파지 라이브러리는 인간 항체를 발현한다(Vaughan et al., 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314; Sheets et al., 1998, PNAS, (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581). 인간 항체는 또한 인간 면역글로블린 좌를 유전자삽입 동물, 예컨대, 마우스 내로 도입하여 제조될 수 있으며, 내부 면역글로블린 유전자는 부분적으로 또는 완전하게 불활성화된다. 이 접근법은 미국 특허 제5,545,807호; 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 및 제5,661,016호에 설명되어 있다. 대안적으로, 인간 항체는 표적 항원을 지향하는 항체를 생산하는 인간 B 림프구를 무한증식시킴으로써 제조할 수 있다(이러한 B 림프구는 개체로부터 회수될 수 있거나 또는 시험관 내에서 면역될 수 있다). 예컨대, 문헌 Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p.77 (1985); Boerner et al., 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95; 및 미국 특허 제5,750,373호를 참조한다.
- [0046] 항체의 "가변 영역"은 항체 경쇄의 가변 영역 또는 항체 중쇄의 가변 영역 단독으로 또는 이의 조합을 의미한다. 각각 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 고가변 영역으로 알려진 3개의 상보성 결정 영역(CDR)에 연결된 4개의 프레임워크 영역(FR)으로 구성된다. 각 사슬 내의 CDR은 다른 사슬의 CDR과 FR에 의하여 근접하여 함께 고정되고, 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다. CDR을 결정하는 최소한 2 기법이 있다: (1) 중-간 서열 변이성에 기초한 방법 (즉, Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학에 기초한 방법(Al-lazikani et al (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)). 본원에서 사용되는 경우, CDR은 이 방법 또는 이 두 방법의 조합으로 정의된 CDR을 의미한다.
- [0047] 항체의 "불변 영역"은 항체 경쇄의 불변 영역 또는 항체 중쇄의 불변 영역, 각각이거나 또는 이들의 조합을 의미한다. 항체의 불변 영역은 일반적으로 구조적 안정성 및 다른 생물학적 기능, 예컨대 항체 사슬 회합, 분비, 태반경유 이동성, 및 보체 결합을 제공하나, 항원에 결합하는 것에 관여하지 않는다. 불변 영역의 유전자 내의 아미노산 서열 및 대응하는 엑손 서열은 이들이 유도된 종에 의존하게 된다; 그러나, 동종이형을 유도하는 아미노산 서열 내의 변이는 종 내의 특정 불변 영역이 상대적으로 제한될 것이다. 각 사슬 내의 가변 영역은 폴리펩타이드 서열의 결합에 의하여 불변 영역에 결합된다. 결합 서열은 경쇄 유전자 내의 "J" 서열, 및 중쇄 유전자 내의 "D" 서열 및 "J" 서열의 조합에 의하여 암호화된다.
- [0048] 본원에서 사용되는 경우, "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체(FcRs) (예컨대 자연사 (NK) 세포, 호중구, 및 마크로파지)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포가 표적 세포 상의 결합 항체를 인식하고, 후

속적으로 표적 세포의 용해를 유발하도록 하는 세포-매개 반응을 의미한다. 대상 분자의 ADCC 활성은 시험관 내 ADCC 분석(예컨대 미국 특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호)를 사용하여 평가될 수 있다. 이러한 분석법에 유용한 효과기 세포에는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 NK 세포가 포함된다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 대상 분자의 ADCC 활성은 생체 내, 예컨대, 동물 모델(Clynes et al., 1998, PNAS (USA), 95:652-656) 내에서 평가될 수 있다.

[0049] "보체 의존성 세포독성" 및 "CDC"는 보체의 존재하에 표적의 용해를 의미한다. 보체 활성화 경로는 보체 시스템의 제1 보체(C1q)와 인지 항원과 복합된 분자(예컨대, 항체)의 결합에 의하여 개시된다. 보체 활성을 평가하기 위하여, CDC 분석(예컨대, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996))을 수행할 수 있다.

[0050] 본원에서 혼용하여 사용되는 용어 "폴리펩타이드", "올리고펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 모든 길이의 아미노산의 고분자를 의미한다. 고분자는 선형 또는 가지형일 수 있으며, 변형된 아미노산을 포함하거나, 비-아미노산에 의하여 중단될 수 있다. 이 용어는 자연적으로 또는 인위적 개입에 의하여 변형된 아미노산 고분자를 포괄한다; 예를 들어, 이황화 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 포스포릴화, 또는 다른 모든 조작 또는 변화, 예컨대 라벨화 성분과의 접합. 이 정의에 포함되는 것은, 예를 들어, 하나 이상의 아미노산의 유사체(예를 들어, 인공 아미노산, 등을 포함) 및 공지의 다른 변형을 포함하는 폴리펩타이드이다. 본 발명의 폴리펩타이드가 항체에 기초하기 때문에, 폴리펩타이드는 단일 사슬 또는 연결 사슬로서 발생할 수 있다고 알려져 있다.

[0051] 본원에서 혼용하여 사용되는 "폴리뉴클레오타이드," 또는 "핵산"은 모든 길이의 뉴클레오타이드의 고분자를 의미하며, 및 DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드 또는 염기, 및/또는 이들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라아제에 의하여 고분자로 포함될 수 있는 모든 기질이 될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 메틸화 뉴클레오타이드 및 이들의 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우라면, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 고분자의 조립 전 후에 가해진다. 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 성분에 의하여 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 예컨대 라벨화 성분과의 접합에 의하여 고분자화된 후 추가로 변형될 수 있다. 다른 유형의 변화는, 예를 들어, "캡"으로서, 하나 이상의 자연 발생적 뉴클레오타이드를 유사체, 뉴클레오타이드간 변화 예컨대, 예를 들어, 비하전 결합을 지닌 것(예컨대, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카바메이트, 등) 및 하전 결합을 지닌 것(예컨대, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 등), 펜던트 모이어티를 함유하는 것, 예컨대, 예를 들어, 단백질(예컨대, 뉴클레아제, 독신, 항체, 신호 펩타이드, pty-L-라이신, 등), 인터칼레이터를 지닌 것(예컨대, 아크리딘, 솔라렌, 등), 킬레이터를 함유한 것(예컨대, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화 금속, 등), 알킬레이터를 함유한 것, 변형된 결합을 지닌 것(예컨대, 알파 아노머 핵산, 등), 및 폴리뉴클레오타이드(들)의 미변형된 형태로 치환하는 것을 포함한다. 추가적으로, 당 내에 일반적으로 존재하는 모든 히드록실기는, 예를 들어, 포스포네이트기, 포스페이트기에 의하여 치환되거나, 표준 보호기에 의하여 보호받거나, 또는 추가적인 뉴클레오타이드에 추가적으로 결합을 준비하기 위하여 활성화될 수 있으며, 고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 최종 OH는 포스포릴화될 수 있거나 또는 아민 또는 1 내지 20 탄소 원자의 유기 캡핑기 모이어티로 치환될 수 있다. 다른 히드록실은 표준 보호기로 유도될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 일반적으로 당해 기술 분야에 공지된 리보오스 또는 데옥시리보오스 당의 유사체 형태를 함유할 수 있으며, 예를 들어, 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보오스, 카보시클릭 당 유사체, α-아노머 당, 에피머 당 예컨대 아라비노스, 자일로노스 또는 라이노스, 피라노스 당, 퓨라노스 당, 세도헥스로스, 아크릴 유사체 및 무염기 뉴클리오사이드 유사체 예컨대 메틸 리보사이드를 포함한다. 하나 이상의 포스포디에스테르 결합은 대안적 결합기에 의하여 대체될 수 있다. 이러한 대체적 결합기는 포스페이트가 P(O)S("티오에이트"), P(S)S("디티오에이트"), "(O)NR₂"("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂("포름아세탈")로 치환되는 실시상태를 포함하나 이에 한정되지 않으며, 여기서 각 R 또는 R'는 독립적으로 H 이거나 또는, 에테르(-O-) 결합, 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아라릴을 선택적으로 함유하는 치환된 또는 미치환된 알킬(1-20C)이다. 폴리뉴클레오타이드 내의 모든 결합이 동일할 것을 요구하는 것은 아니다. 전술한 설명은 RNA 및 DNA를 포함하는 본원에서 언급된 모든 폴리뉴클레오타이드에 적용된다.

[0052] 본원에서 사용되는 경우, "벡터"는 숙주 세포 내에서 하나 이상의 대상 유전자(들) 또는 서열(들)을 전달하고 바람직하게는 발현하는 구조를 의미한다. 벡터의 예는, 바이러스 벡터, 네이키드 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 플라스미드, 코스미드 또는 파지 벡터, 양이온성 촉합제와 결합된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포좀 내에서 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 및 특정 진핵 세포, 예컨대 생산자 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

- [0053] 본원에서 사용되는 경우, "발현 제어 서열"은 핵산의 전사를 조절하는 핵산 서열을 의미한다. 발현 제어 서열은 프로모터, 예컨대 기본구성 또는 유도성 프로모터, 또는 인헨서가 될 수 있다. 발현 제어 서열은 전사될 핵산 서열에 작동가능하게 결합된다.
- [0054] 본원에서 사용되는 경우, 약물, 화합물, 또는 약학적 조성물의 "유효 복용량" 또는 "유효량"은 유익하거나 또는 바람직한 결과에 영향을 미치기에 충분한 양이다. 예방적 용도로서, 유익하거나 또는 바람직한 결과는 예컨대 위험을 제거하거나 또는 감소시키고, 증증도를 감소시키거나, 또는 질병의 생화학적, 조직학적 및/또는 행동학적 증상, 이들의 합병증 및 질병의 발달시 나타나는 중간 병리학적 표현형을 포함하는 질병의 발병을 지연시키는 결과를 포함한다. 치료적 용도로서, 유익하거나 또는 바람직한 결과는 예컨대 질병에 기인한 하나 이상의 증상의 감소, 질병을 겪고 있는 환자의 삶의 질의 증가, 질병의 치료에 요구되는 다른 의학의 복용량의 감소, 예컨대 표적화를 통한 다른 의학의 효과의 증진, 질병의 진행의 지연, 및/또는 생존의 연장의 임상적 결과를 포함한다. 암 또는 종양의 경우, 약물의 유효량은 암세포의 수의 감소; 종양 크기의 감소; 말초 기관 내로의 암세포 침윤의 억제(즉, 다소 감소 및 바람직하게는 정지); 종양 전이의 억제(즉, 다소 감소 및 바람직하게는 정지); 종양 성장의 다소간의 억제; 및/또는 질환에 관련된 하나 이상의 증상을 다소간 경감시키는 효과를 지닌다. 유효 복용량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 본 발명의 목적을 위하여, 약물, 화합물, 또는 약학적 조성물의 유효 복용량은 직접적으로 또는 간접적으로 예방적 또는 치료적 치료를 달성하기에 충분한 양이다. 임상적 의미에서 이해하자면, 약물, 화합물, 또는 약학적 조성물의 유효 복용량은 다른 약물, 화합물, 또는 약학적 조성물과 함께 달성되거나 또는 달성되지 않을 수 있다. 따라서, "유효 복용량"은 하나 이상의 치료제의 투여의 의미로 간주될 수 있으며, 단일 약제는 유효량으로 투여되는 것으로 간주될 수 있다. 하나 이상의 다른 약제와 함께 라면, 바람직한 결과를 달성할 수 있다.
- [0055] 본원에서 사용되는 경우, "~와 함께"는 일 치료 요법에 다른 치료 요법을 첨가하여 투여하는 것을 의미한다. 따라서, "~와 함께"는 다른 치료 요법의 투여 전, 도중 또는 후에 하나의 치료 요법을 투여하는 것을 의미한다.
- [0056] 본원에서 사용되는 경우, "치료" 또는 "치료하는"은 바람직한 임상적 결과를 포함하는 유익하거나 또는 바람직한 결과를 얻는 방법이다. 본 발명의 목적을 위하여, 유익하거나 또는 바람직한 임상적 결과는 하나 이상의 다음의 것을 포함하나 이에 한정되지 않는다: 암성 세포의 증식의 감소(또는 파괴), 질병에 기인한 증상의 감소, 질병을 겪고 있는 환자의 삶의 질의 증가, 질병의 치료에 요구되는 다른 의학의 복용량의 감소, 질병의 진행의 지연, 및/또는 생존의 연장.
- [0057] 본원에서 사용되는 경우, "질병의 발달 지연"은 질병(예컨대 암)의 발달을 지연, 방해, 감소, 퇴행, 안정화 및/또는 연기하는 것을 의미한다. 이 지연은 질병의 병력 및/또는 치료할 개체에 따라 시간이 달라질 수 있다. 당해 기술 분야의 숙련자에 자명한 바와 같이, 충분하고도 현저한 지연은 효과에 있어서 예방을 포함하며, 따라서 개체가 질병을 발달시키지 않는다. 예를 들어, 말기 암, 예컨대 전이의 발달이 지연될 수 있다.
- [0058] "개체" 또는 "대상체"는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간이다. 포유류는 또한 가축, 스포츠용 동물, 애완동물(예컨대 고양이, 개, 말), 영장류, 마우스 및 레트를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0059] 본원에서 사용되는 용어 "특이적으로 인식" 또는 "특이적으로 결합"은 측정가능하고 재생가능한 상호작용 예컨대 표적 및 항체 사이의 인력 또는 결합을 의미하며, 생물학적 분자를 포함하는 분자의 이중 집단의 존재하에 표적의 존재의 결정 요인이다. 예를 들어, 특이적으로 또는 선호적으로 에피토프에 결합하는 항체는 표적의 다른 에피토프 또는 비-표적 에피토프에 결합하는 것 보다 더 큰 친화도, 결합성을 지니고, 더 쉽게, 및/또는 더 오랜 지속시간을 가지고 이 에피토프에 결합하는 항체이다. 예를 들어, 특이적으로 또는 선호적으로 제1 표적에 결합하는 항체 (또는 모이어티 또는 에피토프)는 제2 표적에 특이적으로 또는 선호적으로 결합할 수도 또는 하지 않을 수도 있다. 따라서, "특이적 결합" 또는 "선호적 결합"은 (이들이 포함되더라도) 배제적 결합을 필수적으로 요구하지 않는다. 표적에 특이적으로 결합하는 항체는 최소한 약 10^3 M^{-1} 또는 10^4 M^{-1} , 때로는 약 10^5 M^{-1} 또는 10^6 M^{-1} , 다른 예에서, 약 10^6 M^{-1} 또는 10^7 M^{-1} , 약 10^8 M^{-1} 내지 10^9 M^{-1} , 또는 약 10^{10} M^{-1} 내지 10^{11} M^{-1} 또는 그 이상의 결합 상수를 갖는다. 다양한 면역분석 포맷을 특정 단백질과 특이적으로 면역반응하는 항체를 선택하기 위하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 고체상 ELISA 면역분석법은 단백질과 특이적으로 면역반응하는 단클론성 항체를 선택하기 위하여 일반적으로 사용할 수 있다. 예컨대, 특이적 면역반응성을 결정하기 위하여 사용할 수 있는 면역분석 포맷 및 조건을 설명하고 있는 문헌 Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York를 참조한다.
- [0060] 본원에서 사용되는 경우, 용어 "암," "종양," "암성," 및 "악성 종양"은 조절되지않은 세포 성장에 의하여 일반

적으로 특성화되는 포유류의 생리학적 상태를 의미하거나 또는 설명한다. 암의 예는 아데노암종, 림프종, 모세포종, 흑색종, 및 육종을 포함하는 암종을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 이러한 암의 더 특이적인 예는 편평세포암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐 아데노암종, 폐 편평 세포 암종, 위장암, 호지킨 및 비-호지킨 림프종, 췌장암, 아교모세포종, 자궁경부암, 신경아교종, 난소암, 간암 예컨대 간암종 및 간세포암, 방광암, 유방암, 결장암, 직장결장암, 자궁내막 또는 자궁암종, 침샘 암종, 신장암 예컨대 신장 세포 암종 및 윌름 종양, 기저 세포 암종, 흑색종, 전립선암, 갑상선암, 고환암, 식도암, 및 다양한 유형의 두경부암을 포함한다.

[0061] 본원 및 첨부한 청구항에서 사용되는 경우, 단수형 "a," "an," 및 "the" 는 달리 적시하지 않는 한 복수를 포함한다. 예를 들어, "항체"는 예컨대 물 양으로 일 내지 다수의 항체를 의미하며, 당해 기술 분야의 숙련자에 공지된 이들의 동등물을 포함한다.

[0062] 본원에서 설명하는 본 발명의 특징 및 변형은 특징 및 변형을 "포함하는" 및/또는 "필수적으로 포함하는" 것을 포함한다는 것을 이해하여야 한다.

[0063] 비조혈성 암세포에서 발현되는 CD43 및 CEA 상의 탄수화물 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 및 폴리펩타이드

[0064] 본 발명은 비조혈성 암세포에 의하여 발현되는 CD43 및/또는 CEA 상의 에피토프에 특이적으로 결합하나, 백혈구(예컨대 말초 T 세포) 또는 Jurkat 세포에 의하여 발현되는 CD43에는 특이적으로 결합하지 않는, 분리 항체, 및 항체로부터 유도된 폴리펩타이드를 제공한다. 본 발명의 항체 및 폴리펩타이드는 하나 이상의 다음의 특징을 추가적으로 보유한다: (a) 에피토프를 포함하는 분자를 $\alpha-1 \rightarrow (2,3,4)$ -푸코시다아제로 처리하는 경우 항체 또는 폴리펩타이드와 에피토프의 결합이 감소한다; (b) 항체 또는 폴리펩타이드와 에피토프의 결합은 Le^a 구조, Le^a -락토오스 구조, LNDFH II 구조, 및/또는 LNT 구조를 포함하는 탄수화물에 의하여 억제된다; (c) 세포독소 접합 및 면역 효과기 기능의 부재하에 암세포의 세포 표면상에서 발현되는 에피토프에 결합한 후 비조혈성 암세포의 사멸을 유도한다(예컨대 세포자멸사를 통하여); (d) 암세포의 세포 표면상에서 발현되는 에피토프에 결합한 후 비조혈성 암세포의 세포 성장 또는 증식을 억제하고; 및 (e) 개체 내에서 세포 표면 상의 에피토프를 발현하는 비조혈성 암, 예컨대 직장결장암 및 위암을 치료하거나 또는 예방한다.

[0065] 본원에서 사용되는 경우, 용어 "억제"는 부분적 및 완전한 억제를 포함한다. 예를 들어, 항체 또는 폴리펩타이드와 CD43 및 CEA상의 에피토프의 결합은 Le^a 구조, Le^a -락토오스 구조, LNDFH II 구조, 또는 LNT 구조를 포함하는 탄수화물에 의하여 최소한 약 20%, 최소한 약 30%, 최소한 약 40%, 최소한 약 50%, 최소한 약 60%, 최소한 약 70%, 최소한 약 80%, 또는 최소한 약 90%까지 억제된다. 항체와 에피토프의 결합은 직접 경쟁 또는 다른 기작에 의하여 억제될 수 있다.

[0066] 에피토프를 발현하는 비-조혈 암세포의 예는 직장결장 암세포(예컨대 COLO 205 및 DLD-1) 및 위암 세포(예컨대 NCI-N87)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0067] 본 발명의 항체 및 폴리펩타이드는 비조혈성 암세포상에 제공되는 CD43의 세포의 도메인은 인식하나, 백혈구 CD43(예컨대, 말초 T 세포)의 세포의 도메인, 또는 Jurkat 세포(림프모구 백혈병 세포)상에서 발현되는 CD43의 세포의 도메인에는 결합하지 않는다. 본 발명의 일 실시상태에서, 본 발명의 신규의 항체 또는 폴리펩타이드는 조혈 기원의 세포에 의하여 발현되는 CD43에 특이적으로 발현되지 않는다.

[0068] 본 발명의 항체는 단클론성 항체, 다클론성 항체, 항체 절편(예컨대, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, 등), 키메라 항체, 단일 사슬(ScFv), 이들의 돌연변이, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 요구되는 특이성의 항원 인식 부위를 포함하는 면역글로불린 분자의 변형된 모든 입체구조를 포괄할 수 있다. 항체는 무인, 레트, 낙타, 인간, 또는 다른 모든 기원(인체적응형 항체 포함)이 될 수 있다.

[0069] CD43 또는 CEA에 대한 폴리펩타이드(항체 포함)의 결합 친화도는 약 500 nM, 약 400 nM, 약 300 nM, 약 200 nM, 약 100 nM, 약 50 nM, 약 10 nM, 약 1 nM, 약 500 pM, 약 100 pM, 또는 약 50 pM 이하가 될 수 있다. 당해 기술 분야에 공지된 바와 같이, 결합 친화도는 K_D, 또는 해리 상수로서 나타낼 수 있으며, 증가된 결합 친화도는 감소된 K_D에 대응한다. 항체와 CD43 또는 CEA의 결합 친화도를 측정하는 일 방법은 항체의 단일기능성 Fab 절편의 결합 친화도를 측정하는 것이다. 단일기능성 Fab 절편을 획득하기 위하여, 항체(예를 들어, IgG)는 파파인으로 분해되거나 또는 재조합하여 발현될 수 있다. 항체의 Fab 절편의 친화도는 표면 플라즈몬 공명(BIAcore3000™ Surface plasmon resonance (SPR) system, BIAcore, INC, Piscaway NJ) 및 ELISA에 의하여 측정할 수 있다.

동적 결합 속도(K_{on}) 및 해리 속도(K_{off}) (일반적으로 25℃에서 측정)를 얻었으며; 평형 해리 상수 (KD) 값은 K_{off}/K_{on} 에 의하여 계산된다.

[0070] 본 발명의 일 실시상태에서, 본 발명의 항체 및 폴리펩타이드는 암세포의 수를 감소시키고, 및/또는 에피토프를 보유한 종양 또는 암세포의 세포 성장 또는 증식을 억제한다. 바람직하게는, 세포 수의 감소 또는 세포 성장 또는 증식의 억제는 항체 또는 폴리펩타이드로 처리하지 않은 세포에 비하여 최소한 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 65%, 약 75%, 또는 그 이상이다. 암세포는 직장결장암, 췌장암, 폐암, 위암을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0071] 본 발명의 일 실시상태에서, 본 발명의 항체 및 폴리펩타이드는 비조혈성 암세포의 세포 표면 상에서 발현되는 에피토프에 결합한 후, 예를 들어 세포자멸사를 통하여 세포 사멸만을 유도할 수 있다. 용어 "세포 사멸 유도"는 본원에서 사용되는 경우, 본 발명의 항체 또는 폴리펩타이드는 세포 표면 상에서 발현되는 분자와 직접적으로 상호작용할 수 있으며, 결합/상호작용 만으로 다른 인자 예컨대 세포독소 결합 또는 다른 면역 효과기 기능, 즉, 보체-의존성 세포독성(CDC), 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC), 또는 포식작용의 도움 없이 세포 내에서 세포 자멸을 유도하기에 충분하다는 것을 의미한다.

