



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0042354
(43) 공개일자 2019년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/30 (2013.01)
G01N 33/574 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0134165

(22) 출원일자 2017년10월16일

심사청구일자 2017년10월16일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

권형주

충청북도 청주시 상당구 중흥로 70, 현대 3차 아파트 306동 1204호

박병권

강원도 춘천시 후석로228번길 24 석사2지구아파트 209동 102호

(74) 대리인

구현서

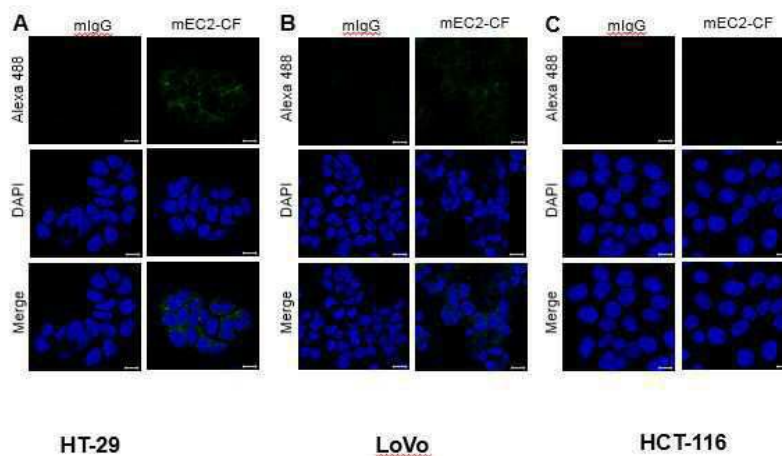
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 사이클릭 펩타이드에 대한 항체 또는 이를 포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 사이클릭 펩타이드를 포함하는 백신 조성물, 사이클릭 펩타이드에 대한 항체 또는 이를 포함하는 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 항체는 중앙특이항원 TM4SF5에 높은 친화력으로 결합하므로, TM4SF5를 발현하는 다양한 암의 진단, 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 2039/51 (2013.01)

A61K 2039/55555 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

G01N 2333/705 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013M3A9A9050126

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 TM4SF5를 타겟으로 하는 항체의 최적화를 통한 간암 치료용 항체 후보 발굴

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.10.17 ~ 2017.10.16

명세서

청구범위

청구항 1

서열목록 제1서열의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드;

및 서열목록 제1서열 중 3번째 시스테인과 32번째 시스테인 아미노산 간에 다이설파이드 결합으로 연결된 사이클릭 펩타이드로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드 백신 조성물은 면역자극 올리고뉴클레오타이드와 리포솜에 포집된 것을 특징으로 하는 펩타이드 백신 조성물.

청구항 3

서열목록 제1서열의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드;

및 서열목록 제1서열 중 3번째 시스테인과 32번째 시스테인 아미노산 간에 다이설파이드 결합으로 연결된 사이클릭 펩타이드로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항체는 서열목록 제2서열로 이루어진 CDRH1, 서열목록 제3서열로 이루어진 CDRH2 및 서열목록 제4서열로 이루어진 CDRH3의 중쇄 CDR(complementarity determining region) 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역; 및

제5서열로 이루어진 CDRL1, 서열목록 제6서열로 이루어진 CDRL2 및 서열목록 제7서열로 이루어진 CDRL3의 경쇄 CDR 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 중쇄 가변영역은 서열목록 제8서열의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은 서열목록 제9서열의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 7

제 4 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산분자.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 핵산분자는 서열목록 제10서열의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 핵산분자.

청구항 9

제 4 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산분자.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 핵산분자는 서열목록 제11서열의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 핵산

분자.

청구항 11

(a) 제 3 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 암은 간암, 대장암, 췌장암, 폐암, 위암, 직장암, 연부조직육종(soft-tissue sarcoma), 결장암, 십이지장 유두부 상피암(carcinoma of the papilla vateri), 비내분비 폐종양(nonendocrine lung tumor) 및 기관지 유암종(bronchial carcinoid tumor)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 13

제 3 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 암 진단용 키트.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 암은 간암, 대장암, 췌장암, 폐암, 위암, 직장암, 연부조직육종(soft-tissue sarcoma), 결장암, 십이지장 유두부 상피암(carcinoma of the papilla vateri), 비내분비 폐종양(nonendocrine lung tumor) 및 기관지 유암종(bronchial carcinoid tumor)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 진단용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 사이클릭 펩타이드에 대한 항체 또는 이를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간 암에서 TM4SF5(transmembrane 4 superfamily member 5 protein)의 mRNA 발현은, 췌장암, 연부조직육종(soft tissue sarcoma), 위암, 십이지장 유두부 상피암(carcinoma of the papilla vateri) 및 대장암에서 관찰되었다(Muller-Pillasch F, *et al. Gene* 208,25-30(1998)). TM4SF5는 유도된 형태학적 신장 및 상피세포의 중간엽 세포로의 전환(epithelial-mesenchymal transition)을 통하여 간세포암(hepatocellular carcinoma, HCC) 형성에 중요한 역할을 하고, 인 비트로에서 비정상적인 세포 성장 및 인 비보에서 종양 형성을 야기한다(Lee SA, *et al. J Clin Invest* 118,1354-1366(2008); Lekishvili T, *et al. J Cell Sci* 121,685-694(2008)). TM4SF5과 인테그린 $\alpha 2$ 사이의 세포 외 상호작용에 의한 콜라겐 타입 I 환경에서 인테그린 $\alpha 2$ 기능을 억제하는 경우 TM4SF5 발현-유도된 조절되지 않은 세포 증식 및 신생혈관형성이 일어난다는 사실이 보고되었다(Lee SA, *et al. Carcinogenesis* 30,1872-1879(2009)). TM4SF5를 타겟팅 하는 합성 억제제인 TSAHC(4'-(p-toluenesulfonyl-amido)-4-hydroxychalcone)는 인 비트로 및 인 비보에서 HCC 성장 및 전이를 억제하였다(Lee SA, *et al. Hepatology* 49,1316-1325(2009)).

[0003] 대장암은 전 세계에서 세 번째로 흔한 암이고, 개발도상국 보다 선진국에서 더 흔한 암이다. 대장암에서 가장 흔한 돌연변이 유전자는 Wnt-APC- β -카테닌 신호전달경로와 관련된 APC, β -카테닌, AXIN1, AXIN2, TCF7L2 또는 NKD1이다(Korinek V, *et al. Science* 275,1784-1787(1997); Khan NP, *et al. Mol Cell Biochem* 355,149-155(2011); Folsom AR, *et al. Diabetes Care* 31,905-909(2008); Guo J, *et al. PLoS One* 4, e7982(2009)).

[0004] 한편, 생체에 의한 종양 세포와 바이러스 감염 세포 등의 배제는 세포성 면역, 특히 세포 독성 T 세포 (CTL라고 칭한다)가 중요한 역할을 하고 있다. 종양 세포의 배제의 경우, CTL은 종양 세포 상에 항원 펩티드(종양 항원 펩티드)와 MHC(Major Histocompatibility Complex) 클래스 I 항원(인간의 경우 HLA 클래스 I 항원이라 칭함)의 복합체를 인식하여 종양 세포를 공격 및 파괴한다. 즉, 종양 항원 펩티드는 종양에 특유의 단백질, 즉 종양 항원단백질이 세포 내에서 합성된 후, 프로테아제에 의해 세포 내에서 분해됨으로써 생성된다. 생성된 종양 항원 펩티드는 소포체 내에서 MHC 클래스 I 항원(HLA 클래스 I 항원)과 결합하여 복합체를 형성하여 세포 표면에 옮겨져 항원으로 제시된다. 이 항원 제시에 따른 복합체를 종양 특이적인 CTL이 인식하고 세포 독성 작용과 림포

카인(lymphokine)의 생산을 통해 항 종양 효과를 나타낸다. 이러한 일련의 작용의 해명에 따라 종양 항원 단백질 또는 종양 항원 펩티드를 이른바 암 면역 요법제(암 백신)로 이용함으로써 암 환자의 체내의 암 특이적 CTL을 증강시키는 치료법이 개발되고 있다.

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[0006] [선행 특허 문헌]

[0007] 대한민국 특허공개번호 제10-2015-0122159호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 사이클릭 펩타이드에 대한 항체를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 암 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 서열목록 제1서열의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드;

[0014] 또는 서열목록 제1서열 중 3번째 시스테인과 32번째 시스테인 아미노산 간에 다이설파이드 결합으로 연결된 사이클릭 펩타이드로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 펩타이드 백신 조성물은 면역자극 올리고뉴클레오타이드와 리포솜에 포집된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0016] 본 명세서에서 용어 "리포솜(liposome)"은 지질 이중막을 형성함으로써 제조되는 지질 운반체를 의미한다. 일반적으로, 리포솜은 생체 친화적이며 양쪽 친매성을 가지고 있어 내부의 친수성 물질을 포함한 채로 소수성 막을 통과할 수 있다. 리포솜의 직경은 일반적으로 20-2,000 nm이나 이에 제한되지 않고, 제조 방법 및 운반될 뉴클레오타이드의 길이에 따라 다양한 크기일 수 있다.

[0017] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 리포솜은 CHEMS 및 DOPE의 혼합물이다. 본 발명에서 사용하는 리포솜 내에서의 DOPE:CHEMS의 몰 비율은 바람직하게는 7:3-3:7이고, 보다 바람직하게는 4.5:5.5-5.5:4.5이며, 가장 바람직하게는 5.0:5.0이다.

[0018] 본 발명의 리포솜의 제조는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 유기용매-혼합 방법 또는 계면제-혼합 방법을 이용한다(미국 특허등록 제5,705,385호; 미국 특허출원 제08/660,025호). 보다 바람직하게는, 리포솜은 DOPE 및 CHEMS를 혼합하고, 이를 질소가스와 함께 증발시켜 무용매(solvent free)지질 필름을 만든 후, 알코올 용액에서 용해시켜 최종적으로 수용성 뉴클레오타이드 혼합물과 혼합하는 과정을 통해 제조한다.

[0019] 본 발명의 리포솜 제조를 유기용매 혼합을 통해 실시하는 경우, 이에 이용되는 유기용매는 클로로포름, 메탄올, 에탄올, n-프로판올 또는 부탄올을 포함한다. 바람직하게는, 상기 유기용매는 에탄올이다.

