

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0102114
(43) 공개일자 2022년07월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-0001356
 (22) 출원일자 2022년01월05일
 심사청구일자 2022년01월05일
- (30) 우선권주장
 1020210004196 2021년01월12일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
 에스지메디칼 주식회사
 서울특별시 송파구 오금로13길 3-11 (방이동, 한
 길빌딩2층,3층)
- 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
 동5가)
- 한국원자력연구원
 대전광역시 유성구 대덕대로989번길 111(덕진동)
- (72) 발명자
 이지철
 경기도 광명시 광덕산로 26, 105동 2202호(
 하안동, 광명 두산위브 트레지움)
- 박혜인
 서울특별시 강동구 구천면로 192, 1313호(천호역
 한강푸르지오시)
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 특허법인충현

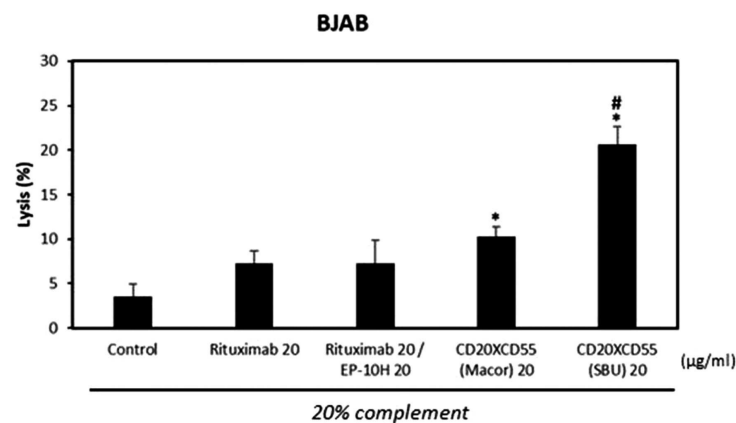
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 CD55에 대한 신규 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 CD55에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 및 이를 포함하는 암의 예방 치료 및/또는 진단용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 항체는 보체 면역기전을 억제하여 종양의 증식을 촉진하는 CD55 단백질에 대해 높은 결합력 및 억제력을 보임으로써 CD55로 매개되는 다양한 질환의 효율적인 치료 조성물로 이용될 수 있다. 또한 본 발명의 항체는 CD55의 과발현으로 인해 CDC(complement dependent cytotoxicity)를 작용기전으로 하는 치료제에 대한 내성이 유도된 다양한 질환에서 약물의 내성을 근본적으로 제거하고 치료 반응성을 현저히 개선시키는 효율적인 치료 보조제로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도11b

*Significantly different in comparison with the Control ($P < 0.05$).#Significantly different in comparison with the Rituximab ($P < 0.05$).

(52) CPC특허분류

C07K 16/2887 (2013.01)
G01N 33/574 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)

(72) 발명자

민성원

서울특별시 성동구 왕십리로 410, 106동 409호(하왕십리동, 센트라스)

권형선

서울특별시 중랑구 면목로34길 28, 401호(면목동, 트라네12차)

정상택

서울특별시 강남구 선릉로69길 20, 112동 6층 702호(역삼동, 역삼 e-편한세상)

임재청

세종특별자치시 보람동로 13, 607동 701호(보람동, 호러울마을6단지)

도소희

서울특별시 강남구 개포로110길 50, 111동 705호(일원동, 래미안 개포 루체하임)

조은하

세종특별자치시 마음안1로 139, 1809동 204호(고운동, 가락마을18단지)

이소영

대전광역시 유성구 은구비남로 34, 807동 2401호(노은동, 열매마을아파트 8단지 새미래)

정성희

충청남도 공주시 반포면 하신소1길 48

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465034670
과제번호	HN21C0103
부처명	다부처
과제관리(전문)기관명	(재단)국가신약개발재단
연구사업명	국가신약개발사업(R&D)(과기정통부, 복지부, 산업부)
연구과제명	혈중 반감기 및 치료용 작용기작 극대화 Fc 변이체가 도입된 암 치료용 유효 및 선택적 비대칭 Anti-CD20xCD55 이중항체 도출
기여율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2021.07.01 ~ 2024.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

하기 일반식 1로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 HCDR1 영역; 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 가지는 HCDR2 영역; 및 하기 일반식 2로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는, CD55에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

일반식 1

D-R-G-M- X_1 ;

일반식 2

N-A- X_2 -A-G-G-W-H-A-A-Y-I-D-A,

상기 일반식 1에서 X_1 은 Ala 또는 Val이며, 상기 일반식 2에서 X_2 는 Val, Ala, Ile, Leu, Phe 및 Met로 구성된 군으로부터 선택된다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 X_1 은 Ala인 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 X_2 는 Val인 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 가지는 LCDR1 영역; 하기 일반식 3으로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 LCDR2 영역; 및 서열목록 제3서열의 아미노산 서열을 가지는 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변영역을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

일반식 3

W-N- X_3 -K-R-P-S,

상기 일반식 3에서 X_3 는 Asn 또는 Asp이다.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 X_3 는 Asp인 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

하기의 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역을 포함하는, CD55에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단

편:

a) 서열목록 제4서열의 경쇄 가변영역; 또는 상기 서열목록 제4서열의 경쇄 가변영역에서 32번째 아미노산 서열인 Y(Tyr)가 F(Phe)로 치환 및 48번째 아미노산 서열인 D(Asp)가 N(Asn)으로 치환으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 치환을 포함하는 경쇄 가변영역, 및

b) 서열목록 제5서열의 중쇄 가변영역; 또는 상기 서열목록 제5서열의 중쇄 가변영역에서 5번째 아미노산 서열인 V(Val)가 A(Ala)로 치환, 23번째 아미노산 서열인 A(Ala)가 V(Val)로 치환, 25번째 아미노산 서열인 S(Ser)가 R(Arg)로 치환, 35번째 아미노산 서열인 A(Ala)가 V(Val)로 치환, 40번째 아미노산 서열인 A(Ala)가 S(Ser)로 치환, 68번째 아미노산 서열인 A(Ala)가 T(Thr)로 치환, 85번째 아미노산 서열인 S(Ser)가 N(Asn)로 치환 및 101번째 아미노산 서열인 G(Gly)가 V(Val), L(Leu), I(Ile), F(Phe), M(Met) 또는 A(Ala)로 치환으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 치환을 포함하는 중쇄 가변영역.

청구항 7

제 1 항 또는 제 6 항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 scFv, Fab 단편, F(ab') 단편, F(ab')₂ 단편 또는 Fv 단편인 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산분자.

청구항 9

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 조성물은 항-CD20 항체 및 티로신 키나아제 억제제로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 약리성분을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 항-CD20 항체는 리투시맙(Rituximab)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제 10 항에 있어서, 상기 티로신 키나아제 억제제는 이마티닙(Imatinib) 및 게피티닙(gefitinib)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 억제제인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제 9 항에 있어서, 상기 암은 CD55 양성인 암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 진단용

조성물.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 암은 CD55 양성인 암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

제 1 항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 CD55에 특이적으로 결합하는 항체의 항원 결합 단편 및 CD20에 특이적으로 결합하는 항체의 항원 결합 단편을 포함하는 이중특이적 항체 또는 이의 기능적 단편.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 CD20에 특이적으로 결합하는 항체는 리투시맵(Rituximab)인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체 또는 이의 기능적 단편.

청구항 18

제 16 항에 있어서 상기 CD55에 특이적으로 결합하는 항체의 항원 결합 단편은 scFv를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체 또는 이의 기능적 단편.

청구항 19

제 16 항에 있어서 상기 CD55에 특이적으로 결합하는 항체의 항원 결합 단편은 VL-링커-VH-CH2-CH3 형태인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체 또는 이의 기능적 단편.

청구항 20

제 16 항에 있어서 상기 CD20에 특이적으로 결합하는 항체의 항원 결합 단편은 Fab를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체 또는 이의 기능적 단편.

청구항 21

제 16 항에 있어서 상기 CD20에 특이적으로 결합하는 항체의 항원 결합 단편은 VL-CK-링커-VH-CH1-CH2-CH3 형태인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체 또는 이의 기능적 단편.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 CD55를 특이적으로 인식하는 신규 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 이를 이용한 암의 예방, 치료 및/또는 진단용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

전세계 항암제 시장은 지난 10년 간 연평균 10 - 13%의 성장률을 보여 왔으며, 2022년에는 총 2,000억 달러에

달할 것으로 예상된다. 2020년 현재 전세계 남성은 5명 중 1명, 여성은 6명 중 1명이 평생 1회 이상의 암 발병을 경험하고 있으며, 남성 8명 중 1명과 여성 11명 중 1명이 암으로 사망하고 있을 만큼 암의 유병률과 사망률은 지속적으로 증가하고 있다.

[0004] 전 세계 항암제 시장은 1세대 화학요법을 시작으로 2세대 표적 항암제와 3세대 면역 항암제까지 패러다임 전환이 이루어지고 있다. 초창기 단순한 암의 축소·억제를 목적으로 하던 치료 방법에서 벗어나 정상적으로 빠르게 분열하는 세포에 대한 손상이 가해지지 않고 암세포만을 선택적으로 공격하는 표적 항암 치료 기술이 활발하게 연구되고 있으며, 이러한 표적 항암치료 기술의 개발은 암세포를 선택적으로 표적화할 수 있도록 하는, 암세포에서 특이적으로 발현되는 수용체의 선별과 수용체와 결합하는 표적화 화합물의 개발의 두 단계로 이루어진다.

[0005] 한편, CD55(Decay-accelerating factor, DAF)는 보체 면역기전을 억제하는 수용체로서 대장암, 폐암, 위암, 유방암, 난소암, 백혈병, 두경부암 등의 다양한 고형암에서 고발현되어 체내의 보체 면역체계가 암세포를 사멸시키는 것을 억제함으로써 암세포의 증식을 촉진한다. 따라서 CD55는 표적 항암치료의 타겟 분자로서 활발하게 연구되어오고 있다.

[0006] 특히 CD55가 고발현되는 고형암에서는 보체 의존성 세포독성(complement dependent cytotoxicity, CDC)을 작용 기전으로 하는 다양한 항암제에 대해 낮은 치료 반응성을 보이기 때문에, CD55에 보다 높은 친화도와 특이성으로 결합하여 이의 활성을 효율적으로 억제할 수 있는 우수한 항체 치료제의 개발이 요구되고 있다.

[0008] 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.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 등록 제10-1800774호
(특허문헌 0002)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명자들은 보체 면역기전을 억제하는 수용체인 CD55 단백질을 특이적으로 인식하고, 이의 활성을 특이적으로 억제함으로써 CD55에 의해 저해된 면역기전을 효율적으로 복구할 수 있는 우수한 CD55 억제제를 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 가변영역 내 핵심 항원인식부위의 일부 아미노산을 치환한 항체를 이용할 경우 현저히 증가된 CD55 결합력 및 억제력으로 인해 암세포 등에 대한 보체매개 세포용해(complement-mediated cell lysis) 활성이 유의하게 회복됨을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 CD55에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료 및/또는 진단용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 CD55에 특이적으로 결합하는 항체의 항원 결합 단편 및 CD20에 특이적으로 결합하는 항체의 항원 결합 단편을 포함하는 이중특이적 항체를 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 일반식 1로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 HCDR1 영역; 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 가지는 HCDR2 영역; 및 하기 일반식 2로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는, CD55에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다:
- [0018] 일반식 1
- [0019] D-R-G-M-X₁;
- [0020] 일반식 2
- [0021] N-A-X₂-A-G-G-W-H-A-A-Y-I-D-A,
- [0022] 상기 일반식 1에서 X₁은 Ala 또는 Val이며, 상기 일반식 2에서 X₂는 Val, Ala, Ile, Leu, Phe 및 Met로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0023] 본 발명자들은 보체 면역기전을 억제하는 수용체인 CD55 단백질을 특이적으로 인식하고, 이의 활성을 특이적으로 억제함으로써 CD55에 의해 저해된 면역기전을 효율적으로 복구할 수 있는 우수한 CD55 억제제를 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 가변영역 내 핵심 항원인식부위의 일부 아미노산을 치환한 항체를 이용할 경우 현저히 증가된 CD55 결합력 및 억제력으로 인해 암세포 등에 대한 보체매개 세포용해(complement-mediated cell lysis) 활성이 유의하게 회복됨을 발견하였다.
- [0025] 본 명세서에서 용어 "항체(antibody)"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 의미하며 다클론항체 및 단클론항체를 모두 포함한다.
- [0026] 항체는 완전한 전장(full-length) 항체 형태뿐만 아니라 항체 분자의 항원 결합 단편(항체 단편)을 포함한다. 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조로서 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 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.
- [0027] 본 명세서에서 용어 "항체의 항원 결합 단편"은 전체 항체 분자 내에서 항원을 특이적으로 인식하고 항원-항체 결합 기능을 보유하는 단편을 의미하며, 단일-도메인 항체(sdAb), 단일쇄 항체(scFv), Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 단편의 예로는, VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편(Fab 단편); 힌지 영역에서 이황화물 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편(F(ab')₂ 단편); VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; 항체의 하나의 암(arm)의 VL 및 VH 도메인, 및 이황화물-연결된 Fv(sdFv)로 구성된 Fv 단편; VH 도메인으로 구성된 dAb 단편; 및 분리된 상보성 결정 영역(CDR) 또는 링커에 의해 선택적으로 이어질 수 있는 둘 이상의 분리된 CDR의 조합을 포함한다. 또한, scFv는 VL과 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자를 형성한 단일 단백질 사슬을 이루도록 링커에 의해 이어질 수 있다. 이러한 단일쇄 항체도 항체의 단편에 포함된다. 또한, 상기 항체 또는 항체의 단편은 2개의 중쇄 분자와 2개의 경쇄 분자를 포함하는 테트라머 항체; 항체 경쇄 모노머; 항체 중쇄 모노머; 항체 경쇄 다이머, 항체 중쇄 다이머; 인트라바디; 1가 항체; 낙타 항체; 및 단일-도메인 항체(sdAb)를 포함한다.
- [0028] Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 PCT 국제 공개특허출원 WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 및 WO 88/09344에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 단쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수도 있다.