[0072] 본원에서 사용되는 경우, 용어 "세포자멸사"는 세포내 세포 파괴의 유전자-관련 프로세스를 의미한다. 세포자멸사는 괴사와는 구별된다; 세포골격 붕괴, 세포질 수축 및 응축, 세포 멤브레인의 외부 표면상의 포스파티딜세린의 발현 및 수포형성을 포함하며, 소포 또는 세포자멸성 바다에 결합된 세포 멤브레인을 형성하게 된다. 이 프로세스는 "프로그래밍된 세포 사멸"을 의미할 수 있다. 세포자멸사 과정에서, 특징적 현상 예컨대, 만곡된 세포 표면, 핵 염색질의 응축, 염색체 DNA의 절편화, 및 미토콘드리아 기능의 저하가 관찰된다. 세포를, 예컨대 아넥신 V, 프로피디움 요오드, DNA 절편화 분석 및 YO-PRO-1(Invitrogen)로 염색하여 세포자멸사를 검출하기 위하여 다양한 공지의 기술이 사용될 수 있다.

[0073] 세포 사멸(예컨대 세포자멸사)을 검출하는 방법에는, 형태 검출, DNA 절편화, 효소 활성, 및 폴리펩타이드 분해, 등을 포함하나 이에 한정되지 않으며, 문헌 Siman et al., 미국 특허 제6,048,703호; Martin and Green (1995), Cell, 82: 349-52; Thornberry and Lazebnik (1998), Science, 281:1312-6; Zou et al., 미국 특허 제6,291,643호; Scovassi and Poirier (1999), Mol. Cell Biochem., 199: 125-37; Wyllie et al. (1980), Int. Rev. Cytol., 68:251-306; Belhocine et al. (2004), Technol. Cancer Res. Treat., 3(1):23-32를 참조한다. 이들은 참고자료로서 본원에 포함되어 있다.

[0074] 본 발명의 일 실시상태에서, 본 발명의 항체 및 폴리펩타이드는 비조혈성 암세포 상에서 발현되는 입체구조 에피토프를 인식하며, 이 에피토프는 트리펩타이드, N'-Trp-Pro-Ile-C'로 형성된 구조와 동등한 물리 및 화학적 특성을 보유한 구조를 포함한다. 본원에서 사용되는 경우, "펩타이드로 형성된 구조와 동등한 물리 및 화학적 특성을 보유한 구조를 포함하는 에피토프"는 두 구조가 항체 결합에 관한 유사한 물리 및 화학적 특성을 보유하여 일 구조에 특이적으로 결합하는 항체가 두 구조에 모두 결합할 수 있는 것을 의미한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 항체 및 폴리펩타이드는 폴리펩타이드의 N-말단에서 아미노산 서열, N'-Trp-Pro-Ile-C'를 포함하는 폴리펩타이드에 결합한다.

[0075] 본 발명의 일 실시상태에서, 본 발명의 항체 및 폴리펩타이드는 암세포의 세포 표면상에서 발현되는 에피토프에 결합하기 위하여, 항체 5F1, 138-10, 또는 51-41과 경쟁한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 본 발명의 항체 또는 폴리펩타이드는 항체 5F1, 138-10, 및 51-41의 최소한 하나에 결합하는 CD43 또는 CEA 상의 에피토프에 결합한다.

[0076] 경쟁 분석법은 일치하거나 또는 입체적으로 오버랩된 에피토프를 인식함으로써 두 항체가 동일한 에피토프에 결합하는지 여부 또는 일 항체가 항원과 다른 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는지 여부를 결정하기 위하여 사용할 수 있다. 이러한 분석법은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 실시예에 잘 설명되어 있다. 일반적으로, 항원 또는 항원 발현 세포는 다중-웰 플레이트 상에 고정되며, 미표지된 항체가 표지된 항체의 결합을 억제하는 능력이 측정되었다. 이러한 경쟁 분석법에 일반적인 표지는 방사성 표지 또는 효소 표지이다.

[0077] 본 발명의 일 실시상태에서, 본 발명의 항체는 항체 5F1 또는 5F1에서 유도된 항체이다. 5F1의 중쇄 및 경쇄 가변 서열은 각각 SEQ ID NO:1 및 SEQ ID NO:2에 나타내었다. 본 발명은 항체 5F1의 절편 또는 영역을 포함하는 항체 또는 폴리펩타이드를 제공한다. 일 실시상태에서, 절편은 항체 5F1의 경쇄이다. 본 발명의 다른 실시상태에서, 절편은 항체 5F1의 중쇄이다. 본 발명의 또 다른 실시상태에서, 절편은 항체 5F1의 경쇄 및/또는 중쇄의 하나 이상의 가변 영역을 포함한다. 본 발명의 또 다른 실시상태에서, 절편은 항체 5F1의 경쇄 및/또는 중쇄의

하나, 둘 또는 세개의 CDR을 포함한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 항체는 5F1의 인체적응형 항체, 예컨대 SEQ ID NO:7에 나타난 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:8에 나타난 경쇄 가변 영역을 포함하는 h5F1이다. 본 발명의 일 실시상태에서, 항체 5F1에서 유도한 하나 이상의 CDR은 5F1의 최소한 하나, 최소한 둘, 최소한 셋, 최소한 넷, 최소한 다섯, 또는 최소한 여섯개의 CDR과 최소한 약 85%, 최소한 약 86%, 최소한 약 87%, 최소한 약 88%, 최소한 약 89%, 최소한 약 90%, 최소한 약 91%, 최소한 약 92%, 최소한 약 93%, 최소한 약 94%, 최소한 약 95%, 최소한 약 96%, 최소한 약 97%, 최소한 약 98%, 또는 최소한 약 99% 일치한다.

[0078]

본 발명의 일 실시상태에서, 본 발명은 항체는 항체 138-10 또는 138-10에서 유도한 항체이다. 138-10의 중쇄 및 경쇄 가변 서열은 각각 SEQ ID NO:3 및 SEQ ID NO:4에 나타내었다. 본 발명은 항체 138-10의 절편 또는 영역을 포함하는 항체 또는 폴리펩타이드를 제공한다. 일 실시상태에서, 절편은 항체 138-10의 경쇄이다. 본 발명의 다른 실시상태에서, 절편은 항체 138-10의 중쇄이다. 본 발명의 또 다른 실시상태에서, 절편은 항체 138-10의 경쇄 및/또는 중쇄의 하나 이상의 가변 영역을 포함한다. 본 발명의 또 다른 실시상태에서, 절편은 항체 138-10의 경쇄 및/또는 중쇄의 하나, 둘, 또는 세개의 CDR을 포함한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 항체는 138-10의 인체적응형 항체이다. 본 발명의 일 실시상태에서, 항체 138-10에서 유도한 하나 이상의 CDR은 138-10의 최소한 하나의, 최소한 둘, 최소한 셋, 최소한 넷, 최소한 다섯, 또는 최소한 여섯개의 CDR과 최소한 약 85%, 최소한 약 86%, 최소한 약 87%, 최소한 약 88%, 최소한 약 89%, 최소한 약 90%, 최소한 약 91%, 최소한 약 92%, 최소한 약 93%, 최소한 약 94%, 최소한 약 95%, 최소한 약 96%, 최소한 약 97%, 최소한 약 98%, 또는 최소한 약 99% 일치한다.

[0079]

본 발명의 일 실시상태에서, 본 발명의 항체는 항체 51-41 또는 51-41에서 유도한 항체이다. 51-41의 중쇄 및 경쇄 가변 서열은 각각 SEQ ID NO:5 및 SEQ ID NO:6에 나타내었다. 본 발명은 항체 51-41의 절편 또는 영역을 포함하는 항체 또는 폴리펩타이드를 제공한다. 일 실시상태에서, 절편은 항체 51-41의 경쇄이다. 본 발명의 다른 실시상태에서, 절편은 항체 51-41의 중쇄이다. 본 발명의 또 다른 실시상태에서, 절편은 항체 51-41의 경쇄 및/또는 중쇄의 하나 이상의 가변 영역을 포함한다. 본 발명의 또 다른 실시상태에서, 절편은 항체 51-41의 경쇄 및/또는 중쇄의 하나, 둘, 또는 세개의 CDR을 포함한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 항체는 51-41의 인체적응형 항체이다. 본 발명의 일 실시상태에서, 항체 51-41에서 유도한 하나 이상의 CDR은 51-41의 최소한 하나의, 최소한 둘, 최소한 셋, 최소한 넷, 최소한 다섯, 또는 최소한 여섯개의 CDR과 최소한 약 85%, 최소한 약 86%, 최소한 약 87%, 최소한 약 88%, 최소한 약 89%, 최소한 약 90%, 최소한 약 91%, 최소한 약 92%, 최소한 약 93%, 최소한 약 94%, 최소한 약 95%, 최소한 약 96%, 최소한 약 97%, 최소한 약 98%, 또는 최소한 약 99% 일치한다.

[0080]

본 발명의 일 실시상태에서, CDR은 Kabat CDR이다. 다른 실시상태에서, CDR은 Chothia CDR이다. 다른 실시상태에서, CDR은 Kabat 및 Chothia CDR의 조합("결합 CDR" 또는 "확장 CDR")이다. 환언하면, 하나 이상의 CDR을 포함하는 실시 상태에서, CDR은 Kabat, Chothia, 및/또는 이의 조합 중의 하나가 될 수 있다.

[0081]

항체 및 항체에서 유도된 폴리펩타이드를 제조하는 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 본원에서 개시하였다. 본 발명의 단클론성 항체는 성립된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 단클론성 항체는 하이브리도마 기술을 사용하여 제조할 수 있으며, 이는 예컨대 문헌 Kohler and Milstein (1975), Nature, 256:495에 설명되어 있다. 하이브리도마법에서, 마우스, 햄스터, 또는 다른 적당한 숙주 동물은 일반적으로 면역제(예컨대, CD43 또는 CEA를 발현하는 암세포, 본원의 항체를 사용하여 분리 정제되는 CD43 또는 CEA(암세포에 의하여 발현되는 세포의 도메인 및 이들의 절편을 포함), 또는 폴리펩타이드의 N-말단에 아미노산 서열 N'-Trp-Pro-Ile-C'를 포함하는 폴리펩타이드)로 면역되어, 면역제에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 또는 생산할 수 있는 림프구를 유도하게 된다. 대안적으로, 림프구는 시험관 내에서 면역될 수 있다. 림프구를 적합한 용융제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 무한증식 세포주와 융합하여 하이브리도마 세포를 형성한다 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-1031). 무한증식 세포주는 일반적으로 형질전환된 포유류 세포, 특히 설치류, 레빗, 소 및 인간 기원의 골수종 세포이다. 일반적으로, 레트 또는 마우스 골수종 세포주를 사용한다. 하이브리도마 세포는 바람직하게는 미융합된, 무한증식 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지 내에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 모세포가 효소 하이포잔틴 구아닌 포스포라이보실 전이효소(HGPRT 또는 HPRT) 결핍인 경우, 하이브리도마 용 배양 배지는 일반적으로 HGPRT-결핍 세포의 성장을 차단하는 물질인 하이포잔틴, 아미노프테린, 및 티미딘을 포함한다("HAT 배지").

[0082]

바람직한 무한증식 세포주는 효과적으로 융합하고, 선택된 항체-생산 세포에 의하여 항체의 안정적인 높은 수준의 발현을 지원하는 것이며, 배지 예컨대 HAT 배지에 민감성인 것이다. 더 바람직한 무한증식 세포주는, 예를

들어, 술크(Salk) 연구소 세포 분배 센터(San Diego, Calif), 및 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(Manassas, Va)에서 획득할 수 있는 뮤린 골수종 세포주이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 인간 단클론성 항체의 생산을 위하여 설명되었다(Kozbor, J. Immunol. (1984), 133:3001; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63).

[0083] 하이브리도마 세포가 배양되는 배양 배지는 단클론성 항체의 존재에 대하여 분석하였다. 항체는 비조혈성 암 또는 종양 세포에 의하여 발현되는 CD-43 또는 CEA 상의 에피토프에 특이적으로 결합하나, CD43 발현 백혈구, Jurkat 세포, 및/또는 조혈 기원의 다른 CD43 발현 세포에는 특이적으로 결합하지 않는 것으로 선별될 수 있다. 에피토프를 포함하는 암세포 또는 세포의 도메인(이들의 절편 포함)이 선별을 위하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 실시예 10에 설명된 COLO 205 세포에 의하여 발현된 CEA-N-A2가 선별을 위하여 사용될 수 있다.

[0084] Jurkat 세포주는 림프모구 백혈병 세포이며, 14세 소년의 말초 혈액에서 생성되었다(Schneider et al., Schneider et al., Int. J. Cancer 19:621-626, 1977). 다양한 Jurkat 세포주를, 예를 들어, 아메리칸 타입 컬처 컬렉션에서 구득가능하다(예컨대, ATCC TIB-152, ATCC TIB-153, ATCC CRL-2678).

[0085] 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의하여 생산된 단클론성 항체의 결합 특이성은 면역침전 또는 시험관 내 결합 분석, 예컨대 방사성면역분석(RIA) 또는 효소-유관 면역흡수 분석(ELISA)에 의하여 측정된다. 이러한 기법 및 분석법은 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 단클론성 항체의 결합 친화도는, 예를 들어, 문헌 Munson and Pollard (1980), Anal. Biochem., 107:220의 스캐차드 분석에 의하여 결정될 수 있다.

[0086] 확인된 항체는 당해 기술 분야에 공지되었거나 본원에서 설명된 방법을 사용하여 세포 사멸(예컨대, 세포자멸사)을 유도하는 이들의 능력, 및/또는 세포 성장 또는 증식을 억제하는 능력을 추가로 시험할 수 있다.

[0087] 소망하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 클론은 제한 회석 절차 및 표준 방법에 의한 성장에 의하여 서브클론할 수 있다(Goding, supra). 이 목적을 위한 적합한 배양 배지는, 예를 들어, 둘베코 변형 이글 배지 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 대안적으로, 하이브리도마 세포는 포유류 내의 복수에서 생체 내 성장시킬 수 있다.

[0088] 단클론성 항체는 하이브리도마 세포를 배양함으로써 생성할 수 있으며, 및 하이브리도마 세포에 의하여 분비된 항체는 추가로 분리 또는 정제될 수 있다. 항체는 기존의 면역글로블린 분리정제 절차 예컨대, 예를 들어, 단백질 A-세파로스, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화도 크로마토그래피에 의하여 배양 배지 또는 복수 유체로부터 분리 또는 정제될 수 있다.

[0089] 본 발명의 항체는, 예컨대 미국 특허 제4,816,567호 및 제6,331,415호에 설명되고, 참고자료로서 본원에 포함된 재조합 DNA 방법에 의하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 단클론성 항체를 암호화하는 DNA는 쉽게 분리될 수 있으며, 기존의 절차를 사용하여(예컨대, 뮤린 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여) 서열화된다. 본 발명의 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 선호하는 공급원으로서 제공된다. 분리된 경우, DNA는 발현 벡터 내로 위치될 수 있으며, 이들은 그 다음 숙주 세포 예컨대, 면역글로블린 단백질을 생산할 수 없는 시미안 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 골수종 세포로 전달감염되어, 재조합 숙주 세포 내의 단클론성 항체의 합성을 획득하게 된다. DNA는 변형될 수 있으며, 예를 들어, 동종 뮤린 서열의 위치 내의 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인의 암호화 서열로 치환됨으로써(미국 특허 제4,816,567호) 또는 비-면역글로블린 폴리펩타이드의 암호화 서열의 모든 또는 일부의 면역글로블린 암호화 서열에 공유결합함으로써 변형될 수 있다. 이러한 비-면역글로블린 폴리펩타이드는 키메라 2가 항체를 생성하기 위하여 본 발명의 항체의 불변 도메인으로 치환되거나, 또는 본 발명의 항체의 하나의 항원-결합 부위의 가변 도메인으로 치환될 수 있다.

[0090] 본 발명의 일 실시상태에서, 본 발명의 항체는 두 발현 벡터로부터 발현된다. 제1 발현 벡터는 항체 중쇄의 가변 영역을 암호화하는 제1 부분, 및 항체 중쇄의 불변 영역을 암호화하는 제2 부분을 포함하는 항체(예컨대, 인체적응형 항체)의 중쇄를 암호화한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 제1 부분은 SEQ ID NO:7로 나타난 아미노산 서열을 보유한 가변 영역을 암호화한다. 제2 발현 벡터는 항체 경쇄의 가변 영역을 암호화하는 제1 부분, 및 항체 경쇄의 불변 영역을 암호화하는 제2 부분을 포함하는 항체의 경쇄를 암호화한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 제1 부분은 SEQ ID NO:8로 나타난 아미노산 서열을 보유한 가변 영역을 암호화한다.

[0091] 대안적으로, 본 발명의 항체(예컨대, 인체적응형 항체)는 단일 발현 벡터로부터 발현된다. 단일 발현 벡터는 본 발명의 항체의 중쇄 및 경쇄 모두를 암호화한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 발현 벡터는 SEQ ID NO:7로 나타난 아미노산 서열을 보유한 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:8로 나타난 아미노산 서열을 보유한 경쇄 가변 영역을

암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

- [0092] 정상적으로 발현 벡터는 숙주 세포와 경쟁할 수 있는 종으로부터 유도된 전사 및 번역 조절 서열을 보유한다. 이와 함께, 벡터는 일반적으로 형질전환된 세포 내의 표현형 선택을 제공할 수 있는 특이적 유전자(들)을 운반한다.
- [0093] 진핵 세포용 재조합 숙주-벡터 발현 시스템의 다양성은 공지되어 있으며, 본 발명에 사용될 수 있다. 다수의 다른 균주, 예컨대 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)를 사용할 수 있음에도, 예를 들어, 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 일반적인 베이킹 효모가 진핵 미생물사이에서 가장 일반적으로 사용된다. 다세포성 유기체 예컨대 ATCC로부터 이용가능한 Sp2/0 또는 차이나이즈 햄스터 난소(CHO)에서 유도된 세포주가 숙주로 사용될 수 있다. 진핵 세포 형질전환에 적합한 전형적인 벡터 플라스미드는, 예를 들어, pSV2neo 및 pSV2gpt(ATCC), pSVL 및 pSVK3(Pharmacia), 및 pBPV-1/pML2d(International Biotechnology, Inc.)이다.
- [0094] 본 발명에 유용한 진핵 숙주 세포는, 바람직하게는, 하이브리도마, 골수종, 형질세포종 또는 림프종 세포이다. 그러나, 포유류 숙주 세포가 단백질의 발현을 위한 전사 및 발현 DNA 서열을 인식하고; 리더 서열의 분해 및 단백질의 분비에 의하여 리더 펩타이드의 프로세싱하며; 및 단백질의 번역후 변형, 예컨대, 글리코실화를 제공할 수 있다면 다른 진핵 숙주 세포도 적절하게 사용할 수 있다.
- [0095] 따라서, 본 발명은 본원의 DNA 구조체를 포함하는 재조합 발현 벡터에 의하여 형질전환되고, 본 발명의 항체 또는 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 진핵 숙주 세포를 제공한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 본 발명의 형질전환된 숙주 세포는, 따라서, 항체 또는 폴리펩타이드의 발현을 조절하기 위하여 본원의 경쇄 및 중쇄 DNA 서열, 및 경쇄 및 중쇄-암호화 DNA 서열에 관련되어 위치된 전사 및 번역 조절 서열을 포함하는 최소한 하나의 DNA 구조체를 포함한다.
- [0096] 본원에서 사용된 숙주 세포는 당해 기술 분야에 공지된 표준 전달감염 절차에 따라 다양한 방법으로 형질전환될 수 있다. 사용할 수 있는 표준 전달감염 절차는 전기천공 기법, 프로토플라스트 융합 및 칼슘-포스페이트 침전 기법이다. 이러한 기법들은 일반적으로 문헌 F. Toneguzzo et al. (1986), *Mol. Cell Biol.* 6:703-706; G. Chu et al., *Nucl. Acid Res.* (1987), 15:1311-1325; D. Rice et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1979), 79:7862-7865; 및 V. Oi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983), 80:825-829 등에 설명되어 있다.
- [0097] 두 발현 벡터의 경우, 두 발현 벡터는 하나씩 별도로 또는 함께(동시-전달 또는 동시-전달감염) 숙주 세포 내로 전달감염될 수 있다.
- [0098] 본 발명은 또한 항체 또는 폴리펩타이드를 제조하는 방법을 제공하며, 이는 항체 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 발현 벡터(들)을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 당해 기술 분야의 숙련자에게 공지된 방법에 의하여 배양물로부터 항체 또는 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함한다.
- [0099] 더욱이, 소망하는 항체를 유전자삽입 동물 내에서 생산할 수 있다. 적합한 유전자삽입 동물은 난(egg)으로 적절한 발현 벡터를 미소-주입하여, 난을 가임 암컷으로 전달하고, 소망하는 항체를 발현하는 자손을 선택하는 것을 포함하는 표준 방법에 따라 획득할 수 있다.
- [0100] 본 발명은 암세포에서 발현되는 CD43 및 CEA 상의 에피토프를 특이적으로 인식하는 키메라 항체를 제공한다. 예를 들어, 키메라 항체의 가변 및 불변 영역은 별개의 종으로부터 온 것이다. 본 발명의 일 실시상태에서, 중쇄 및 경쇄 모두의 가변 영역은 본원의 무린 항체에서 유래한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 가변 영역은 SEQ ID NO:1 및 SEQ ID NO:2에 나타난 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 가변 영역은 SEQ ID NO:3 및 SEQ ID NO:4에 나타난 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 가변 영역은 SEQ ID NO:5 및 SEQ ID NO:6에 나타난 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 중쇄 및 경쇄 모두의 불변 영역은 인간 항체에서 유래한다.
- [0101] 본 발명의 키메라 항체는 당해 기술 분야에서 잘 확립된 방법으로 제조할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제 6,808,901호, 미국 특허 제 6,652,852호, 미국 특허 제 6,329,508호, 미국 특허 제 6,120,767호 및 미국 특허 제 5,677,427호를 참조하며, 이들 각각은 참고자료로서 본원에 포함되어 있다. 일반적으로, 키메라 항체는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 cDNA를 확보하고, 이 cDNA를 발현 벡터로 삽입함으로써 제조할 수 있으며, 이들이 진핵 숙주 세포 내로 도입되어, 본 발명의 키메라 항체를 발현하게 된다. 바람직하게는, 발현 벡터는 기능적으로 완전한 불변 중쇄 또는 경쇄 서열을 운반하여, 모든 가변 중쇄 또는 경쇄 서열이 발현 벡터 내로 쉽게 삽입될 수 있다.