[0020] 본 명세서에서 용어 "포집(encapsulation)"은 효율적인 인 비보 운반을 위해 운반될 물질을 상대적으로 안정한 쉘 내로 가두는(enclosure) 것을 의미한다.

[0021] 본 명세서에서 용어 "면역자극(immunostimulatory)"은 초기 면역반응을 유도하거나 또는 항원에 대한 기존의 면

역반응을 측정 가능할 정도로 증가시키는 것을 의미한다.

- [0022] 본 발명에서 이용될 수 있는 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 당업계에 공지된 어떠한 면역자극 올리고뉴클레오타이드도 포함한다. 예를 들어, 상기 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 헤어핀 이차 구조를 형성하는 펩티드, CpG 모티프, CpT 모티프 또는 다중 G 도메인을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 다른 공지된 ISS(immunostimulatory sequence)일 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 이용되는 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 미국 특허출원공개 제20080045473호, WO 2006/063152 또는 WO 1998/18810에 개시된 면역자극 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 상기 CpG 모티프를 포함하는 면역자극 올리고뉴클레오타이드의 구체적인 예는 WO 2006/[0027] 080596에 개시된 본 발명자들에 의해 개발된 CpG 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0023] 본 발명에서 유효성분으로 이용되는 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 천연(natural-occurring)뉴클레오타이드, 백본(backbone)-변형된 뉴클레오타이드(예컨대, 펩타이드 핵산(PNA)(M. Egholm, et al., Nature, 365: 566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아미드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당-변형된 뉴클레오타이드(예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 헥소오스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA), 및 염기-변형된 뉴클레오타이드(예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴- 및 피리디- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리디- 포함), 이노신 및 디아미노퓨린)을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 천연 뉴클레오타이드이다.
- [0024] 환원 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴- 및 피리디- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리디- 포함), 이노신 및 디아미노퓨린)을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 천연 뉴클레오타이드이다.
- [0025] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 포스포로다이에스테르 백본 또는 포스포로티오에이트 백본을 가진다.
- [0026] 본 발명에서 이용되는 면역자극 올리고뉴클레오타이드의 길이는 특별하게 제한되지 않으며, 바람직하게는 8-100 뉴클레오타이드 길이이고, 보다 바람직하게는 15-50 뉴클레오타이드 길이이며, 가장 바람직하게는 약 13-25 뉴클레오타이드 길이이다. 바람직하게는, 본 발명의 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제23서열의 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0027] 본 명세서에서 용어 "에피토프(epitope)"는 항체와 상호작용하는 항원의 부위를 의미한다. 보다 자세하게는, 에피토프는 면역글로블린(immunoglobulin) 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정부위(determinant)를 의미한다. 또한, 본 발명의 에피토프는 면역반응을 증가시킬 수 있는 어떠한 분자 또는 물질을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 에피토프는 펩타이드, 이들 펩타이드를 인코딩하는 핵산 및 당단백질을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 "펩타이드(peptide)"는 아미노산 잔기들 간의 펩타이드 결합에 의해 형성된 선형의 분자를 의미하고, 본 명세서에서 용어 "펩타이드 에피토프(peptide epitope)"는 B 세포 및/또는 T 세포의 특이적 반응을 유도할 수 있는 에피토프를 포함하는 펩타이드를 의미한다.
- [0029] 본 발명의 조성물에는 기타 약물 또는 다른 면역 보조제가 포함되어 추가적인 면역 자극 효과를 제공할 수 있다. 면역보강제의 종류들은 당 분야에 널리 공지되어 있다(Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach, 1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Eds. Powell, M.F., and Newman, M.J., Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X). 바람직하게는, 본 발명의 조성물에 포함되는 면역보강제는 알루미늄 염 또는 칼슘 염(예를 들어, 하이드록사이드 또는 포스페이트)을 포함한다.
- [0030] 바람직한 면역보강제의 구체적 예는 다음과 같다: 알루미늄염 또는 칼슘염(하이드록사이드 또는 포스페이트), 수중유(oil-in-water) 에멀전(WO 95/17210, EP 0 399 843) 또는 리포솜과 같은 미립성 캐리어(WO 96/33739), 남아메리카 수목인 킬라자 사포나리아 몰리나(Quillaja Saponaria Molina)로부터 유래된 면역학적으로 항원보강제 활성을 지닌 사포닌 분획(예를 들어, Quil A), 3 De-O-실화된 모노포스포릴 지질 A, 뮤라밀 디펩티드, 3DMPL(3-O-데아실화된 모노포스포릴 지질 A)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 백신 조성물은 다양한 상태 또는 질환의 치료에 적용될 수 있으며, 상기 상태 또는 질환의 예는 대장암, 간암, 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암과 같은 암에 적용될 수 있다.

- [0032] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0033] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 바람직하게는 비경구 투여이고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001-10,000 mg/kg(체중)이다.
- [0035] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0038] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0040] 항-TM4SF5 인간화된 항체 및 그의 항원 결합 단편
- [0041] 본 발명의 항체는 TM4SF5에 대하여 특이적 결합능을 갖는다.
- [0042] 본 명세서에서, TM4SF5를 언급하면서 사용되는 용어, "항체"는 TM4SF5에 대한 특이 항체로서, TM4SF5의 특정 에피토프에 대해 특이적으로 결합하며, 완전한 항체 형태뿐만 아니라 항체 분자의 항원 결합 단편(항체 단편)을 포함한다.
- [0043] 용어 "인간화"는 항체가 전체적으로 또는 부분적으로 비-인간 기원의 것, 예를 들어 관심있는 항원으로 마우스를 면역화시켜 수득된 뮤린 항체 또는 그러한 뮤린 항체에 기반한 키메라 항체인 경우, 특히 중쇄 및 경쇄의 프레임워크 영역 및 불변 도메인에 있는 특정 아미노산을 대체시켜 인간에서 면역 반응을 회피하거나 최소화할 수 있다는 사실을 지칭한다. 모든 항체는 논의되고 있는 항체의 "인간화(humanness)" 정도와 어느 정도 관련되는 인간 항-항체 반응을 유도할 가능성을 지니는 것으로 알려져 있다. 비록 면역원성, 그리고 이에 의해 특정 항체의 인간 항-항체 반응을 정밀하게 예측할 수는 없지만, 비-인간 항체는 인간 항체보다 더욱 면역원성인 경향이 있다. 외래 (일반적으로 설치류) 불변 영역이 인간 기원의 서열로 대체된 키메라 항체는 완전한 외래 기원의 항체보다 일반적으로 덜 면역원성인 것으로 나타났고, 치료용 항체에서의 추세는 인간화 또는 완전한 인간 항체를 향하고 있다. 키메라 항체 또는 비-인간 기원의 그 밖의 항체의 경우, 그 결과로서, 이들을 인간화시켜 인간 항-항체 반응의 위험성을 감소시키는 것이 바람직하다.
- [0044] 항체 서열을 인간화하는 많은 방법이 당 분야에 공지되어 있다; 참조: 예컨대, Almagro & Fransson (2008) Front Biosci. 13: 1619-1633에 의해 개관됨. 한 가지 일반적으로 사용되는 방법은, 예컨대 뮤린-유래된 키메라 항체의 경우 뮤린 가변 영역 유전자에 대한 인간 생식세포 유전자 대응부를 동정하고 뮤린 CDR 서열을 이러한 프레임워크로 그래프팅하는 것을 포함하는 CDR 그래프팅이다. CDR 그래프팅은 케이벳 CDR 정의에 기반할 수 있으나, 보다 최근의 간행물 (Magdelaine-Beuzelin et al. (2007) Crit Rev.Oncol Hematol. 64: 210-225)은 IMGT® 정의 (the international ImmunoGeneTics information system®, www.imgt.org)가 인간화의 결과를 향상시킬 수 있음을 제안하였다 (Lefranc et al. (2003), IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains, Dev. Comp Immunol. 27, 55-77 참조). CDR 그래프팅이 CDR 그래프팅된 비-인간 항체의 결합 특이성 및 친화성, 및 이에 따라 생물학적 활성을 감소시킬 수 있으므로, 복귀 돌연변이 (때로 "프레임워크 복구"로 지칭됨)를, 전형적으로 프레임워크 영역에서 CDR 그래프팅

된 항체의 선택된 위치에 도입시켜 부모 항체의 결합 특이성 및 친화성을 재확립시킬 수 있다. 가능한 복귀 돌연변이를 위한 위치의 확인은 문헌 및 항체 데이터베이스에서 이용가능한 정보를 이용하여 수행될 수 있다. 복귀 돌연변이의 후보인 아미노산 잔기는 전형적으로 항체 분자의 표면에 위치한 것들인 반면, 숨겨져거나 낮은 정도의 표면 노출을 지니는 잔기는 일반적으로 변경되지 않을 것이다. CDR 그래프팅 및 복귀 돌연변이에 대한 인공화 기법은 비-인간 기원의 표면 노출되지 않은 잔기를 유지하는 한편 표면 잔기를 인간 잔기로 변경시키는 리서피싱(resurfacing)이다.

[0045] 특정 경우에, 표적 에피토프에 대한 결합 친화성을 향상시키기 위해 하나 이상의 CDR 아미노산 잔기를 변경시키는 것이 또한 바람직할 수 있다. 이것은 "친화성 성숙화"로 알려져 있고, 예를 들어 항체의 인간화가 감소된 결합 특이성 또는 친화성을 초래하고 복귀 돌연변이 단독에 의해 결합 특이성 또는 친화성을 충분히 향상시킬 수 없는 상황에서, 임의로 인간화와 함께 수행될 수 있다. 다양한 친화성 성숙화 방법, 예를 들어 문헌[Burks et al. (1997) PNAS USA, vol. 94, pp. 412-417]에 기재된 시험관내 스캐닝 포화 돌연변이발생 방법 및 문헌[Wu et al. (1998) PNAS USA, vol. 95, pp. 6037-6042]의 단계식 시험관내 친화성 성숙화 방법이 당 분야에 공지되어 있다.

[0046] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.

[0047] 항체 분자의 항원 결합 단편 또는 항체 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(C_{H1})을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 C_{H1} 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 PCT 국제 공개특허출원 WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 및 WO 88/09344에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 단쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수도 있다.