- [0029] 본 명세서에서 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 명세서 용어 "경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 V_L 및 불변영역 도메인 C_L 을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.
- [0030] 본 명세서에서, 용어 "CDR(complementarity determining region)"은 면역글로블린의 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(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3) 및 경쇄(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)에는 각각 3개의 CDR이 포함되어 있으며, 이들 CDR은 항체가 항원 또는 에피토프에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 항체 또는 항체 단편의 범위에는 CDR 영역에 보존적 아미노산 치환을 갖는 변이체가 포함되며, CD55를 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서 첨부한 서열목록에 기재된 아미노산 서열에 대한 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 외에 반감기, 생체 적합성 기타 생물학적 특성을 보다 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 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, 일 특정예에 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. Bio.* (1970) 48:443; Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* (1988) 24: 307-31; Higgins and Sharp, *Gene* (1988) 73:237-44; Higgins and Sharp, *CABIOS* (1989) 5:151-3; Corpet *et al. Nuc. Acids Res.* (1988) 16:10881-90; Huang *et al. Comp. Appl. BioSci.* (1992) 8:155-65 및 Pearson *et al. Meth. Mol. Biol.* (1994) 24:307-31에 개시되어 있다.
- [0032] 본 명세서에서 용어 "친화도(affinity)"는 항체 또는 이의 항원결합 단편과 항원 간의 결합 강도를 의미하며, 이에 "결합력"으로도 표현될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 일반식 1의 X_1 은 Ala이다.
- [0034] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 일반식 2의 X_2 는 Val이다.
- [0035] 보다 구체적으로는, 본 발명의 중쇄 가변영역은 다음의 HFR1 내지 HFR4 로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프레임워크 영역(FR)을 포함한다:
- [0036] HFR1: EVQLY₁ESGGGLVQPGGSLRLSCY₂AY₃GFTFS (Y_1 은 Val 또는 Ala이고, Y_2 는 Val 또는 Ala이며, Y_3 는 Ser 또는 Arg이다)
- [0037] HFR2: WVRQY₄PGKGLEWVS (Y_4 는 Ala 또는 Ser이다)
- [0038] HFR3: RY₅TISRDNKNTLYLQMN₆Y₆LRAEDTAVYYCAK (Y_5 는 Ala 또는 Thr이고 Y_6 는 Ser 또는 Asn이다)
- [0039] HFR4: WGQGTITVTVSS
- [0040] 보다 더 구체적으로는, 본 발명의 중쇄 가변영역은 서열목록 19 내지 22로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가진다.
- [0041] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 가지는 LCDR1 영역; 하기 일반식 3으로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 LCDR2 영역; 및 서열목록 제3서열의 아미노산 서열을 가지는 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변영역을 추가적으로 포함한다:
- [0042] **일반식 3**
- [0043] W-N-X₃-K-R-P-S,

- [0044] 상기 일반식 3에서 X_3 는 Asn 또는 Asp이다.
- [0045] 보다 구체적으로는, 상기 X_3 는 Asp이다.
- [0046] 보다 구체적으로는, 본 발명의 경쇄 가변영역은 다음의 LFR1 내지 LFR4 로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프레임워크 영역(FR)을 포함한다:
- [0047] LFR1: SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
- [0048] LFR2: WY₇QQKPGQSPVTVIY (Y_7 은 Phe 또는 Tyr이다)(F 또는 Y)
- [0049] HFR3: GIPERFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYC
- [0050] HFR4: FGGGTKLTVL
- [0051] 보다 더 구체적으로는, 본 발명의 경쇄 가변영역은 서열목록 4 또는 18의 아미노산 서열을 가진다.
- [0052] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역을 포함하는, CD55에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다:
- [0053] a) 서열목록 제4서열의 경쇄 가변영역; 또는 상기 서열목록 제4서열의 경쇄 가변영역에서 32번째 아미노산 서열인 Y(Tyr)가 F(Phe)로 치환 및 48번째 아미노산 서열인 D(Asp)가 N(Asn)으로 치환으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 치환을 포함하는 경쇄 가변영역, 및
- [0054] b) 서열목록 제5서열의 중쇄 가변영역; 또는 상기 서열목록 제5서열의 중쇄 가변영역에서 5번째 아미노산 서열인 V(Val)가 A(Ala)로 치환, 23번째 아미노산 서열인 A(Ala)가 V(Val)로 치환, 25번째 아미노산 서열인 S(Ser)가 R(Arg)로 치환, 35번째 아미노산 서열인 A(Ala)가 V(Val)로 치환, 40번째 아미노산 서열인 A(Ala)가 S(Ser)로 치환, 68번째 아미노산 서열인 A(Ala)가 T(Thr)로 치환, 85번째 아미노산 서열인 S(Ser)가 N(Asn)로 치환 및 101번째 아미노산 서열인 G(Gly)가 V(Val), L(Leu), I(Ile), F(Phe), M(Met) 또는 A(Ala)로 치환으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 치환을 포함하는 중쇄 가변영역.
- [0056] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0057] 본 명세서에서 용어 "핵산 분자"는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 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.
- [0058] 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 얼라인 된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 일 특정예에서는 최소 90%의 상동성, 다른 특정예에서는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다.
- [0060] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0062] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 억제학적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

- [0064] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 치료용도(for use in therapy)를 제공한다.
- [0066] 본 명세서에서 용어 "예방"은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [0067] 본 명세서에서 용어 "치료"는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하면 CD55 수용체의 활성을 억제함으로써 보체 면역기전을 회복하고 암세포의 증식을 억제하여 암의 진행을 저해하거나, 이로 인한 증상을 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 암 치료용 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분, 예를 들어 CDC(complement dependent cytotoxicity)를 작용기전으로 하는 치료제와 함께 투여되어 이의 치료 반응성을 향상시키는 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 "치료" 또는 "치료제"는 "치료 보조" 또는 "치료 보조제"의 의미를 포함한다.
- [0068] 본 명세서에서 용어 "투여" 또는 "투여하다"는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [0069] 본 발명에서 용어 "치료적 유효량"은 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 조성물 내의 약리성분이 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 "예방적 유효량"을 포함하는 의미이다.
- [0070] 본 명세서에서 용어 "대상체"는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.
- [0071] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 조성물은 항-CD20 항체 및 티로신 키나아제 억제제로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 약리성분을 추가적으로 포함한다.
- [0072] 보다 구체적으로는, 상기 항-CD20 항체는 리투시맵(Rituximab)이다.
- [0073] 보다 구체적으로는, 상기 티로신 키나아제 억제제는 이마티닙(Imatinib) 및 게피티닙(gefitinib)으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0075] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 암은 CD55 양성인 암이다.
- [0076] 본 명세서에서 용어 "CD55 양성 암"은 CD55 수용체를 발현하는 암세포로 구성된 암종을 의미하며, 구체적으로는 대상체 내에서의 보체 면역활성이 측정 가능할 정도로 저해될 만큼 CD55가 발현되는 암을 의미한다. 이에, 용어 "CD55 양성 암"은 "CD55 과발현 암"을 포함하는 의미이다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 CD55의 과발현으로 인해 치료제에 대한 내성이 유도된 다양한 암종에서 약물의 내성을 제거하고 치료 민감성을 증진시킬 수 있다.
- [0077] CD55 양성 암은 예를 들어 흑색종, 림프종, 폐암, 갑상선암, 유방암, 대장암, 전립선암, 두경부암, 위암, 간장암, 방광암, 신장암, 자궁경부암, 췌장암, 백혈병, 골수암, 난소암, 자궁경부암, 육종, 담관암 및 자궁내막세포암을 포함하나, 이에 제한되지 않고 CD55를 발현하는 모든 고형암 및 혈액암을 포함한다.
- [0079] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 암의 진단용 조성물을 제공한다.
- [0080] 본 발명에서 사용되는 항체 또는 그의 항원결합 단편과 대상이 되는 암에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.
- [0081] 본 명세서에서 용어 "진단"은 특정 질환에 대한 개체의 감수성(susceptibility)의 판정, 특정 질환을 현재 개체가 가지고 있는 지 여부의 판정, 및 특정 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)의 판정을 포함한다.
- [0082] CD55 수용체는 정상 조직에 비해 암 조직에서 높은 발현 수준을 보이는 전형적인 암 진단 마커로서, CD55에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체는 생물학적 시료 내 종양의 존재를 정확하게 판정할 수 있다. 아울러, 본

발명의 항체는 다양한 면역 어세이 방법을 통해 종양 내 CD55의 발현 수준을 정확히 측정하여 해당 종양의 CDC 약물에 대한 치료 민감성을 예측함으로써, 암의 성격에 따른 맞춤형 치료 전략을 조기에 수립하는 데에 유용하게 이용될 수 있다.

- [0083] 본 명세서에서 용어 "진단용 조성물"은 대상체의 암 발병 여부를 판단하거나 CDC 약물에 대한 치료 민감성을 예측하기 위해 CD55 단백질의 발현량 측정수단으로서 본 발명의 항체를 포함하는 통합적인 혼합물(mixture) 또는 장비(device)를 의미하며, 이에 "진단용 키트"로 표현될 수도 있다.
- [0084] 본 명세서에서 용어 "생물학적 시료"란 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 림프액, 척수액, 조직 부검 시료(뇌, 피부, 림프절, 척수 등), 세포 배양 상등액, 과열된 진핵세포 및 세균 발현계를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0085] 생물학적 시료에서 CD55 단백질의 검출은, 비색법(colormetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 또는 섬광계수법(scintillation counting method)을 이용한 항원-항체 복합체 형성의 검출을 통하여 수행할 수 있다. 본 명세서에서 용어 "검출"은 항원-항체 복합체의 형성 여부를 판정하기 위한 일련의 과정을 의미한다. 검출은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자 또는 방사성 동위원소를 포함하는 다양한 표지체를 사용하여 실시할 수 있다.
- [0086] 검출 표지체로서 사용되는 효소는 예를 들어 아세틸콜린에스테라제, 알칼라인 포스파타제, β -D-갈락토시다제, 호스래디쉬 퍼옥시다제 및 β -라타마제를 포함하며, 형광물로는 플루오레세인, Eu^{3+} , Eu^{3+} 킬레이트 또는 크립테이트 등을 포함하고, 리간드로는 바이오틴 유도체 등을 포함하며, 발광물로는 아크리디늄 에스테르 및 이소루미놀 유도체 등을 포함하고, 미소입자로는 콜로이드 금 및 착색된 라텍스 등을 포함하며, 방사성 동위원소로는 ^{57}Co , ^3H , ^{125}I 및 ^{125}I -볼톤(Bonton) 헌터(Hunter) 시약 등을 포함할 수 있다.
- [0087] 본 발명의 일구현예에 따르면, 항원-항체 복합체를 효소면역흡착법(ELISA)을 이용하여 검출할 수 있다. 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.
- [0089] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 본 발명의 항원 결합 단편 및 CD20에 특이적으로 결합하는 항체의 항원 결합 단편을 포함하는 이중특이적 항체 또는 이의 기능적 단편을 제공한다.
- [0090] 본 명세서에서 용어 "이중특이적 항체"는 상이한 아미노산 서열에 의해 정의되는 상이한 2개의 항원-결합 영역을 포함하는 항체를 의미한다. 전형적으로, 이중특이적 항체에 포함된 2개의 항원 결합 영역은 각각 상이한 항원 또는 에피토프에 대해 특이적이다.
- [0091] 본 발명의 이중특이적 항체는 전술한 본 발명의 CD55 특이적인 항원 결합 단편과 CD20를 특이적으로 인식하는 또 다른 항원 결합 단편이 결합된 하나의 항체(CD20 x CD55) 분자로서, 본 발명에 따르면, 각각의 항-CD55 항체(예를 들어 후술하는 실시예의 EP-10H)와 항-CD20 항체(예를 들어 리툽시맵)를 병용 투여한 경우에 비하여 리툽시맵 저항성 종양에 대해 더 우수한 치료 효과를 보인다.
- [0092] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 이중특이적 항체에 포함된 항-CD55 항체의 항원 결합 단편은 scFv 형태이다.
- [0093] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 CD55에 특이적으로 결합하는 항체의 항원 결합 단편은 scFv를 포함하는 것이다.
- [0094] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 CD55에 특이적으로 결합하는 항체의 항원 결합 단편은 VL-링커-VH-CH2-CH3 형태인 것이다.
- [0095] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 이중특이적 항체에 포함된 항-CD20 항체의 항원 결합 단편은 Fab 형태이다.
- [0096] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 CD20에 특이적으로 결합하는 항체의 항원 결합 단편은 Fab를 포함하는 것이다.
- [0097] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 CD20에 특이적으로 결합하는 항체의 항원 결합 단편은 VL-CK-링커-

VH-CH1-CH2-CH3 형태인 것이다.

- [0098] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 CD20에 특이적으로 결합하는 항체는 리툭시맙(Rituximab)이다.
- [0099] 본 발명의 이중특이적 항체는 안정하게 회합할 수 있는 제 1 및 제 2 서브유닛으로 이루어진 Fc 영역을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 용어 "Fc 영역"은 전장 항체의 불변 영역 중 적어도 일부분을 함유하는 항체 중쇄의 C-말단 영역을 의미하며, 이는 야생형 서열 Fc 영역과 변이체 Fc 영역을 모두 포함한다. IgG의 Fc 영역은 IgG CH2 및 IgG CH3 도메인을 포함한다. 본 발명의 이중특이적 항체의 CH3 영역은 야생형 또는 변이체 CH3 도메인 (예를 들어, 그의 한 쇠에 도입된 "돌출부"(" knob") 및 그의 다른 쇠에 상응하는 도입된 "공동(cavity)"(" hole")을 갖는 CH3 도메인일 수 있다.
- [0100] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 이중특이적 항체는 CD20 X CD55의 중쇄끼리의 원치 않는 쌍의 결합을 막기 위해 knob-into-hole)방법을 사용할 수 있다. "knob-into-hole" 방법[US 5,731,168; US7,695,936; Ridgway et al., *Prot Eng* 9, 617-621 (1996); Carter, *J Immunol Meth* 248, 7-15 (2001)]은 이중이량체 생성을 촉진하고 동중이량체 생성을 저해하기 위해 돌출부가 공동에 위치할 수 있도록, 제 1 폴리펩타이드의 계면에 돌출부(" knob") 및 제 2 폴리펩타이드의 계면에 상응하는 공동(" hole")을 도입한다. 돌출부는 제 1 폴리펩타이드의 계면으로부터 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄(예, 티로신 또는 트립토판)로 치환시킴으로써 구성된다. 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 측쇄(예, 알라닌 또는 트레오닌)로 치환시킴으로써, 돌출부와 동일하거나 유사한 크기의 상호보완적 공동이 제 2 폴리펩타이드의 계면에 생성된다.
- [0101] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 이중특이적 항체는 VL-linker-VH-CH2-CH3 형태의 항-CD55 항체의 항원 결합 단편 및 VL-CK-linker-VH-CH1-CH2-CH3 형태의 항-CD20 항체의 항원 결합 단편이 결합된 형태일 수 있다.
- [0102] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 이중특이적 항체는 CD20 X CD55의 중쇄끼리의 원치 않는 쌍의 결합을 막기 위해 10 내지 100개, 보다 구체적으로는 15 내지 60개의 Gly과 Ser으로 구성된 링커를 사용할 수 있다.
- [0103] 구체적으로는, 본 발명의 이중특이적 항체는 CD55-scFv-knob(VL-linker20-VH-CH2-CH3)과 CD20-Fab-hole(VL-CK-linker40-VH-CH1-CH2-CH3)이 결합된 형태일 수 있다.
- [0104] linker20은 상기 Gly 또는 Ser을 20개 포함하는 것으로, 이의 예로는 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0105] linker40은 상기 Gly 또는 Ser을 20개 포함하는 것으로, 이의 예로는 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ser을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0107] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0108] (a) 본 발명은 CD55에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 및 이를 포함하는 암의 예방 치료 및/또는 진단용 조성물을 제공한다.
- [0109] (b) 본 발명의 항체는 보체 면역기전을 억제하여 종양의 증식을 촉진하는 CD55 단백질에 대해 높은 결합력 및 억제력을 보임으로써 CD55로 매개되는 다양한 질환의 효율적인 치료 조성물로 이용될 수 있다.
- [0110] (c) 또한 본 발명의 항체는 CD55의 과발현으로 인해 CDC(complement dependent cytotoxicity)를 작용기전으로 하는 치료제에 대한 내성이 유도된 다양한 질환에서 약물의 내성을 근본적으로 제거하고 치료 반응성을 현저히 개선시키는 효율적인 치료 보조제로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0112] 도 1은 4-1H와 G4-1H의 CD55에 대한 친화도를 측정한 ELISA 분석 결과를 보여주는 그림이다.