- [0102] 본 발명은 비조혈성 암세포에 의하여 발현되는 CD43 및 CEA 상의 에피토프를 특이적으로 인식하는 인체적응형 항체를 제공한다. 인체적응형 항체는 일반적으로 CDR의 잔기가 비인간 중 예컨대, 소망하는 특이성, 친화도 및 용량을 지닌 마우스, 랫트 또는 레빗의 CDR의 잔기로 대체된 인간 항체이다. 예를 들어, 인간 항체의 Fv 프레임 워크 잔기는 대응하는 비인간 잔기에 의하여 대체된다.
- [0103] 단클론성 항체를 인간화하는 일반적인 4 단계가 존재한다. 이들은: (1) 개시 항체 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 뉴클레오타이드 및 예견된 아미노산 서열을 결정하는 단계, (2) 인체적응형 항체를 설계하는 단계, 즉, 인간화 프로세스에 사용되는 항체 프레임워크 영역을 결정하는 단계, (3) 실제 인간화 방법론/기법, 및 (4) 인체적응형 항체의 전달감염 및 발현이다. 예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호; 제5,807,715호; 제5,866,692호; 제6,331,415호; 제5,530,101호; 제5,693,761호; 제5,693,762호; 제5,585,089호; 제6,180,370호; 및 제6,548,640호를 참조한다. 예를 들어, 불변 영역은 항체가 임상 시험 및 인간 치료에 사용되는 경우, 면역 반응을 회피하기 위하여 인간 불변 영역과 더욱 유사하게 조작될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,997,867호 및 제5,866,692호를 참조한다.
- [0104] 중요한 것은 항체가 항원 및 다른 유익한 생물학적 특성에 대한 고 친화도를 보유한 인체적응형이 된다는 것이다. 이 목표를 달성하기 위하여, 인체적응형 항체는 모 서열 및 인체적응형 서열의 3차원 모델을 사용하여 모 서열 및 다양한 개념적 인체적응형 산물의 분석 프로세스에 의하여 제조될 수 있다. 3차원 면역글로블린 모델이 일반적으로 사용가능하며, 이는 당해 기술 분야의 숙련자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로블린 서열의 가능한 3차원 입체형태 구조를 도시하고 현시하는 컴퓨터 프로그램을 사용할 수 있다. 이러한 현시의 조사는 후보 면역글로블린 서열의 기능에 있어서의 잔기의 역할의 분석, 즉 후보 면역글로블린이 이들의 항원에 결합하는 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방법으로, FR 잔기를 선택할 수 있으며, 컨센서스로부터 결합하고, 서열에 도입하여, 소망하는 항체 특성, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도를 달성하게 된다. 일반적으로, CDR 잔기는 직접적으로 및 가장 실질적으로 항원 결합에 영향을 미친다. 인체적응형 항체는 항체의 하나 이상의 특성을 향상시키기 위하여 힌지 영역 내에서의 변형을 함유할 수 있다.
- [0105] 다른 대안으로서, 파지 디스플레이 기술에 의하여 항체를 선별하고, 재조합적으로 생산할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,565,332호; 제5,580,717호; 제5,733,743호 및 제6,265,150호; 및 문헌 Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994)를 참조한다. 대안적으로, 파지 디스플레이 기술 (McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990))은 비면역화 공여자의 면역글로블린 가변 (V) 도메인 유전자 레퍼토리로 부터 시험관 내에서 인간 항체 및 항체 절편을 생산하기 위하여 사용될 수 있다. 이 기법을 따라, 항체 V 도메인 유전자는 필라멘트 형 박테리오파지, 예컨대 M13 또는 fd의 메이저 또는 마이너 피복 단백질 유전자로 프레임-내 클론되고, 파지 입자의 표면에 기능적 항체 절편을 현시한다. 필라멘트형 입자가 파지 게놈의 단일-가닥 DNA 카피를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 특성에 기초한 선택은 이러한 특성을 나타내는 항체를 암호화하는 유전자의 선택이 된다. 따라서, 파지는 B 세포의 특성의 일부를 모사한다. 파지 디스플레이는 다양한 포맷에서 수행될 수 있다; 리뷰를 위하여, 예컨대, 문헌 Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3, 564-571 (1993)을 참조한다. V-유전자 부분의 다양한 공급원은 파지 디스플레이용으로 사용될 수 있다. 문헌 Clackson et al, Nature 352:624-628 (1991)는 면역화 마우스의 비장에서 유도한 V 유전자의 작은 무작위 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 배열을 분리하였다. 비면역화 인간 공여자의 V 유전자 레퍼토리는 구조화될 수 있으며, 항원(자가-항원을 포함)의 다양한 배열에 대한 항체는 문헌 Mark et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), 또는 Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)에 설명된 기법에 따라 필수적으로 분리될 수 있다. 자연 면역 요법에서, 항체 유전자는 돌연변이를 고도로 축적한다(체세포 과돌연변이). 도입된 변화의 일부는 고 친화도를 부여하게되며, 고-친화도 표면 면역글로블린을 현시하는 B 세포는 후속적 항원 시험시 우전적으로 복제되고 분화된다. 이 자연적 프로세스는 "체인 서플링"으로 알려진 기법을 사용하여 모사될 수 있다(Marks, et al., Bio/Technol. 10:779-783 (1992)). 이 방법에서, 파지 디스플레이에 의하여 획득한 "1차" 인간 항체의 친화도는 중쇄 및 경쇄 V 영역 유전자를 비면역화 공여자에서 획득한 V 도메인 유전자의 자연 발생적 변이체(레퍼토리)의 레퍼토리로 대체함으로써 향상시킬 수 있다. 이 기법은 pM-nM 범위에서 친화도를 지닌 항체 및 항체 절편을 생산할 수 있다. 초거대 파지 항체 레퍼토리("모든 라이브러리의 모체")를 생산하기 위한 전략은 문헌 Waterhouse et al, Nucl. Acids Res. 21 :2265-2266 (1993)에 설명되어 있다. 유전자 서플링은 설치류 항체에서 인간 항체를 유도하기 위하여 사용할 수 있으며, 여기서, 인간 항체는 개시 설치류 항체와 유사한 친화도 및 특이성을 보유한다. "에피토프 임프린팅"으로 불리우는 이 방법을 따라서, 파지 디스플레이 기법에 의하여 획득한 설치류 항체의 중쇄 또는 경쇄 V 도메인 유전자는 인간 V 도메인 유전자의 레퍼토리로 대체되어, 설치류-인간 키메라를 생성한다. 항원의 선택에 의하여 기능성 항원-결합 부위를 복구할 수

있는 인간 가변 영역의 분리가 되며, 즉, 에피토프가 파트너의 선택을 결정(임프린트)한다. 이 프로세스가 잔존하는 설치류 V 도메인을 치환하기 위하여 반복되는 경우, 인간 항체를 획득한다(PCT 출원 WO 93/06213, April 1, 1993 발행). CDR 이식에 의한 설치류 항체의 전통적인 인간화와 달리, 이 기법은 설치류 기원의 프레임워크 또는 CDR 잔기를 보유하지 않은 완전한 인간 항체를 제공한다. 전술한 논의가 인체적용형 항체에 관한 것이지만, 논의된 일반적인 원칙은, 예를 들어, 개, 고양이, 영장류, 말 및 소에 사용하기 위한 주문형 항체에 적용할 수 있다는 것은 명백하다.

[0106] 특정 실시상태에서, 항체는 완전한 인간 항체이다. 항원에 특이적으로 결합하는 비인간 항체는 항원에 결합하는 완전한 인간 항체를 생산하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 당해 기술 분야의 숙련자는 체인 스와핑 기법을 사용할 수 있으며, 여기서 비인간 항체의 중쇄가 다른 인간 경쇄를 발현하는 발현 라이브러리와 동시 발현된다. 하나의 인간 경쇄와 하나의 비인간 중쇄를 함유하는 최종 하이브리드 항체는 항원 결합으로 선별된다. 항원 결합에 참여하는 경쇄는 인간 항체 중쇄의 라이브러리와 동시 발현된다. 최종 인간 항체는 항원 결합으로 한 번 더 선별된다. 이 기법은 예컨대 미국 특허 제5,565,332호에 보다 상세하게 설명되어 있다. 이와 함께, 항원은 인간 면역글로블린 유전자의 유전자삽입하는 동물을 접종하기 위하여 사용될 수 있다. 예컨대, 미국 특허 제5,661,016호를 참조한다.

[0107] 항체는 이중특이성 항체일 수 있으며, 최소한 두개의 서로 다른 항원에 결합 특이성을 지닌 단클론성 항체는 본원의 항체를 사용하여 생산할 수 있다. 이중특이성 항체를 생산하기 위한 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있다(예컨대, Suresh et al, 1986, Methods in Enzymology 121:210). 전통적으로, 이중특이성 항체의 재조합 생산은 서로 다른 특이성을 지닌 두 중쇄를 지닌 두 면역글로블린 중쇄-경쇄 짝의 동시발현에 기초한다(Millstein and Cuello, 1983, Nature 305, 537-539).

[0108] 이중특이성 항체를 제조하는 일 방법에 따라, 소망하는 결합 특이성을 지닌 항체 가변 도메인(항체-항원 결합 부위)은 면역글로블린 불변 도메인 서열에 융합된다. 바람직하게는 융합은 힌지, CH2 및 CH3 영역의 최소한 일부를 포함하는 면역글로블린 중쇄 불변 도메인과 하게된다. 최소한 하나의 융합에 존재하는, 경쇄 결합에 필요한 부위를 포함하는 제1 중쇄 불변 영역(CH1)을 보유하는 것이 바람직하다. 면역글로블린 중쇄 융합을 암호화하는 DNA, 및 소망하는 경우, 면역글로블린 경쇄가 별도의 발현 벡터 내로 삽입되고, 적합한 숙주 유기체 내로 동시전달감염된다. 제조시 사용되는 세 폴리펩타이드의 불균등한 비율이 최적의 수득율을 제공하는 실시상태에서, 이는 세 폴리펩타이드 절편의 성숙 부분을 조절하는 상당한 유연성을 제공한다. 그러나, 최소한 두 폴리펩타이드 사슬이 동일한 비율로 발현하여 고도의 수득율을 나타내는 경우 또는 비율이 특정한 중요성을 가지지 않은 경우 일 발현 벡터 내의 둘 또는 셋 모두의 폴리펩타이드 사슬의 암호화 서열을 삽입하는 것이 가능하다.

[0109] 일 방법으로서, 이중특이성 항체는 한 팔에 제1 결합 특이성, 및 다른 팔에 하이브리드 면역글로블린 중쇄-경쇄 짝(제2 결합 특이성 제공)을 보유한 하이브리드 면역글로블린 중쇄로 구성되어 있다. 이중특이성 분자의 절반 내에서만 면역글로블린 경쇄를 보유한 이 대칭 구조는 원치않는 면역글로블린 사슬 조합으로부터 소망하는 이중특이성 화합물의 분리를 촉진한다. 이 방법은 PCT 출원 WO 94/04690(March 3, 1994 발행)에 설명되어 있다.

[0110] 공유 결합된 항체를 포함하는 이형접합 항체는 본 발명의 범위 내에 있다. 이러한 항체는 표적 면역 시스템 세포가 원치않는 세포를 표적화하거나(미국 특허 제4,676,980호), 및 HIV 감염의 치료용(PCT 출원 WO 91/00360 및 WO 92/200373; 및 EP 03089)으로 사용되어 왔다. 이형접합 항체는 모든 종래의 가교-결합 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 적합한 가교-결합제 및 기법은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 미국 특허 제4,676,980호에 설명되어 있다.

[0111] 단일 사슬 Fv 절편을 생산할 수 있으며, 예컨대 문헌 Iliades et al, 1997, FEBS Letters, 409:437-441에 설명되어 있다. 다양한 링커를 사용한 이러한 단일 사슬 절편의 커플링은 문헌 Kortt et al., 1997, Protein Engineering, 10:423-433에 설명되어 있다. 다양한 재조합 생산 및 항체 조작 기법은 당해 기술 분야에 공지되어 있다.

[0112] 전술한 단클론성 항체뿐만 아니라, 항체의 활성 결합 영역을 함유하는 이들의 절편, 예컨대 Fab, F(ab')₂, scFv, Fv 절편 등을 포괄 하는 것으로 고려되었다. 이러한 절편은 잘 확립된 기법에 의하여 본원의 단클론성 항체로부터 생산될 수 있다(Rousseaux et al. (1986), in Methods Enzymol, 121 :663-69 Academic Press).

[0113] 항체 절편을 제조하는 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 항체 절편은 F(ab')₂로 언급되는 100 Kd 절편을 제공하기 위하여 펩신으로 항체의 효소 분해에 의하여 생산될 수 있다. 이 절편은 50 Kd Fab' 1

가 절편을 생산하기 위하여 이황화 결합을 분해하는 티올 환원제, 및 선택적으로 설프하이드릴기의 차단기를 사용하여 추가로 분해할 수 있다. 대안적으로, 과과인을 사용한 효소 분해는 직접적으로 두개의 1가 Fab 절편 및 Fc 절편을 생산한다. 이러한 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제4,036,945호 및 제4,331,647호 및 본원에 포함된 참고자료에 설명되어 있으며, 이들 특허는 참고자료로서 본원에 포함되어 있다. 또한 문헌 Nisonoff et al. (1960), Arch Biochem. Biophys. 89: 230; Porter (1959), Biochem. J. 73: 119, Edelman et al., in METHODS IN ENZYMOLOGY VOL. 1, page 422 (Academic Press 1967)을 참고한다.

[0114] 대안적으로, Fab는 항체의 Fab를 암호화하는 DNA를 원핵생물용 발현 벡터 또는 진핵생물용 발현 벡터에 삽입하고, Fab를 발현하기 위하여 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물로 도입함으로써 생산할 수 있다.

[0115] 본 발명은 이들의 특성 및 증진 또는 감소된 활성 및/또는 친화도를 보유한 변이체에 현저한 영향을 미치지 않는 기능적으로 동등한 항체를 포함하는 본원의 항체 또는 폴리펩타이드의 변형을 포괄한다. 예를 들어, 항체 5F1 또는 인체적응형 항체의 아미노산 서열은 암세포에서 발현되는 CD43 또는 CEA와의 소망하는 결합 친화도를 지닌 항체를 획득하기 위하여 돌연변이된다. 폴리펩타이드의 변형은 당해 기술 분야에 일상적인 것이므로 본원에서 달리 설명할 필요가 없다. 변형된 폴리펩타이드의 예는 기능 활성을 상당히 변화시키지 않는 아미노산 잔기의 보존적 치환, 하나 이상의 아미노산의 결실 또는 첨가, 또는 화학적 유사체가 사용되는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0116] 아미노산 서열 삽입은 하나의 잔기에서 수백개 이상의 잔기를 포함하는 폴리펩타이드 길이 범위의 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합 및, 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 내부서열 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 지닌 항체 또는 에피토프 태그에 융합된 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 혈장반감기를 증가시키는 효소 또는 폴리펩타이드의 항체의 N- 또는 C-말단에 융합을 포함한다.

[0117] 치환 변이체는 제거된 항체 분자 내에 최소한 하나의 아미노산 잔기 및 그 자리에 삽입된 잔기를 포함한다. 치환 돌연변이발생의 가장 관심 대상인 부위는 고가변 영역을 포함하나, FR 변형 또한 고려된다. 보존적 치환은 "보존적 치환이라는 표제하의 표에 나타내었다. 이러한 치환이 생물학적 활성의 변화를 나타내는 경우, 하기 표의 "예시적 치환"으로 나타내었거나 또는 아미노산 클래스의 참고자료에 더 자세히 설명한 더욱 실질적인 변화가 도입될 수 있으며, 산물을 선별하게 된다.

아미노산 치환		
원 잔기	보존적 치환	예시적 치환
Ala(A)	Val	Val;Leu;Ile
Arg(R)	Lys	Lys;Gln;Asn
Asn(N)	Gln	Gln;His;Asp;Lys;Arg
Asp(D)	Glu	Gln;Asn
Cys(C)	Ser	Ser;Ala
Gln(Q)	Asn	Asn;Glu
Glu(E)	Asp	Asp;Gln
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Arg	Asn;Gln;Lys;Arg
Ile(I)	Leu	Leu;Val;Met;Ala;Phe; Norleucine
Leu(L)	Ile	Norleucine;Ile;Val;Met; Ala;Phe
Lys(K)	Arg	Arg;Gln;Asn
Met(M)	Leu	Leu;Phe;Ile
Phe(F)	Tyr	Leu;Val;Ala;Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Ser	Ser
Trp(W)	Tyr	Tyr;Phe
Tyr(Y)	Phe	Trp;Phe;Thr;Ser
Val(V)	Leu	Ile;Leu;Met;Phe;Ala; Norleucine

[0118]

[0119] 항체의 생물학적 특성의 실질적인 변경은 (a) 치환 영역 내의 폴리펩타이드 골격의 구조, 예를 들어, 시트 또는 나선 입체형태, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피를 유지시키는 이들의 효과를 현저하게 변화시키는 치환을 선택함으로써 달성할 수 있다. 자연 발생적 잔기는 측쇄 특성에 기초하여 그룹으로 나누어 진다:

[0120] (1) 무극성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

- [0121] (2) 무전하 극성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- [0122] (3) 산성(음성 전하): Asp, Glu;
- [0123] (4) 염기성(양성 전하): Lys, Arg;
- [0124] (5) 사슬 방향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro; 및
- [0125] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe, His.
- [0126] 비보전적 치환은 이러한 클래스의 일 멤버를 다른 멤버로 교환함으로써 생산된다.
- [0127] 항체의 적합한 입체형태에 관여하지 않는 모든 시스테인 잔기는, 일반적으로 세린으로 치환되어, 분자의 산화 안정성을 향상시키고 변종 가교-결합을 예방한다. 이와 반대로, 시스테인 결합(들)은 항체에 부가되어 이들의 안정성을 향상시키고, 여기서 특히 항체는 항체 절편 예컨대 Fv 절편이다.
- [0128] 아미노산 변형은 하나 이상의 아미노산의 변화 또는 변형에서 영역, 예컨대 가변 영역의 재설계에 이르는 범위가 될 수 있다. 가변 영역에서의 변화는 결합 친화도 및/또는 특이성을 변화시킨다. 본 발명의 일 실시상태에서, 1 내지 5개의 보존적 아미노산 치환만이 CDR 도메인 내에서 만들어 진다. 다른 실시상태에서, 1 내지 3개의 보존적 아미노산 치환만이 CDR 도메인 내에서 만들어 진다. 또 다른 실시상태에서, CDR 도메인은 CDRH3 및/또는 CDR L3이다.
- [0129] 변형은 글리코실화 및 비글리코실화 폴리펩타이드, 및 다른 번역 후 변형, 예컨대, 다른 당에 의한 글리코실화, 아세틸화, 및 포스포릴화를 한 폴리펩타이드를 포함한다. 항체는 이들의 불변 영역 내의 보존된 위치에서 글리코실화된다(Jefferis and Lund, 1997, Chem. Immunol. 65:111- 128; Wright and Morrison, 1997, TibTECH 15:26-32). 면역글로불린의 올리고사카라이드 측쇄는 단백질의 기능(Boyd et al., 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe and Howard, 1990, Biochem. 29:4175-4180) 및 입체형태에 영향을 미치며, 글리코단백질의 삼차원 표면에 나타나는 글리코단백질 부분 사이의 분자내부 상호작용(Jefferis and Lund, supra; Wyss and Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7:409-416)에 영향을 미친다. 올리고사카라이드는 글리코단백질이 특이적 인식 구조에 기초하여 특정 분자를 표적화하도록 제공한다. 항체의 글리코실화는 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC)에 영향을 미친다고 보고되어 왔다. 특히, β (1,4)-N-아세틸글루코사미닐전이효소 III(GnTIII), GlcNAc를 양분하는 글리코실전이효소의 소테트라사이클린-조절 발현을 하는 CHO 세포가 향상된 ADCC 활성을 보유한다고 보고되었다(Umana et al., 1999, Mature Biotech. 17: 176-180).
- [0130] 항체의 글리코실화는 일반적으로 N-링크 또는 O-링크이다. N-링크는 아스파라긴 잔기의 측쇄에 탄수화물 모이어티를 부착하는 것이다. 트리펩타이드는 아스파라긴-X-세린, 아스파라긴-X-트레오닌, 및 아스파라긴-X-시스테인을 서열화하며, 여기서 X는 프롤린을 제외한 모든 아미노산이며, 탄수화물 모이어티에 아스파라긴 측쇄를 효소적으로 부착하기 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩타이드 내의 이러한 트리펩타이드 서열 중의 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시라이신이 사용되는 경우라도, O-링크 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토오스, 또는 자일로스 중의 하나가 히드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 부착하는 것이다.
- [0131] 글리코실화 부위에 항체의 첨가는 아미노산 서열을 변화시킴으로써 손쉽게 달성할 수 있으므로, 하나 이상의 전술한 (N-링크 글리코실화 부위를 위한) 트리펩타이드 서열을 함유하게 된다. 변화는 (O-링크 글리코실화 부위를 위한) 원 항체의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 첨가 또는 치환함으로써 만들 수 있다.
- [0132] 항체의 글리코실화 패턴은 잠재적인 뉴클레오타이드 서열의 변화 없이 변화될 수 있다. 글리코실화는 크기는 항체를 발현하기 위하여 사용된 숙주 세포상에 의존한다. 잠재적인 치료제로서 재조합 글리코단백질, 예컨대 항체의 발현에 사용되는 세포 유형이 드물게는 천연 세포이기 때문에, 항체의 글리코실화 패턴 내의 다양성이 기대될 수 있다(예컨대 Hse et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:9062- 9070).
- [0133] 숙주 세포의 선택과 함께, 항체의 재조합 생산시 글리코실화에 영향을 미치는 인자는 성장 모드, 배지 형성, 배양 밀도, 산소공급, pH, 분리정제 스킴 등을 포함한다. 올리고사카라이드 생산에 관련된 특정 효소의 도입 또는 과다발현을 포함하는 다양한 방법이 특정 숙주 유기체 내에서 달성된 글리코실화 패턴을 변화시키도록 제안되었다(미국 특허 제5,047,335호; 제5,510,261호 및 제5,278,299호). 글리코실화, 또는 특정 유형의 글리코실화는 예를 들어, 엔도글리코시다아제 H (엔도 H), N-글리코시다아제 F, 엔도글리코시다아제 F1, 엔도글리코시다아제 F2, 엔도글리코시다아제 F3를 사용하여 글리코단백질로부터 효소적으로 제거될 수 있다. 이와 함께, 재조합 숙주 세포는 특정 유형의 폴리사카라이드의 처리에 결합이 있도록 유전자 조작될 수 있다. 이러한 및 유사한 기법

은 당해 기술 분야에 공지되어 있다.