[0048] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명에서 항체는 Fab 형태이거나 완전한 항체 형태이다. 또한, 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 또는 엡실론(ϵ) 중의 어느 한 이소타입으로부터 선택될 수 있다. 하나의 특정예에서 불변영역은 감마1(IgG1), 감마2(IgG2), 감마 3(IgG3) 또는 감마 4(IgG4)이고, 다른 특정예에서 불변영역은 IgG2a 아이소타입이다. 경쇄 불변영역은 카파 또는 람다 형일 수 있다. 하나의 특정예에서 상기 경쇄 불변영역은 카파 형이다.

[0049] 본 명세서에서 사용되는 용어, "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 V_H 및 3 개의 불변영역 도메인 C_{H1}, C_{H2} 및 C_{H3}을 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어, "경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 V_L 및 불변영역 도메인 C_L을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.

[0050] 본 명세서에서, 용어 "CDR(complementarity determining region)"은 면역글로블린 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역(hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다(Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)). 중쇄(CDRH1, CDRH2 및 CDRH3) 및 경쇄(CDRL1, CDRL2 및 CDRL3)에는 각각 3개의 CDRs이 포함되어 있다. CDR은 항체가 항원 또는 에피토프에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공한다.

[0051] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은, TM4SF5를 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서 첨부한 서열목록에 기재된 아미노산 서열의 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 항

체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

[0052] 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스(hydrophobic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신(+4.5); 발린(+4.2); 루이신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스테인(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글라이신(-0.4); 프롤린(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 타이로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르트레이트(-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).

[0053] 단백질의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유했을 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 일특정예에서는 ± 2 이내, 다른 특정예에서는 ± 1 이내, 또 다른 특정예에서는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

[0054] 한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌(+3.0); 라이신(+3.0); 아스파르트레이트(+3.0 $\pm$ 1); 글루타메이트(+3.0 $\pm$ 1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글라이신(0); 프롤린(-0.4); 프롤린(-0.5 $\pm$ 1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 루이신(-1.8); 아이소루이신 (-1.8); 타이로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4). 친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 일특정예에서는 ± 2 이내, 다른 특정예에서는 ± 1 이내, 또 다른 특정예에서는 ± 0.5 이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

[0055] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu 및 Asp/Gly 간의 교환이다.

[0056] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 항체 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인 하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인 된 서열을 분석한 경우에, 최소 61%의 상동성, 일특정예에 따르면 70%의 상동성, 다른 특정예에 따르면 80%의 상동성, 또 다른 특정예에 따르면 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* (1981) 2:482 Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* (1970) 48:443; Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* (1988) 24: 307-31; Higgins and Sharp, *Gene* (1988) 73:237-44; Higgins and Sharp, *CABIOS* (1989) 5:151-3; Corpet *et al. Nuc. Acids Res.* (1988) 16:10881-90; Huang *et al. Comp. Appl. BioSci.* (1992) 8:155-65 및 Pearson *et al. Meth. Mol. Biol.* (1994) 24:307-31에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul *et al. J. Mol. Biol.* (1990) 215:403-10)은 NBCI 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

[0057] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 항체는 서열목록 제8서열의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역을 포함한다.

[0058] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 항체는 서열목록 제9서열의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함한다.

- [0059] 본 발명의 항체는 단일클론 항체, 다특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fvs(scFV), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab')단편, 다이설파이드-결합 Fvs(sdFV) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 그리고 상기 항체들의 에피토프-결합 단편 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명에 따르면, 본 발명의 항체는 다양한 형태의 항체로 제조될 수 있다. 예를 들어, 하기의 실시예에 기재된 바와 같이, 본 발명의 항체는 Fab 항체로 제조될 수 있고, 또한 Fab 항체에 얻은 경쇄 및 중쇄 가변영역을 이용하여 사람 유래의 불변영역과 재조합함으로써 완전한(whole) 형태의 항체를 제공할 수도 있다.
- [0061] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 항체는 단일클론 항체이다. 용어 “단일클론 항체”는, 실질적으로 동일한 항체 집단에서 수득한 단일 분자 조성의 항체분자를 의미하며, 단일클론 항체는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다.
- [0062] 본 발명의 항체는 종양특이항원으로 알려진 TM4SF5 단백질에 결합하여 이의 활성을 감소/억제/제거시킴으로써 암을 치료할 수 있다.
- [0064] 핵산 분자 및 재조합 벡터
- [0065] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0066] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 TM4SF5에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0067] 본 명세서에서 사용되는 용어, "핵산 분자"는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, (1990) 90:543-584). 본 발명의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자의 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.
- [0068] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자는 서열목록 제10서열의 뉴클레오타이드를 포함하며, 상기 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자는 서열목록 제11서열의 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0069] 본 발명의 핵산 분자는 상기한 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 일 특정예에서는 최소 90%의 상동성, 다른 특정예에서는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다.
- [0070] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 본 발명의 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자; 및 (b) 본 발명의 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0071] 본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터; 코즈미드 벡터; 그리고 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다.
- [0072] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 벡터에서 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자 및 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자는 프로모터와 작동적으로 결합(operatively linked)되어 있다.
- [0073] 본 명세서에서 사용되는 용어, "작동적으로 결합된"은 핵산 발현조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0074] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 벡터는 (a) 서열목록 제25서열의 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자; 및 (b) 서열목록 제26서열의 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자를 포함한다.
- [0075] 본 발명의 재조합 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory

Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

- [0076] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL λ 프로모터, pR λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주세포로서 *E. coli*(예컨대, HB101, BL21, DH5 α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토향 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C. J. *Bacteriol.* 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터(pL λ 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D. *Ann. Rev. Genet.* 14:399-445(1980))가 조절부위로서 이용될 수 있다. 숙주세포로서 바실러스 균이 이용되는 경우, 바실러스 쉼린겐시스의 독소단백질 유전자의 프로모터(*Appl. Environ. Microbiol.* 64:3932-3938(1998); *Mol. Gen. Genet.* 250:734-741(1996)) 또는 바실러스균에서 발현 가능한 어떠한 프로모터라도 조절부위로 이용될 수 있다.
- [0077] 한편, 본 발명의 재조합 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pCL, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지(예: λ gt4 $\cdot$ λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0078] 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터, β -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 모로니 바이러스의 프로모터 엡스타인바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0079] 본 발명의 재조합 벡터는 그로부터 발현되는 항체의 정제를 용이하게 하기 위하여 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은, 예컨대 글루타민 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA); 말토스 결합 단백질(MB3, USA); FLAG(Boehringer-Mannheim, USA); 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA), Pre-S1, c-Myc와 같은 태그 서열; OmpA, PelB와 같은 선도서열 등이 있다. 또한, 본 발명의 벡터에 의해 발현되는 단백질이 항체이기 때문에 정제를 위한 추가적인 서열 없이도, 발현된 항체는 단백질 A 겔럼 등을 통하여 용이하게 정제할 수 있다.
- [0080] 한편, 본 발명의 재조합 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0081] 본 발명의 항체를 발현하는 벡터는, 경쇄와 중쇄가 하나의 벡터에서 동시에 발현되는 벡터 시스템이거나 또는 경쇄와 중쇄를 각각 별도의 벡터에서 발현시키는 시스템 모두 가능하다. 후자의 경우, 두 벡터는 동시 형질전환(co-transformation) 및 표적 형질전환(targeted transformation)을 통하여 숙주세포로 도입된다. 동시 형질전환은 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 각각의 벡터 DNA를 동시에 숙주세포로 도입한 뒤 경쇄와 중쇄를 모두 발현하는 세포를 선별하는 방법이다. 표적 형질전환은 경쇄(또는 중쇄)를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포를 선별하고 경쇄를 발현하는 선별된 세포를 중쇄(또는 경쇄)를 포함하는 벡터로 다시 형질전환 하여 경쇄 및 중쇄 모두를 발현하는 세포를 최종적으로 선별하는 방법이다. 하기의 실시예에서는, 경쇄(V_L 및 C_L)와 중쇄(V_H 및 C_H1)가 하나의 벡터에서 동시에 발현되는 벡터 시스템을 이용하여 항체를 제조하였다.
- [0083] 형질전환체
- [0084] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0085] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 쉼린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*)(예를 들면, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스

스(*Staphylococcus*)(예를 들면, 스태필로코쿠스 카르노수스(*Staphylococcus carnosus*))와 같은 원핵 숙주세포를 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0086] 상기 벡터의 적합한 진핵세포 숙주세포는 아스페르길러스 속(*Aspergillus species*)과 같은 진균, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*) 및 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)와 같은 효모, 그 밖의 하등 진핵세포, 곤충-유래 세포와 같은 고등 진핵생물의 세포, 그리고 식물 또는 포유동물로부터 유래한 세포를 이용할 수 있다.

[0087] 본 명세서에서, 숙주세포로의 "형질전환" 및/또는 "형질감염"은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로 박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나, 이로 제한되지 않는다.

[0089] 항-TM4SF5 항체 변이체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법

[0090] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환 된 숙주세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 숙주세포에서 항-TM4SF5 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 발현시키는 단계를 포함하는 항-TM4SF5 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공한다.

[0091] 상기 항체 제조에서 형질전환 된 숙주세포의 배양은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양과정은 당업자라면 선택되는 균주에 따라 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 이러한 다양한 배양 방법은 다양한 문헌(예를 들면, James M. Lee, *Biochemical Engineering*, Prentice-Hall International Editions, 138-176)에 개시되어 있다. 세포 배양은, 세포의 성장방식에 따라 현탁배양과 부착 배양, 배양방법에 따라 회분식, 유가식 및 연속배양식의 방법으로 구분된다. 배양에 사용되는 배지는 특정한 균주의 요구조건을 적절하게 만족시켜야 하다.

[0092] 동물세포 배양은 상기 배지는 다양한 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 사용될 수 있는 탄소원의 예는, 포도당, 자당, 유당, 과당, 말토오스, 전분 및 셀룰로오스와 같은 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유 및 코코넛유와 같은 지방, 팔미트산, 스테아린산 및 리놀레산과 같은 지방산, 글라이세롤 및 에탄올과 같은 알코올, 그리고 아세트산과 같은 유기산을 포함한다. 이들 탄소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원의 예는, 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액(CSL) 및 대두밀과 같은 유기 질소원 및 요소, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄과 같은 무기 질소원을 포함한다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는, 인산이수소칼륨, 인산수소 이칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 또한, 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 포함할 수 있다. 그 외에, 아미노산, 비타민, 및 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다.

[0093] 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배양물의 호기상태를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 20℃ 내지 45℃, 바람직하게는 25℃ 내지 40℃이다.