도 2는 G4-1H 가변영역의 유전자에 무작위 돌연변이가 도입된 라이브러리로부터 선별하여 제작한 항체의 CD55에 대한 친화도를 측정한 ELISA 분석 결과를 보여주는 그림이다.

도 3은 결합력 향상 핵심 부위를 소수성 아미노산으로 치환하여 제작한 항체의 CD55에 대한 친화도를 측정한 ELISA 분석 결과를 보여주는 그림이다.

도 4는 리투시맵과 EP-10H 병용처리에 의한 BJAB 세포의 사멸 효과를 분석한 FACS 어세이 결과이다.

도 5a는 Ramos와 Ramos-RR에서 CD20 및 CD55의 발현량을 비교 분석한 FACS어세이 결과이다. 도 5b는 리투시맵과 EP-10H 항체의 병용처리에 의한 Ramos-RR 세포의 사멸 효과를 분석한 FACS 어세이 결과이다.

도 6a는 K562와 K562-IR에서 CD55 발현량을 비교 분석한 FACS 어세이 결과이다. 도 6b는 이마티닙과 EP-10H 항체의 병용처리에 의한 K562-IR 세포의 사멸 효과를 분석한 FACS 어세이 결과이다.

도 7a는 PC9과 PC9-GR에서 CD55 발현량을 비교 분석한 FACS 어세이 결과이다. 도 7b는 이마티닙과 EP-10H 항체의 병용처리에 의한 PC9-GR 세포의 사멸 효과를 분석한 FACS 어세이 결과이다.

도 8은 본 발명의 CD20 X CD55 이중항체인 SBU와 Macor가 보고한 이중항체 형태를 비교한 항체 모식도를 보여주는 그림이다.

도 9는 본 발명의 SBU 형태의 CD20 X CD55 이중항체에 대한 SDS-PAGE 분석결과를 나타낸다.

도 10은 CD20 X CD55 이중항체의 CD20(도 10a) 및 CD55(도 10b)에 대한 친화도를 측정한 ELISA 분석 결과를 각각 보여준다.

도 11a는 CD20 X CD55 이중항체에 의한 BJAB 세포의 사멸 효과를 분석한 FACS 어세이 결과를 나타낸다. 도 11b는 리투시맵 단독처리, 리투시맵과 EP-10H 항체의 병용처리 및 CD20 X CD55 이중항체 처리 시의 각각의 BJAB 세포 사멸률을 비교한 결과이다.

도 12a는 CD20 X CD55 이중항체에 의한 Ramos 세포의 사멸 효과를 분석한 FACS 어세이 결과를 나타낸다. 도 12b는 리투시맵 단독처리, 리투시맵과 EP-10H 항체의 병용처리 및 CD20 X CD55 이중항체 처리 시의 각각의 Ramos 세포 사멸률을 비교한 결과이다.

도 13a는 CD20 X CD55 이중항체에 의한 Ramos-RR 세포의 사멸 효과를 분석한 FACS 어세이 결과를 나타낸다. 도 13b는 리투시맵 단독처리, 리투시맵과 EP-10H 항체의 병용처리 및 CD20 X CD55 이중항체 처리 시의 각각의 Ramos-RR 세포 사멸률을 비교한 결과이다.

도 14는 Ramos-RR 세포에 리투시맵, SBU 형태의 CD20 X CD55 이중항체를 처리한 상등액 내의 C4d 생산량을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0113] 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.

[0115] 실시예

[0116] 실시예 1: 4-1H의 인간화

[0117] 대한민국 출원 제10-2016-0132333호에 개시된 4-1H의 면역원성을 감소시키기 위하여 다음과 같은 방법으로 인간화를 수행하였다:

[0118] 4-1H의 인간화를 위해, 4-1H의 경쇄 가변영역 내 3개의 FR(LFR1, LFR2, LFR3)을 IGLV3-1*01의 FR로 치환하였고 중쇄 가변영역 내 3개의 FR(HFR1, HFR2, HFR3)을 IGHV3-23D*02의 FR로 치환하였다. 그 후, 아미노산의 물리화학적 성질의 유사성 또는 비유사성을 고려하여 특정한 아미노산을 모항체(4-1H)의 아미노산으로 다시 치환하였다. 모항체(4-1H)로 다시 치환된 아미노산은 경쇄 가변영역에서 L46T, N66K이고, 중쇄 가변영역에서 F68A이었다. 항체 도메인의 아미노산 잔기 번호는 당업계에서 통상적으로 사용되는 카밧 EU 넘버링 시스템(Kabat EU numbering system, Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed., U.S.

Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991에서와 같은 EU 지수번호에 따름)에 따라 넘버링하였다. 경쇄 가변영역의 J gene은 US2010-0056386을 참고하여 FGGGTKLTVL로 고정하였고, 중쇄 가변영역의 J gene은 US2014-0206849를 참고하여 WGQGTITVTVSS로 고정하였다. 인간화 4-1H 항체를 G4-1H로 명명하였고, 그 염기서열을 표 1에 표시하였다.

표 1

[0119]

G4-1H의 중쇄 및 경쇄 가변영역 아미노산 서열

경쇄 가변영역		
G4-1H (VL)	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGGGSGYGWYQKPGQSPVTIYWNDRPSGIPERFSGSKSGNTATLTISGTQAMD EADYYCGGWDSSYAIFFGGGTKLTVL	서열번호 4
중쇄 가변영역		
G4-1H (VH)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAWVRQAPGKGLEWVSGISSSGRYTYAPAVKGRATISRDNSKNT LYLQMNSLRADTAVYYCAKNAGAGGWHAAYIDAWGQGTITVTVSS	서열번호 5

[0120]

상기 표에서 밑줄친 글씨는 CDR 영역이고, 볼드체는 모항체 (4-1H)로 다시 치환된 아미노산을 나타낸다.

[0121]

실시예 2: G4-1H 클론의 완전 항체 전환 및 발현/정제

[0123]

실시예 1에서 제작한 G4-1H 항체의 가변영역의 DNA를 scFv 형태로 합성하고 (Cosmogenetech, 한국), PCR을 통해 완전 항체(full-length IgG)로 전환하였다. 먼저 scFv를 포함하는 pUC 벡터(Cosmogenetech, 한국)로부터 중쇄 및 경쇄의 가변영역과 불변 영역의 절편을 하기 표 2의 V_H, C_H 및 V_L, C_K 프라이머 조합을 이용해서 PCR을 통하여 수득하였다. 수득한 항체의 가변영역과 불변영역을 이용하여 하기 표 2의 HC 및 LC 프라이머 조합을 사용하여 PCR을 수행하였고, 그 결과 G4-1H의 중쇄와 경쇄를 확보하였다. 중쇄는 *EcoRI*과 *NotI*(New England Biolab, 영국) 효소를 처리하였고 마찬가지로 동일한 제한효소로 처리된 동물세포 발현용 벡터인 pCMV 벡터(ThermoFisher Scientific, 미국)에 라이게이션하였다. 또한 경쇄는 *XbaI* (New England Biolab, 영국) 효소를 사용하여 처리하였으며 마찬가지로 동일한 제한효소로 처리된 pCMV 벡터에 라이게이션 하였다. 라이게이션이 완료된 플라스미드는 DH5α competent cell(New England Biolab, 영국)에 열충격을 가하여 형질전환하였고, 확보한 콜로니를 대량 배양하여 플라스미드를 수득하였다.

표 2

[0124]

G4-1H 완전항체 클로닝에 사용된 프라이머

	프라이머	서열	서열번호
V _H	정방향	CTT CCT GTC AGT AAC TAC AGG TGT CCA CTC CCA GGT GCA ACT GCA GCA GTC	6
	역방향	CCA GCG TGA CCG TAT CCA GCG CCT CCA CCA AGG GCC CCA	7
C _H	정방향	GCC TCC ACC AAG GGC CC	8
	역방향	TCC CCC GGC AAG TGA GCG GCC GCT CAC	9
HC	정방향	CAG AAT TCA CTC TAA CCA TGG AAT GGA GCT GGG TCT TTC TCT TCT TCC TGT CAG TAA CTA CAG	10
	역방향	TCC CCC GGC AAG TGA GCG GCC GCT CAC	9
V _L	정방향	GGT CTT TGT ATA CAT GTT GCT GTG GTT GTC TGG TGT TGA AGG AAG CTA CGA GCT GAC AC	11
	역방향	CAA GCT CAC CGT CTT GCG GAC CGT GGC C	12
C _K	정방향	CGG ACC GTG GCC GCC CCC TC	13
	역방향	CGG GGC GAG TGC TAG TTC TAG AAC TA	14
LC	정방향	GGG AAT TCT AGA GGA TCG AAC CCT TTG CAA GCT TCG GCA CGA GCA GAC CAG CAT GGG CAT CAA GAT GGA GAC ACA TTC TCA GGT CTT TGT ATA CAT GTT G	15
	역방향	CGG GGC GAG TGC TAG TTC TAG AAC TA	14

[0126]

완전항체로 전환시킨 중쇄와 경쇄 각각의 플라스미드를 폴리에틸렌이민(PEI)(Polysciences, 미국)과 150 mM

NaCl을 이용하여 Expi293F 세포(Invitrogen, 미국)에 형질도입하고 Freestyle 293 발현배지(Invitrogen, 미국)에서 37℃, 8% CO₂ 및 55% 습도 조건으로 Erlenmeyer 플라스크에서 7일간 부유배양하였다. 발현 세포 배양액을 4,000rpm로 10분 간 원심분리한 후, 상등액을 취해 0.22 μm 필터로 여과하였다. 여과된 상등액은 4℃에서 MabSelect sure(GE Healthcare, 미국) 레진 1 ml에 결합을 유도하였다. 결합된 레진은 10 cv(column volume)의 20mM 제이인산나트륨과 500mM 염화나트륨(pH 7.0) 용액으로 세척 후, 100 mM 시트르산(pH 3.0) 용액을 사용하여 결합된 항체를 용출한 후, 1M Tris-HCl(pH 9.0)으로 중화하였다. Slide-A-Lyzer Dialysis 카세트(ThermoFisher Scientific, 미국)를 이용하여 pH 7.2 - 7.4 PBS로 완충액 교환을 진행 후 SDS-PAGE를 통해 정제된 항체의 경쇄와 중쇄의 크기 및 순도를 최종적으로 확인하였으며, 그 결과 이론적 계산치와 일치하는 분자량과 높은 순도를 확인할 수 있었다.

[0127]

[0128]

실시예 3: CD55에 대한 4-1H와 G4-1H의 친화도 분석

[0129]

상기 실시예 2에서 제작한 G4-1H 단클론 항체의 CD55에 대한 결합력을 간접 ELISA로 확인하였다. 간접 ELISA는 50 μl의 PBS에 1 μg/ml로 재조합 인간 CD55 (R&D Systems, 미국)를 희석하여 96웰 면역 플레이트(Corning, 미국)에 넣고, 4℃에서 보관하여 밤새 흡착시켰다. 3% 우혈청 알부민(Millipore, 미국)이 포함된 완충용액으로 상온에서 1시간 반응시킨 후, 0.5% Tween 20(Amresco, 미국)이 포함된 완충용액으로 3회 세척하고, 순차적 농도(0.0001, 0.0003, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10nM)로 희석한 각각의 항체를 웰 당 50 μl씩 처리하였다. 항원에 항체가 결합할 수 있도록 상온에서 2시간 반응시킨 후, 0.5% Tween 20 (Amresco, 미국)이 포함된 완충용액으로 3회 세척하였다. 항-인간 면역글로불린 Fc-HRP 항체(Jackson Immunoresearch, 미국)를 1:3,000으로 희석하여 웰당 50 μl씩 처리한 후, 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 0.5% Tween 20 (Amresco, 미국)이 포함된 완충용액으로 3회 세척한 후, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB)(ThermoFisher Scientific, 미국) 50 μl씩 넣고 10분간 발색 시켰다. 분광 광도계(Biotek, 미국)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한 결과, G4-1H는 4-1H에 비하여 CD55에 대하여 낮은 친화력을 나타냈다(도 1).

[0130]

[0131]

실시예 4: 가변영역의 유전자에 무작위 돌연변이가 도입된 라이브러리 제작

[0132]

G4-1H의 CD55에 대한 친화도를 개선시키기 위하여 G4-1H 항체의 가변영역 유전자에 Error prone PCR 과정을 통해 무작위 돌연변이가 도입된 라이브러리를 구축하였다. 구체적으로, G4-1H scFv를 포함하는 pComb3x 벡터에 scFv 시퀀싱 프라이머 1과 프라이머 2, 교정 기능이 없는 중합효소(Takara, 일본), 중합효소 완충액, dATP, dTTP, dCTP, dGTP를 넣고 염 농도와 망간 양을 조절하여 변이 빈도를 조절하였다. Error prone PCR은 94℃에서 5분간 사전 예열, 91℃에서 1분간 이중 나선 분리, 55℃에서 1분간 프라이머 결합, 72℃에서 3분간 DNA 합성 반응의 절차를 30회 반복하여 수행하였고, 마지막으로 72℃에서 5분간 DNA 합성 반응을 수행하였다. 정제된 PCR 산물과 파지미드 벡터인 pComb3x 벡터를 *Sfi*I(New England Biolab, 영국) 제한 효소를 사용하여 절단 후 이를 라이게이션하고, ER2738 대장균에 형질전환한 다음 배양하였다.