- [0134] 다른 변형 방법은 당해 기술 분야에 공지된 커플링 기법을 포함하며, 효소적 수단, 산화적 치환 및 킬레이트화를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 변형은 예를 들어, 면역분석용 표지의 부착에 사용될 수 있다. 변형된 폴리펩타이드는 당해 기술 분야에서 확립된 절차를 사용하여 제조되며, 당해 기술 분야에 공지된 표준 분석법을 사용하여 선별되고, 이들 중 일부는 아래 및 실시예에 설명하였다.
- [0135] 본 발명의 항체 또는 폴리펩타이드는 약제, 예컨대 치료제 및 표지에 접합(예를 들어 링크)될 수 있다. 치료제의 예는 방사성 모이어티, 세포독소, 또는 화학치료제 분자이다.
- [0136] 본 발명의 항체 (또는 폴리펩타이드)는 표지 예컨대 형광 분자, 방사성 분자, 효소, 또는 공지된 모든 표지로 링크될 수 있다. 본원에서 사용되는 경우, 용어 "표지"는 검출할 수 있는 모든 분자를 의미한다. 특정 실시 상태에서, 항체는 방사성표지된 아미노산의 합입에 의하여 표지화될 수 있다. 본 발명의 특정 실시상태에서, 마크된 아비딘(예컨대, 광학적으로 또는 색도계로 검출할 수 있는 형광 마커 또는 효소 활성을 함유하는 스트렙타비딘)으로 검출할 수 있는 바이오틴 모이어티가 항체에 부착될 수 있다. 특정 실시상태에서, 표지는 대상 항체에 차례로 결합하는 다른 시약에 혼입되거나 또는 부착될 수 있다. 예를 들어, 표지는 대상 항체에 차례로 특이적으로 결합하는 항체에 혼입되거나 또는 부착될 수 있다. 특정 실시상태에서, 표지 또는 마커는 치료제일 수 있다. 폴리펩타이드 및 글리코단백질을 표지하는 다양한 방법이 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 사용될 수 있다. 표지의 일반적 클래스는 효소, 형광, 화학발광, 및 방사성 표지를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0137] 폴리펩타이드용 표지의 예는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: 방사성동위원소 또는 방사선헤종(예컨대, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), 형광 표지(예컨대, 플루오레세인 이소토시아네이트(FITC), 로다민, 란탄족 포스포르, 피코에리스린 (PE)), 효소 표지 (예컨대, 홍당무 퍼옥시다아제, β-갈락토시다아제, 루시페라아제, 알카라인 포스파타아제, 글루코스 산화효소, 글루코스-6-포스페이트 데하이드로지나아제, 알콜 데하이드로지나아제, 말레이트 데하이드로지나아제, 페니실리나아제, 루시페라아제), 화학발광, 바이오티닐기, 2차 수용체에 의하여 인식되는 설정된 폴리펩타이드 에피토프(예컨대, 류신 지퍼 짝 서열, 2차 항체의 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그). 특정 실시상태에서, 표지는 잠재적 입체 장애를 감소시키기 위하여 다양한 길이의 스페이서 팔에 의하여 부착된다.
- [0138] 본 발명은 또한 본 발명의 항체 또는 폴리펩타이드, 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 약학적으로 허용가능한 부형제는 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 약리학적 효과 물질의 투여를 촉진하는 상대적으로 불활성인 물질이다. 예를 들어, 부형제는 형태 또는 경도를 부여할 수 있으며, 또는 희석제로서 작용한다. 적합한 부형제는 안정화제, 습윤 및 에멀전화제, 다양한 삼투압에 대한 염, 캡슐화제, 완충제, 및 피부 관통 인헨서를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 부형제 및 경구 및 비경구 약물 전달을 위한 제형은 문헌 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)에 설명되어 있다.
- [0139] 본 발명의 일 실시상태에서, 본 발명은 의약의 용도로서 및/또는 의약의 제조용으로서 본원에서 설명한 방법을 사용하기 위한 (본원의) 조성물을 제공한다.
- [0140] 폴리뉴클레오타이드, 벡터 및 숙주 세포
- [0141] 본 발명은 본원의 어떠한 단클론성 항체 및 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 폴리펩타이드는 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 서열을 포함한다.
- [0142] 본 발명의 일 실시상태에서, 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:1에 나타난 중쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열, 및/또는 SEQ ID NO:2에 나타난 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일 실시상태에서, 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:1의 하나, 둘, 또는 세개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열 및/또는 SEQ ID NO:2의 하나, 둘, 또는 세개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일 실시상태에서, 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:9에 나타난 핵산 서열, 및/또는 SEQ ID NO:10에 나타난 핵산 서열을 포함한다.
- [0143] 본 발명의 일 실시상태에서, 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:3에 나타난 중쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열, 및/또는 SEQ ID NO:4에 나타난 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:3의 하나, 둘, 또는 세개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역을 암호화하

는 핵산 서열, 및/또는 SEQ ID NO:4의 하나, 둘, 또는 세개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:11에 나타난 핵산 서열, 및/또는 SEQ ID NO:12에 나타난 핵산 서열을 포함한다.

[0144] 본 발명의 일 실시상태에서, 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:5에 나타난 중쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열, 및/또는 SEQ ID NO:6에 나타난 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:5의 하나, 둘, 또는 세개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열, 및/또는 SEQ ID NO:6의 하나, 둘, 또는 세개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:13에 나타난 핵산 서열, 및/또는 SEQ ID NO:14에 나타난 핵산 서열을 포함한다.

[0145] 본 발명의 일 실시상태에서, 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:7에 나타난 중쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열, 및/또는 SEQ ID NO:8에 나타난 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:15에 나타난 핵산 서열, 및/또는 SEQ ID NO:16에 나타난 핵산 서열을 포함한다.

[0146] 당해 기술 분야의 숙련자라면, 유전 암호의 변성의 결과로서, 본원에서 설명한 폴리펩타이드를 암호화하는 다수의 뉴클레오타이드 서열이 존재한다는 사실을 이해하여야한다. 이러한 폴리뉴클레오타이드의 일부는 모든 천연 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 최소 상동성을 지닌다. 따라서, 코돈 용법의 차이에 기인하여 달라지는 폴리뉴클레오타이드는 본 발명에 의하여 특이적으로 고려되었다. 추가적으로, 본원에서 제공된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자의 대립유전자는 본 발명의 범위내에 있다. 대립유전자는 하나 이상의 돌연변이, 예컨대 뉴클레오타이드의 결실, 첨가 및/또는 치환의 결과로서 변화되는 내부유전자이다. 최종 mRNA 및 단백질은 필수적인 것은 아니나 변형된 구조 또는 기능을 보유할 수 있다. 대립유전자는 표준 기법을 사용하여 확인할 수 있다(예컨대 하이브리드화, 증폭 및/또는 데이터베이스 서열 비교).

[0147] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 화학 합성, 재조합 방법, 또는 PCR을 사용하여 획득할 수 있다. 화학적 폴리뉴클레오타이드 합성법은 당해 기술 분야에 공지되어 있고, 본원에서 상세하게 설명할 필요는 없다. 당해 기술 분야의 숙련자는 본원의 서열 및 상업적 DNA 합성기를 사용하여 소망하는 DNA 서열을 생산할 수 있다.

[0148] 재조합법을 사용하여 폴리뉴클레오타이드를 제조하기 위하여, 소망하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 적합한 벡터 내로 삽입될 수 있으며, 본원에서 설명한 바와 같이 차례로 벡터가 복제 및 증폭을 위하여 적합한 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 당해 기술 분야에 공지된 수단에 의하여 숙주 세포 내로 삽입될 수 있다. 세포는 직접 흡입, 세포내이입, 전달감염, F-메이팅 또는 전기천공에 의하여 외래 폴리뉴클레오타이드를 도입함으로써 형질전환된다. 도입된 경우, 외래 폴리뉴클레오타이드는 비통합 벡터(예컨대 플라스미드)로서 세포 내에서 유지될 수 있거나 또는 숙주 세포 게놈내로 통합될 수 있다. 이렇게 증폭된 폴리뉴클레오타이드는 당해 기술 분야에 공지된 숙주 세포로부터 분리될 수 있다. 예컨대, 문헌 Sambrook et al. (1989)을 참조한다.

[0149] 대안적으로, PCR은 DNA 서열의 재생산을 가능하게 한다. PCR 기술은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 미국 특허 제4,683,195호, 제4,800,159호, 제4,754,065호 및 제4,683,202호 및, 문헌 PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkauwer Press, Boston (1994)에 설명되어 있다.

[0150] 본 발명은 본원에서 설명한 어떠한 폴리펩타이드(항체 포함)를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 (예컨대, 클로닝 벡터, 발현 벡터)를 제공한다. 적합한 클로닝 벡터는 표준 기법을 따라 제조되거나, 또는 구득할 수 있는 다수의 클로닝 벡터로부터 선택될 수 있다. 선택된 클로닝 벡터는 사용하는 숙주 세포에 따라 달라질 수 있으나, 유용한 클로닝 벡터는 일반적으로 자기-복제능을 보유하며 특정 제한 엔도뉴클레아제에 대한 단일 표적을 보유할 수 있으며, 및/또는 벡터를 함유하는 클론을 선택하기위하여 사용될 수 있는 마커용 유전자를 운반할 수 있다. 적합한 예는 플라스미드 및 박테리아 바이러스, 예컨대, pUC18, pUC19, Bluescript(예컨대, pBS SK+) 및 이의 유도체, mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIE1, pCR1, RP4, 파지 DNA, 및 서틀 벡터 예컨대, pSA3 및 pAT28을 포함한다. 이러한 및 다수의 다른 클로닝 벡터는 상업적 공급자 예컨대 BioRad, Strategene, 및 Invitrogen 사로부터 구득할 수 있다.

[0151] 발현 벡터는 일반적으로 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제가능 폴리뉴클레오타이드 구조체이다. 발현 벡터는 에피솜 또는 염색체 DNA의 통합 부분으로서 숙주 세포 내에서 복제가능하다. 적합한 발현 벡터는 플라스미드, 아데노바이러스, 아데노-유관 바이러스, 레트로바이러스를 포함하는 바이러스 벡터, 코스미드, 및

PCT 출원 WO 87/04462에 개시한 발현 벡터(들)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 벡터 성분은 일반적으로 하나 이상의 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: 신호 서열; 복제 원점; 하나 이상의 마커 유전자; 적합한 전사 조절 요소 (예컨대 프로모터, 인핸서 및 종결자). 발현 (즉, 번역)을 위하여, 하나 이상의 번역 조절 요소가 일반적으로 요구되며, 예컨대 리보솜 결합 부위, 번역 개시 부위, 및 종결 코돈이다.

[0152] 대상 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 전기천공, 염화 칼슘, 염화 루비듐, 칼슘 포스페이트, DEAE-텍스트란, 또는 다른 물질을 이용한 전달감염; 입세입자투사법; 리포펙션; 및 감염 (예컨대, 벡터가 감염제, 예컨대 백시니아 바이러스)를 포함하는 다수의 적절한 수단으로 숙주 세포 내로 도입할 수 있다. 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드의 도입의 선택은 숙주 세포의 특성에 따라 달라질 수 있다.

[0153] 본 발명은 본원의 어떠한 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 이중유래 DNA를 과다-발현할 수 있는 모든 숙주 세포는 대상 항체, 폴리펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 유전자를 분리하기 위하여 사용할 수 있다. 포유류 숙주 세포의 비제한적 예는 COS, HeLa, 및 CHO 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는다. PCT 출원 WO 87/04462를 참조한다. 적합한 비포유류 숙주 세포는 원핵생물 (예컨대 E. coli 또는 B. subtilis) 및 효모 (예컨대 S. cerevisiae, S. pombe; 또는 K. lactis)를 포함한다.

[0154] 진단적 용도

[0155] 본 발명은 에피토프 발현과 관련된 질병, 질환 또는 상태(정상 시료에 비하여 증가 또는 감소하였거나, 및/또는 부적절한 발현, 예컨대 에피토프 발현이 정상적으로는 결핍된 조직(들) 및/또는 세포(들) 내에서의 발현의 존재)를 검출, 진단 및 모니터링하기 위한 본 발명 항체, 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드를 사용하는 방법을 제공한다.

[0156] 본 발명의 일 실시상태에서, 이 방법은 암, 예컨대 직장결장암, 췌장암, 위암, 및 폐암을 보유하는 것으로 의심되는 대상체로부터 획득한 시료 내에서 에피토프 발현을 검출하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 이 검출 방법은 시료에 본 발명의 항체, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드를 접촉하는 단계 및 결합의 수준이 대조구 또는 비교 시료의 것과 다른지 여부를 결정하는 단계를 포함한다. 방법은 본원의 항체 또는 폴리펩타이드가 환자에 적합한 치료인지 여부를 결정하기 위하여 유용하다.

[0157] 본원에서 사용되는 경우, 용어 "시료" 또는 "생물학적 시료"는 전 유기체 또는 이들의 조직, 세포 또는 구성 부분의 서브세트 (예컨대, 혈액, 점액, 림프액, 윤활액, 뇌척수액, 타액, 양수, 제대혈, 소변, 질액 및 정액을 포함하나 이에 한정되지 않는 체액)을 의미한다. "시료" 또는 "생물학적 시료"는 또한 전 유기체 또는 예를 들어, 혈장, 혈청, 척수액, 림프액, 피부의 외부 부분, 호흡관, 위장관, 및 비뇨생식관, 누액, 타액, 모유, 혈액 세포, 종양, 장기를 포함하나 이에 한정되지 않는 이들의 조직, 세포 또는 구성 부분, 또는 분획 또는 이들의 일부의 서브세트로부터 제조된 균등질, 용해물 또는 추출물이다. 종종, 시료는 동물로부터 제거되었으나, 용어 "시료" 또는 "생물학적 시료"는 생체 내 분석된 세포 또는 조직을 의미할 수 있으며, 즉, 동물에서 제거되지 않았을 수 있다. 일반적으로, "시료" 또는 "생물학적 시료"는 동물의 세포를 포함할 수 있으나, 이 용어는 비세포성 생물학적 물질, 예컨대 암-유관 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 수준을 측정하기 위하여 사용할 수 있는 혈액, 타액, 또는 소변의 비세포성 분획이 될 수 있다. "시료" 또는 "생물학적 시료"는 세포성 성분, 예컨대 단백질 또는 핵산 분자를 함유하는 유기체를 번식시키는 배지, 예컨대 영양 액체배지 또는 겔일 수 있다.

[0158] 일 실시상태에서, 세포 또는 세포/조직 용해물이 항체와 접촉하며, 항체와 세포 사이의 결합이 결정된다. 시험 세포가 동일 조직 타입의 대조구 세포에 비하여 결합 활성을 나타내는 경우, 이는 시험 세포가 양성이라는 것을 나타낸다. 본 발명의 일 실시상태에서, 시험 세포는 인간 조직의 것이다.

[0159] 특이적 항체-항원 결합을 검출하는 당해 기술 분야의 다양한 방법이 사용될 수 있다. 본 발명의 예시적인 면역 분석법은 형광 극성화 면역분석(FPIA), 형광 면역분석(FIA), 효소 면역분석(EIA), 혼탁 억제 면역분석(NIA), 효소 면역 측정법(ELISA), 및 방사성면역분석(RIA)을 포함한다. 지시기 모이어티, 또는 표지기가 대상체 항체에 부착될 수 있으며, 분석 기기 및 적합성 면역분석 절차를 활용하여 검출하는 다양한 방법을 사용하여 선택할 수 있다. 적합한 표지는 방사선택종 (예컨대, ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H , 또는 ^{32}P), 효소 (예컨대, 알카라인 포스파타아제, 홍당무 퍼옥시다아제, 루시페라아제, 또는 β -갈락토시다아제), 형광 모이어티 또는 단백질(예컨대, 플루오레세인, 로다민, 피코에리스린, GFP, 또는 BFP), 또는 발광 모이어티 (예컨대, QdotTM 나노입자, Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA)를 제한없이 포함한다. 전술한 면역분석법을 수행하기 위하여 사용되는 다양한 기법은 당해 기술 분야의 숙련자에게 공지되어 있다.

[0160] 진단을 위하여, 항체를 포함하는 폴리펩타이드는 방사성동위원소, 형광 표지, 및 다양한 효소-기질 표지를 포함

하나 이에 한정되지 않는 검출가능한 모이어티로 표지될 수 있다. 표지와 항체의 접합 방법은 공지되어 있다.

[0161] 본 발명의 일 실시상태에서, 본 발명의 항체를 포함하는 폴리펩타이드는 표지할 필요는 없으며, 이들의 존재는 본 발명의 항체에 결합하는 표지 항체를 사용하여 검출할 수 있다.

[0162] 본 발명의 항체는 모든 공지의 분석법, 예컨대 경쟁적 결합 분석법, 직접 및 간접 샌드위치 분석법, 및 면역침전 분석법에 사용될 수 있다(Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987)).

[0163] 항체 및 폴리펩타이드는 생체 내 진단적 분석법, 예컨대 생체 내 영상화에 사용될 수 있다. 일반적으로, 항체 또는 폴리펩타이드는 방사선헤중(예컨대 ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , 또는 ^3H)으로 표지되어, 대상 세포 또는 조직을 면역섬광조영술을 사용하여 국소화할 수 있다.

[0164] 항체는 당해 기술 분야에 공지된 기법을 사용하여 조직학에서 염색 시약으로서 사용할 수 있다.

[0165] 치료적 용도

[0166] 본 발명 항체의 놀라운 특징은 비조혈성 암세포 사멸을 효과적으로 유도하는 이들의 능력에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 암, 예컨대, 직장결장암, 폐암, 췌장암, 위암, 유방암, 간세포 암종, 및 갑상선암 등의 치료시 본 발명의 항체 및 폴리펩타이드의 치료적 용도를 제공한다. 암세포가 본원의 항체에 의하여 인식되는 에피토프를 발현하는 한 모든 암, 예컨대 결장암, 직장결장암, 폐암, 유방암, 뇌종양, 악성 흑색종, 신장 세포 암종, 방광암, 림프종, T 세포 림프종, 다발성 골수종, 위암, 췌장암, 뇌암, 자궁내막 암종, 난소암, 식도암, 간암, 두경부 편평 세포 암종, 피부암, 비뇨관 암종, 전립선암, 용모막암종, 인두암, 후두암, 난포막종, 남성모세포종, 자궁내막 과다증식, 자궁내막증, 배아종, 섬유육종, 카포시 육종, 혈관종, 해면 혈관종, 혈관모세포종, 망막모세포종, 별아교세포종, 신경섬유종증, 희소돌기신경아교종, 속질모세포종, 신경절신경모세포종, 신경아교종, 횡문근육종, 과오모세포종, 골원성 육종, 평활근육종, 갑상선 육종 및 윌름 종양을 치료할 수 있다. 방법은 치료를 위하여 개체 내에서 본원의 항체 또는 폴리펩타이드와 종양 또는 암세포 사이의 결합을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0167] 일반적으로, 치료가 필요한 대상체에 항체 또는 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 유효량이 투여되어 암세포의 성장을 억제하거나 및/또는 암세포의 사멸을 유도하게 된다. 바람직하게는 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체로 제형화된다.

[0168] 일 실시상태에서, 조성물은 복강내, 정맥, 피하, 및 근육내 주입, 및 다른 형태의 투여 예컨대 경구, 점막, 흡입, 설하, 등을 통하여 투여하도록 제형화될 수 있다.

[0169] 본 발명의 다른 실시상태에서, 본 발명은 다른 분자, 예컨대 검출가능한 표지, 또는 치료제 또는 세포독성제에 접합된 본 발명의 항체 또는 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 투여를 고려한다. 약제는 방사성동위원소, 독신, 독소이드, 염증제, 효소, 안티센스 분자, 펩타이드, 사이토키인, 또는 화학치료제를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 항체와 이러한 분자를 접합하는 방법은 일반적으로 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 예컨대, PCT 출원 WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; 미국 특허 제5,314,995호; 및 EP 396,387를 참조하며; 이들의 내용은 일체성을 지닌 채 본원에 참고자료로서 포함되어 있다.

[0170] 일 실시상태에서, 조성물은 세포독성제에 접합된 항체 또는 폴리펩타이드를 포함한다. 세포독성제는 세포에 해로운 모든 약제를 포함할 수 있다. 항체 또는 절편과 접합할 수 있는 세포독성제의 선호하는 클래스는 파크리탁셀, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 브롬화 에티디움, 이미딘, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미토산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 푸로마이신 및 이들의 유사체 또는 동종체를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0171] 치료에 필요한 복용량은 투여 경로, 제형의 특성, 대상체 질병의 특성, 대상체의 크기, 체중, 표면적, 연령 및 성별; 투여되는 다른 약물, 및 임상치의 판단에 따라 달라질 수 있다. 적합한 복용량은 0.01 내지 1000.0 mg/kg의 범위이다.

[0172] 일반적으로, 다음의 복용량이 사용될 수 있다: 최소한 약 50 mg/kg 체중; 최소한 약 10 mg/kg 체중; 최소한 약 3 mg/kg 체중; 최소한 약 1 mg/kg 체중; 최소한 약 750 $\mu\text{g/kg}$ 체중; 최소한 약 500 $\mu\text{g/kg}$ 체중; 최소한 약 250 $\mu\text{g/kg}$ 체중; 최소한 약 100 $\mu\text{g/kg}$ 체중; 최소한 약 50 $\mu\text{g/kg}$ 체중; 최소한 약 10 $\mu\text{g/kg}$ 체중; 최소한 약 1 $\mu\text{g/}$

kg 체중, 또는 그 이하의 복용량이 투여된다. 상태에 따라, 수일 또는 그 이상의 반복적 투여를 위하여, 치료는 질병 증상의 소망하는 역제가 발생할 때까지 지속될 수 있다. 예시적인 투여 요법은 약 6 mg/kg의 항체의 주당 투여량을 투여하는 단계를 포함한다. 그러나, 임상이가 달성하기 바라는 약물동태학적 붕괴 패턴에 따라서 다른 투여 요법도 가능하다. 실험적 고려로서, 예컨대 반감기는, 일반적으로 복용량의 결정에 기여하게 된다. 이 요법의 진행은 종래의 기법 및 분석법에 의하여 쉽게 모니터링될 수 있다.