[0094] 형질전환된 숙주세포를 배양하여 수득한 항체는 정제하지 않은 상태로 사용될 수 있으며 추가로 다양한 통상의 방법, 예를 들면 투석, 염 침전 및 크로마토그래피 등을 이용하여 고순도로 정제하여 사용될 수 있다. 그 중에서 크로마토그래피를 이용하는 방법이 가장 많이 사용되며, 컬럼의 종류와 순서는 항체의 특성, 배양방법 등에 따라 이온교환 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등에서 선택할 수 있다.

[0096] 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물

[0097] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 본 발명의 TM4SF5에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0098] 상기 항체는 TM4SF5에 높은 친화도로 결합하여 TM4SF5를 발현하는 암의 성장, 침윤 및 전이를 억제할 수 있으므로

로 항체 단독 또는 통상의 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 암의 예방 및 치료에 사용가능하다.

- [0099] 본 명세서에서 사용되는 용어, "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 암을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 암의 발전의 억제, 암의 경감 또는 암의 제거를 의미한다.
- [0100] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에 적용되는 질환인 암은 TM4SF5를 발현하는 암이고, 이러한 암의 예로는 간암, 대장암, 췌장암, 폐암, 위암, 직장암, 연부조직육종(soft-tissue sarcoma), 결장암, 십이지장 유두부 상피암(carcinoma of the papilla vateri), 비내분비 폐종양(nonendocrine lung tumor) 및 기관지 유암종(bronchial carcinoid tumor) 등을 들 수 있다.
- [0101] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0102] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한 약제학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0103] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-100 mg/kg이다. 본 명세서에서 용어, "약제학적 유효량"은 암을 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0104] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0105] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [0106] 항체는 항체-치료제 결합체 형태로 생체내로 투입하여 암의 치료에 이용할 수 있다. 치료제는 화학치료제, 방사선훈종, 면역치료제, 사이토킨, 케모킨, 독소, 생물작용제 및 효소 저해물질 등을 포함한다. 본 발명의 항체 또는 그의 단편과 커플링 시키기기에 바람직한 기능성 분자는 화합물질, 사이토킨 또는 케모킨이다. 상기 화합물질은 항암제이고, 예를 들면 아시바이신, 아클라루비신, 아코다졸, 아크로나이신, 아도젤레신, 알라노신, 알데스루킨, 알로푸리놀 소듐, 알트레타민, 아미노글루테티미드, 아모나파이드, 암플리겐, 암사크린, 안드로겐스, 안구이딘, 아피디콜린 글리시네이트, 아사레이, 아스파라기나아제, 5-아자시티딘, 아자티오프린, 바실러스 칼메테-구에린(BCG), 베이커스 안티폴, 베타-2-디옥시티오구아노신, 비스안트렌 HCl, 블레오마이신 설페이트, 불서판, 부티오닌 설펡시민, BWA773U82, BW 502U83/HCl, BW 7U85 메실레이트, 세라세미드, 카르베티머, 카르보플라틴, 카르무스틴, 클로람부실, 클로로퀴녹살린-설포나미드, 클로로조토신, 크로모마이신 A3, 시스플라틴, 클라드리빈, 코르티코스테로이드, 코리너박테리움 파르븀, CPT-11, 크리스나톨, 사이클로사이티딘, 사이클로포스파미드, 사이타라빈, 사이템베나, 다비스 말리에이트, 데카르바진, 닥티노마이신, 다우노루비신 HCl, 디아자유리딘, 텍스라족산, 디엔하이드로 갈락티톨, 디아지쿠온, 디브로모톨시톨, 디데민 B, 디에틸디티오카르바메이트, 디클라이코알데하이드, 다이하이드로-5-아자사이틴, 독소루비신, 에치노마이신, 데다트렉세이트, 에텔포신, 에플롤니틴, 엘리우스 용액, 엘사미트루신, 에피루비신, 에소루비신, 에스트라머스틴 포스페이트, 에스트로젠, 에타니다졸, 에티오포스, 에토포사이드, 파드라졸, 파자라빈, 펜레티나이드, 필그라스티프, 피나스테라이드, 플라본 아세트산, 플록스유리딘, 플루다라빈 포스페이트, 5'-플루오로우라실, Flusol™, 플루타미드, 갈륨 나이트

레이트, 겐사이타빈, 고세레틴 아세테이트, 헤프셀팜, 헥사메틸렌 비스아세트아미드, 호모하링토닌, 하이드라진 설페이트, 4-하이드록시안드로스테네디온, 하이드로지우레아, 이다루비신 HCl, 이포스파미드, 4-이포메아놀, 이프로플라틴, 이소트레티노인, 류코보린 칼슘, 류프로라이드 아세테이트, 레바미솔, 리포좀 다우노루비신, 리포좀 포집 독소루비신, 로머스틴, 로니다민, 마이탄신, 메클로레타민 하이드로클로라이드, 멜팔란, 메노가릴, 메르바론, 6-머캅토프린, 메스나, 바실러스 칼레테-구에린의 메탄올 추출물, 메토티렉세이트, N-메틸포름아미드, 미페프리스톤, 미토구아존, 마이토마이신-C, 미토탄, 미톡산트론 하이드로클로라이드, 모노사이트/마크로파지 콜로니-자극 인자, 나빌론, 나폭시딘, 네오키르지노스타틴, 옥트레오타이드 아세테이트, 오르마플라틴, 옥살리플라틴, 파크리탁셀, 팔라, 펜토스타틴, 피페라진디온, 피포브로만, 피라루비신, 피리트렉심, 피록산트론 하이드로클로라이드, PIXY-321, 플리카마이신, 포르피머 소듐, 프레드니무스틴, 프로카르바진, 프로게스틴스, 파이라조푸린, 라족산, 사르그라마스틴, 세무스틴, 스피로게르마늄, 스피로무스틴, 스트렙토나이트린, 스트렙토조신, 술로페너르, 수라민 소듐, 타목시펜, 탁소레레, 테가푸르, 테니포사이드, 테레프탈아미딘, 테록시론, 티오구아닌, 티오테파, 티미딘 인젝션, 티아조푸린, 토토테칸, 토레미펜, 트레티노인, 트리플루오페라진 하이드로클로라이드, 트리플루리딘, 트리메트렉세이트, TNF(tumor necrosis factor), 우라실 머스타드, 빈블라스틴 설페이트, 빈크리스틴 설페이트, 빈데신, 비노렐빈, 빈줄리딘, Yoshi 864, 조루비신, 사이토신아라비노시드, 에토포시드, 멜파란, 탁소텔, 탁솔 및 이들의 혼합물이나, 이에 한정되지 않는다.

[0108] 암 진단용 조성물

[0109] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.

[0110] 본 발명의 항체는, 생물학적 시료에 적용되어 암의 발병 여부를 진단할 수 있다.

[0111] 본 명세서에서 사용된 용어, “생물학적 시료”란 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 조직 부검 시료(뇌, 피부, 림프절, 척수 등), 세포 배양 상등액, 파열된 진핵세포 및 세균 발현계 등을 들 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 이들 생물학적 시료를 조작하거나 조작하지 않은 상태로 본 발명의 항체와 반응시켜서 암의 발병여부를 확인할 수 있다.

[0112] 상기한 항원-항체 복합체의 형성은 비색법(colormetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 또는 섬광계수법(scintillation counting method)으로 검출할 수 있다. 본 명세서상의 “검출”은 항원-항체 복합체를 검출하기 위한 것으로 여러 가지 표지체를 사용하여 실시할 수 있다. 표지체의 구체적인 예로는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자 또는 방사성 동위원소를 포함한다.

[0113] 검출 표지체로서 사용되는 효소로는 아세틸콜린에스테라제, 알칼라인 포스파타제, β -D-갈락토시다제, 호스래디쉬 퍼옥시다제 및 β -라타마제 등을 포함하며, 형광물로는 플루오레세인, Eu^{3+} , Eu^{3+} 킬레이트 또는 크립테이트 등을 포함하며, 리간드로는 바이오틴 유도체 등을 포함하며, 발광물로는 아크리디늄 에스테르 및 이소루미놀 유도체 등을 포함하며, 미소입자로는 콜로이드 금 및 착색된 라텍스 등을 포함하며, 방사성 동위원소로는 ^{57}Co , ^3H , ^{125}I 및 ^{125}I -볼톤(Bonton) 헌터(Hunter) 시약 등을 포함한다.

[0114] 본 발명의 일구현예에 따르면, 항원-항체 복합체를 효소면역흡착법(ELISA)을 이용하여 검출할 수 있다. 효소면역흡착법에는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 이차항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다. 본 발명의 항체는 검출 표지를 가질 수 있으며, 검출표지를 가지지 않을 경우는 본 발명의 항체를 포획할 수 있고 검출 표지를 가지는 또 다른 항체를 처리하여 확인할 수 있다.

[0115] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0116] 후보 펩타이드의 선정 및 anti-hTM4SF5EC2-CF 펩타이드-특이적인 단클론 항체(mEC2-CF)의 생산

[0117] hTM4SF5 EC2 도메인 (도 1A)의 구조 및 기능적 영향을 고려하여, 본 발명자들은 사이클릭 펩타이드,

hTM4SF5EC2-CF를 고안하였다(도 1B). 본 발명자들은 BALB/c 마우스를 hTM4SF5EC2-CF 에피토프 펩타이드 및 Lipoplex(O) 복합체로 면역화하였다.