표 3

[0133]

Error prone PCR에 사용된 프라이머

scFv 시퀀싱 프라이머		
1	ACA CTT TAT GCT TCC GGC	서열번호 16
2	CAA AAT CAC CGG AAC CAG AG	서열번호 17

[0134]

[0135]

실시예 5: 4-1H에 비하여 CD55에 대한 친화도가 개선된 클론의 선별

[0136]

상기 실시예 4에서 제작한 라이브러리를 이용한 바이오패닝(biopanning)을 통하여 G4-1H 및 4-1H 보다 CD55에 대한 친화도가 개선된 클론을 선별하였다.

[0137]

먼저, 마그네틱 비드(Invitrogen, 미국)에 재조합 인간 CD55(R&D Systems 2009-CD/CF, 미국) 2.5 μg를 접합시켰다. 파아지 라이브러리와 마그네틱 비드에 접합된 CD55를 상온에서 2시간 동안 반응시킴으로써 CD55에 친화력을 가진 파아지를 결합시킨 후, 이를 4-1H 항체와 상온에서 30분 반응시켜 4-1H와 경쟁시켰다. 0.5% Tween

20(Amresco, 미국)이 포함된 완충용액으로 세척하고, 산성 용액을 이용하여 용출하였다. 용출된 파아지는 다음 라운드 패닝(panning)을 위해 대장균 ER2738에 감염시켜 밤새 배양하여 증식시켰다. 이러한 과정을 4차례 반복하며 바이오패닝을 진행하였다. 1차에서 1회, 2-3차에서 3회, 4차에서 5회 세척하여 패닝 횟수가 증가할수록 세척 횟수를 증가시켜 결합력이 높은 파아지를 축적하였다.

3차와 4차 바이오패닝 결과물의 플레이트로부터 선별된 192개의 클론을 96 딥웰(deep well) 플레이트에서 100 μ g/ml 카베니실린, 70 μ g/ml 가나마이신 및 VCSM13 헬퍼 파아지를 넣고 37°C에서 밤새 배양하여 항체가 발현된 파아지의 증식을 유도하였다. 상기에서 수득한 배양액을 원심분리를 통해 파아지를 포함한 배지 상등액을 얻어 재조합 인간 CD55(R&D Systems 2009-CD/CF, 미국)가 코팅되어 있는 ELISA 플레이트에 넣고 37에서 2시간 동안 배양하였으며, HRP가 접합되어 있는 항-M13 항체(Merck, 미국)를 이차항체로 이용하여 CD55에 결합하는 항체를 ELISA로 확인하였다. 대조군으로 4-1H 클론의 파아지를 사용하여, 이보다 결합력이 높은 5개의 클론을 선별하였다.

실시예 6: 선별된 클론의 완전 항체 전환 및 발현/정제

EP-1E, EP-1F, EP-9B, 3R-2-1H 및 EP-10H를 전장(full-length)의 완전 IgG 형태로 만들기 위한 클로닝을 진행하였다. 상기 EP-1E, EP-1F, EP-9B, 3R-2-1H 및 EP-10H는 하기 표 4의 CDR 서열을 가진다.

표 4

선별된 클론의 경쇄 및 중쇄 가변영역의 아미노산 서열

	아미노산	서열번호
EP-1E 경쇄 가변영역	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGGGSGYGWFFQKPGQSPVTVIYWNKRPSPGIPERFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYCGGWDSSSTYAIFFGGGTKLTVL	18
EP-1E 중쇄 가변영역	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAVVRQAPGKGLEWVSGISSSGRYTYYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNAVAGGWHAAYIDAWGQGTITVTSS	19
EP-1F 경쇄 가변영역	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGGGSGYGWYQKPGQSPVTVIYWNDRKPSGIPERFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYCGGWDSSSTYAIFFGGGTKLTVL	4
EP-1F 중쇄 가변영역	EVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAVVRQAPGKGLEWVSGISSSGRYTYYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNAVAGGWHAAYIDAWGQGTITVTSS	20
EP-9B 경쇄 가변영역	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGGGSGYGWYQKPGQSPVTVIYWNDRKPSGIPERFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYCGGWDSSSTYAIFFGGGTKLTVL	4
EP-9B 중쇄 가변영역	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAVVRQSPGKGLEWVSGISSSGRYTYYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNAVAGGWHAAYIDAWGQGTITVTSS	21
3R-2-1H 경쇄 가변영역	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGGGSGYGWYQKPGQSPVTVIYWNDRKPSGIPERFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYCGGWDSSSTYAIFFGGGTKLTVL	4
3R-2-1H 중쇄 가변영역	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVARGFTFSDRGMAVVRQAPGKGLEWVSGISSSGRYTYYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNAVAGGWHAAYIDAWGQGTITVTSS	22
EP-10H 경쇄 가변영역	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGGGSGYGWYQKPGQSPVTVIYWNDRKPSGIPERFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYCGGWDSSSTYAIFFGGGTKLTVL	4
EP-10H 중쇄 가변영역	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAVVRQAPGKGLEWVSGISSSGRYTYYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNAVAGGWHAAYIDAWGQGTITVTSS	19

상기 표에서 밑줄친 부분은 CDR 영역을, 볼드체는 G4-1H와 서로 다른 아미노산을 각각 나타낸다. 상기 실시예 5에서 선별된 항체인 EP-1E, EP-1F, EP-9B, 3R-2-1H 및 EP-10H는 scFv 형태이므로 이들을 완전항체로 전환하였으며, 완전항체 전환 및 발현/정제는 전술한 실시예 2와 동일한 방법으로 수행하였다.

표 5

선별된 클론의 완전항체 클로닝에 사용된 프라이머

	프라이머	서열	서열번호
V _L	정방향	GGT CTT TGT ATA CAT GTT GCT GTG GTT GTC TGG TGT TGA AGG AAG CTA CGA GCT GAC AC	11
	역방향	CAA GCT CAC CGT CTT GCG GAC CGT GGC C	12

C _K	정방향	CGG ACC GTG GCC GCC CCC TC	13
	역방향	CGG GGC GAG TGC TAG TTC TAG AAC TA	14
LC	정방향	GGG AAT TCT AGA GGA TCG AAC CCT TTG CAA GCT TCG GCA CGA GCA GAC CAG CAT GGG CAT CAA GAT GGA GAC ACA TTC TCA GGT CTT TGT ATA CAT GTT G	15
	역방향	CGG GGC GAG TGC TAG TTC TAG AAC TA	14
V _H	정방향	CTT CCT GTC AGT AAC TAC AGG TGT CCA CTC CGA GGT CCA GCT GGT C	23
	역방향	GTG ACC GTG TCC AGC GCC TCC ACC AAG GG	24
C _H	정방향	GCC TCC ACC AAG GGC CC	8
	역방향	TCC CCC GGC AAG TGA GCG GCC GCT CAC	9
HC	정방향	CAG AAT TCA CTC TAA CCA TGG AAT GGA GCT GGG TCT TTC TCT TCT TCC TGT CAG TAA CTA CAG	10
	역방향	TCC CCC GGC AAG TGA GCG GCC GCT CAC	9

[0145]

[0146] 실시예 7: 선별하여 제작한 완전항체의 CD55에 대한 친화도 분석

[0147] 상시 실시예 6에서 제작한 항체의 CD55에 대한 친화도를 간접 ELISA로 확인하였다. 간접 ELISA는 전술한 실시예 3과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0148] ELISA 결과 실시예 6의 항체는 4-1H에 비하여 높은 CD55에 대한 친화도를 나타냈다(도 2). EP-1E, EP-1F, 3R-2-1H 및 EP-10H는 비슷한 친화도를 나타냈고, EP-9B는 4-1H 보다는 높지만 다른 항체보다 낮은 친화도를 나타냈다. 4-1H에 비하여 CD55에 대한 친화도가 높은 항체들은 각종 암 진단이나 약학적 치료 조성물 제조에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0150] 실시예 8: 결합력 향상 핵심 부위의 아미노산 치환

[0151] 표 4에 기재된 클론들은 모두 G4-1H에서 카뎀 EU 넘버링 시스템에 따른 H100A위치의 G가 V로 치환되었다. 이 부분은 항체의 항원 결합에 중요한 HCDR3 영역에 포함된다. 본 발명자들은 이 부위를 결합력 향상을 위한 핵심 부위로 파악하였고 그 부위를 V 이외의 소수성 아미노산으로 치환하기 위해 클로닝을 진행하였다. H100A 위치만 G4-1H와 다른 EP-10H를 기본 백본으로 하여 제작한 10H(A), 10H(I), 10H(L), 10H(F) 및 10H(M)은 하기의 CDR 서열을 갖는다(표 6).

표 6

[0152]

	아미노산	서열번호
10H(A) 중쇄 가변영역	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAWVRQAPGKGLEWVSGISSSGRYTYYPAPVKGRATISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNAAGGWHAAIDAWGQGTTTVSS	25
10H(I) 중쇄 가변영역	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAWVRQAPGKGLEWVSGISSSGRYTYYPAPVKGRATISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNAIAGGWHAAIDAWGQGTTTVSS	26
10H(L) 중쇄 가변영역	EVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAWVRQAPGKGLEWVSGISSSGRYTYYPAPVKGRATISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNALAGGWHAAIDAWGQGTTTVSS	27
10H(F) 중쇄 가변영역	EVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAWVRQAPGKGLEWVSGISSSGRYTYYPAPVKGRATISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNAFAGGWHAAIDAWGQGTTTVSS	28
10H(M) 중쇄 가변영역	EVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDRGMAWVRQAPGKGLEWVSGISSSGRYTYYPAPVKGRATISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNAMAGGWHAAIDAWGQGTTTVSS	29

[0153]

[0154] 동물세포 발현용 벡터인 pCMV 벡터(ThermoFisher Scientific, 미국)에 클로닝된 완전 IgG 형태인 EP-10H의 중쇄 가변영역 중 G4-1H와 다른 돌연변이가 일어난 중쇄의 상보성 결정 영역의 아미노산을 소수성 아미노산으로 치환하였다.

[0155] 먼저 EP-10H의 중쇄 가변영역을 포함하는 pCMV 벡터로부터 표 4의 HC1, HC2 프라이머 조합을 이용하여 중쇄의 가변영역과 불변영역을 PCR을 통해 수득하였다. PCR을 통해 얻어진 중쇄 가변영역과 불변영역을 HC3 정방향 프라이머와 HC2 역방향 프라이머를 사용하여 overlap PCR 과정을 거쳐 VH-CH1-CH2-CH3 형태를 얻었다. 이렇게 얻은 중쇄는 EcoRI과 NotI(New England Biolab, 영국) 제한효소를 사용하여 절단하였으며 마찬가지로 동일한 제한

효소로 처리된 동물세포 발현용 벡터인 pCMV 벡터(ThermoFisher Scientific, 미국)에 라이게이션하였다. 라이게이션이 완료된 플라스미드는 DH5α 대장균(New England Biolab, 영국)에 열충격을 가하여 형질전환을 한 후 대량 배양하여 플라스미드를 얻었다.

표 7

[0157] 결합력 향상 핵심부위의 아미노산 치환을 위해 사용한 프라이머

	프라이머	서열	서열번호
HC1	정방향	CTT CCT GTC AGT AAC TAC AGG TGT CCA CTC CGA GGT CCA GCT GGT C	23
	역방향	GTA CTA CTG CGC CAA G	30
HC2	정방향1	GTA CTA CTG CGC CAA GAA CGC CGC GGC CGG GGG GTG GCA CGC	31
	정방향2	GTA CTA CTG CGC CAA GAA CGC CAT TGC CGG GGG GTG GCA CGC	32
	정방향3	GTA CTA CTG CGC CAA GAA CGC CCT GGC CGG GGG GTG GCA CGC	33
	정방향4	GTA CTA CTG CGC CAA GAA CGC CAT GGC CGG GGG GTG GCA CGC	34
	정방향5	GTA CTA CTG CGC CAA GAA CGC CTT TGC CGG GGG GTG GCA CGC	35
	역방향	TCC CCC GGC AAG TGA GCG GCC GCT CAC	9
HC3	정방향	CAG AAT TCA CTC TAA CCA TGG AAT GGA GCT GGG TCT TTC TCT TCT TCC TGT CAG TAA CTA CAG	10
	역방향	TCC CCC GGC AAG TGA GCG GCC GCT CAC	9

[0158] 클로닝을 완료한 후, EP-10H 경쇄 플라스미드와 표 6의 중쇄 플라스미드를 이용한 완전항체의 발현/정제는 전술한 실시예 2와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0159]

[0160] 실시예 9: 결합력 향상 핵심 부위를 치환하여 제작한 완전항체의 CD55에 대한 친화도 분석

[0161] 상기 실시예 8에서 제작한 항체의 CD55에 대한 친화도를 간접 ELISA로 확인하였다. 간접 ELISA는 전술한 실시예 3과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0162] ELISA 분석 결과 결합력 핵심부위를 소수성 아미노산으로 치환하여 제작한 항체는 4-1H에 비하여 높은 CD55에 대한 친화도를 나타냈다(도 3). 그러나 10H(A), 10H(I), 10H(L), 10H(F) 및 10H(M)는 EP-10H보다 낮은 친화도를 나타냈다. 이는 H100A 위치에서 G가 V로 치환되는 것이 결합력 향상에 가장 효율적인 결과를 나타냄을 의미한다.

[0163]

[0164] 실시예 10: CD55가 과발현된 약제 내성 암세포주에서 EP-10H의 치료 효과

[0165] 실험예 10-1: 버킷 림프종 세포주 BJAB에서 리톡시맙과 EP-10H의 병용 효과

[0166] BJAB은 보체-저항성을 가지며, 이는 CD55의 발현에 기인한다(Golay, et al., *Blood*, 95(12):3900-8, 2000). 이러한 이유로 CDC(complement dependent cytotoxicity)가 주된 치료 기작인 리톡시맙에 대한 반응성이 낮다. B 세포 림프종 중 악성으로 알려진 버킷 림프종에 대한 리톡시맙의 치료효과 개선 가능성을 확인하기 위하여 버킷 림프종 세포주인 BJAB에서 EP-10H와의 병용을 통한 세포 사멸능을 확인하였다. 샘플 당 5×10^5 개의 BJAB 세포에 리톡시맙을 20 μg/ml, 그리고 병용 투여 효과 확인을 위하여 4-1H 또는 EP-10H와 리톡시맙을 각각 50 μg/ml과 20 μg/ml 농도가 되도록 50% complement sera human(Sigma, 미국)이 첨가된 RPMI 배지로 희석하여 최종 100 μl를 처리한 후, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후, FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD(BioLegend, 미국)를 이용하여 FACS 분석 장비인 Attune NxT(ThermoFisher Scientific, 미국)로 사멸 세포를 확인하여 CDC를 관찰하였다(도 4). 종래 보고된 바와 같이 BJAB 세포는 리톡시맙에 대한 반응성이 낮았으나, 항 CD55 항체(4-1H 및 EP-10H)와 병용 투여시 그 효과가 증가되었으며, 증가된 효과의 폭은 리톡시맙과 4-1H를 조합한 경우에 비하여 리톡시맙과 EP-10H가 조합된 경우가 더 컸다. 이러한 결과는 CD55의 발현이 리톡시맙의 CDC 효과를 저해하는데, 항체를 이용하여 CD55를 억제할 경우 저해된 효과가 회복됨을 의미하며, 이러한 효과는 CD55에 대한 친화도가 더 우수한 EP-10H에 의하여 보다 현저하게 발휘됨을 보여준다.