[0173] 일부 대상체 내에서는, 1회 복용량 이상이 요구된다. 투여 빈도는 치료법의 경과를 따라 결정되고 조절된다. 예를 들어, 투여 빈도는 치료할 암의 유형 및 단계, 약제가 예방적으로 투여되었는지 치료적으로 투여되었는지 여부, 이전의 치료법, 환자의 임상적 병력과 약제에 대한 반응, 및 임상이의 판단에 기초하여 결정 또는 조절될 수 있다. 일반적으로 임상이는 적절한 투여량이 소망하는 결과를 달성할 때까지 치료적 항체 (예컨대 인체적응형 5F1)를 투여하게 된다. 일부의 경우, 항체의 지속성 계속 방출 제형이 절절할 수 있다. 지속 방출을 달성하기 위한 다양한 제형 및 기구가 당해 기술 분야에 공지되어 있다.

[0174] 일 실시상태에서, 항체 또는 폴리펩타이드의 투약량은 하나 이상의 투여(들)을 받는 대상체 내에서 실험적으로 결정될 수 있다. 대상체는 항체 또는 폴리펩타이드의 점증적 투약량이 주어질 수 있다. 항체 또는 폴리펩타이드의 효능을 사정하기 위하여, 질병 증상의 마커 예컨대 CD43 또는 CEA를 모니터링할 수 있다. 생체 내 효능은 종양 부하 또는 부피, 질병 진행 시간(TDP)을 평가하고, 및/또는 응답률(RR)을 결정함으로써 측정할 수 있다.

[0175] 본 발명에 다른 항체 또는 폴리펩타이드의 투여는, 예를 들어, 수용자의 생리학적 상태, 투여 목적이 치료적인지 예방적인지 여부, 및 숙련된 임상이에 공지된 다른 요소에 따라 계속적이거나 또는 간헐적이 될 수 있다. 항체 또는 폴리펩타이드의 투여는 설정된 기간 동안 계속될 수 있거나 또는, 간격을 두고 투여될 수 있다.

[0176] 다른 제형은 담체 예컨대 리포솜을 포함하나 이에 한정되지 않는 당해 기술 분야에 공지된 적합한 전달 형태가 포함된다. 예를 들어, 문헌 Mahato et al. (1997) Pharm. Res. 14:853-859를 참조한다. 리포솜 제조는 사이토펙틴, 다중라멜라 소포 및 비라멜라 소포를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0177] 본 발명의 다른 실시상태에서, 조성물은 하나 이상의 항암제, 하나 이상의 본원의 항체, 또는 다른 항원에 결합하는 항체 또는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 최소한 하나의, 최소한 둘, 최소한 셋, 최소한 넷, 최소한 다섯개의 다른 항체를 포함할 수 있다. 항체 및 다른 항암제는 동일제형 (예컨대, 혼합물로서, 당해 기술 분야에서 적시하는 바와 같이)이 되거나, 또는 다양한 개체 집단의 범위의 치료에 유용한, 동시 또는 순차적으로 투여되는 별도 제형이 될 수 있다.

[0178] 본 발명의 어떠한 항체 또는 폴리펩타이드 (예컨대, 항체 5F1 또는 인체적응형)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 소망하는 세포 내에서 본 발명의 어떠한 항체 또는 폴리펩타이드의 전달 및 발현에 사용될 수 있다. 발현 벡터가 항체 또는 폴리펩타이드의 발현을 조절하기 위하여 사용될 수 있다는 사실은 자명하다. 발현 벡터는 당해 기술 분야에 공지된 수단, 예컨대 복강내, 정맥, 근육내, 피하, 경막내, 뇌실내, 경구, 장관내, 비경구, 비강내, 피부, 설하, 또는 흡입 등으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터의 투여는 주입, 경구 투여, 입자총 또는 카테터 투여, 및 국소 투여를 포함하는 국부 또는 전신 투여를 포함한다. 당해 기술 분야의 숙련자는 발현 벡터의 투여에 익숙하여 외래 단백질의 생체 내 발현을 획득할 수 있다. 예컨대, 미국 특허 제6,436,908호; 제6,413,942호; 및 제6,376,471호를 참조한다.

[0179] 본 발명의 어떠한 항체 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 치료적 조성물의 표적화 전달이 사용될 수 있다. 수용체-매개 DNA 전달 기법은, 예를 들어, 문헌 Findeis et al., Trends Biotechnol. (1993) 11:202; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods and Applications Of Direct Gene Transfer (J. A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu et al., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3655; Wu et al. (1991), J. Biol. Chem. 266:338에 설명되어 있다. 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 치료적 조성물은 유전자 요법 프로토콜 내에서 약 100 ng 내지 약 200 mg의 DNA의 범위로 국부적으로 투여된다. 약 500 ng 내지 약 50 mg, 약 1 μ g 내지 약 2 mg, 약 5 μ g 내지 약 500 μ g, 및 약 20 μ g 내지 약 100 μ g의 DNA의 농도 범위가 유전자 요법 프로토콜에서 사용될 수 있다.

[0180] 본 발명의 치료적 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드는 유전자 전달 운반체를 사용하여 전달될 수 있다. 유전자 전달 운반체는 바이러스 또는 비바이러스 기원의 것이 될 수 있다 (일반적으로, Jolly (1994), Cancer Gene Therapy 1 :51; Kimura (1994), Human Gene Therapy 5:845; Connelly (1985), Human Gene Therapy 1:185; 및 Kaplitt (1994), Nature Genetics 6:148). 이러한 암호화 서열의 발현은 내부 포유류 또는 이중유래 프로모터

를 사용하여 유도될 수 있다. 암호화 서열의 발현은 구조적이거나 또는 조절될 수 있다.

- [0181] 소망하는 폴리뉴클레오타이드에 전달 및 소망하는 세포 내에서의 발현을 위한 바이러스-기초 벡터는 공지되어 있다. 예시적인 바이러스-기초 운반체는, 재조합 레트로바이러스를 포함하나 이에 한정되지 않으며, 예컨대, PCT 출원 WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; 미국 특허 제5,219,740호; 제4,777,127호; 영국 특허 제2,200,651호; 및 유럽 특허 제0 345 242호; 알파바이러스-기초 벡터, 예컨대, 신드비스(Sindbis) 바이러스 벡터, 샘리키 포레스트(Semliki forest) 바이러스(ATCC VR-67; ATCC VR-1247), 로스 리버(Ross River) 바이러스(ATCC VR-373; ATCC VR-1246) 및 베네주엘라 에퀀 엔세팔리티스(Venezuelan equine encephalitis) 바이러스(ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), 및 아데노-유관 바이러스(AAV) 벡터, 예컨대, PCT 출원 WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 및 WO 95/00655이다. 사멸 아데노바이러스에 링크된 DNA의 투여(Curiel (1992), Hum. Gene Ther. 3:147)가 사용될 수 있다.
- [0182] 사멸 아데노바이러스에만 링크 또는 미링크된 다중양이온 축합 DNA (예컨대, Curiel (1992), Hum. Gene Ther. 3:147); 리간드-링크 DNA (예컨대, Wu (1989), J. Biol. Chem. 264:16985); 진핵 세포 전달 운반체 세포 (예컨대, 미국 특허. 5,814,482; PCT 출원 WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; 및 WO 97/42338) 및 핵 전하 중성화 또는 세포 멤브레인과 융합을 포함하나 이에 한정되지 않는 비바이러스 전달 운반체 및 방법이 사용될 수 있다.
- [0183] 네이키드 DNA가 사용될 수 있다. 예시적인 네이키드 DNA 도입 방법은 PCT 출원 WO 90/11092 및 미국 특허 제 5,580,859호에 설명되어 있다. 유전자 전달 운반체로서 작용하는 리포솜은 미국 특허 제5,422,120호; PCT 출원 WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; 및 유럽 특허 제0 524 968호에 설명되어 있다. 추가적인 방법은 문헌 Philip (1994), Mol. Cell Biol. 14:2411 및 Woffendin (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. 91:1581에 설명되어 있다.
- [0184] 본 발명의 항체를 포함하는 조성물은 하나 이상의 다른 치료제 예컨대 화학치료제 (예컨대 5-FU, 5-FU/MTX, 5-FU/Leucovorin, Levamisole, Irinotecan, Oxaliplatin, Capecitabin, 또는 Uricil/Tegafur), 면역보조제, 성장 억제제, 세포독성제 및 사이토카인, 등과 함께 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 항체 및 치료제의 양은 어떠한 유형의 약물이 사용되었는지, 치료되는 조직학적 조건, 및 투여의 계획 및 경로에 따라 달라지나, 일반적으로 개별적으로 사용되는 것 보다는 적게 될 것이다.
- [0185] 본원의 항체를 포함하는 조성물의 투여 후, 조성물의 효능이 당해 기술 분야의 숙련자에 공지된 다양한 방법에 의하여 시험관 내 및 생체 내 모두에서 평가될 수 있다. 후보 조성물의 항암 활성을 시험하기 위한 다양한 동물 모델이 공지되어 있다. 이러한 것들에는 무흉선 누드 마우스 또는 scid/scid 마우스, 또는 유전자 뮌린 종양 모델 예컨대 p53 녹아웃 마우스로 인간 종양 이종이식을 포함한다. 이러한 동물 모델의 생체 내 특성은 이들이 특히 인간 환자 내에서 반응을 예측하도록 한다. 이러한 모델은 표준 기법, 예컨대, 피하 주사, 꼬리 정맥 주사, 비장 이식, 복강내 이식 및 신장 캡슐 하의 이식, 등을 사용하여 세포를 동계(syngeneic) 마우스 내로 도입함으로써 생성할 수 있다.
- [0186] 키트
- [0187] 본 발명은 또한 즉석 방법에 사용하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 분리정제된 본원의 항체 또는 폴리펩타이드 및 본 발명의 방법에 따라 사용하기 위한 설명서를 포함하는 하나 이상의 용기를 포함한다. 본 발명의 일 실시상태에서, 이러한 설명서는 비조혈성암, 예컨대 직장결장암의 치료를 위하여 본원에서 설명한 어떠한 방법을 따라 항체 투여의 설명을 포함한다. 키트는 개체가 질병을 보유하는지 여부 및 질병의 단계, 또는 에피토프가 개체 내의 암세포상에서 발현되는지 여부를 확인하는 것에 기초하는 치료에 적합한 개체를 선택하는 설명을 추가로 포함한다.
- [0188] 본 발명의 일 실시상태에서, 시료 내에서 암세포를 검출하기 위한 키트는 본원의 항체 또는 폴리펩타이드 및 항체 또는 폴리펩타이드와 시료 내의 세포의 결합을 검출하기 위한 시약을 포함한다.
- [0189] 암을 치료하기 위한 항체 또는 폴리펩타이드의 용도에 관한 지시는 일반적으로 의도하는 치료를 위한 투약량, 투여 계획, 및 투여 경로에 관한 정보를 포함한다. 용기는 유닛 투여량, 벌크 포장(예컨대, 다중-투여 포장) 또는 서브-유닛 투여량이 될 수 있다. 본 발명의 키트에 제공되는 설명서는 일반적으로 라벨 또는 포장 삽입물(예컨대, 키트에 포함된 페이지 시트) 상의 인쇄 설명서이나, 기계 판독 설명서 (예컨대, 자기 또는 광학 디스크에 담긴 설명서)고 허용된다.

- [0190] 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물이 본원에 설명된 암의 치료에 사용된다는 것을 나타낸다. 설명서는 본원에 설명한 어떠한 방법을 실행하기 위하여 제공될 수 있다.
- [0191] 본 발명의 키트는 적합한 포장 내에 존재한다. 적합한 포장은 바이알, 보틀, 단지, 유연성 포장 (예컨대, 밀봉 마일라 또는 플라스틱 백), 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 또한 특이적 기구, 예컨대 흡입기, 비강 투여 기구(예컨대, 분무기) 또는 주입 기구 예컨대 미니펌프로 조합하여 사용하는 포장을 고려할 수 있다. 키트는 무균 접근 포트를 구비할 수 있다(예를 들어 용기는 정맥 용액 백 또는 피하주사바늘이 관통하는 마개를 지닌 바이알이 될 수 있다). 용기는 무균 접근 포트를 구비할 수 있다(예를 들어 용기는 정맥 용액 백 또는 피하주사바늘이 관통하는 마개를 지닌 바이알이 될 수 있다). 조성물 내의 최소한 하나의 활성제는 본원의 항체이다. 용기는 제2 약학적 활성제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0192] 키트는 선택적으로 부가적 성분 예컨대 완충액 및 번역 설명서를 포함할 수 있다. 정상적으로, 키트는 용기 및 용기상의 또는 이와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물(들)을 포함한다.
- [0193] **[실시예]**
- [0194] 다음의 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것이지만 제한하려는 것이 아니다.
- [0195] 실시예1: 암세포 상에서 발현되는 CD43에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체의 생성 및 특성화
- [0196] 단클론성 항체의 생성
- [0197] 인간 직장결장 아데노암종 세포주, COLO 205 (ATCC CCL-222)는 식품 산업 연구 및 개발 연구소(Food Industry Research and Development Institute, CCRC 60054, Hsin-chu, Taiwan)로부터 구입하고, 10% FBS(Hyclone), 100 units/ml의 페니실린 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 스트렙토마이신(GIBCO BRL)과 함께 RPMI 1640 배지(GIBCO BRL)에서 37°C로 5% CO₂의 습한 환경에서 성장시켰다. 8주령 암컷 Balb/c 마우스를 2×10^7 COLO 205 세포의 500 μl PBS 용액 또는 10 μg 의 부분 분리정제 단백질의 CFA 용액으로 2주마다 3회 접종하였으며, 마지막으로 2×10^6 COLO 205 세포 또는 10 μg 의 부분 분리정제 단백질의 200 μl PBS 용액의 부스트를 주입하였다. 최종 부스트 5일 후, 비장 세포를 X63 골수종 세포와 융합하였다. 하이브리도마를 10% FBS(Hyclone) 및 HAT (Hybri-Max®, Sigma H0262, 100 μM 하이포잔틴, 0.4 μM 아미노프테린, 16 μM 티미딘의 최종 농도)로 보충한 DMEM으로 선택하였다. 단클론성 항체 5F1, 51-41, 및 138-10를 분리하는 세 하이브리도마 세포주 m5F1, m51-41, m138-10를 생성하였다.
- [0198] 단클론성 항체 5F1에 대한 표적 항원의 확인 및 특성화
- [0199] 직장결장암 조직 또는 COLO 205 세포의 멤브레인 단백질을 프로테아제 억제제(Complete tabs; Roche Molecular Biochemicals)를 함유하는 추출 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40)으로 분리하였다. 멤브레인 단백질 용해물은 단백질 G 세파로스(Amersham Pharmacia Biotech Inc., N.J., U.S.A) 상에 고정된 비-면역 마우스 IgG를 함유하는 1-ml 컬럼상에서 제1 사전제거하였으며, 유출부를 단백질 G-세파로스에 커플된 5F1의 1-ml 컬럼상에 직접 가하였다. 컬럼을 세척하고, 5F1의 표적 단백질을 용출시켰다. 분리 단백질의 순도는 실버 염색에 의하여 시각화되었고, 8% SDS-PAGE 상의 분리 후 웨스턴 블롯에 의하여 확인되었다. 분리 단백질은 마우스를 면역화하기 위하여 사용하여 다른 5F1-유사 항체 예컨대 138-10 또는 51-41를 생성하였다.
- [0200] 면역침전 실험을 위하여, 멤브레인 단백질을 5F1 또는 항-CD43 항체 (AF2038, R&D System, Inc.)와 함께 배양하였으며, 그 다음 단백질 G 세파로스(Amersham Pharmacia Biotech Inc., N.J., U.S.A.)와 함께 배양하였다. 침전물을 8% SDS-PAGE에 걸고, 웨스턴(또는 면역) 블롯 분석에 가하였다.
- [0201] 단백질을 동일 부피의 시료 완충액 (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% 브로모페놀 블루, 10% 글리세롤)과 혼합하고, 8% SDS-PAGE로 분리하였고, 그 다음 니트로셀룰로오스 멤브레인(Hybond-C Super, Amersham)으로 전이시켰다. 니트로셀룰로오스 멤브레인을 그 다음 5% 스킨된 밀크의 PBS 용액으로 차단하였으며, 5F1 또는 항-CD43 mAb (AF2038)로 배양하였다. 블롯을 홍당무 퍼옥시다아제-접합 염소 항-마우스 면역글로불린(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.)으로 처리하였으며, 화학발광 시약(ECL, Amersham, UK)으로 현상하였다.
- [0202] 5F1가 CD43를 인식하는지 여부를 시험하기 위하여, 구득가능한 항-CD43 mAb (AF2038, R&D system, Inc.)를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의하여 COLO 205 용해물에서 5F1 친화도-분리정제 단백질을 확인한다. 5F1 결합 음성 세포주 COLO 320의 용해물을 대조구로서 사용하였다. 우리의 결과(도 1)는 항-CD43 (AF2038) 및 5F1 항체 모

두는 5F1 면역친화도 컬럼에 의하여 포획된 단백질과 반응한다는 것을 보여주며, 이는 5F1가 CD43를 인식한다는 사실을 강력하게 입증하고 있다.

[0203] 단클론성 항체 5F1는 비조혈성 암세포의 세포 표면상에서 발현하는 CD43를 특이적으로 인식한다.

[0204] 2×10^5 COLO 205 세포를 v-보텀 96-웰 플레이트의 각 웰에 넣고, 0.33 내지 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위의 서로 다른 농도의 5F1 항체를 4°C 에서 1 시간 동안 배양하였다. 세포를 $200 \mu\text{l}$ FACS 완충액 (1x PBS+1% FBS)으로 2회 세척하고, $100 \mu\text{l}$ 의 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (FACS 완충액 용액) 염소-항-마우스 IgG-PE (Southern Biotech.)로 염색한 뒤, 4°C 에서 30분간 배양하였다. 세포를 FACS 완충액으로 2회 세척하고, 흐름 세포 분석(BD LSR3 BD Life Sciences)으로 분석하였다.

[0205] 흐름 세포분석의 항체 결합은 표 1에 나타내었다. 단클론성 항체, 예컨대 5F1 (아이소타입: IgG3), 또는 138-10 (아이소타입 IgM), 또는 51-41 (아이소타입 IgM)은 COLO 205 직장결장암 세포 및 NCI-N87 위암 세포의 세포질 멤브레인상에서 발현되는 표면 CD43을 인식하나, 말초 T 나 Jurkat (림프모구 백혈병 세포주; ATCC TIB-152)는 인식하지 못한다. 하기 표 1을 참조한다. 흐름 세포 분석 데이터(도 2A 및 2B)는 5F1이 다른 유형의 암세포, 예컨대 직장결장암 세포(DLD-1), 및 위암 세포(NCI-N87)에 결합하나, 정상 내피 세포(HUVEC), 정상 폐 세포(MRC-5), 정상 유선 상피 세포(MCF-10A), 정상 직장결장 세포(CCD841-CoN), 활성화 T 림프구(7일간 활성화), 또는 정상 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에는 결합하지 않는다는 것을 나타낸다.

[0206] 표 1은 직장결장암, 위암 세포, 인간 말초 T 세포, 및 Jurkat (림프모구 백혈병 세포주)에 대한 항-CD43 항체 예컨대 5F1, 138-10, 또는 51-41의 항원-결합 특성을 나타낸다.

[0207] [표 1]

% 결합/Abs	말초 T 세포	Jurkat (백혈병 세포)	COLO 205	NCI-N87 (위암 세포)
5F1	<10%	<10%	>80%	>80%
138-10	<10%	<10%	>80%	>80%
51-41	<10%	<10%	>80%	>80%
항-CD162	>80%	>80%	<10%	미시험
MEM-59 (항-CD43; Biovendor, Candler, NC)	>80%	미시험	>70%	미시험
아이소 타입 대조구 Ab	<10%	<10%	<10%	<10%

[0208]

[0209] COLO 205 세포 및 인간 직장결장암 조직 내에서 5F1의 표적 단백질의 발현을 검출하기 위하여, 통상의 면역조직화학적 방법이 사용되었다. 간단히 말하면, 세포 또는 조직을 면역염색하기 위하여 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 5F1로 고정하고, 바이오틴-표지화 항-마우스 IgG와 함께 배양한 뒤, 아비딘-바이오틴 퍼옥시다아제 복합체(Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, U.S.A.)로 배양하였고, 크로모젠 3,3'-디아미노벤지딘 테트라클로라이드로 염색하였다. 면역조직화학적 연구는 직장결장암 환자의 52.5%의 조직(31/59)이 5F1로 양성 염색되었다는 것을 나타낸다.

[0210] 실시예 2. 암세포상에서 발현되는 CD43에 특이적으로 결합되는 항체의 세포자멸성 활성

[0211] ELISA 분석에 의한 COLO 205 세포 내에서 5F1에 의하여 유도되는 세포자멸사의 검출

[0212] 5F1에 의하여 유도된 세포 사멸의 유형을 평가하기 위하여, 직장결장암 세포는 배양 플레이트 내에서 성장하였으며, 5F1의 존재 또는 부재하에 배양되었다. 뉴클레오솜간(세포자멸성) DNA 절편화의 수준은 세포 사멸 검출 ELISA^{PLUS} 키트(Roche, Cat# 1774425)를 사용하여 항체-매개 포획 및 세포질 모노뉴클레오솜 및 올리고뉴클레오솜-유관 히스톤-DNA 복합체의 검출에 의하여 결정된다. ELISA 분석은 제조자의 설명서에 따라 수행되었다. 간단하게 말하자면, 1×10^4 COLO 205 세포를 96-웰 플레이트의 각 웰에 평판하고, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도의 5F1 또는 9E10(항-myc 항체), 또는 배지 대조구와 함께 배양하였다. 37°C 배양 6, 24 또는 48 시간 후, 세포를 세척하고, $200 \mu\text{l}$ 의 용해 완충액으로 30분간 배양하였다. 핵을 펠렛화한 후 ($200 \times g$, 10 분), 절편화 DNA를 함유하는 $20 \mu\text{l}$ 의 상청(세포질 분획)을 바이오틴화 단클론성 안티히스톤 항체와 함께 배양된 스트렙타비딘-피복 마이크로티터 플레이트에 전이시킨다. 항-히스톤 항체에 결합한 뉴클레오솜의 절편화 DNA의 양은 기질로서 ABTS(2,2-아지

노-디[3-에틸벤즈티아졸린 설퍼네이트-6-디아모늄 염])을 사용하여 퍼옥시다아제-접합 단클론성 항-DNA 항체에 의하여 평가되었다. 마지막으로, 퍼옥시다아제 기질과 10-20 분간 배양시 405 nm에서의 흡광도는 마이크로플레이트 리더로 결정되었다(Molecular Devices, SPECTRA max M2). 용해 완충액 및 기질 만을 함유한 웰의 값은 배경으로서 제하였다. 데이터는 다음의 공식을 사용한 값으로부터, 세포질로 방출된 모노- 및 올리고뉴클레오타이드의 특이적 강화로 분석되었다:

$$\text{강화인자}(E.F.) = \frac{\text{시료의 } mU(\text{사멸중인/사멸세포})}{\text{배양대조구의 } mU(mAb\text{처리안한세포})}$$

$mU = \text{흡광도} [10^{-3}]$

도 3에 나타낸 데이터는 배양 24 시간 후 COLO 205 세포의 세포질 내의 뉴클레오타이드의 강화를 유도한다는 것을 나타낸다. 5F1 처리 세포질 내에서 검출된 절편화 DNA는 배지 대조구에 비하여 4 배 이상 증가하였다. 이러한 강화는 대조구 항체 9E10(항-myc 항체) 또는 배지 단독으로 처리한 세포 내에서 관찰되지 않으며, 이는 5F1 단독으로 암세포를 세포자멸사로 유도한다는 것을 의미한다.