[0118] 그 혈청을 ELISA로 분석할 때, 많은 양의 anti-hTM4SF5EC2-CF 항체를 생성하였다(도 1C). 면역화된 비장으로부터 지라세포(Splenocytes)를 얻은 후, 표준 하이브리도마 기술(Yokoyama WM, et al. Curr Protoc Immunol Chapter 2, Unit 2.5(2006))에 따라 40% (w/v) 폴리에틸렌글리콜의 존재 하에서 HAT-sensitive SP2/0 마우스 골수종 세포와 융합하고 HAT 배지에서 세포-융합 실험의 초기 스크리닝하고(도 2A 및 2B) HT 배지에서 하이브리도마 클론의 스크리닝하였다(도 2C 및 2D). HEK293 세포를 myc-tagged hTM4SF5 (hTM4SF5-myc) 발현하는 벡터로 트랜스펙션 하고 그 세포 파쇄액을 하이브리도마 세포의 배양 상청액을 웨스턴 블롯을 사용한 면역침전법으로 분석하였다. 그 후, 하이브리도마 클론 2D7-1F7 세포(anti-hTM4SF5EC2-CF 단클론을 생산하는 클론)을 선택하고 다섯 마리 마우스의 복수에서 항체의 생성을 ELISA에 의하여 확인하였다(도 3A). 그 후, 그 항체를 분리하고 protein A 크로마토그래피로 복수로부터 정제하였다(도 3B). IgG 이소타이핑에 대한 ELISA는 그 단클론항체가 IgG2a로 동정되었다(도 3C). 그 항체의 특이성을 결정하기 위해, ELISA를 도 1B의 여러 TM4SF5의 펩타이드로 수행하였다. 그 항체는 hTM4SF5EC2-CF 펩타이드에 강하게 결합하고, 고농도에서 두 펩타이드(hTM4SF5R2-F25V 및 hTM4SF5EC2-C)에 매우 약하게 결합하였고(도 3D), 다른 펩타이드에 대한 결합은 없었다. 이 결과는 그 단클론항체가 hTM4SF5EC2-CF에 매우 특이적이라는 것을 시사한다. 항체 결합 친화도는 $EC_{50} = 280 \text{ pM}$ 로 측정되었다(도 3E). 이 결과들은 hTM4SF5EC2-CF 에피토프가 hTM4SF5EC2-CF 펩타이드에 대한 강하고 특이적인 친화도를 가지는 IgG2a의 생성을 유도한다는 것을 나타낸다. 그 anti-hTM4SF5EC2-CF 단클론 항체를 mEC2-CF로 명명하였다.

[0121] anti-hTM4SF5EC2-CF 펩타이드-특이적 단클론 항체(mEC2-CF)의 특성

[0122] mEC2-CF의 기능을 조사하기 위하여, HEK293 세포를 empty 벡터 또는 myc-tagged hTM4SF5 (hTM4SF5-myc) 발현하는 벡터로 트랜스펙션하고 그 세포 파쇄액을 웨스턴 블롯 및 그 항체를 사용한 면역침전법으로 분석하였다. 웨스턴 블롯의 결과는 mEC2-CF는 효과적으로 hTM4SF5-myc 단백질을 인식하는 것을 나타내고 그 특이성을 anti-Myc 항체를 사용하여 확인하였다(도 4A, B). 다음, 본 발명자들은 hTM4SF5-myc 단백질을 PNGase-F로 그 세포 파쇄액을 처리하여 글리코실레이션을 제거하고 웨스턴 블롯팅 및 면역침전 분석을 사용하여 mEC2-CF의 반응성을 조사하였다(도 4D, E). mEC2-CF는 glycosylated 및 unglycosylated hTM4SF5-myc 단백질 모두를 검출하였고(도 4D), 그것은 anti-Myc 항체로 면역블롯팅으로 확인하였다(도 4E). mEC2-CF는 또한 hTM4SF5-myc 단백질의 두 형태 모두를 면역침전할 수 있었다(도 4F). 따라서 이러한 결과들은 mEC2-CF가 hTM4SF5 단백질에 반응성을 가지고 hTM4SF5의 138의 Asn의 당화는 항체 인지에 필요하지 않다는 것을 시사한다.

[0124] anti-hTM4SF5EC2-CF 펩타이드-특이적인 단클론 항체(mEC2-CF)에 의해 결합된 TM4SF5의 내부화

[0125] 치료제로 항체의 효율성은 그 세포로 들어가는 그들의 능력에 의존한다. 그 가능성을 결정하기 위하여, mEC2-CF를 HT-29 및 LoVo 세포주에 처리하고 Alexa 488-부착된 goat anti-mouse IgG로 배양하였다. 공초점 현미경으로 면역형광 트레이싱은 mEC2-CF가 hTM4SF5를 발현하는 HT-29 및 LoVo 세포로 성공적으로 들어왔다는 것을 나타내었다(도 5A 및 B). 이것은 mEC2-CF의 내부화가 hTM4SF5에 그것의 결합에 매개된다는 것을 시사한다. 따라서, 본 발명자들은 mEC2-CF가 효과적으로 hTM4SF5를 인지하고 그 후 hTM4SF5 단백질을 발현하는 타겟 세포로 내부화된다는 것을 시사한다.

[0127] anti-h(mEC2-TM4SF5EC2-CF 펩타이드-특이적 단클론 항체CF)의 가변 도메인의 클로닝

[0128] 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인(V_H 및 V_L)을 코딩하는 cDNA 서열을 일반적인 중쇄 및 경쇄 프라이머를 사용한 anti-hTM4SF5EC2-CF 펩타이드-특이적인 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포(2D7-1F7)로부터 클로닝하였다. DNA 시퀀싱에 의하여 확인한 서열들을 도 6에 나타내었다. 그 서열들을 protein BLAST 프로그램(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 의하여 공지된 서열과 호모로지를 분석하였다.

[0130] 인간 대장암 조직에서 TM4SF5 단백질의 검출

[0131] 대장암 조직에서 TM4SF5 단백질의 발현을 조사하기 위하여, 본 발명자들은 mEC2-CF로 면역조직 염색을 수행하였다. 본 발명자들은 대조군으로 정상 대장 조직과 1차 대장암 조직의 32 샘플을 분석하였다(조직 마이크로어레이 A303II). 정상 조직에서는 TM4SF5의 발현이 없었으나, 거의 대부분의 대장암 조직(32 샘플 중 18) TM4SF5를 발현하였다(도 7, 표 1).

표 1

[0132]

Colon cancer tissue sections (AccuMax Array) A303II	n	TM4SF5 positive (%)	Number (%) of cases expressing TM4SF5				
			>75%	74-50%	49-11%	<10%	negative
	32	56.2	5(15.6)	5(15.6)	8(25.0)	12(37.5)	2(6.3)

[0133] 표 1은 인간의 대장암 조직(n=32, AccuMax Array A303II)에서 본 발명에서 확보한 항체를 이용하여 면역조직화학 분석한 결과로 괄호 내 퍼센트는 각 중앙 타입에서 샘플 전체 수로 나눈 각 사분위(quartile)에 대한 TM4SF5-양성 샘플의 수로 계산.

발명의 효과

[0135] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 항체는 중앙특이항원 TM4SF5에 높은 친화력으로 결합하므로, TM4SF5를 발현하는 다양한 암의 진단, 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0137] 도 1은 hTM4SF5EC2-CF 펩타이드-특이적인 항체의 생산. (A) 막 내의 hTM4SF5 구조. (B) hTM4SF5 에피토프 펩타이드의 노미네이션. (C) TM4SF5 (hTM4SF5EC2-CF)의 B-세포 에피토프 펩타이드 및 Lipoplex(O) 복합체를 BALB/c 마우스에 면역화하고 혈청을 항원으로 hTM4SF5EC2-CF 펩타이드를 사용하여 ELISA로 분석.

도 2는 TM4SF5를 인지하는 anti-TM4SF5 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 클론의 HAT 배지 및 HT 배지에서 스크리닝. (A) BALB/c 마우스를 10일 간격으로 4회 DOPE:CHEMS 복합체에 동시캡슐화된 hTM4SF5EC2-CF 펩타이드 및 MB-ODN 4531(O)로 i.p.(복강에) 면역화하고, 면역화된 마우스의 지라세포를 사용한 HAT 배지에서 세포-융합 실험의 초기 스크리닝으로부터 유래한 ELISA 결과들. (B) HEK 293F-TM4SF5 세포의 단백질들을 SDS-PAGE로 분리하여 하이브리도마 클론들의 배양 상등액, anti-Myc 항체를 사용한 웨스턴 블롯으로 분석. (C, D) 도 2A 유래한 하이브리도마 클론을(2D7) 단클론 항체의 생산을 위해 선택하여 리미팅 희석 방법을 사용하여 서브클로닝을 함. (C) 사이클릭 펩타이드 hTM4SF5EC2-CF 에 대한 하이브리도마 클론 배양 상등액을 ELISA를 사용하여 분석. (D) HEK 293F-TM4SF5 세포의 단백질들을 SDS-PAGE로 분리하여 HT 배지에서 하이브리도마 클론 배양 상등액을 사용한 웨스턴 블롯으로 분석.

도 3은 anti-hTM4SF5EC2-CF 펩타이드-특이적인 단클론 항체의 정제 및 특징. (A) 복수를 2D7-1F7 클론-주사된 마우스로부터 얻어서 hTM4SF5EC2-CF 펩타이드-특이적인 단클론 항체의 생산을 ELISA로 분석하였다. (B) anti-hTM4SF5EC2-CF 펩타이드-특이적 단클론 항체(mEC2-CF)를 Protein A 컬럼 크로마토그래피로 정제하고 SDS-PAGE 및 Coomassie Blue 염색으로 동정하였다. R, 환원 조건. NR, Non-reducing condition. (C) 항체의 이소타입을 결정하기 위하여, isotype 특이적인 ELISA를 수행함. (D) hTM4SF5EC2-CF 펩타이드에 대한 항체의 결합 특이성을 결정함. (E) hTM4SF5EC2-CF 펩타이드로 항체의 결합 친화도를 ELISA를 사용하여 측정.

도 4는 anti-hTM4SF5EC2-CF 펩타이드-특이적 단클론 항체의 반응성. empty vector 또는 TM4SF5 발현 벡터를 HEK293F 세포에 트랜스펙션함. (A) 세포 파쇄액을 mEC2-CF, rabbit anti-Myc antibody 또는 anti-베타-Actin 항체로 웨스턴 블롯팅으로 분석. (B) 세포 파쇄액을 PNGase F로 처리하고 mEC2-CF 또는 rabbit anti-Myc 항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅으로 분석. (C) 세포 파쇄액을 PNGase F로 처리하고 mEC2-CF로 면역침전하고 mEC2-CF를 사용하여 웨스턴 블롯팅으로 분석.

도 5는 대장암 세포주에서 TM4SF5의 내부화. 대장암 세포주, HT-29 (A), 및 LoVo (B)를 mEC2-CF 또는 마우스 normal IgG (mIgG)으로 3시간 배양 후 Alexa 488-conjugated 2차 항체로 배양. 핵 염색을 위하여, 세포들을 Hoechst 33258로 배양하였다. 이미지들을 공초점 현미경법으로 얻었음. 스케일 바; 20 μ m.