- [0168] 실험예 10-2a: 리툽시맙 내성 세포주인 Ramos-RR에서 CD55의 발현 확인
- [0169] Ramos는 리툽시맙 반응성 B 세포 림프종 세포주로 Ramos를 이용하여 제작한 리툽시맙 내성 세포주인 Ramos-RR에서 CD55 발현을 확인하기 위하여 하기와 같이 실험을 진행하였다.
- [0170] 샘플 당 5×10^5 개의 Ramos 및 Ramos-RR을 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 EP-10H 단클론 항체가 포함되거나 포함되지 않은 PBS로 현탁하고, 4℃에서 1시간 동안 배양하였다. 배양액을 4,000 rpm에서 5분간 원심분리 후, PBS 100 μl 로 세척하고 4,000 rpm에서 5분간 다시 원심분리 하였다. PBS를 이용하여 1:100의 비율로 희석한 Goat 항-human IgG 항체, Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, 미국)을 세포에 처리하고 차광한 상태로 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 형광 염색된 세포를 PBS로 세척 후 PBS 400 μl 로 현탁하고 FACS 분석 장비인 Attune NxT(ThermoFisher Scientific, 미국)를 이용하여 분석하고 그 결과를 도 5a에 나타내었다.
- [0171] 그 결과 Ramos에 비하여 Ramos-RR의 CD55 발현이 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 리툽시맙의 약제 내성에 CD55가 관여함을 의미한다.
- [0173] 실험예 10-2b: 리툽시맙 내성 세포주인 Ramos-RR에 대한 리툽시맙과 EP-10H의 병용 효과
- [0174] CD55가 과발현되어 리툽시맙에 대한 내성을 나타내는 Ramos-RR에서 실험예 10-1의 방법으로 리툽시맙과 EP-10H의 병용투여를 세포 사멸능을 확인하였다(도 5b). 리툽시맙은 Ramos에서 세포사멸을 유도한 반면, Ramos-RR에서는 세포사멸 유도 정도가 Ramos에 비하여 낮았다. 그러나 EP-10H와 4-1H의 병용은 Ramos-RR에서 세포사멸을 증가시켰으며, BJAB에서와 마찬가지로 EP-10H와의 병용이 4-1H와의 병용에 비하여 리툽시맙의 세포사멸능을 더욱 현저히 증가시켰다. 이러한 결과는 B 세포 림프종에서 원발암(BJAB 세포주는 원발암 세포주임) 뿐 아니라 기존의 치료법에 내성을 획득한 암종에서도 EP-10H가 치료 효과를 나타낼 수 있음을 보여준다.
- [0176] 실험예 10-3a: 이마티닙 내성 세포주인 K562-IR에서 CD55의 발현 확인
- [0177] K562는 티로신 키나아제 억제제인 이마티닙(Imatinib)에 반응성을 가지는 백혈병 세포주이다. K562를 이용하여 제작한 이마티닙 내성 세포주인 K562-IR에서 CD55 발현을 실험예 10-2a와 동일한 방법으로 확인하였다. 그 결과 K562에 비하여 K562-IR의 CD55 발현이 증가함을 확인할 수 있었다(도 6a). 이는 이마티닙의 약제 내성에 CD55가 관여함을 의미한다.
- [0179] 실험예 10-3b: K562-IR 세포주에서 이마티닙과 EP-10H의 병용 효과 확인
- [0180] K562와 CD55가 과발현되어 이마티닙에 대한 내성을 나타내는 K562-IR를 12 웰 세포배양 플레이트에 웰당 2×10^5 개로 분주한 직후, 이마티닙을 2 μM , 그리고 병용투여 효과를 확인하기 위해 이마티닙 2 μM 과 4-1H 또는 EP-10H를 각각 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도가 되도록 RPMI 배지로 희석하여 최종 500 μl 를 처리하고 37℃, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 7-AAD와 FITC Annexin V Apoptosis 검출 키트를 이용하여 FACS 분석 장비인 Attune NxT로 사멸세포를 분석하였다(도 6b).
- [0181] 이마티닙은 K562 세포주에서 세포사멸을 유도한 반면 K562-IR에서는 효과를 나타내지 못하였으나, EP-10H 또는 4-1H와 병용투여하자 K562-IR에서 세포사멸을 유도하였다. 또한 EP-10H와 이마티닙의 병용이 4-1H와 이마티닙의 병용에 비하여 더 큰 세포사멸 효과를 나타냈다. 이러한 결과는 티로신 키나아제 억제제인 이마티닙의 내성의 원인이 CD55임을 실험예 10-3a의 결과와 더불어 입증하며, EP-10H를 이용한 CD55의 저해는 이마티닙의 내성을 극복하는 효과적인 전략임을 의미한다. 이마티닙은 백혈병 치료에 널리 사용되는 장기 복용 약물로서, 장기 복용에 따라 유도될 수 있는 약물의 내성 극복 전략이 절실히 필요하다. 이에, EP-10H를 이용한 이마티닙의 내성 극복 전략은 백혈병 치료에 매우 효과적일 것으로 기대된다.
- [0183] 실험예 10-4a: 게피티닙 내성 세포주인 PC9-GR에서 CD55의 발현 확인

- [0184] PC9는 티로신 키나아제 억제제인 게피티닙(gefitinib)에 대한 반응성을 가지는 비소세포폐암(NSCLC) 세포주이다. PC9를 이용하여 제작한 게피티닙 내성세포주인 PC9-GR에서 CD55 발현을 실험예 10-2a의 방법으로 확인한 결과 PC9에 비하여 PC9-GR의 CD55 발현이 증가함을 확인할 수 있었다(도 7a). 이는 게피티닙의 약제 내성에 CD55가 관여함을 의미한다.
- [0186] 실험예 10-4b: PC9-GR에서 게피티닙과 EP-10H의 병용 효과 확인
- [0187] NSCLC 세포주인 PC9과 CD55가 과발현되어 게피티닙에 대한 내성을 나타내는 PC9-GR을 12웰 세포배양 플레이트에 웰 당 1×10^5 개로 분주한 후, 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 분주 24시간 뒤에 게피티닙을 5 µg/ml, 그리고 병용투여 효과를 확인하기 위해 게피티닙 5 µg/ml과 4-1H 또는 EP-10H를 각각 5 µg/ml 농도가 되도록 RPMI 배지로 희석하여 최종 500 µl를 처리한 후, 37℃, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 다시 배양하였다. 그 후, 7-AAD와 FITC Annexin V Apoptosis 검출 키트를 이용하여 FACS 분석 장비인 Attune NxT로 사멸세포를 분석하였다(도 7b).
- [0188] 게피티닙은 NSCLC 세포주인 PC9 세포주에서 세포사멸을 유도한 반면 PC9-GR에서는 효과를 나타내지 못하였으나, EP-10H 또는 4-1H와 게피티닙의 병용은 PC9-GR에서 세포사멸을 유도하였다. 또한 EP-10H와 게피티닙의 병용이 4-1H와 게피티닙의 병용에 비하여 더 큰 세포사멸 효과를 나타냈다. 이러한 결과는 표적항암제 중 티로신 키나아제 억제제인 게피티닙의 내성의 원인이 CD55임을 실험예 10-4a의 결과와 더불어 입증하며, EP-10H를 이용한 CD55의 저해는 게피티닙의 내성을 극복하는 효과적인 전략임을 의미한다. 게피티닙은 치료제가 많지 않은 NSCLC에 효과적인 약물로서, 치료제의 다른 옵션이 많지 않은 상황에서 약물의 내성이 나타나면 2차 약물의 선택이 어렵기 때문에 약물의 내성을 극복하는 전략이 절실히 필요하다. EP-10H를 이용한 게피티닙의 내성 극복 전략은 NSCLC 치료에 매우 효과적인 것으로 기대된다.
- [0189]
- [0190] **실시예 11: EP-10H를 이용한 이중항체 제작 및 효능 확인**
- [0191] 실시예 10에서 EP-10H와 다양한 약물의 병용효과를 확인하였다. 실시예 10의 실험예 10-1, 2에서 확인한 리톡시맙과 병용효과 결과를 바탕으로, 서로 다른 항원을 타겟하는 두개의 항체를 병용하는 방법과 하나의 항체로 두개의 항원을 동시에 타겟할 수 있는 이중항체의 암세포 사멸능을 비교하기 위하여 리톡시맙과 EP-10H를 이용하여 CD20 x CD55 이중항체를 제작하였고, 이중항체의 암세포 사멸 능력을 병용투여와 비교하여 확인하였다.
- [0193] 실험예 11-1. 동물 세포 발현을 위한 이중항체 (CD20 X CD55) 클로닝
- [0194] 본 발명에서는 종래 보고된 CD20과 CD55를 동시에 타겟 하는 이중항체(Macor, et al., *Leukemia*, 29(2):406-14, 2014)와는 상이한 신규 이중항체를 개발하였으므로, 본 발명자들은 이중항체 형태에 따른 효능을 비교하기 위해 리톡시맙과 EP-10H의 유전자를 이용하여 CD20과 CD55를 동시에 타겟하는 이중항체를 클로닝하였다. 본 발명에서 제작된 이중항체는 SBU(SpecificBi-functionalUnit)라고 명명하였다(도 8).
- [0195] SBU 형태의 CD20 X CD55 이중항체는 중쇄끼리의 원하지 않는 pair와 결합하는 것을 막기 위해 knob-into-hole 기법을 사용하였으며, 경쇄끼리의 잘못된 결합을 막기 위해서는 Gly과 Ser으로 구성된 링커를 사용하였다. CD55-scFv-knob (VL-linker20-VH-CH2-CH3)과 CD20-Fab-hole(VL-CK-linker40-VH-CH1-CH2-CH3) 형태로 각각 클로닝을 진행하였으며, CD55-scFv-knob의 경우에는 실시예 6에서 제작한 EP-10H를 주형으로 사용하고 표 8의 프라이머 조합을 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 유전체는 BssHII와 XbaI(New England Biolab, 영국) 효소를 처리하였고, 마찬가지로 동일한 제한효소로 처리된 동물세포 발현용 벡터인 pMAZ 벡터에 라이게이션하였다. 라이게이션이 완료된 플라스미드는 DH5 α competent cell(New England Biolab, 영국)에 열충격을 가하여 형질전환하였고, 확보한 콜로니를 대량 배양하여 플라스미드를 수득하였다.
- [0196] CD20-Fab-hole(VL-CK-linker40-VH-CH1-CH2-CH3) 형태의 제작을 위해 Drug Data Bank에 공개된 리톡시맙 서열을 토대로 표 9의 프라이머 조합을 이용해서 PCR을 수행하였다. 증폭된 유전체는 BssHII와 XbaI 효소를 처리하였고, 마찬가지로 동일한 제한효소로 처리된 동물세포 발현용 벡터인 pMAZ 벡터에 라이게이션하였다. 라이게이션이 완료된 플라스미드는 DH5 α competent cell(New England Biolab, 영국)에 열충격을 가하여 형질전환하였고,

확보한 콜로니를 대량 배양하여 플라스미드를 수득하여 서열 분석(표 10)을 완료하였다.

표 8

[0197]

CD55-scFv-knob 클로닝에 사용된 프라이머

	프라이머	서열	서열번호
V _L	정방향	CAG CGC GCA CTC CAG CTA CGA GCT GAC ACA GCC	36
	역방향	GAC CAA GCT CAC CGT CTT GGG CGG AGG CGG GAG TGG TGG TGG CGG TAG CGG TGG AGG AGG C	37
V _H	정방향	GTG GAG GAG GCA GTG GAT CTG GCG GCT CTG AGG TCC AGC TGG TCG	38
	역방향	GGC ACA ACC GTG ACC GTG TCC AGC GGC GGC TCA GAC AAA ACT CAC AC	39
C _H	정방향	CGT GTC CAG CGG CGG CTC AGA CAA AAC TCA CAC ATG C	40
	역방향	CTC TCC CTG TCC CCG GGT AAA TGA CTA GAA CTA	41

표 9

[0198]

CD20-Fab-hole 클로닝에 사용된 프라이머

	프라이머	서열	서열번호
V _L -C _K	정방향	CGC AGC GAG CGC GCA CTC CCA GAT TGT CCT GTC TCA GTC TCC TGC	42
	역방향	CGG CCG CCG TGC GAG ATC TTT TGA TTT CCA GTT TAG TTC CGC CG	43
V _H	정방향	CAA GTC CAA CTG CAA CAA CCG GG	44
	역방향	GGA AGA CCG ATG GGC CCT TGA AGC TAG CGG CGG AAA CCG TTG TGC CAG AG	45
C _H	정방향	GCA AGC TTC AAG GGC	46
	역방향	CTC TCC CTG TCC CCG GGT AAA TGA CTA GAA CTA	41

[0199]

표 10

[0200]

SBU 형태의 CD55-scFv-knob과 CD20-Fab-hole의 가변영역 아미노산 서열

CD55-scFv-knob	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGGGSGYGYQQKPGQSPVTVIYWNDKRPSPGIPERFSGSKSGNTATLTISG TQAMDEADYYCGGWDSSSTYAIFFGGGKTLTVLGGGSGGGGSGGGSGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSDRGMAVVRQAPGKGLEWVSGISSSGRYTYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKNAVAGGWHAAYIDAWGQGTITVTVSSGSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	서열번호 47
CD20-Fab-hole	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWQQKPGSSPKPWYIATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLT ISRVEADAATYCYQWTSNPPTFGGGTKLEIKRSRTAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGG SGGGSGGGSGSGSGGGSGGGSGGGSGGGSGSSQVQLQPGAEVLPKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWV KQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGDDWYFNV WGAGTTTVTSAAAFKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	서열번호 48

[0201]

[0202]

실험예 11-2. 동물세포에서 발현 및 정제

[0203]

상기 실험예 11-1에서 제작한 DNA의 발현은 전술한 실시예 2와 동일한 방법으로 수행하였다. SBU 형태의 CD20 X CD55 이중항체는 서열번호 47, 48 각각의 플라스미드를 폴리에틸렌이민(PEI)(Polysciences, 미국)과 150 mM NaCl을 이용하여 HEK293F 세포(Invitrogen, 미국)에 형질도입하고 Freestyle 293 발현 배지(Invitrogen, 미

국)에서 37℃의 온도, 8% CO₂ 및 55% 습도 조건으로 7일간 배양하였다. SBU와 유사한 형태의 이중항체가 보고가 되었으나(Moore, et al., A robust heterodimeric Fc platform engineered for efficient development of bispecific antibodies of multiple formats. *Methods*, 154:38-50), 상기 문헌에 개시된 이중항체의 경우 발현 시 3종의 DNA가 필요하다. 3종의 DNA가 필요한 종래의 이중 항체 제조방법과 달리, 본 발명의 SBU는 경쇄끼리의 잘못된 결합을 막기 위해 Gly와 Ser으로 구성된 링커를 사용함으로써 2종의 DNA로 이중항체 발현이 가능하다. 발현 세포 배양액을 4,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상등액을 취해 0.22 μm 필터를 통해 여과하였다. 여과된 상등액은 4℃에서 KappaSelect(GE Healthcare, 미국) 레진 1 ml에 결합을 유도하였다. 결합된 레진은 10 cv(column volume)의 PBS 용액으로 세척 후, 100 mM glycine-HCl(pH 2.7) 용액을 사용하여 결합된 항체를 용출한 후, 1 M Tris-HCL (pH 9.0)으로 중화하였다. pH 7.2-7.4 PBS로 완충액 교환을 진행 후 SDS-PAGE를 통해 정제된 항체의 경쇄와 중쇄의 크기 및 순도를 확인하였고 그 결과 이론적 계산치와 일치하는 분자량과 높은 순도를 확인할 수 있었다(도 9). SBU 형태의 이중항체는 CD20 결합부위가 Fab이고 CD55 결합부위가 scFv인 헤테로 형태이다. Fab의 C kappa 부분을 이용하여 protein L로 정제를 하면 이중항체 정제 시 생성 가능성이 가장 높다고 알려진 knob-knob 호모다имер 또는 knob 모노머 (Giese, et al., *Biotechnol Prog*, 34(2)397-404)의 생성을 억제하고 원하는 형태인 헤테로다имер만 얻을 수 있다.