아넥신 V 및 PI 염색을 사용하여 COLO 205 세포 내에서 5F1, 138-10, 및 51-41에 의하여 유도된 세포자멸사의 검출

아넥신 V는 세포자멸사 프로세스의 초기 단계에서 세포질 멤브레인의 외측을 향하여 움직이는 포스포지질을 염색한다. 따라서, FACS 분석에 의하여 분석된 아넥신 V5의 염색은 세포가 세포자멸사를 겪고 있다는 것을 나타낸다. 1.2×10^5 COLO 205 세포를 96-웰 플레이트의 각 웰에 넣고, 그 다음 배지 또는 신선 배지 (미처리 대조구) 내에서 희석된 다양한 농도의 5F1 ($2-16 \mu\text{g/ml}$)를 세포에 첨가하였다.

5F1의 가교-링크(CL)가 종양 세포 내의 세포자멸사를 유도하기 위하여 필요한지 여부를 시험하기 위하여, $20 \mu\text{g/ml}$ 의 레빗 항-마우스 IgG (Jackson ImmunoResearch, Cat#315-005-045)를 비교를 위한 시료 세트에 첨가하였다. 37°C 배양 6 시간 후, 세포를 $0.25 \mu\text{l}$ 의 FITC-접합 아넥신 V (Strong Biotech Corporation)의 $100 \mu\text{l}$ 아넥신 V 결합 완충액 용액으로 실온에서 15분 간 염색하였다. 그 다음 세포를 프로피디움 요오드 (PI, DNA 염색 염료)로 염색하고, 흐름 세포 분석으로 분석하였다.

흐름 세포 분석 데이터는 가교-링크의 부재하에, 6 시간 동안 $4 \mu\text{g/ml}$ 또는 그 이상의 농도로 5F1 처리하여 상당한 수의 직장결장 암세포를 세포자멸사하게 하였었으며, 5F1 단독으로 COLO 205 세포 내에서 세포자멸사를 효과적으로 유도할 수 있다는 것을 입증하였다.

다른 항-C43 항체, 138-10 및 51-41에 의한 COLO 205 세포의 세포자멸사 유도 효과를 시험하였다. 하기 표 2는 5F1, 138-10, 또는 51-41가 직장결장 암세포 내에서 세포자멸사를 유도한다는 것을 나타낸다. COLO 205 세포를 $32 \mu\text{g/ml}$ 의 각 항체와 함께 6 시간 동안 배양하고, 아넥신-V 및 그 다음 PI로 염색하고, FACS 분석을 하였다.

[표 2]

5F1, 138-10, 및 51-41에 의한 COLO 205 세포 내의 세포자멸사 유도				
	5F1	138-10	51-41	대조구 항체
% 세포자멸사	> 40%	> 30%	>30%	< 15%

상기 결과는 암 발현 CD43에 특이적인 항체 처리가 암세포 내에서 세포자멸사를 유도할 수 있다는 것을 나타낸다.

YO-PRO-1 염색 또는 아넥신 V 및 PI 염색을 사용하여 NCI-87 세포 내에서 m5F1에 의하여 유도된 세포자멸사의 검출

4×10^5 세포의 NCI-N87 (인간 위암종 세포주) 또는 5×10^5 세포의 COLO 205를 12-웰 배양 플레이트(Nunc Catalog # 150628)에 넣었다. 밤샘 배양 후, 배지를 교환하고, 도 10에 적시한 농도의 항체 또는 아지드를 첨가하여 6 시간 동안 배양하였다. 그 다음, 세포를 프립신으로 처리하고, YO-PRO-1(Invitrogen, Catalog # Y3603)로 염색하거나 또는 아넥신-V-FITC & PI(Strong Biotech, 세포자멸사 검출 키트, Catalog # AVK250)로 이중 염색하기 위하여 수집하였다.

- [0226] 10A 및 10B에 나타난 바와 같이, 항체 m5F1는 YO-PRO-1 염색(A) 및 아넥신-V-FITC 및 PI의 이중 염색(B)에 의하여 측정된 바와 같이 NCI-87 및 COLO 205 세포 내에서 세포자멸사를 유도하였다. 이러한 데이터는 m5F1가 위암종 세포 내에서도 세포자멸사를 유도할 수 있다는 사실을 입증한다.
- [0227] 실시예 3. 5F1에 의한 암세포 성장의 억제
- [0228] 5F1 단독으로 암세포 성장을 억제
- [0229] 직장결장 암세포(COLO 205), 및 정상 내피 세포(HUVEC)를 넣고, 5F1 또는 대조구 항체 9E10와 함께 배양하였다. 또한 음성 대조구로서 미처리 세포를 포함하였다. 세포 생존은 MTT & WST-1 분석법을 사용하여 평가하여 본원에서 설명한 증식 활성을 검출하였다.
- [0230] WST-1 분석은 세포성 미토콘드리아 테하이드로지니아제에 의한 테트라졸륨 염 WST-1의 포마잔으로의 분해에 기초한다. 생성된 포마잔은 450 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 분광광도계에 의하여 정량화될 수 있다. 생활성 세포의 증식에 의하여 효소의 전체 활성의 증가가 나타나며; 효소 활성의 감소는 세포 성장 억제를 나타낸다. 따라서, WST-1 분석은 5F1 처리 후 종양 세포의 생존율을 평가하기 위하여 사용된다. 간단히 말하면, 4×10^3 COLO 205 세포의 100 μ l 배양 배지 용액을 96-웰 배양 플레이트 내에 각 처리당 5벌씩 넣었다. 그 다음 10 μ g/ml의 5F1, 대조구 항체 9E10(항-myc 항체) 또는 신선 배지(미처리 대조구)를 첨가하였다. 0.5% 아지드화 나트륨(NaN_3)의 처리를 세포독성 대조구로서 분석에 포함시켰다. 37°C로 3일 배양 후, 20 μ l의 WST-1 시약(Roche, Cat# 1664807)을 각 웰에 첨가하였으며, 혼합물을 37°C로 30분간 배양하였다. 450 nm에서의 흡광도는 처리 세포의 생존율을 반영하기 위하여 획득하였다. COLO 205 세포의 WST-1 분석의 결과를 도 4에 나타내었다. 데이터는 COLO 205 세포의 성장을 실질적으로 억제하였으나(도 4) 반면에 HUVEC의 성장(미도시)은 5F1 처리에 의하여 영향을 받지 않았다는 것을 나타낸다. 생존율 %는 직장결장 암세포로 처리된 아이소타입 대조구 항체 9E10에 비하여 처리된 항체 5F1는 50% 이하로 감소하였다. 0.5% 아지드화 나트륨으로 처리된 양성 대조구 그룹은 19%의 생존율을 나타낸다.
- [0231] 다른 실험에서, 세포 (2×10^3)를 96-웰 배양 플레이트의 각 웰에 넣었으며, 10 μ g/ml의 단클론성 항체 5F1 또는 대조구 항체 9E10(c-myc에 대한 항체)로 배양하였다. 미처리 세포를 음성 대조구로서 사용하였고; 0.5% 아지드화 나트륨 처리 세포를 양성 대조구로서 사용하였다. 37°C로 2 내지 3일 배양 후, 10 μ l의 WST-1 시약을 각 웰에 첨가하였으며, 세포를 추가로 30분간 배양하였다. WST-1 세포 생존 분석을 전술한 바와 같이 수행하였다. 도 5에 나타난 결과는 직장결장 암종 세포, 예컨대 COLO 205의 성장이 항체 5F1에 의하여 실질적으로 억제되었으나, 정상 직장결장 세포주(예컨대 CCD841-CoN)는 영향을 받지 않았다.
- [0232] MTT는 세포 생활성 및 증식의 측정을 위한 또다른 테트라졸륨-기초 방법이다. 옐로우 테트라졸륨 MTT(3-(4,5-디메틸티아졸릴-2)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드)는 대사적 활성 세포, 부분적으로는 테하이드로지니아제 효소의 작용에 의하여 환원되어 환원 등가체 예컨대 NADH 및 NADPH를 생성한다. 최종 세포 내 퍼플 포마잔은 분광광도 수단에 의하여 가용화되고 정량화될 수 있다. 세포 (5×10^3)를 96-웰 배양 플레이트의 각 웰에 넣고, 단클론성 항체 5F1 (0-64 μ g/ml의 농도 범위) 또는 c-myc에 대한 대조구 항체 9E10(64 μ g/ml)와 함께 배양하였다. 미처리 세포를 음성 대조구로서 사용하였으며; 0.5% 아지드화 나트륨으로 처리된 세포를 양성 대조구로서 사용하였다. 37°C로 72시간 배양 후, 10 μ l의 MTT 시약을 각 웰에 첨가하였으며, 세포를 퍼플 침전물이 보일 때까지 2-4 시간 동안 배양하였다. 100 μ l의 세척제(DMSO)를 첨가하였다. 570 nm에서의 시료의 흡광도를 기록하였다. MTT 분석의 데이터는 5F1가 투여량-의존성 방법(0 내지 64 μ g/ml)으로 COLO 205의 세포 증식을 억제하였다는 것을 입증하였으며, ED50(50% 억제 유효 투여량)은 8 μ g/ml이었다(도 6).
- [0233] 도 6에 나타난 바와 같이, 64 μ g/ml의 5F1이 사용된 경우 세포 성장의 상당한 억제가 관찰되었으나, 동일한 농도의 대조구 항체 9E10에서는 효과가 없었다.
- [0234] 생체 내 5F1의 항-종양 효과의 평가
- [0235] 5F1의 생체 내 항-종양 효과는 종양 이종이식 마우스 모델에서 분석하였다. 실험 0일에 5×10^6 COLO 205 세포를 SCID 마우스의 하인드 플랭크 영역으로 피하 이식하였다. 세포 접종 1주일 후, 일 실험에서, 마우스를 복막내 주사에 의하여 500 μ g의 5F1 또는 PBS로 처리하였다. 또다른 실험에서, 확립된 종양을 보유한 4 그룹의 마우스(각 그룹 6 마우스)에 4회 투여량의 25 mg/kg의 5-플루오로우라실과 류코보린(5 FU/LV)을 격일로 정맥 투여하고, 다양한 투여량의 5F1를 주 2회 복막내 투여하였다.

[0236] 일 실험에서, SCID 마우스 내의 종양 이식은 실험 0일 1×10^7 세포/마우스의 직장결장 암세포 COLO 205의 피하 주사에 의하여 달성되고, 그 다음 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 및 17일에 단클론성 항체 5F1 ($500 \mu\text{g}$ /투여) 또는 대조구 단클론성 항체 9E10 (c-myc에 대한 항체) 또는 PBS를 복강내 주사하여 처리하였다. 14주의 마우스를 실험 각 군에 사용하였다. 종양 크기를 폭, 폭 및 길이의 곱(WxWxL)으로서 5 일에서 24 일까지 측정하였으며, mm^3 로 나타내었다. 도 7에 나타난 바와 같이, 단클론성 항체 5F1는 대조구 항체 9E10 및 PBS (미처리)에 비하여 종양 성장을 효과적으로 억제하였다.

[0237] 5F1 및 5FU/LV 등의 화학-약물의 결합 효과를 관찰하기 위하여, 종양 이식 7일 후 3주간 마우스에 25 mg/kg 의 5FU/LV를 격일로 4회 iv 주사하였으며 다양한 양의 5F1 항체를 주 2회 ip 주사하거나 하지 않았다. 종양 성장은 캘리퍼스로 종양 부피(mm^3)를 주 2회 측정하여 평가하였으며, 종양 크기는 다음의 공식을 사용하여 계산하였다: $\pi/6 \times \text{큰 직경} \times (\text{작은 직경})^2$ (Kievit E, Cancer Research, 60:6649-55). 도 8에 나타난 바와 같이, 5F1 항체 및 5FU/LV 치료의 결합은 화학-약물 단독 치료에 비하여 인간 직장결장 종양 성장을 현저하게 억제하였다(도 8).

[0238] 실시예 4. 신규의 세 항-CD43 항체, 5F1, 138-10, 및 51-41가 암세포상에서 발현되는 유사한 에피토프를 인식한다

[0239] 신규의 세 항-CD43 항체 (5F1, 138-10, 및 51-41)의 결합 특성을 이해하기 위하여, FACS 분석이 사용되었다. COLO 205 세포(100,000)를 다양한 양의 비-바이오틴화 항체 5F1, 138-10, 및 51-41의 존재하에 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 바이오틴화 5F1로 4°C 에서 1 시간 동안 염색하였다. 세척 후, 세포를 동일한 조건 하에서 30 분간 스트렙타비딘-FITC로 추가 염색하였다. 세포를 세척하고, FACS에 의하여 분석하였다. 하기 표 3에 나타난 데이터는 대표적 일 실험의 평균 형광 강도이다. 51-41 및 138-10 항체 모두는 바이오틴화-5F1와 COLO 205 세포의 결합과 경쟁할 수 있으며, 이는 세 항체 모두가 COLO 205 세포의 표면상에서 발현된 유사한 결합 부위와 결합할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0240] [표 3]

5F1, 138-10, 및 51-41는 COLO 205 세포 상에서 발현되는 유사한 에피토프를 인식한다			
경쟁 항체 농도 ($\mu\text{g/ml}$)	비표지 5F1, 138-10, 또는 51-41의 존재하의 평균 형광 강도		
	5F1	51-41	138-10
200	9.78	75.66	199.7
66.7	60.28	135.62	297.03
22.2	21.67	325.23	395.53
7.4	129.04	606.20	640.42
2.64	733.36	783.81	702.79
0.82	1004	789.23	724.15
0.273	1027	901.36	683.08
0.09	825	869.61	717.19
0.03	888	860.13	704.33

[0241]

[0242] 실시예 5. 항체 5F1의 에피토프 결정

[0243] 단클론성 항체 5F1에 의하여 인식되는 에피토프 구조를 추가로 정의하기 위하여, 이 단클론성 항체를 다른 폴리펩타이드 서열에 대한 이들의 특이적 반응성을 시험하기 위하여 사용하였다. 96-웰 마이크로티터 플레이트를 $10 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 0.1 M NaHCO_3 (pH 8.6) 피복 완충액 내에서 4°C 로 밤샘하여 $50 \mu\text{l}$ /웰의 항체 5F1로 피복하였다. 세척 후, 플레이트를 0.1 M NaHCO_3 (pH 8.6), 5 mg/ml BSA, 0.02% NaN₃ ($150 \mu\text{l}$ /웰)을 함유한 차단 완충액으로 최소한 한 시간 동안 4°C 에서 배양하여 차단하였다. 플레이트를 다양한 농도의 폴리펩타이드의 다양한 절편을 함유하는 융합 단백질과함께 1 시간동안 실온에서 배양하였다. TBS를 함유한 0.5% Tween으로 세척 후, 결합된 융합 단백질-폴리펩타이드를 0.2M 글리신-HCl(pH 2.2) 완충액을 함유하는 1 mg/ml BSA로 용출시켰으며, 1 M Tris-HCl(pH 9.1)로 중성화하였다. 그 다음 용출된 융합 단백질-폴리펩타이드의 아미노산 서열을 결정하였다. 항체 5F1가 결합하는 폴리펩타이드는 N-말단에서 C-말단으로 트리펩타이드 서열 Trp-Pro-Ile (WPI)를 함유한다. 이 트리펩타이드 아미노산 서열은 CD43 아미노산 서열 내에 존재하지 않는다. Pallant et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1328-32, 1989; Shelley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2819-23, 1989.

[0244]

항체 5F1가 결합하는 트리캡타이드 에피토프를 확인하기 위하여, 샌드위치 ELISA를 수행하였다. 96-웰 마이크로 티터 플레이트를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 4℃에서 밤샘하여 50 μl /웰의 항체 (5F1 또는 대조구 항체 9E10)로 피복하였다. 플레이트를 0.25%의 BSA의 PBS(150 μl /웰) 용액으로 37℃에서 1 시간 배양하여 차단하였다. 플레이트를 담 체 단백질과 융합된 폴리캡타이드의 다양한 절편을 함유하는 융합 단백질과 함께 실온에서 2 시간 동안 배양하였다. 0.05%의 Tween 20을 함유한 PBS로 4회 세척한 후, 플레이트를 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 담체 단백질-특이적 항체로 실온에서 1.5 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 플레이트를 PBST로 4회 세척하였다. HRP와 접합된 50 μl 의 1 내지 3000배 희석 염소 항-담체 단백질-특이적 항체를 각 웰에 첨가하였으며, 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 이러한 두 항체(5F1 및 9E10)에 대한 폴리캡타이드에 대한 반응성을 결정하기 위하여 HRP 효소의 기질을 첨가함으로써 효소 반응을 수행하였다. 하기 표 4는 5F1 또는 9E10가 플레이트상에 고정된 경우 ELISA 분석의 데이터를 나타낸다. "+"는 지정된 폴리캡타이드가 단클론성 항체에 결합한 것을 나타내며; "-"는 지정된 폴리캡타이드가 단클론성 항체에 결합하지 않는다는 것을 나타낸다. 단클론성 항체 5F1는 트리캡타이드 WPI 에피토프 구조를 인식한다. 트리캡타이드 WPI 서열이 CD43 내에 존재하지 않기 때문에, 이러한 데이터는 5F1이 트리캡타이드 WPI에 의하여 형성된 구조와 유사 또는 등가의 물리 및/또는 화학적 특성을 보유한 구조를 포함하는 입체구조 에피토프를 인식한다는 것을 나타낸다.

[0245]

[표 4]

5F1에 의하여 인식되는 에피토프 구조				
캡타이드 이름	아미노산 서열	5F1	9E10	
5F1-01-2-21	W P I D L M S E T P I L (SEQ ID NO:17)	+	-	
5F1-01-2-04	W P I A N H E N A L S A (SEQ ID NO:18)	+	-	
5F1-01-2-18	W P I S G K H S F W S L (SEQ ID NO:19)	+	-	
5F1-01-2-17	W P I L D H A V S R P S (SEQ ID NO:20)	+	-	
5F1-01-2-16	W P I D I P Y A W D F S (SEQ ID NO:21)	+	-	
5F1-01-2-13	W P I S P Q P G A R P V (SEQ ID NO:22)	+	-	
5F1-01-2-09	W P I A P N R Y L L S S (SEQ ID NO:23)	+	-	
5F1-01-2-06	W P I P P E V E P F K H (SEQ ID NO:24)	+	-	
5F1-01-2-05	W P I L Q N A A G T G L (SEQ ID NO:25)	+	-	
5F1-01-2-23	W P I P T L M E L P S A (SEQ ID NO:26)	+	-	
5F1-01-2-22	W P I T N S D S R I T W (SEQ ID NO:27)	+	-	
5F1-01-2-14	W P I H S A H V R Y T T (SEQ ID NO:28)	+	-	
9F9-01-03-24	A E T D Y D P D H F T P (SEQ ID NO:29)	-	-	
9F9-01-03-18	D A R Y S H D P A W P Y (SEQ ID NO:30)	-	-	
9F9-01-03-17	A G Q K W D P E W P H S (SEQ ID NO:31)	-	-	
9F9-01-03-21	Y D H H W T N P P T Q K (SEQ ID NO:32)	-	-	
9F9-01-03-25	E P N M D P N W A S P S (SEQ ID NO:33)	-	-	

[0247]

[0248]

실시예 6. 5F1, 138-10, 및 51-41의 경쇄 및 중쇄의 가변 영역의 클로닝 및 항체 인체적응화

[0249]

5F1 경쇄 및 중쇄의 가변 영역 cDNA를 PCR로 증폭하였으며, 합성된 cDNA를 서열 결정을 위하여 pCRII(Invitrogen) 내로 서브클론하였다. 뉴클레오타이드 서열을 수개의 독립적 클론으로부터 획득하여 분석하였다. 독립 클론의 일치하는 cDNA 서열을 각 항체의 경쇄 또는 중쇄 V 영역을 나타내기 위하여 선택하였다. 하기 표 5는 5F1, 138-10, 51-41, 및 인체적응형 5F1(h5F1Vc)의 번역된 아미노산 서열 및 경쇄 및 중쇄 V 영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.