도 6은 하이브리도마 세포 클론 2D7-1F7로부터 분리한 가변 중쇄 및 경쇄 도메인의 cDNA 서열들. (A) 중쇄 가변 도메인의 서열. (B) 경쇄 가변 도메인의 서열. 예측된 아미노산 서열을 cDNA 서열 밑에 표시함.

도 7은 대장암 조직에서 TM4SF5의 검출. 대장암 조직의 면역조직화학 분석을 anti-hTM4SF5EC2-CF 펩타이드-특이적인 단클론 항체로 수행함. 종양의 TM4SF5 발현 >75%, 74-50%, 49-11%, 및 <10%를 가지는 대장암 조직의 예.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0138] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0139] 실시예 1: 세포 배양

[0140] 인간 배아 신장 세포(HEK293F)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 인간 대장암 세포인 HT-29, LoVo, HCT-116은 한국세포주은행에서 얻었다. HEK293F 세포를 Freestyle 293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 유지하였고, HT-29, LoVo HCT-116 세포는 RPMI 1640 배지에서 관리하였다. 모든 배지들은 10% FBS, 25 mM HEPES, 100 U/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신으로 보충하였다. 모든 세포들을 95% 공기 및 5% CO₂에서 37°C의 온도로 배양하였다.

[0141] 실시예 2: TM4SF5 B 세포 에피토프 펩타이드의 합성

[0142] hTM4SF5-특이적 항체 생산을 위한 B 세포 에피토프 펩타이드를 선택하기 위하여, 본 발명자들은 그것의 에피토프 가능성, 표면 접근성 및 항원성 지수에 기반하여 hTM4SF5 단백질을 분석하였다 (<http://tools.iedb.org/bcell>). 본 발명자들은 몇 에피토프 서열을 TM4SF5의 EC2 도메인으로부터 선택하였다 (도 1A 및 B). 본 발명자들은 자동화된 펩타이드 합성기로 사이클릭 펩타이드를 포함한 각 에피토프 펩타이드를 합성하였다(Pepttron III-R24, Pepttron, Daejeon, Korea). 그 펩타이드들을 역상 HPLC (Prominence HPLC, Shimadzu Corp., Tokyo, Japan)로 to greater than 90% 이상의 순도로 정제하였다.

[0143] 실시예 3: 동물 및 면역화

[0144] 4주령의 암컷 BALB/c 마우스(H-2^b)를 Nara Biotech, Inc로부터 구입하여 그 마우스를 무특이 병원 조건 하에서 20-25°C, 32-37% 습도에서 유지하였다. 모든 동물 실험 과정은 국립수의과학검역원의 실험동물 사용관리 가이드에 따랐고, 한림대의 동물실험 관리 위원회의 승인을 받고 수행하였다(Permit Number: Hallym 2015-55, Hallym 2015-56).

[0145] 에피토프 펩타이드-CpG-DNA liposome 복합체(Lipoplex(0))를 Kim D, Kwon S, Ahn CS, Lee Y, Choi SY, Park J, Kwon HY, Kwon HJ. BMB Rep. 2011; 44:758-763에 기재된 것과 같이 제조하였고, 상기 해당 논문에 기재된 것과 같이 마우스에 리포솜에 캡슐화된 50 μ g의 CpG-DNA와 혼합된 50 μ g의 펩타이드 에피토프를 복강내 주사하였다. 모든 마우스를 10일 간격으로 3회 주사하였다.

[0147] 실시예 4: 항원-특이적 Ig enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

[0148] 펩타이드 에피토프-특이적 항체를 동정하기 위하여 마우스를 희생시켜 혈청을 얻었다. 96-웰 면역플레이트(Nalgen Nunc International)를 5 μ g/ml hTM4SF5EC2-CF 펩타이드로 코팅하고, 1% BSA를 함유하는 0.05% PBST로 두 시간 동안 블락하였다.

[0149] Park BK, Choi SH, Kim YE, Park S, Lee Y, Lee KW, Kwon HJ Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 2015; 34:101-109에 기재된 것과 같이 혈청 내 항체 생산 수준을 분석하였다. 단클론 항체의 특이성을 동정하기 위하여, 도 1B의 여러 TM4SF5 펩타이드를 96-웰 면역플레이트 상에 코팅하고 4°C에서 밤새 배양하였다. 그 플레이트를 1%의 BSA를 포함하는 PBS로 1시간 동안 블락킹하고 그 단클론 항체로 두 시간 동안 인큐베이션 한 다음 그 플레이트를 세척하고, HRP(horseradish peroxidase)-결합된 염소 항-마우스 IgG 항체(1:5000)를 처리하였다.

면역반응성은 KPL로부터 구입한 디벨로핑 키트(Gaithersburg, MD, USA)로 측정하고 Park BK, Lee SI, Lee Y, Kwon HJ. Appl Biol Chem. 2016; 59:739-746에 기재된 것과 같이 정량화하였다.

[0150] IgG 아이소타입은 HRP-conjugated anti-mouse IgG (각 아이소타입) 항체(BD Biosciences)로 동정하였다. anti-hTM4SF5EC2-CF 펩타이드-특이적인 단클론 항체의 결합 친화도(EC50 value)를 측정하기 위하여, 5 µg/웰의 hTM4SF5EC2-CF 펩타이드를 96-웰 면역플레이트에 코팅하고 1% BSA를 포함한 PBST로 처리하였다. 결합 친화도 수준을 Park BK, Lee SI, Lee Y, Kwon HJ. Appl Biol Chem. 2016; 59:739-746 에 기재된 것과 같이 측정하였다.

[0152] 실시예 5:mEC2-CF 단클론 항체의 생산

[0153] anti-hTM4SF5EC2-CF 펩타이드-특이적인 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 클론(2D7-1F7)은 표준 하이브리도마 기술(Yokoyama WM. Production of monoclonal antibodies. Curr Protoc Cytom. 2006; Appendix3, Appendix 3J;Yokoyama WM, Christensen M, Santos GD, Miller D. Production of monoclonal antibodies. Curr Protoc Immunol. 2006; Chapter 2, Unit 2.5)로 얻었다.

[0154] 요약하면, anti-hTM4SF5EC2-CF를 생산하는 마우스의 지라세포를 추출하여 마우스 myeloma 세포주, SP2/0와 하이브리다이즈하였다. 2D7-1F7 클론을 배지를 포함한 HT 및 HAT로 선택하여 복수의 생산을 위하여 pristane-primed BALB/c 마우스에 주사하였다. 복수를 모은 후, 그 anti-hTM4SF5EC2-CF 펩타이드-특이적 단클론 항체(mEC2-CF)를 protein A 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다.

[0156] 실시예 6:Western blot 및 면역침전법 분석

[0157] 단클론 항체에 의한 hTM4SF5 검출을 동정하기 위하여, HEK293F 세포를 hTM4SF5/pcDNA으로 트랜스팩션하고 파쇄액을 Wu G, Kim D, Park B.K, Park S, Ha JH, Kim TH, Gautam A, Kim JN, Lee SI, Park HB, Kim YS, Kwon HJ, Lee Y. Oncotarget. 2016; 7:79170-79186에 기재된 것과 같이 제조하였다. 세포 파쇄액을 SDS-PAGE 상에서 분리하고 Western blot 분석을 mEC2-CF 또는 마우스 anti-c-Myc tag 항체(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)로 평가하였다. 면역침전 을 분석하기 위하여 세포 파쇄액을 mEC2-CF 또는 마우스 anti-c-Myc 항체로 4 시간 동안 4°C 배양한 후 protein A 비드로 폴-다운하였다. 그 샘플들을 SDS-PAGE 상에 로딩하고 mEC2-CF 및 마우스 anti-Myc tag 항체로 검출하였다. mEC2-CF가 glycosylated hTM4SF5를 검출하는지 여부를 동정하기 위하여, lysates of hTM4SF5 과발현 세포의 파쇄액을 PNGase F (N-glycosidase F, Elpis-Biotech, Daejeon, Korea)로 1% β-mercaptoethanol 및 0.05% SDS 상에서 1시간 동안 37°C에서 배양하고 mEC2-CF로 면역침전하였다. 그 얻어진 면역복합체를 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다.

[0158] 실시예 7:공초점 이미지

[0159] 항체 internalization 활성을 모니터하기 위하여, HT-29, LoVo 및 HCT-116 세포들을 12-웰 플레이트에 플레이팅하고 마우스 normal IgG 및 mEC2-CF로 RPMI1640 배지(1% FBS 함유)에서 배양하였다. 3시간 후, 그 세포들을 4% formaldehyde로 10분간 고정하고 3% BSA 및 0.1% Triton X-100을 포함하는 PBS로 10분간 블락킹하였다. 그 세포들을 Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (ratio 1:500, Thermo Fisher scientific)으로 1시간 동안 상온에서 배양하였다. 핵 염색을 위하여, 10 µg/ml의 Hoechst 33258 (Thermo Fisher scientific)로 10분간 세포에 처리하였다. Fluoromount G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)로 마운팅한 후, 그 세포들을 한림대 연구 기관 협동 센터 내 Carl Zeiss LSM 710 (Jena, Germany)으로 스캐닝하였다.

[0161] 실시예 8: anti-TM4SF5 단클론 항체의 가변 중쇄 및 경쇄 도메인의 클로닝

[0162] anti-hTM4SF5EC2-CF 펩타이드-특이적인 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포(2D7-1F7)를 배양하고 마우스 단클론 항체 이소타이핑 키트(Dipstick format, Bibco BRL or Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 이소타이핑하였다. 총 RNAs를 하이브리도마 세포(2D7-1F7)로부터 RNeasy Mini Kit (Qiagen)로 추출하고, cDNA를 Wu G, Kim D, Park B.K, Park S, Ha JH, Kim TH, Gautam A, Kim JN, Lee SI, Park HB, Kim YS, Kwon HJ, Lee Y. Oncotarget. 2016; 7:79170-79186에 기재된 것과 같이 제조하였고, mEC2-CF의 가변 중쇄 및 경쇄 도메인(V_H 및 V_L)에 대한 서열을 클로닝하기 위하여, 그 생성된 cDNAs를 하기 프라이머 세트와 Vent polymerase (NEB)를 사용

하여 증폭하였다. 증쇄 프라이머용으로, IGG2A (5'- GGA AGA TCT CTT GAC CAG GCA TCC TAG AGT CA-3') 및 5'MH2 (5'-CTT CCG GAA TTC SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG-3')을 사용하였고, 카파 체인 프라이머들 위하여, 3'Kc (5'-GGT GCA TGC GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3') 및 5'Mk (5'-GG GAG CTC GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3')를 사용하였다. 표준 PCR 반응을 25 주기 수행하였다. PCR 산물들을 pGEM-T easy vector (Promega)으로 직접적으로 라이게이션하였다. 클로닝된 mouse Ig 삽입물을 DNA 시퀀싱으로 분석하였다.