[0205] 실험예 11-3. ELISA를 통한 이중항체의 결합력 확인

[0206] 상기 실험예 11-2에서 제작한 CD20 X CD55 이중항체가 타겟하는 각각의 항원인 CD20 및 CD55에 대한 친화도를 간접 ELISA로 확인하였다. 간접 ELISA는 상기 실시예 3의 방법으로 수행하였으며, CD20와 CD55에 모두 우수한 결합력을 나타냈다 (도 10a 및 10b). 특히 SBU 형태의 CD20 X CD55 이중항체는 CD20에 대하여 Macor 가 저술한 선행 문헌에 개시된 형태의 CD20 X CD55 이중항체보다 높은 친화도를 나타냈고, CD55에 대하여 Macor가 저술한 선행 문헌에 개시된 형태인 CD20 X CD55 이중항체와 비슷한 친화도를 나타냈다. CD20이 과발현되는 혈액암 치료제로 사용 가능한 CD20 X CD55 이중항체는 CD20에 대한 친화도가 더 높은 SBU 형태의 CD20 X CD55 이중항체가 더 효과적인 것이다.

[0208] 실험예 11-4. BJAB에서 CD20 X CD55 이중항체의 세포 사멸능 확인

[0209] 상기 실험예 10-1의 방법으로 CD20 X CD55 이중항체의 세포사멸능을 확인하였다. 샘플 당 5x10⁵개의 BJAB 세포에 리톡시맵을 20 μg/ml, 병용투여 효과 확인을 위하여 EP-10H와 리톡시맵 각각 20 μg/ml, 그리고 CD20 X CD55 이중항체 중 Macor가 저술한 선행 문헌에 개시된 형태와 SBU 형태를 각각 20 μg/ml 농도로 20% complement sera human (Sigma, 미국)이 첨가된 RPMI 배지로 희석하여 최종 100 μl를 처리하였다. 그 외는 실험예 10-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0210] 그 결과, 리톡시맵에 반응성이 낮은 BJAB 세포에서 CD20 X CD55 이중항체는 complement sera human만 처리한 control 대비 유의적인 차이의 세포사멸능을 나타냈으며, SBU는 특히 리톡시맵 대비 유의적인 차이의 세포사멸능을 나타냈다(도 11a 및 11b). 이러한 결과는 서로 다른 항원을 타겟하는 두개의 항체를 병용투여 하는 것에 비해 두 항원을 동시에 타겟할 수 있는 하나의 이중항체가 암세포에 대한 CDC 유도에 보다 효과적이며, 대표적인 CD20 X CD55 이중항체인 Macor 이중항체보다도 본 발명의 SBU가 암세포에 대한 CDC 유도에 보다 적합함을 의미한다. 또한 SBU 형태의 CD20 X CD55 이중항체는 B 세포 림프종 중 악성으로 알려진 버킷 림프종의 효과적인 치료제가 될 수 있다.

[0212] 실험예 11-5. Ramos에서 CD20 X CD55 이중항체의 세포 사멸능 확인

[0213] 상기 실험예 11-4의 방법으로 Ramos 세포주에서 CD20 X CD55 이중항체의 세포사멸능을 확인하였다(도 12a 및 12b). 그 결과, 리톡시맵 반응성 Ramos 세포에서 CD20 X CD55 이중항체는 리톡시맵 대비 유의적인 차이의 세포사멸능을 나타냈다. 또한 Macor의 이중항체보다 본 발명의 SBU가 우수한 세포사멸능을 나타냈다. 이러한 결과는 CD20 X CD55 이중항체는 리톡시맵 반응성 암종에서 리톡시맵 보다 효과적인 항암 효과를 나타낼 수 있으며, CD20이 발현된 혈액암에서 SBU는 CD20 X CD55 이중항체 중 효과적인 치료제로 적용될 수 있음을 의미한다.

[0215] 실험예 11-6. Ramos-RR에서 CD20 X CD55 이중항체의 세포 사멸능 확인

[0216] 상기 실험예 11-4의 방법으로 Ramos-RR 세포주에서 CD20 X CD55 이중항체의 세포사멸능을 확인하였다(도 13a 및 13b). 그 결과, 리톡시맙에 반응성을 나타내지 않는 Ramos-RR 세포에서 CD20 X CD55 이중항체는 리톡시맙 대비 유의적인 차이의 세포사멸능을 나타냈다. BJAB 세포주의 결과와 동일하게 이중항체 중에서도 Macor의 이중항체 보다 본 발명의 SBU가 월등히 우수한 세포사멸능을 나타냈다. 이러한 결과는 SBU 형태의 CD20 X CD55 이중항체는 CD20이 발현된 혈액암 중에서 리톡시맙 내성을 나타내는 암종에 효과적인 치료제로 적용될 수 있음을 의미한다.

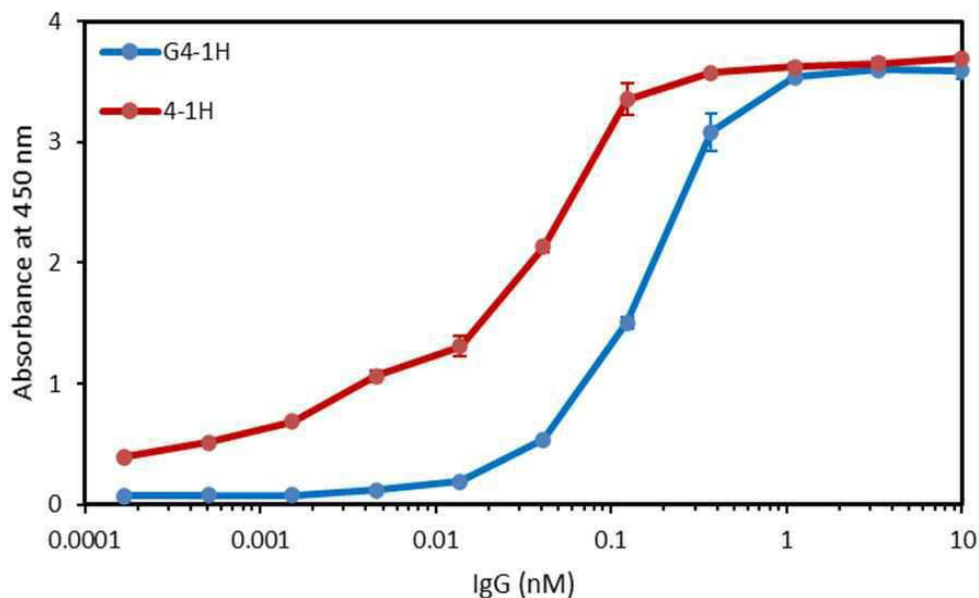
[0218] 실험예 11-7. SBU 형태의 CD20 X CD55 이중항체의 CDC 활성화 분석

[0219] 상기 실험예 11-5에서 Ramos-RR 세포 펠렛의 유세포 분석 전 리톡시맙과 SBU 형태의 CD20 X CD55 이중항체를 처리한 상등액을 취하여 CDC 활성화를 분석하였다(도 14). CDC 기작은 C1q가 항체와 결합을 하는 것을 매개로 일어나는 반응으로써, 그의 부산물인 C4d의 생산량을 토대로 전체 CDC 과정 중의 중간단계에서 활성화 분석이 가능하다. 각각의 상등액에서 C4d 생산량을 확인할 수 있는 ELISA kit (Quidel, 미국)를 통하여 분석하였을 때, SBU 형태의 CD20 X CD55 이중항체를 처리한 상등액에서 리톡시맙을 처리한 상등액에 비하여 많은 C4d가 생산되었고 그 차이는 유의적이었다. 이러한 결과는 SBU CD20 X CD55 이중항체의 우수한 세포 사멸능은 CDC 활성화 기작에 의한 것임을 분명히 보여준다.

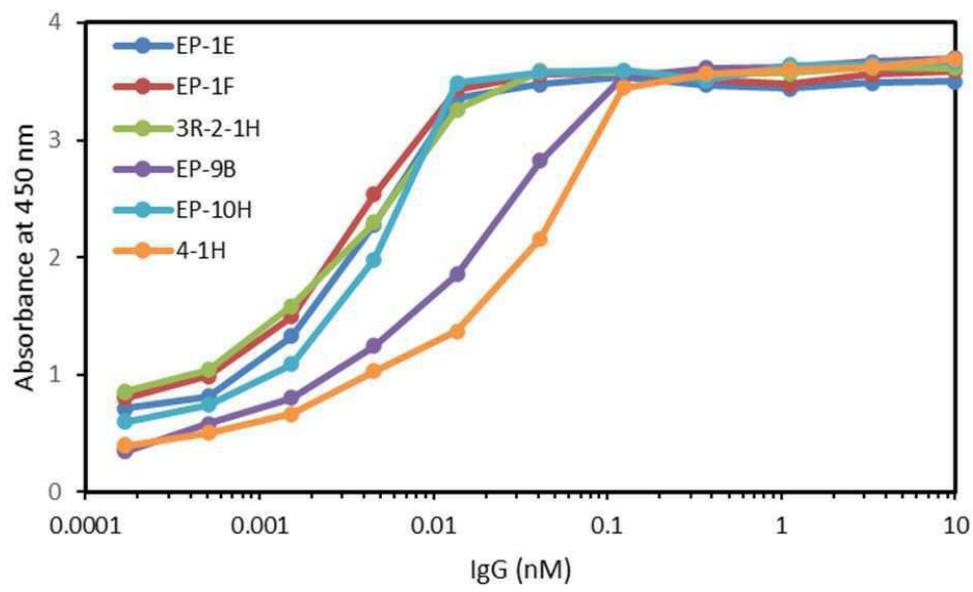
[0221] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