[0250]

[표 5]

항체 가변 영역의 아미노산 서열 및 항체 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열
(CDR은 밑줄)

[0251]

[0252]

5F1 중쇄 아미노산 서열 (SEQ ID NO:1) 및 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID NO:9)

```

1 M E W S W I F L F L L S G T A G V H S E
1 ATGGAATGCAGTTGGATATTCTCTTTCTCTCTGTCAGGAAGTCAGGTGCCACTCTGAG

21 V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V R M S
61 GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAGCCTGGGGCTCAGTGAGGATGTCC

41 C T A S G Y T F T S Y V M H W I K Q K P
121 TGCACGGCTTCTGGATACACATTCAGTACGTATGTTATGCACCTGGATAAAGCAGAGGCTT

61 G Q G L D W I G Y I N P Y N G G T Q Y N

```

[0253]

181 GGCAGGGCCTTGACTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGGTGGTACTCAGTACAAT
81 E K F K G K A T L T S D K S S S T A Y M
241 GAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCAGCACAGCCTACATG
101 E L S S L T S E D S A V Y Y C A R R T F
301 GAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGGGTCTATTACTGTGCAAGACGAGACCTTC
121 P Y Y F D Y W G Q G T T L T V S S
361 CGTACTACTTTGACTACTTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

[0254]

[0255]

5F1 경쇄 아미노산 서열 (SEQ ID NO:2) 및 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID:10)

1 M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D
1 ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTGGTGTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGAT
21 V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I
61 GTTTTGATGACCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTGGAGATCAAGCCTCCATC
41 S C R S S Q S I L H S N G N T Y L E W Y
121 TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTTTACATAGTAATGGAACACCTATTTAGAAATGGTAC
61 L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S
181 CTGCAGAAACAGGCCAGTCTCAAAGCTCCTGATCTACAAGTTTCCAACCGATTITCT
81 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S
241 GGGTCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGATCAGGCACAGATTTCACACTCAAGATCAGC
101 R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H A P L
301 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTACTACTGCTTTCAAGGTTACATGCTCTCTC
121 T F G A G T K L E L K
361 ACCTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0256]

[0257]

138-10 중쇄 아미노산 서열 (SEQ ID NO:3) 및 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID NO:11)

1 M E C N W I L P F I L S V I S G V Y S E
1 ATGGAATGTAACCTGGATACTTCTTTATTCTGTCGGTAATTCAGGGGTCTACTCAGAG
21 V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S
61 GTTCAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCTGGGGCTCCGTGAAGATGTCC
41 C K A S G Y S F I S Y W M H W V K Q R P
121 TGCAAGGCTTCTGGCTACAGCTTTATCAGCTACTGGATGCAGCTGGGTAAAAACAGAGGCCT
61 G Q G L E W I G A I S P G D S D T T Y N
181 GGACAGGGCTCTAGAATGGATTGGTGCTATTCTCTGGAGATAGTGATACTACCTACAAC
81 Q R F T G K A K L T A V T S A S T A Y M

[0258]

241 CAGAGGTTACGGGCAAGGCCAACTGACTGCAGTCACATCCGCCAGCACTGCCTACATG
101 E L S S L T N E D S A V Y Y C I R R D G
301 GAGCTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGGGTCTATTATTGTATAAGAAGGGATGGT
121 N Y Q V A W F A Y W G Q G T L V T V S A
361 AACTAGCAAGTTGCCTGGTTTGCTTACTTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0259]

[0260]

138-10 경쇄 아미노산 서열 (SEQ ID NO:4) 및 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID:12)

1 M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D
1 ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTGGTGTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGAT
21 V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I
61 GTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTGGAGATCAAGCCTCCATC
41 S C R S S Q S I V H S N G N T Y L E W Y
121 TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAACACCTATTTAGAAATGGTAC
61 L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S
181 CTGCAGAAACAGGCCAGTCTCAAAGCTCCTGATCTACAAGTTTCCAACCGATTITCT
81 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S
241 GGGTCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGATCAGGCACAGATTTCACACTCAAGATCAGC
101 R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P F
301 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCATT
121 T F G S G T K L E I K
361 ACCTTCGGCTCGGGACAAAGTTGGAATAAAA

[0261]

[0262]

51-41 중쇄 아미노산 서열 (SEQ ID NO:5) 및 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID : 13)

```

1  M E C N W I L P F I L S V I S G V Y S E
1  ATGGAATGTAACGGATACTTCCTTTTATTCTGTCGGTAATTCAGGGGCTCTACTCAGAG

21  V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S
61  GTTCAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCTGGGGCTTCGGTGAAGATGTCC

41  C K A S G Y S F T S Y W M H W V K Q R T
121  TGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTACCAGCTACTGGATGCACCTGGGTAAACAGAGGACT

61  G Q G L E W I G A I S P G D G D T T Y N
181  GGGCAGGCTCTAGAATGATGTGGTCTATTCTCTGGAGATGGTGATACTACCTACAAC

81  Q K F T G K A K L T A V T S A S T A Y M
241  CAGAAGTTCAAGGCAAGGCCAACTGACTGACAGTCACATCCGCCAGCACTGCCTACATG

101  E L S S L T H E D S A V Y Y C T R R D G
301  GAGCTCAGCAGCCTGACACATGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAAGAGATGGT

```

[0263]

```

121  S Y Q V A W F A Y W G R G T L V T V S A
361  AGCTACCAAGTTGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCGAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

```

[0264]

[0265]

51-41 경쇄 아미노산 서열 (SEQ ID NO:6) 및 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID NO:14)

```

1  M K L P V R L L V L M F W I P V S S S D
1  ATGAAATGCGCTGTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCGTGTTCCAGCAGTGAT

21  V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I
61  GTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTGAGTCTGGAGATCAAGCTCCATC

41  S C R S S Q S I V H S N G N T Y L E W F
121  TCTTGACAGATCTAGTCAGAGCATTGTCCATAGTAATGGAACACCTATTAGAAATGGTTC

61  L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S
181  CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCTGATCTACAAGTTTCCAACCGATTITCT

81  G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S
241  GGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGCAGACATTCACACTCAAGATCAGC

101  R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P F
301  AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCATTG

121  T F G S G T K L E I K
361  ACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAA

```

[0266]

[0267]

h5F1Vc 중쇄 아미노산 서열 (SEQ ID NO:7) 및 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID NO:15)

```

1  M G W S W I F L F L L S G T A G V H S Q
1  ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTCTCTCTGTCAGGTACCGCGGGCGTGCACTCTCAG

21  V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S
61  GTCCAGCTTGTCAGTCTGGGGCTGAAGTCAAGAACTGGCTCGAGCGTGAAGTCTCC

41  C K A S G Y T F T S Y V M H W V R Q A P
121  TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGCTATGTTATGCACCTGGGTAAGGCAGGCCCT

61  G Q G L E W I G Y I N P Y N G G T Q Y N
181  GGACAGGCTCTGGAATGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGGTGGTACTCAGTACAAT

81  E K F K G K A T I T A D E S T N T A Y M
241  GAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACAATTACTGCAGACGAATCCACCAATACGCCTACATG

101  E L S S L T S E D S A V Y Y C A R R T F
301  GAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACAGCGCAGTCTATTACTGTGCAAGACCGACCTTC

121  P Y Y F D Y W G Q G T T L T V S S
361  CGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCAAGCTCACAGTCTCTCTCA

```

[0268]

[0269] h5F1Vc 경쇄 아미노산 서열 (SEQ ID NO:8) 및 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID:16)

```

1  M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1  ATGGAGACCGATACCCCTCCTGCTATGGGTCCTCTGCTATGGGTCACGATCAACCGGA

21  D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
61  GATATTGAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTCTGCTAGCGTCGGGGATAGGGTCACC

41  I T C R S S Q S I L H S N G N T Y L E W
121  ATAACTGCAGATCTAGTCAGAGCATTTTACATAGTAATGAAACACCTATTTAGAATGG

61  Y Q Q K P G K A P K L L I Y K V S N R F
181  TACCAGCAGAAGCCAGGCAAGCTCCCAAGCTTCTAATCTATAAAGTTTCCAACCGATT

81  S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I
241  TCTGGAGTCCCTTCACGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCGATTTCACCTCACAATC

101  S S L Q P D D F A T Y Y C F Q G S H A P
301  AGCTCTCTGCAGCCAGATGATTTGCGCACTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGCTCCT

121  L T F G Q G T K V E L K
361  CTCAGCTTCGGTCAGGGACCAAGGTGGAGCTGAAA

```

[0270]

[0271] 실시예 7. 키메라 5F1 항체의 생산 및 특성화

[0272] 키메라 항체 5F1(c5F1)의 구축 및 생산

[0273] 발현 키메라 항체용 벡터를 구축하기 위하여, 5F1의 경쇄 V 영역을 플라스미드 pVκ 내로 서브클론하였다. pVκ는 CMV 프로모터, 및 인간 경쇄 불변 영역을 포함한다. 인간 경쇄 불변 영역의 서열 및 생물학적 정보는 문헌 Hieter, P.A., et al. (1980), Cloned human and mouse kappa immunoglobulin constant and J region genes conserve homology in functional segments. Cell, 22(1 Pt 1): p.197-207에서 찾을 수 있다.

[0274] 5F1의 중쇄 V 영역을 플라스미드 pVγ1 내로 서브클론하였다. pVγ1 플라스미드는 CMV 프로모터를 보유하며, IgG1의 인간 중쇄 불변 영역을 포함한다. 인간 IgG1 중쇄 불변 영역의 서열 및 생물학적 정보는 문헌 Ellison, J. W., B.J. Berson, and L.E. Hood (1981), The Nucleotide sequence of a humane immunoglobulin C gamma 1 gene., Nucl. Acids Res. 10:4071에서 찾을 수 있다.

[0275] 경쇄 및 중쇄 발현 플라스미드는 Cos-7 세포 내로 동시-전달감염된다. c5F1를 함유하는 상청을 수거하고, c5F1의 세포자멸사-유도 기능에 대하여 분석하였다.

[0276] c5F1의 기능성 시험

[0277] c5F1를 함유하는 상청을 표면 염색에 의한 COLO 205 세포에 대한 이의 결합 및 전술한 아빅신 V 세포자멸사 분석에 의한 이들의 기능에 대하여 시험하였다. 결합 분석을 위하여, 0.58 μg/ml의 c5F1를 사용하였다. 세포자멸사 분석을 위하여, 2~32 μg/ml의 m5F1, c5F1 및 9E10 (항-myc 대조구 항체)를 사용하였으며, 배양은 16 시간 동안 하였다. c5F1를 함유하는 상청은 COLO 205 세포에 결합하였으며, 이들의 대응 마우스와 같이 COLO 205 세포 세포자멸사를 유도하였고, 이는 클론된 cDNA 절편이 5F1의 V 영역을 암호화한다는 사실을 입증한다(도 9A 및 9B).

[0278] 실시예 8. m5F1에 대한 직장결장 암 조직의 면역조직화학 연구

[0279] m5F1에 의한 조직 염색

[0280] m5F1 표적의 발현은 직장결장 암 환자의 파라핀-내장 1차 종양 조직 시료 내에서 면역조직화학에 의하여 조사되었다(n=59). 파라핀-내장 인간 결장 및 직장암 조직의 조직 배열을 SuperBioChips Laboratories (인간 조직 배열, Cat no. CD1)에서 획득하였다. 면역조직화학을 위하여 제조자의 지시에 따라 표준 염색 절차를 사용하였다 (VECTASTAIN Elite ABC Kit, Vector Laboratories). 모든 부분을 58℃로 1 시간 가열하여, 크실렌으로 5회 파라핀을 제거하였으며, 농도를 감소시키면서 연속적으로 에탄올로 재수화하였다. 정상 혈청(VECTASTAIN, PK6102)을 1시간 동안 차단한 후, 그 부분을 1 μg/ml의 농도로 RT에서 1 시간 동안 m5F1와 함께 배양하였으며 후속적으로 제2, 바이오틴화 항-마우스 항체(VECTASTAIN, PK6102)로 배양하였다. 그 다음 부분을 스트렙타비딘-바이오틴 복합체 (VECTASTAIN, PK6102)로 배양하였다. 슬라이드를 디아미노벤지딘 용액으로 현상하였다. 마지막으로 슬라이드를 50 % 글리세롤의 PBS 용액에 탈수, 정제, 및 장착된 헤마톡실린으로 카운터염색하였다.

[0281] 등급의 평가

[0282] 각 조직 부분의 항원 발현을 두 독립적 관찰자에 의하여 평가되었으며, 5F1에 의한 염색은 실험적 반-정량적 시스템으로 등급을 주었다: -, 음성; +-, 약한 염색; +, 중간 염색; ++, 강한 염색.

[0283] 결과

[0284] 모든 부분에서, m5F1 염색이 멤브레인에 대부분을 차지하였다. 총합으로서, 59개의 암 시료 중 31개 (52.5%)가 5F1 표적에 대한 양성 염색을 나타내었으며, 이들 중 27개(45.8 %)는 강한 수준의 발현을 나타내었다. 19개의 시료(32.2 %)는 m5F1 표적 발현의 음성 염색을 나타내었다. 시험된 모든 직장결장 암 시료의 염색 결과의 요약 을 도 6에 나타내었다. 이러한 데이터는 항체 m5F1을 직장결장암을 진단하기 위하여 사용될 수 있다는 것을 나 타낸다.

[0285] [표 6]

인간 직장결장암 내의 5F1 표적 발현의 빈도									
직장결장암 시료/m5F1 염색의 결과									
1++	2++	3++	4-	5++	5+-	7++	8-	9++	10++
11++	12-	13++	14+-	15-	16-	17++	18++	19+-	20++
21++	22+-	23+	24-	25++	26-	27-	28-	29++	30++
31++	32-	33-	34++	35++	36-	37-	38++	39++	40++
41++	42++	43-	44-	45-	46-	47+-	48++	49-	50+
51++	52++	53+-	54++	55++	56++	57+-	58+-	59-	60탄소
++ : 27/59(45.76%) + : 4/59(6.78%) +- : 9/59(15.25%) - : 19/59(32.20%)									

[0286]

[0287] 실시예 9. m5F1는 COLO 205에 의하여 발현된 재조합 인간 CEA(rhCEA) 및 CD43(rhCD43)에 결합하나, COS-7 세포에 의하여 발현되는 rhCEA 또는 rhCD43를 인식하지 않는다

[0288] 단백질 시료 제조

[0289] COLO 205 및 COS 세포 내의 재조합 플레그-태그된 CEA의 면역-침전: 전장 CEA 단백질(35-702aa)을 암호화하는 cDNA를 플라스미드 pFlag-CMV-1 내로 클론하였다. 조작된 플라스미드 DNA를 전기천공에 의하여 COLO 205 (안정적 세포주 조작용) 내로 도입하거나 또는 리포펙타민 2000 (Invitrogen, Catalog # 11668-019)에 의하여 COS 세포(임시 발현 실험용)를 도입하였다. 항원 발현 세포를 수거하고, 프로테아제 억제제 (Roche, Catalog # 11836145001)를 함유한 용해 완충액 (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 150 mM NaCl, 1% NP40) 내에서 용해시켰다. 세포 용해물의 상청을 단백질 G 세파로스 비드(GE Healthcare, Catalog # 17-0618-02)와 커플링된 항-플레그(M2, Stratagene, Catalog # 200472)와 함께 4℃에서 2 시간 동안 배양하였다. 단백질 G 세파로스 비드를 용해 완충액으로 3회 세척하였다. IP 산물을 함유하는 단백질을 G 세파로스 비드를 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯의 시료로서 사용하였다.

[0290] COLO 205 세포 내에서 발현되는 CrI-태그된 CD43를 위한 가용성 재조합 단백질 분리정제: CD43 단백질의 세포의 도메인을 암호화하는 cDNA를 N-말단 플레그 및 C-말단 CrI 태그를 함유하는 변형된 pcDNA3 플라스미드 내로 클론하였다. 안정적인 세포주 발달을 위하여 조작된 플라스미드 DNA를 전기천공에 의하여 COLO 205 세포 내로 도입하였다. COLO 205에 의하여 발현되는 가용성 재조합 hCD43²⁰⁻²⁵³는 N-말단 3x플레그 태그 및 C-말단 CrI 태그를 함유한다. 가용성 단백질은 단백질 A 세파로스 비드(GE Healthcare, Catalog # 17-1279-02)로 정제된다. 글리신 완충액으로 용출시킨 후, PBS에 대하여 투석하였다, 단백질을 시료를 장래의 사용에 대비하여 -20℃로 저장하였다.

[0291] COS 세포 내에서 임시 발현된 전 세포 용해질: 전장 인간 CD43(pcDNA3.1myc-His)를 함유하는 구조체는 리포펙타민 2000 (Invitrogen, Catalog #11668-019)에 의하여 COS 세포 내로 도입하였다. 세포를 프로테아제 억제제를 함유하는 RIPA 완충액 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.25% SDS, 1% NP-40)으로 용해시켰으며, 21,900g, 4℃에서 10분간 원심분리하여 상청을 수거하였다. Bio-Rad 정량화 후, 충분한 양의 단백질을 용해물을 웨스턴 블롯 분석을 위하여 SDS-PAGE에 탑재하였다.

[0292] 웨스턴 블롯 분석

[0293] 시료 완충액을 첨가한 후, 단백질을 시료를 95℃로 가열하여, SDS-PAGE 미니-겔에 탑재하였으며, 그 다음 NC 필터(GE Healthcare, Hybond-ECL, Catalog # RPN303D)로 전이시켰다. 5% 무지방 유의 TBS 용액으로 멤브레인을 차단시킨 후, 제1 항체를 첨가하였다. 제1 항체의 결합은 제2 항체 (NEN Life Science, HRP-goat anti-mouse

IgG, Catalog # NEF822, 또는 Southern Biotech, HRP-goat anti-mouse Ig, Catalog # 1010-05)와 접합된 HRP에 의하여 검출되며, ECL 웨스턴 블로팅 검출 시약(GE Healthcare, Catalog # RPN2106)으로 발달시킨다.

[0294] 결과

[0295] 도 11A에 나타난 실험에서, COLO 205 세포 발현 rhCEA의 세포 용해물은 항-플래그 항체와 함께 면역침전되었으며, 면역침전 단백질을 SDS-PAGE상에서 수행시키고, NC 페이퍼로 전이하였다. NC 페이퍼는 다양한 항체로 블롯되었다: 항-플래그, m5F1, 50-14, 51-41, 138-10, 186-14, 280-6, 또는 항-CEA 항체 (CEA/Ab-3; 클론 명칭 COL-I, NeoMarker Cat. MS-613-P1ABX). 도 11A 내의 데이터는 m5F1, 51-41, 및 138-10가 COLO 205 세포에 의하여 발현된 rhCEA를 인식한다는 것을 보여준다.

[0296] 도 11B에 나타난 실험에서, rhCEA를 발현하는 COS-7 세포의 세포 용해물은 항-플래그 항체로 면역침전되었으며, 면역침전 단백질을 SDS-PAGE에 수행시키고, NC 페이퍼로 전이하였다. NC 페이퍼를 다양한 항체로 블롯하였다: 항-플래그, m5F1, 또는 항-CEA (CEA/Ab-3). 도 11B의 데이터는 COS-7 세포에 의하여 발현되는 rhCEA에 결합하지 않는다는 것을 보여준다.

[0297] 도 12A에 나타난 실험에서, COLO 205에 의하여 발현되는 가용성 단백질을 단백질 A 세파로스로 정제하고, SDS 겔 상에서 수행시키고 NC 페이퍼로 전이시켰다. NC 페이퍼를 다양한 항체로 블롯하였다: m5F1, 51-41, 또는 138-10. 도 12A의 데이터는 m5F1, 51-41, 및 138-10가 COLO 205 세포에 의하여 발현되는 rhCD43를 인식한다는 것을 나타낸다.

[0298] 도 12B에 나타난 실험에서, COLO 205 내에서 발현된 가용성 단백질은 단백질 A 세파로스로 정제되었으며, SDS-PAGE 상에 수행시키고 NC 페이퍼로 전이시켰다. NC 페이퍼를 항-CD43 (MEM59)(좌측 패널) 또는 m5F1(우측 패널)로 블롯하였다. 도 12B의 데이터는 m5F1가 COS-7 세포에 의하여 발현되는 rhCD43를 인식하지 못한다는 것을 나타낸다. 이러한 데이터는 m5F1에 의하여 인식되는 에피토프에는 특정 세포 유형에 특이적인 번역 후 변형을 포함한다는 것을 나타낸다.

[0299] 실시예 10. m5F1, 51-41, 및 138-10에 의하여 인식되는 에피토프는 루이스^a (Le^a) 구조를 포함하며, 푸코오스 의존성이다

[0300] 글리코시다아제 처리

[0301] 재조합 인간 CEA (rhCEA)는 COLO 205 세포 내에서 인간 CEA 단백질을 발현함으로써 생산된다. rhCEA (CEA-N-A2)를 암호화하는 cDNA는, CEA의 아미노산 35-145(N 도메인) 및 아미노산 324-415(A2 도메인)을 보유한 융합체로서, 플래그 태그를 함유하는 변형된 pcDNA3 플라스미드 내로 클론된다. CEA의 아미노산 잔기 위치는 전구-단백질 내의 아미노산 위치에 기초한다. 조작된 플라스미드 DNA는 전기천공에 의하여 조작된 안정적인 세포주를 위하여 COLO 205 세포 내로 도입된다. 재조합 CEA 단백질은 항-플래그 항체를 사용하여 재조합-CEA 발현 안정적 세포주의 세포 배양 상정으로부터 정제되었다.

[0302] 각 반응에서, 약 1.8 μ g의 재조합 단백질(rhCEA)은 서로 다른 양의(0, 0.01, 0.03, 또는 0.1 mU)의 잔토모나스(Xanthomonas) sp.로부터의 α -1 $\rightarrow$ (2,3,4)-푸코시다아제 용액(Sigma, Catalog # F 1924)으로 37°C에서 20 시간 동안 배양되었다. 처리 후, 단백질 시료를 쿠마시 블루 염색(도 13 좌측 패널)또는 m5F1로 웨스턴 블롯 검출(도 13 우측 패널)을 위하여 SDS-PAGE에 탑재한다.

[0303] 도 13에 나타난 바와 같이, m5F1와 rhCEA의 결합은 항원을 α -1 $\rightarrow$ (2,3,4)-푸코시다아제로 처리시 감소하며, 이는 m5F1가 푸코오스 민감성 글리코-에피토프를 인식한다는 것을 의미한다.

[0304] 올리고사카라이드 경쟁 분석

[0305] m5F1에 의하여 인식되는 글리코-에피토프를 시험하기 위하여, 다양한 올리고사카라이드에 의한 경쟁 분석법을 수행하였다. 올리고사카라이드(루이스^a, Sigma Catalog # 03499, 루이스^b-락토오스, Sigma Catalog # L7033, 루이스^x-락토오스, Sigma Catalog # L7777, 루이스^y, Sigma Catalog # L7784, 시알릴-루이스^x, Sigma Catalog # S 1782, 락토-N-테트라오스, Sigma Catalog # L6770, 락토-N-디푸코헥사오스 II, Sigma Catalog # L6645, 루이스^a, Calbiochem Catalog # 434626, 및 β -락토오스, Sigma Catalog # L3750)를 구입하고, PBS에 용해시켰다. 이러한 올리고사카라이드의 구조는 도 14에 나타내었다. 올리고사카라이드(최종 농도 1 mM)를 2×10^5 COLO 205 세포가 함유된 다른 웰에 첨가하였으며, 적시된 항체(m5F1, 51-41, 또는 138-10; 각각 0.25 μ g/ml)를 첨가하였

다. 4℃에서 1시간의 배양 후, 상청을 제거하고, 제2 항체 (Southern Biotech, RPE-goat anti-mouse IgG, Catalog # 1032-09, 또는 Southern Biotech, RPE-goat anti-mouse IgM, Catalog # 1022-09)를 첨가하였다. 세포 고정 결합 신호를 흐름 세포 분석으로 검출하였다.

[0306] 도 15에 나타난 바와 같이, LNDFH II, Le(a)-락토오스, 및 Le(a) 모두는 다양한 수준에서, 항체 m5F1, 51-41, 및 138-10와 COLO 205 세포의 결합을 억제하였다; 및 LNT는 항체 51-41 및 138-10의 결합도 억제하였으나, m5F1와 COLO 205 세포의 결합을 현저하게 억제하지 못하였다. 이는 이러한 항체에 의하여 인식된 에피토프는 Lea 또는 유사한 구조를 포함할 수 있으며, 푸코오스 민감성이다. 이와 함께, m5F1 항체는 항체 51-41 및 138-10 보다 푸코오스에 대하여 고도의 의존성을 보인다.