[0163] 실시예 9: 조직 마이크로어레이 및 면역조직화학

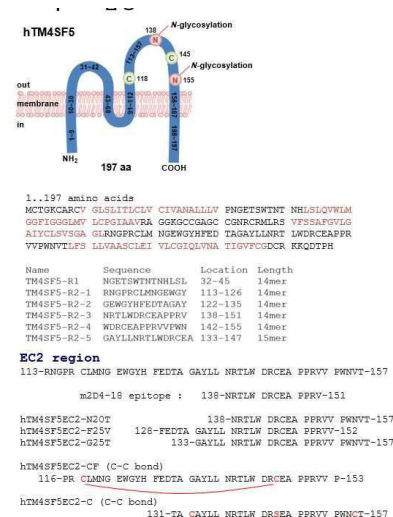
[0164] 대장암 조직 분석을 위하여, formalin-고정화된, paraffin-충진된 AccuMax 조직 어레이를 한림대 연구 윤리 위원회의 승인을 얻어서 ISUABXIS로부터 구입하였다. 대장암 조직 어레이(A303II)는 32 케이스의 대장암 조직 duplicate 및 8 정상 대장 조직으로 구성되었다. 그 슬라이드를 xylene으로 파라핀을 제거하고 에탄올로 재수화하였고, 내생적인 peroxidase 활성을 3% hydrogen peroxide으로 15분간 블락킹하였다. 항원 회수를 위하여, 모든 절편들을 citrate buffer (pH 6.0) (ScyTek Laboratories)로 15분간 가열하였다. 그 슬라이드들을 The slides were incubated overnight in PBST (PBS, Tween 0.2%) containing the anti-hTM4SF5EC2-CF 펩타이드-특이적 단클론 항체(mEC2-CF) (1 µg/ml)를 포함하는 PBST (PBS, Tween 0.2%)에서 4° C에서 밤새 배양한 후, biotinylated anti-mouse IgG 항체(Histostain Plus kit, Invitrogen)로 배양하였다. 그들을 streptavidin-부착된 peroxidase, 3',3'-diaminobenzidine (0.5 mg/ml) 및 hydrogen peroxide으로 순차적으로 반응한 후 hematoxylin으로 카운터염색하였다. 행군 후, 그 절편들을 마운팅하고, 탈수하고, 커버 슬립으로 덮었다.

[0165] 모든 이미지들을 Nikon Eclipse E-200 microscope을 사용하여 조사하였다. TM4SF5를 발현하는 세포의 퍼센트를 각 종양 타입에서 전체 세포수로 나누어진 TM4SF5-양성 세포 수로 계산하였다.

[0167] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

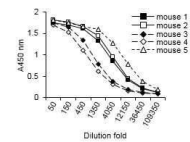
도면1a



도면1b

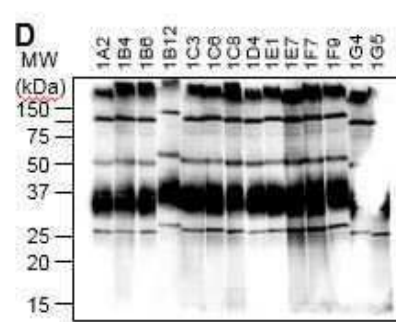
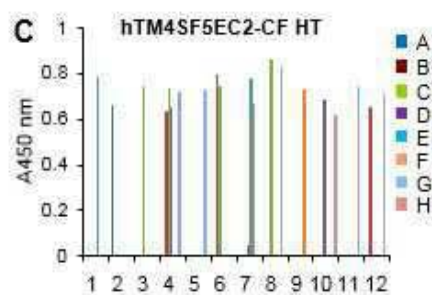
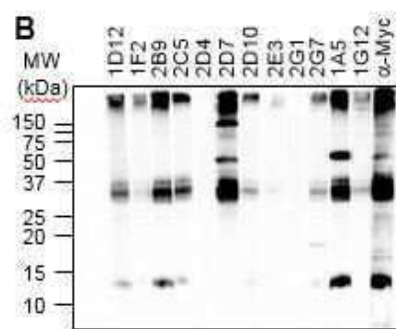
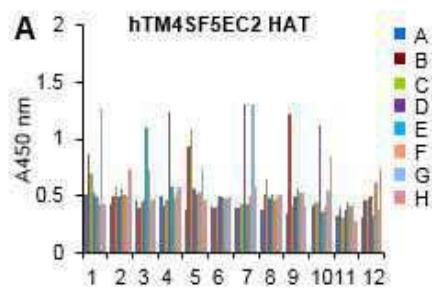
Abbreviations	Sequences
hTM4SF5R2-3	¹¹⁷ NTLNLCEAPPHV ¹⁵⁰
hTM4SF5R2-3	¹¹⁸ NRTLNDRCCEAPPRV ¹⁵¹
hTM4SF5R2-N20T	¹¹⁹ NRTLNDRCCEAPPRVFNVT ¹⁵⁷
hTM4SF5R2-F25V	¹²¹ FEDTAGAYLLNRTLNDRCCEAPPRV ¹⁵²
hTM4SF5R2-G25T	¹²² GAYLLNRTLNDRCCEAPPRVFNVT ¹⁵⁷
hTM4SF5EC2-C	¹²³ TACAYLLNRTLNDRCCEAPPRVFNVT ¹⁵⁷
hTM4SF5EC2-CF	¹²⁴ PCCLADGEGVHFEDTAGAYLLNRTLNDRCCEAPPRV ¹⁵³

도면1c

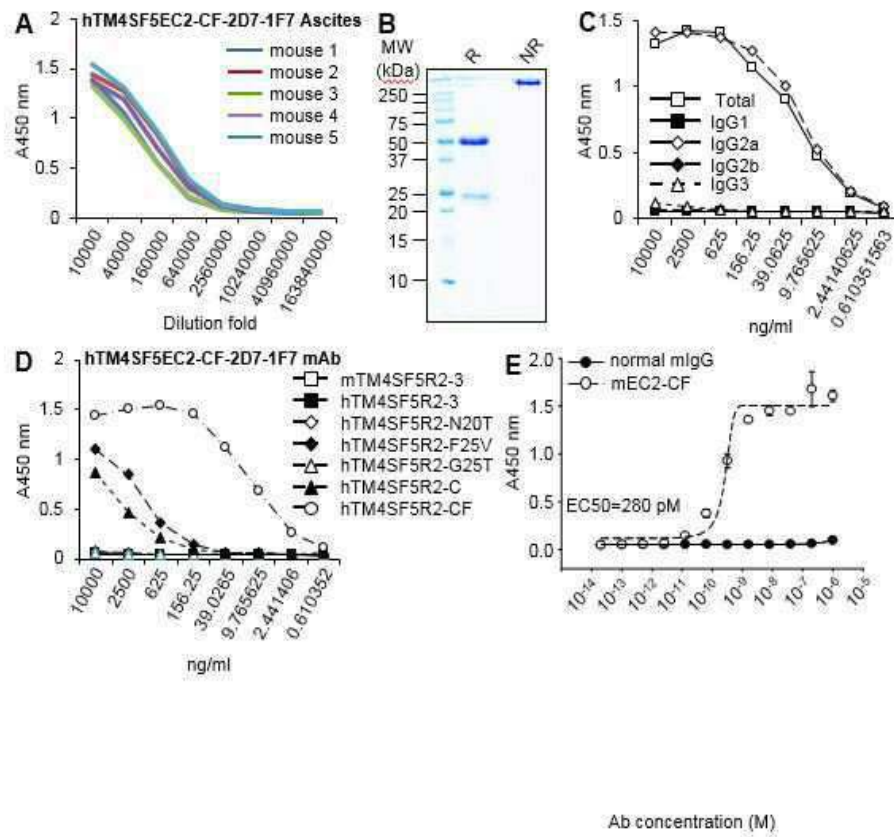


Abbreviations	Sequences
hTM4SF5R2-3	¹²⁷ NTLNLCEAPPHV ¹⁵⁰
hTM4SF5R2-3	¹²⁸ NRTLNDRCCEAPPRV ¹⁵¹
hTM4SF5R2-N20T	¹²⁹ NRTLNDRCCEAPPRVFNVT ¹⁵⁷
hTM4SF5R2-F25V	¹³⁰ FEDTAGAYLLNRTLNDRCCEAPPRV ¹⁵²
hTM4SF5R2-G25T	¹³¹ GAYLLNRTLNDRCCEAPPRVFNVT ¹⁵⁷
hTM4SF5EC2-C	¹³² TACAYLLNRTLNDRCCEAPPRVFNVT ¹⁵⁷
hTM4SF5EC2-CF	¹³³ PCCLADGEGVHFEDTAGAYLLNRTLNDRCCEAPPRV ¹⁵³