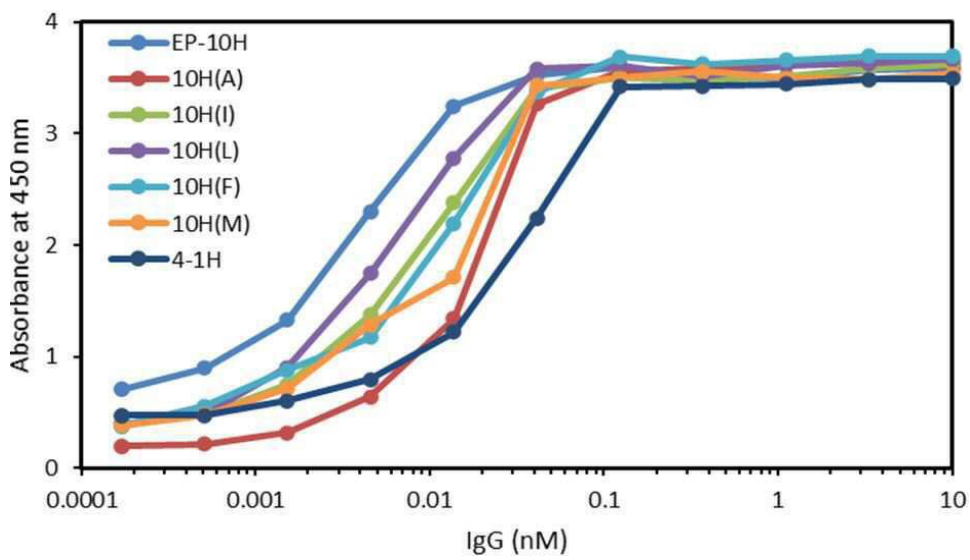
도면1



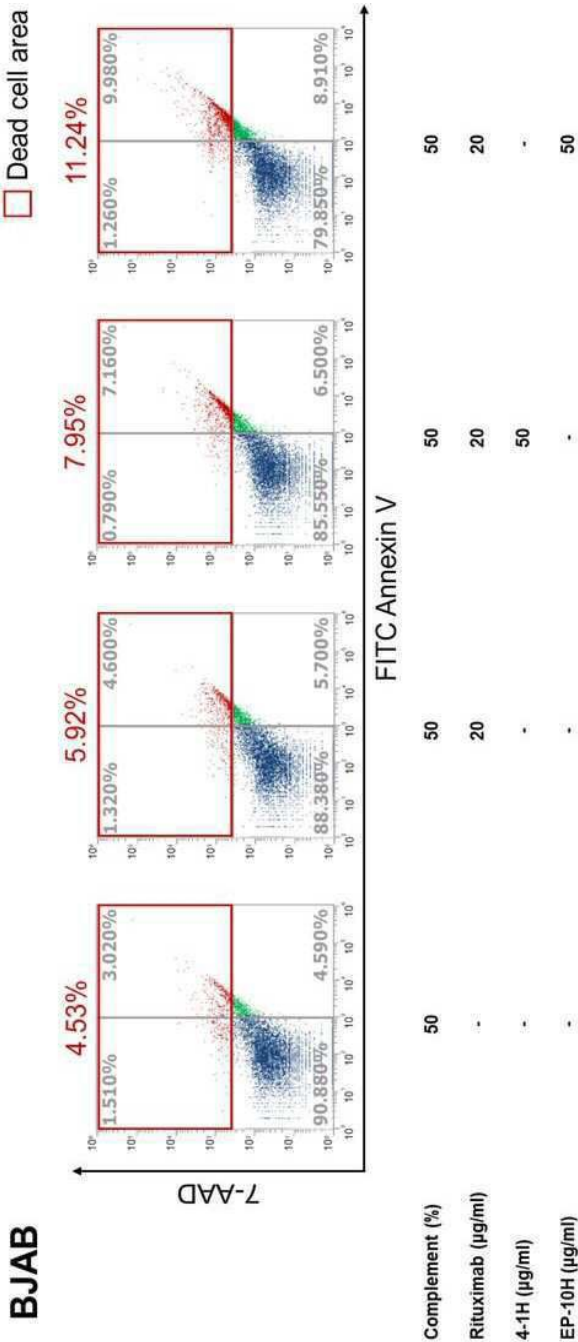
도면2



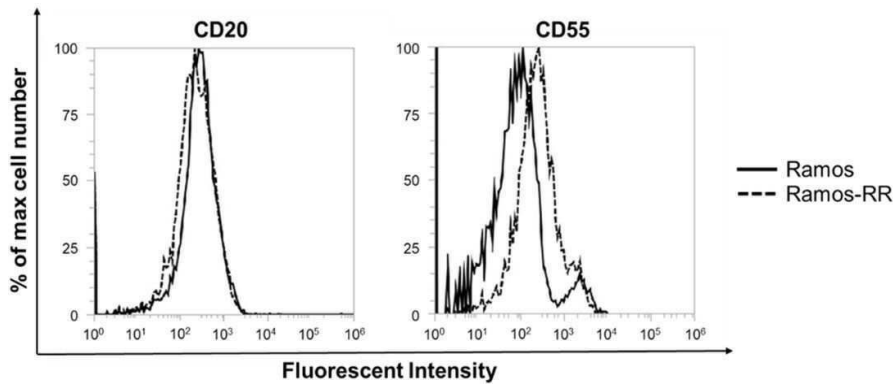
도면3



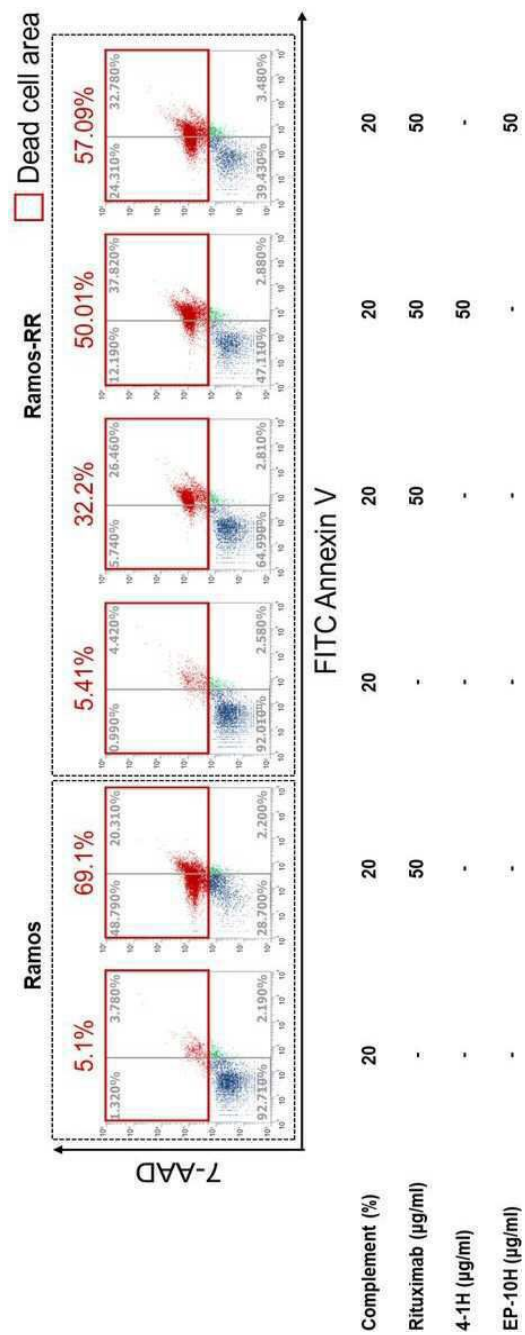
도면4



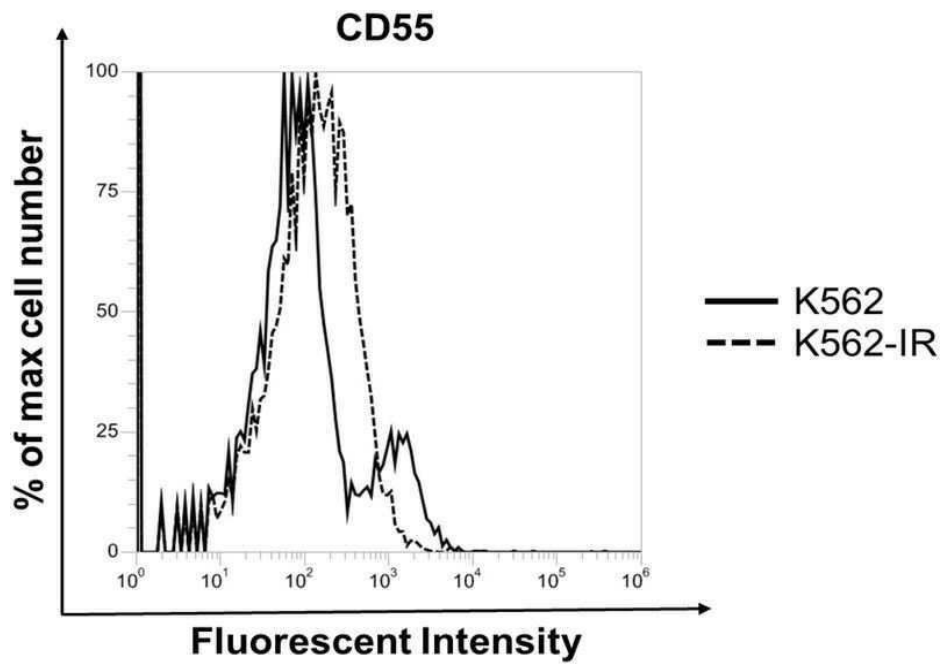
도면5a



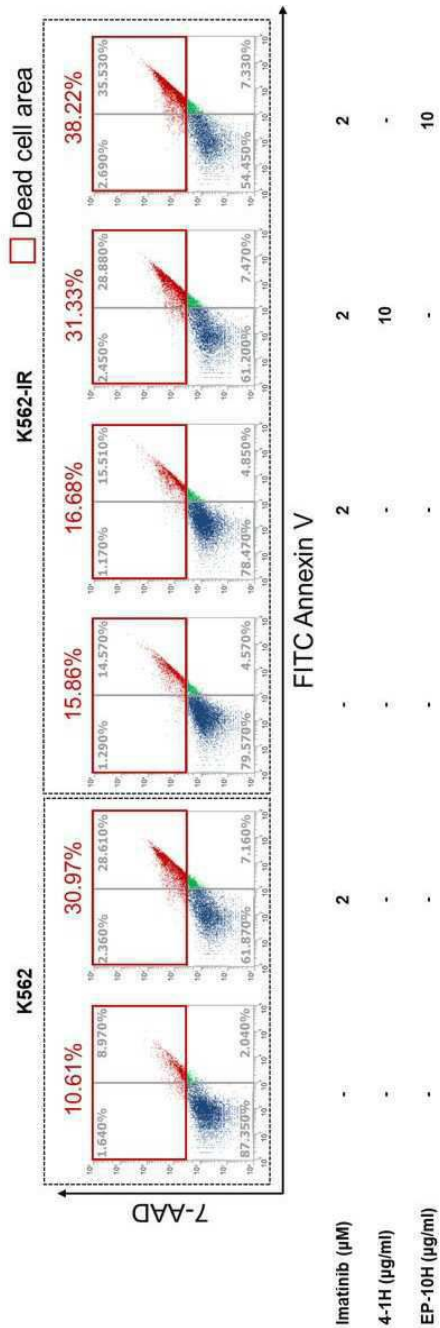
도면5b



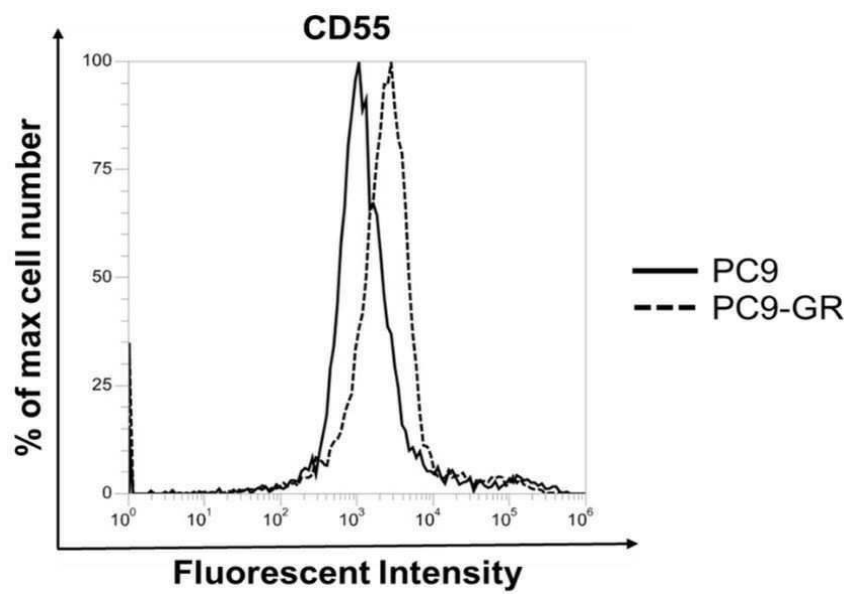
도면6a



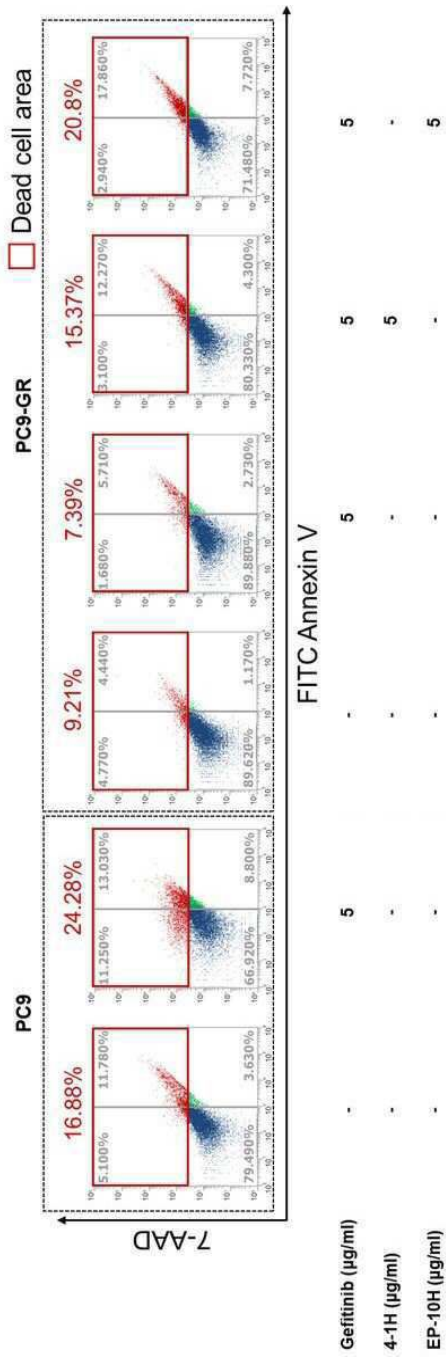
도면6b



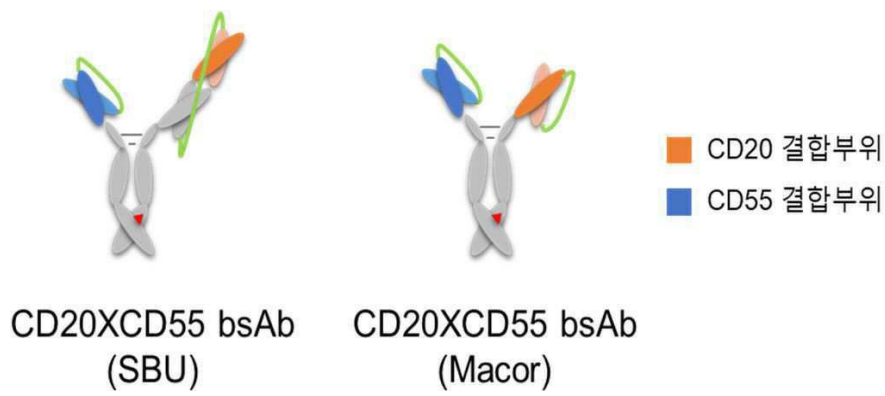
도면7a



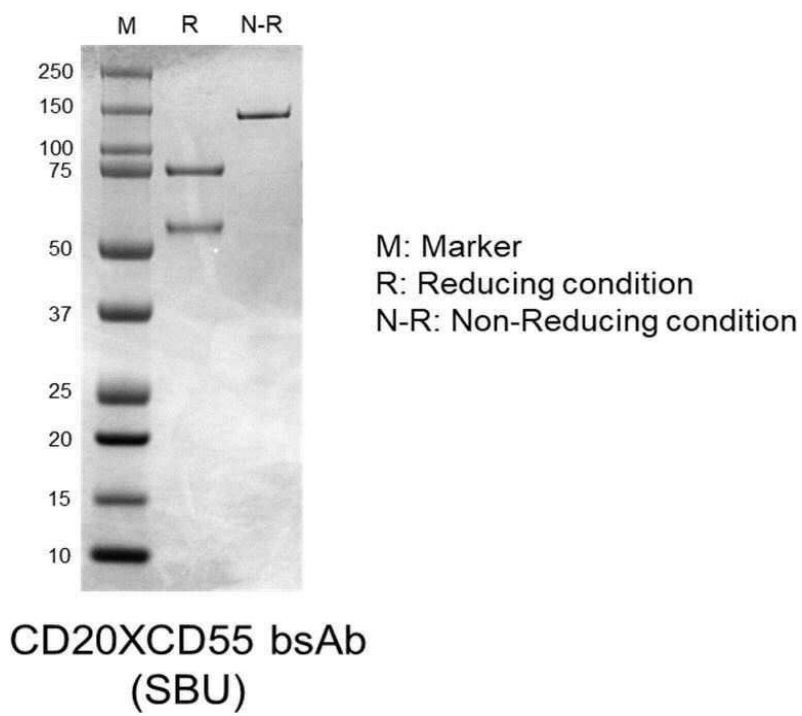
도면7b



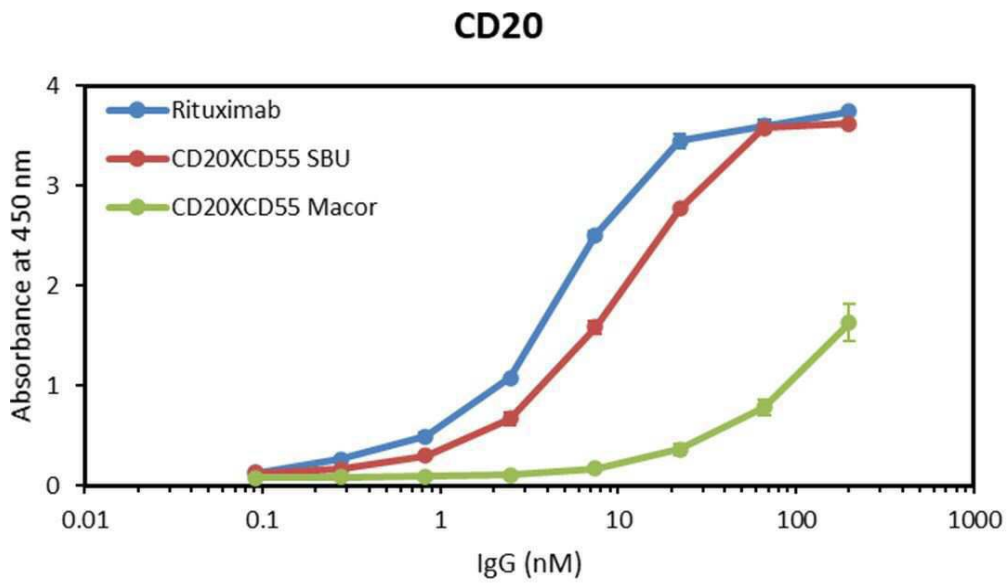