[0307] 전술한 발명이 완전한 이해를 위하여 도면 및 실시예에 의하여 상세하게 설명되었으나, 상세한 설명 및 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니된다.

[0308] 참고자료

[0309] Laos, S., Baekstrom, D, and Hansson, G.C. (2006) Inhibition of NF-kappaB activation and chemokine expression by the leukocyte glycoprotein, CD43, in colon cancer cells. *Int. J. Oncol.* 28(3):695-704.

[0310] Fuhlbrigge, R.C., King, S.L., Sackstein, R., and Kupper, TS. (2006) CD43 is a ligand for E-selectin on CLA+ human T cell. *Blood.* 15:107(4):1421-6.

[0311] Matsumoto, M., Atarashi, K., Umemoto, E., Furukawa, Y., Shigeta, A., Miyasaka, M., and Hirata, T. (2005) CD43 functions as a ligand for E-selectin on activated T cell. *J. Immunol.* 15:175(12):8042-50.

[0312] Pimenidou, A., Madden, L.A., Topping, K.P., Smith, K.A., Monson, J.R., and Greenman, J. (2004) Novel CD43 specific phage antibodies react with early stage colorectal tumours. *Oncol. Rep.* 11(2):327-31.

[0313] Kadaja, L., Laos, S., and Maimets, T. (2004) Overexpression of leukocyte marker CD43 causes activation of the tumor suppression proteins p53 and ARF. *Oncogene.* 19:23(37):2523-2530.

[0314] Fernandez-Rodriguez, J., Andersson, C.X., Laos, S., Baekstrom, D., Sikut, A., Sikut, R., and Hansson, G.C. (2002) The leukocyte antigen CD43 is expressed in different cell lines of nonhematopoietic origin. *Tumour Biol.* 23(4):193-201.

[0315] Cermak, L., Simova, S., Pintzas, A., Horejsi, V., and Andera, L. (2002) Molecular mechanisms involved in CD43-mediated apoptosis of TF-I cell. Roles of transcription Daxx expression, and adhesion molecules. *J Biol Chem.* 8:277(10):7955-61.

[0316] *Carlow, D. A., Corbel, S. Y., and Ziltener, H.J. (2001) Absence of CD43 fails to alter T cell development and responsiveness. *J Immunol.* 166(1):256-61.

[0317] Nieto, M., Rodriguez-Fernandez, J.L., Navarro, F., Sancho, D., Frade, J.M., Mellado, M., Martinez- A, C, Cabanas, C. and Sanchez-Madrid, F. (1999) signaling through CD43 induces natural killer cell activation, chemokine release, and PYK-2 activation. *Blood.* 94(8):2767-77.

[0318] Sikut, R., Andersson, C.X., Sikut, A., Fernandez-Rodriguez, J., Karlsson, N.G., and Hansson, G.C. (1999) Detection of CD43 (leukosialin) in colon adenoma 및 adenocarcinoma by novel monoclonal antibodies against its intracellular domain. *Int. J. cancer.* 82(1):52-8.

[0319] Lopez, S., Seveau, S., Lesavre, P., Robinson, M.K., and Halbwachs-Mecarelli, L. (1998) CD43 (sialophorin, leukosialin) shedding is an initial event during neutrophil migration, which could be closely related to the spreading of adherent cells. *Cell Adhes. Commun.* 5(2): 151-60.

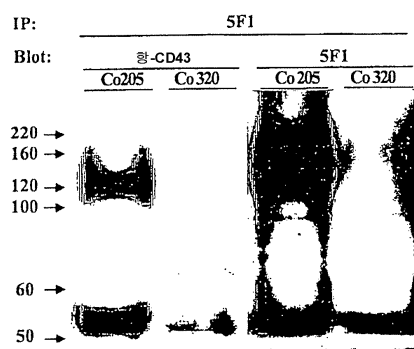
[0320] Stockton, B.M., Cheng, G., Manjunath, N., Ardman, B., and von Andrian, U.H. (1998) Negative regulation of T cell homing by CD43. *Immunity.* 8(3):373-81.

[0321] McEvoy, L.M., Jutila, M.A., Tsao, P.S., Cooke, J.P., and Butcher, E.G. (1997) Anti-CD43 inhibits monocyte-endothelial adhesion in inflammation and atherogenesis. *Blood.* 90(9):3587-94.

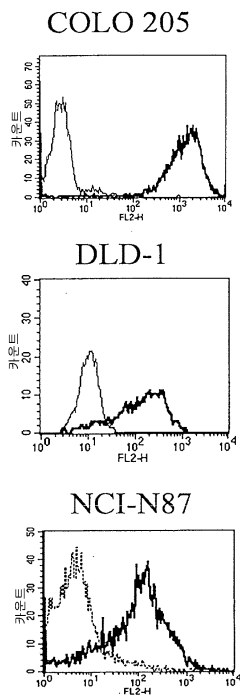
- [0322] Baeckstrom, D. (1997) Post-translational fate of a mucin-like leukocyte sialoglycoprotein (CD43) aberrantly expressed in a colon carcinoma cell line. *J Biol Chem.* 272(17): 11503-9.
- [0323] McEvoy, L.M., Sun, H., Frelinger, J.G., and Butcher, E.C. (1997) Anti-CD43 inhibition of T cell homing. *J Exp Med.* 185(8):1493-8.
- [0324] Brown, T.J., Shuford, W.W., Wang, W.C., Nadler, S.G., Bailey, T.S., Marquardt, H., and Mittler, R.S. (1996) Characterization of a CD43/leukosialin-mediated pathway for inducing apoptosis in human T-lymphoblastoid cells. *J Biol Chem.* 271(44):27686-95.
- [0325] Santamaria, M., Lopez-Beltran, A., Toro, M., Pena, J., and Molina, IJ. (1996) Specific monoclonal antibodies against leukocyte-restricted cell surface molecule CD43 react with nonhematopoietic tumor cells. *Cancer Res.* 56(15):3526-9.
- [0326] Bazil, V., Brandt, J., Chen, S., Roeding, M., Luens, K., Tsukamoto, A., and Hoffman, R. (1996) A monoclonal antibody recognizing CD43 (leukosialin) initiates apoptosis of human hematopoietic progenitor cells but not stem cells. *Blood.* 87(4):1272-81.
- [0327] Manjunath, N., Correa, M., Ardman, M.} and Ardman, B. (1995) Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature.* 377(6549):535-8
- [0328] Nong, Y.H., Remold-O'Donnell, E., LeBien, T. W., and Remold, H.G. (1989) A monoclonal antibody to sialophorin (CD43) induces homotypic adhesion and activation of human monocytes. *J Exp Med.* 170(1):259-67.
- [0329] Mentzer, SJ., Remold-O'Donnell, E., Crimmins, M.A., Bierer, B.E., Rosen, F.S., and Burakoff, SJ. (1987) Sialophorin, a surface sialoglycoprotein defective in the Wiskott- Aldrich syndrome, is involved in human T lymphocyte proliferation. *J Exp Med.* 165(5): 1383-92.
- [0330] Pallant, A., Eskenazi, A., Mattei, MG., Fournier, R.E.K., Carlsson, S.R., Fukuda, M., and Frelinger, J.G. (1989) Characterization of cDNA encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1328- 32.
- [0331] Shelley, C.S., Remold-O'Donnell, E., Davis III, A.E., Bruns, G.A.P., Rosen, F.S., Carroll, M.C., and Whitehead, A.S. (1989) Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2819-23.

도면

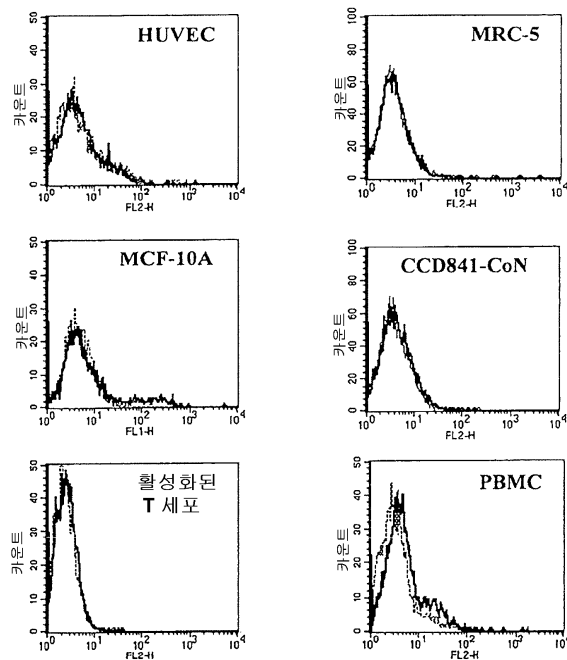
도면1



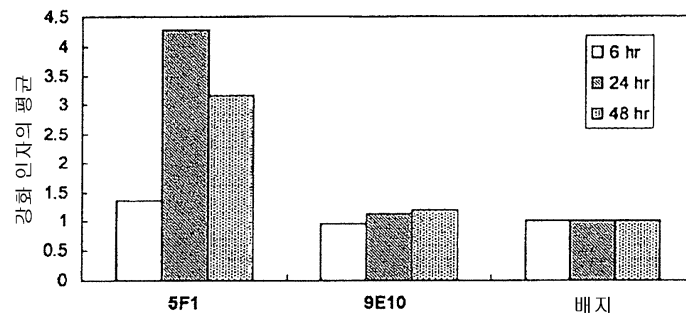
도면2a



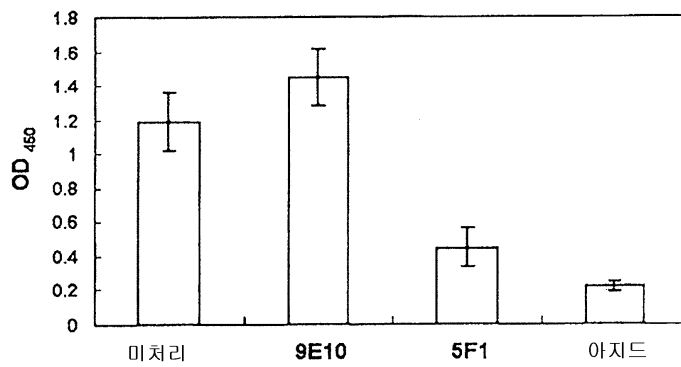
도면2b



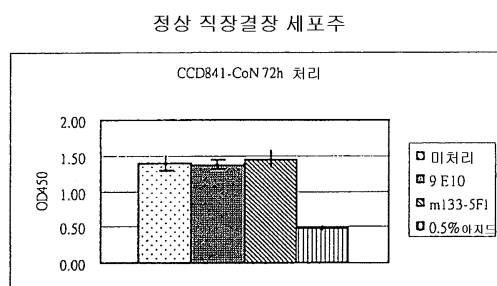
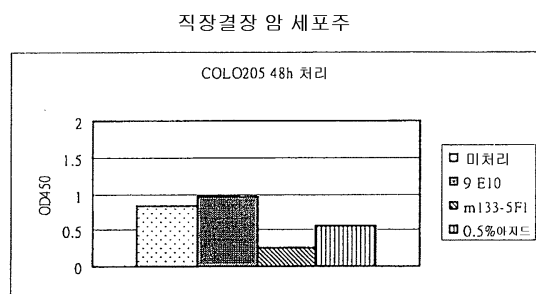
도면3



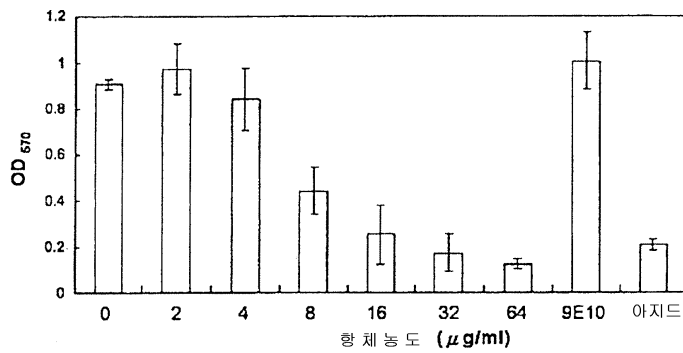
도면4



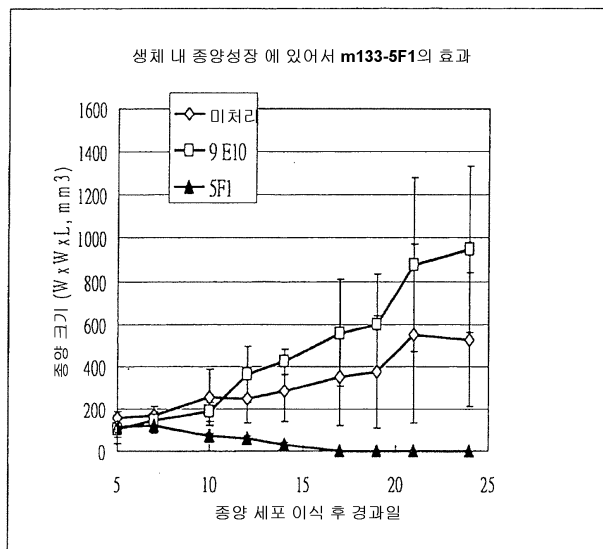
도면5



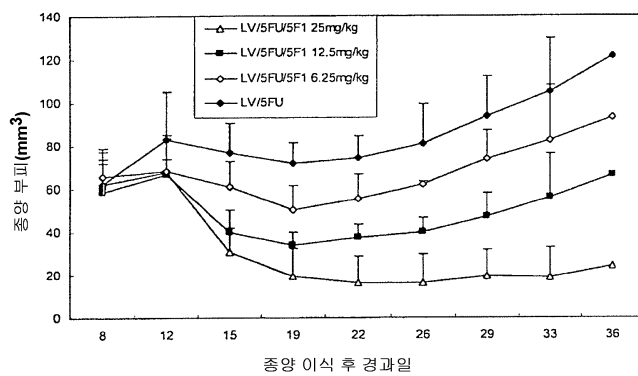
도면6



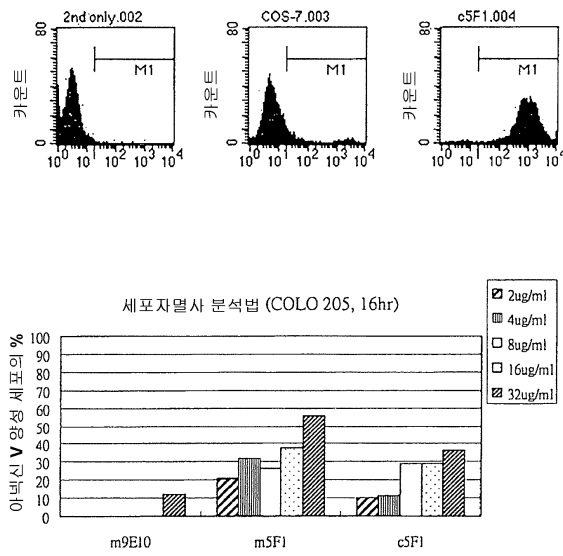
도면7



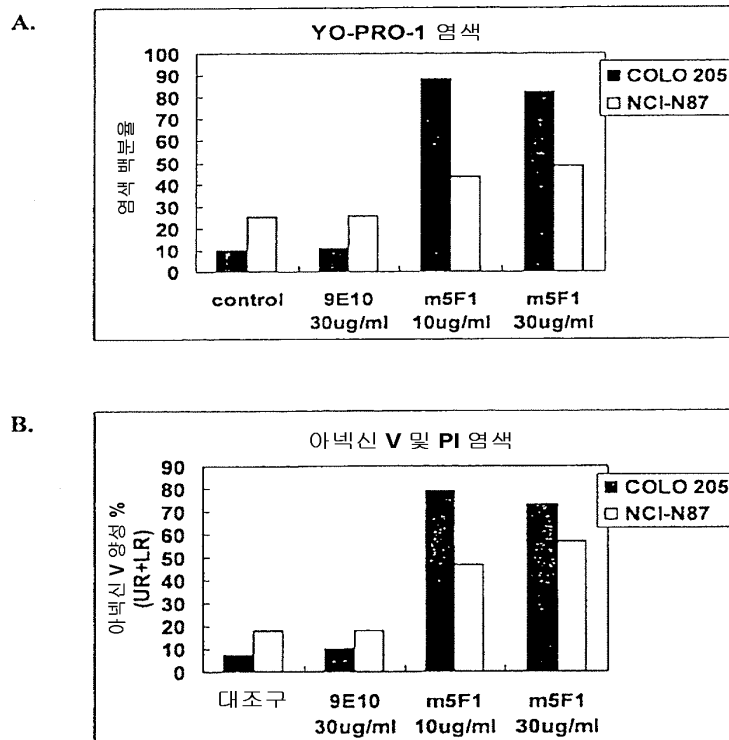
도면8



도면9

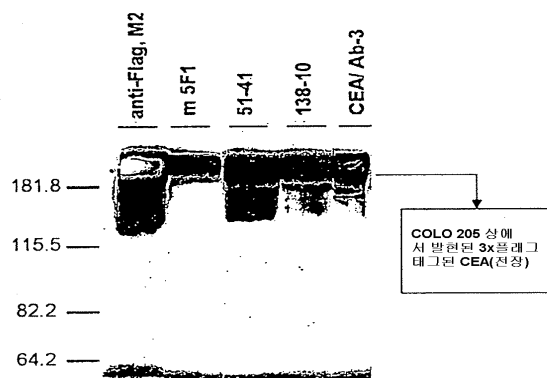


도면10

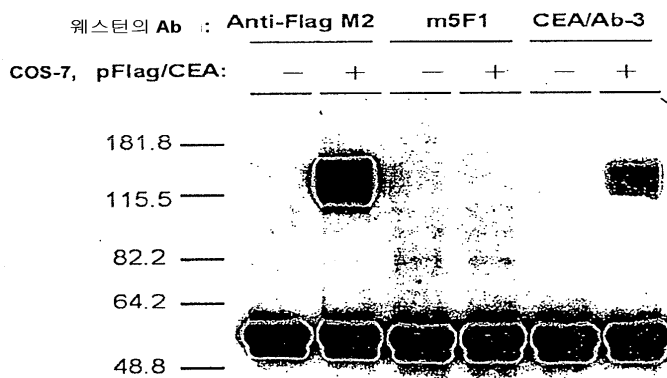


도면11

A.

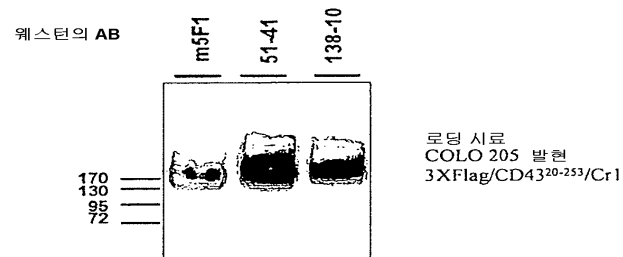


B.

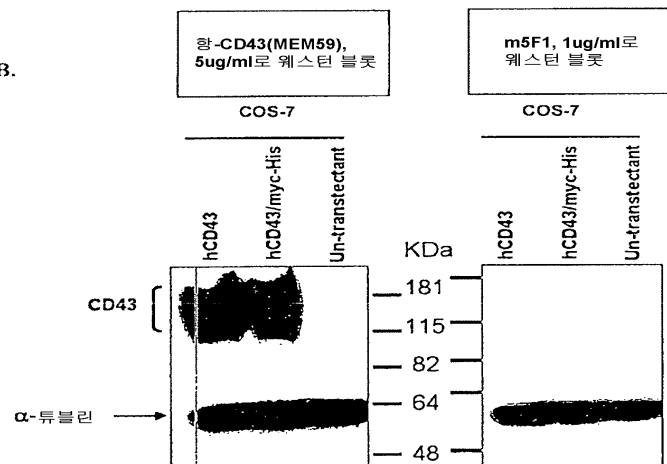


도면12

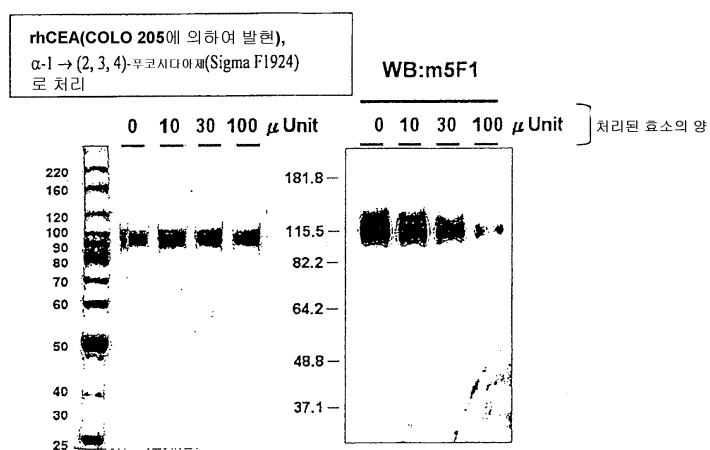
A.



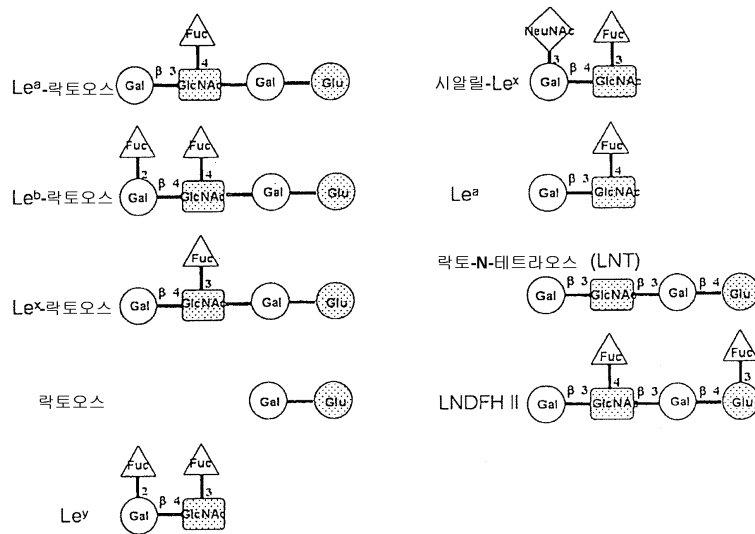
B.



도면13



도면14



도면15

형광 평균값으로 측정된,
% 억제