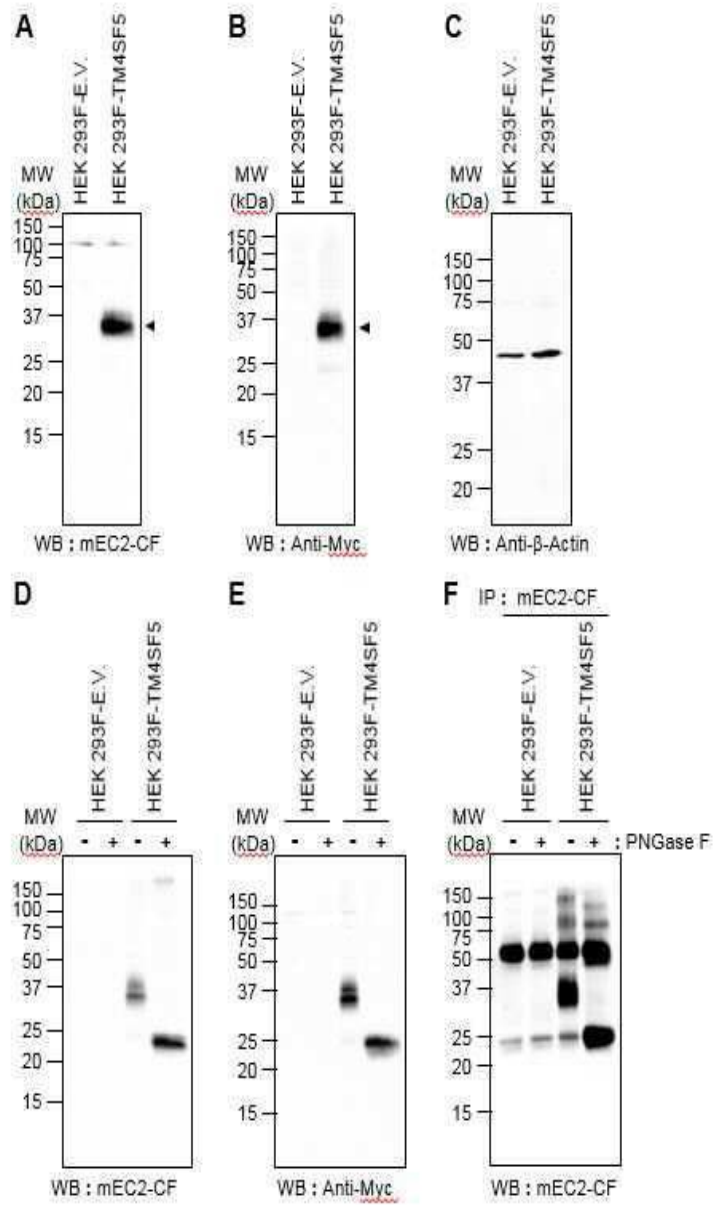
도면2



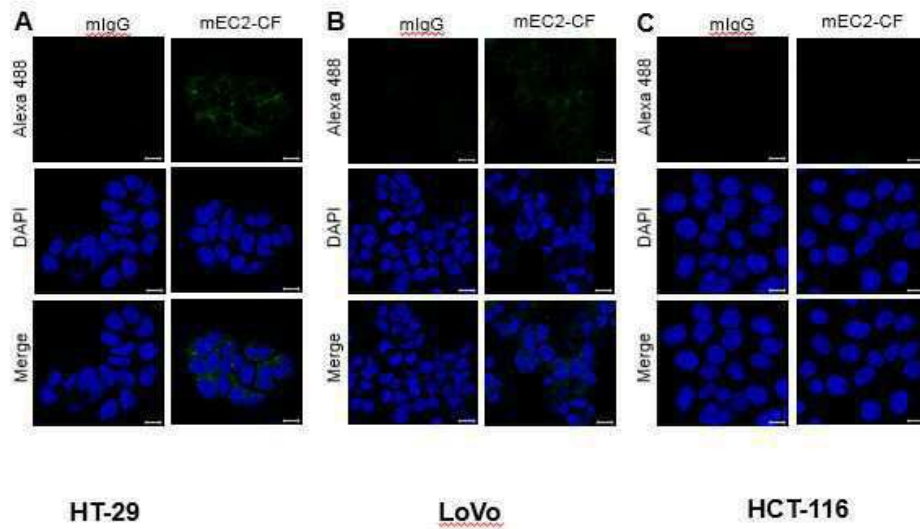
도면3



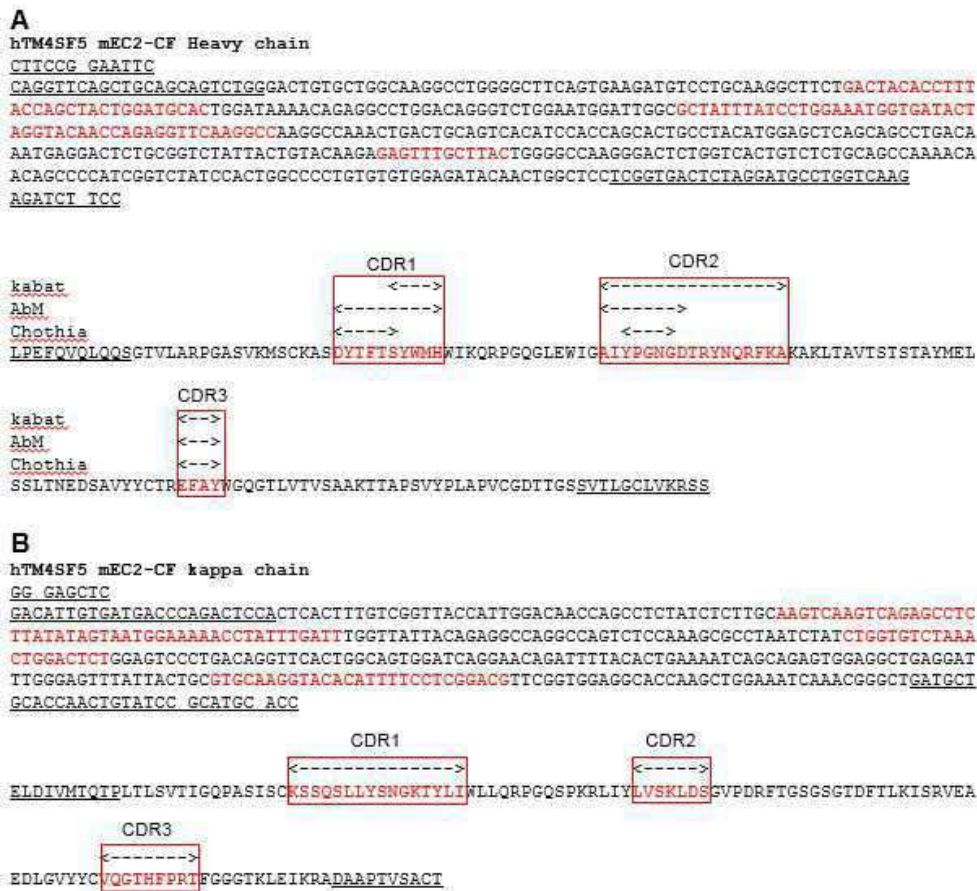
도면4



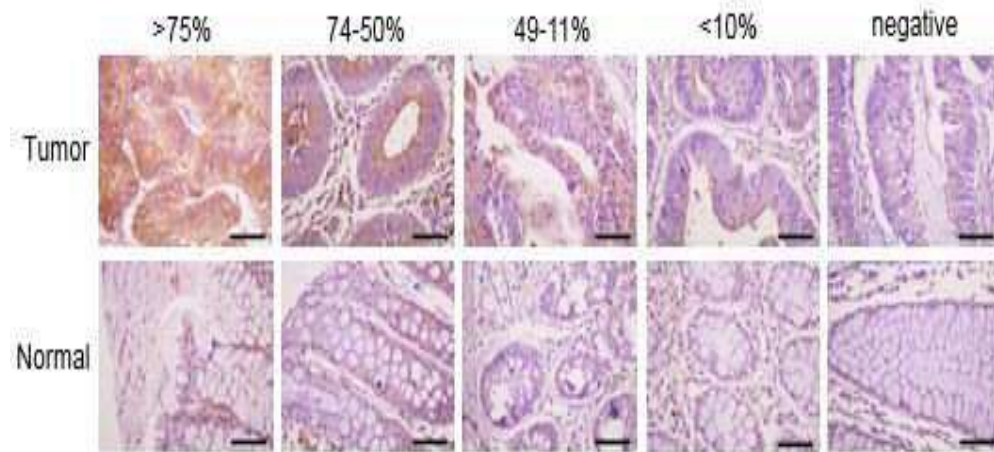
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION HALLYM UNIVERSITY

<120> An antibody against the cyclic peptide and a compositions
comprising the same

<130> P17-0187HS

<160> 11

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 38

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Pro Arg Cys Leu Met Asn Gly Glu Trp Gly Tyr His Phe Glu Asp Thr

1 5 10 15

Ala Gly Ala Tyr Leu Leu Asn Arg Thr Leu Trp Asp Arg Cys Glu Ala

20 25 30

Pro Pro Arg Val Val Pro

35

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH1

<400> 2

Asp Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His

1 5 10

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH2

<400> 3

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

1 5 10 15

Ala

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH3

<400> 4

Glu Phe Ala Tyr

1

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL1

<400> 5

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Ile

1 5 10 15

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL2

<400> 6

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL3

<400> 7

Val Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 8

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain

<400> 8

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

1 5 10 15

Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr

20 25 30

Phe Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly

35 40 45

Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Arg Tyr

50 55 60

Asn Gln Arg Phe Lys Ala Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr

65 70 75 80

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala

85 90 95

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

100 105 110

Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu

115 120 125

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

130 135 140

Leu Val Lys Arg Ser Ser

145 150

<210> 9

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Kappa chain

<400> 9

Glu Leu Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr

1 5 10 15

Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu

65 70 75 80

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val

85 90 95

Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu

100 105 110

Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ala Cys Thr

115 120 125

<210> 10

<211> 450

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain

<400> 10

cttccggaat tccaggttca gctgcagcag tctgggactg tgctggcaag gcctggggct	60
tcagtgaaga tgtcctgcaa ggcttctgac tacaccttta ccagctactg gatgcactgg	120
ataaaacaga ggcttgaca gggctctggaa tggattggcg ctatttatcc tggaaatggt	180
gatactaggt acaaccagag gttcaaggcc aaggccaaac tgactgcagt cacatccacc	240
agcactgcct acatggagct cagcagcctg acaaatgagg actctgcggt ctattactgt	300
acaagagagt ttgcttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc agccaaaaca	360
acagcccat cggctctatcc actggcccct gtgtgtggag atacaactgg ctctctcggtg	420
actctaggat gcctgggtcaa gagatcttcc	450

<210> 11

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Kappa chain

<400> 11

gagctcgaca ttgtgatgac ccagactcca ctcactttgt cggttaccat tggacaacca	60
gcctctatct cttgcaagtc aagtcagagc ctcttatata gtaatggaaa aacctatitg	120
atttggttat tacagaggcc aggccagtct ccaaagcgcc taatctatct ggtgtctaaa	180
ctggactctg gagtccctga caggttcact ggcagtggat caggaacaga ttttactg	240
aaaatcagca gattggaggc tgaggatttg ggagtttatt actgcgtgca aggtacacat	300
tttcctcgga cgttcgggtg aggcaccaag ctggaaatca aacgggctga tgctgcacca	360
actgtatccg catgcacc	378