도면8



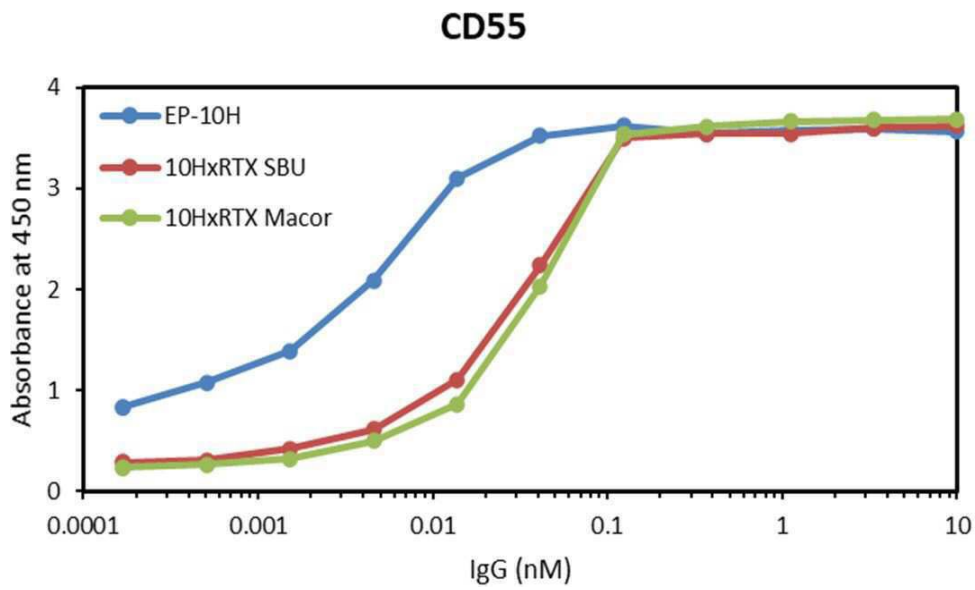
도면9



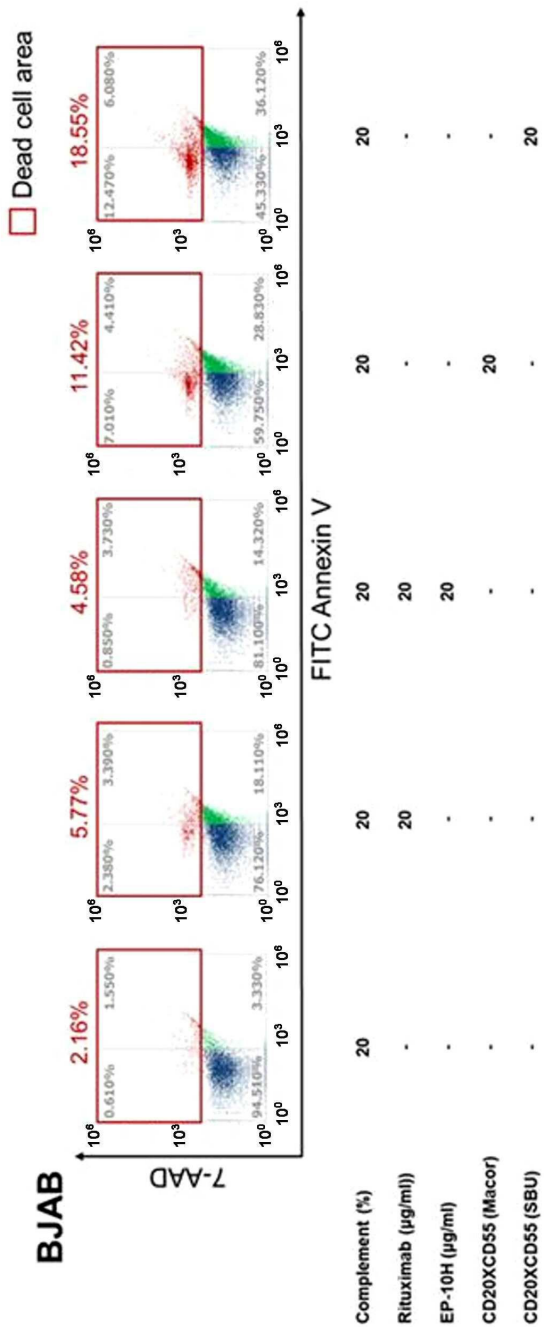
도면10a



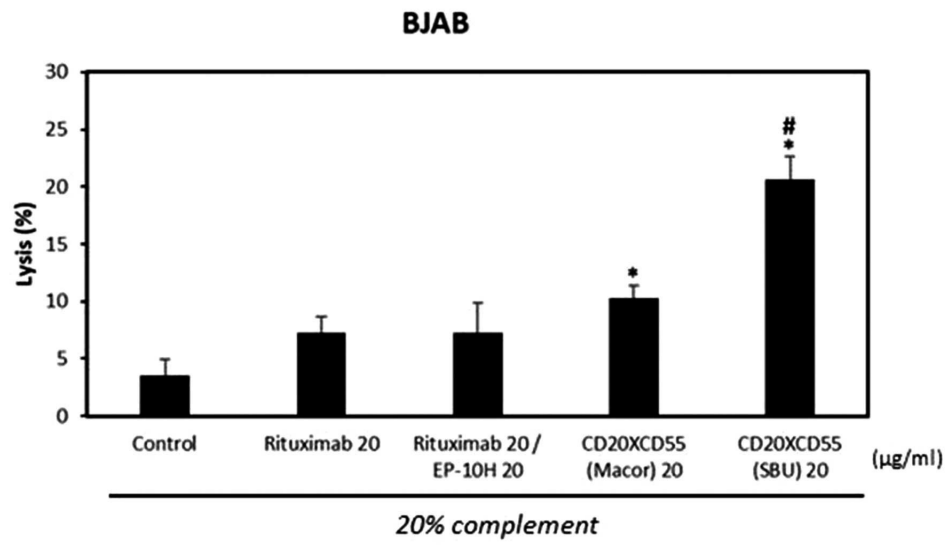
도면10b



도면11a



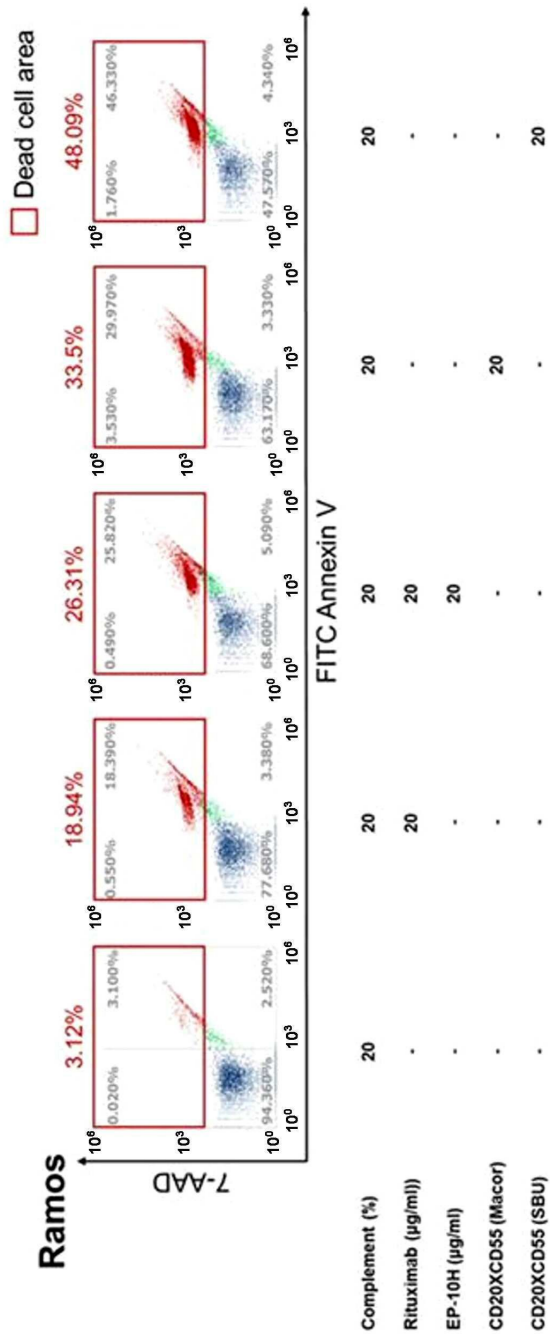
도면11b



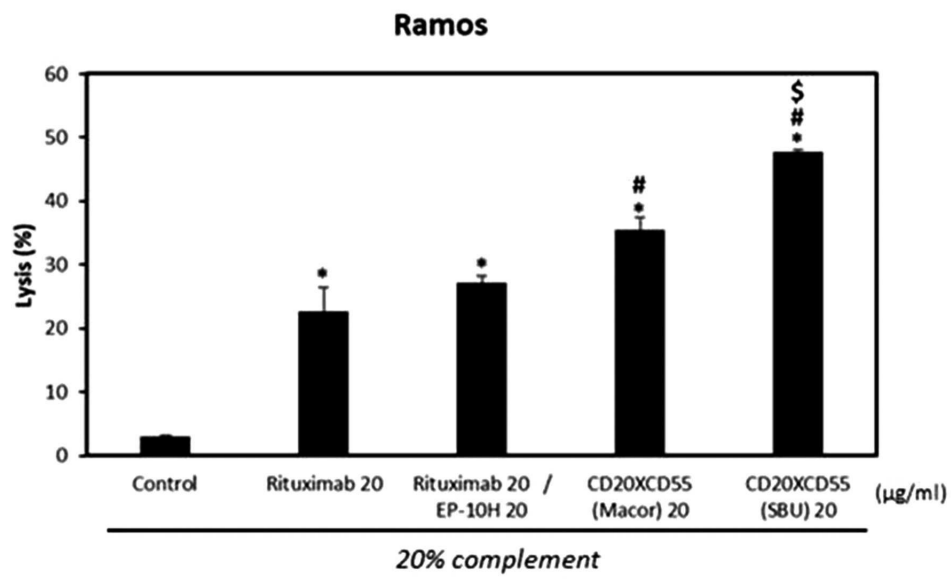
*Significantly different in comparison with the Control ($P<0.05$).

#Significantly different in comparison with the Rituximab ($P<0.05$).

도면12a



도면12b

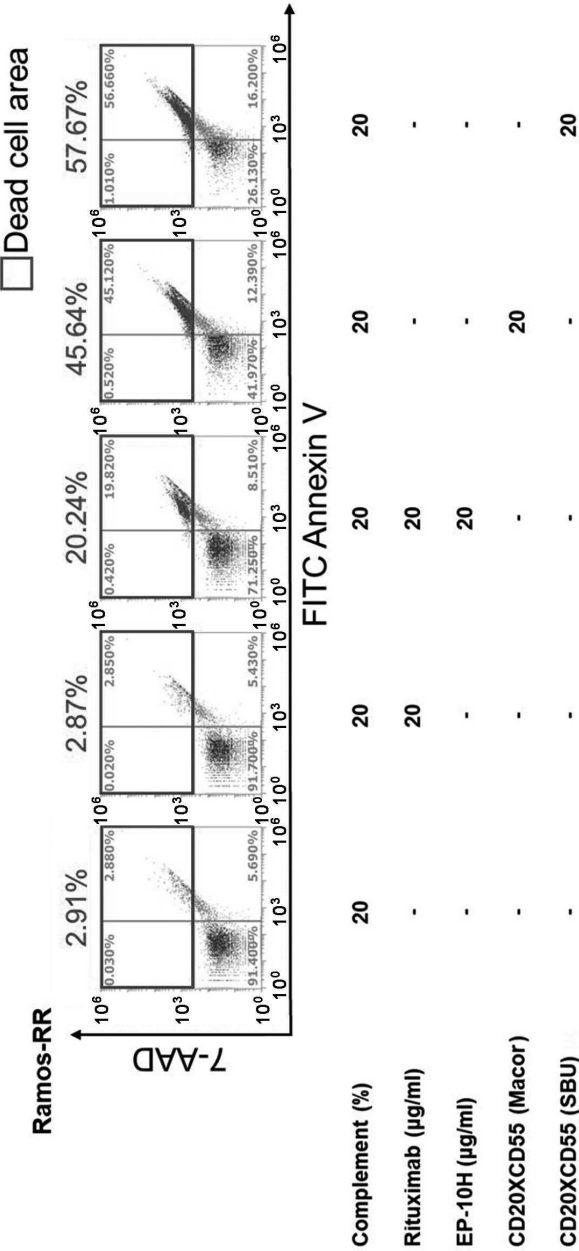


*Significantly different in comparison with the Control ($P<0.05$).

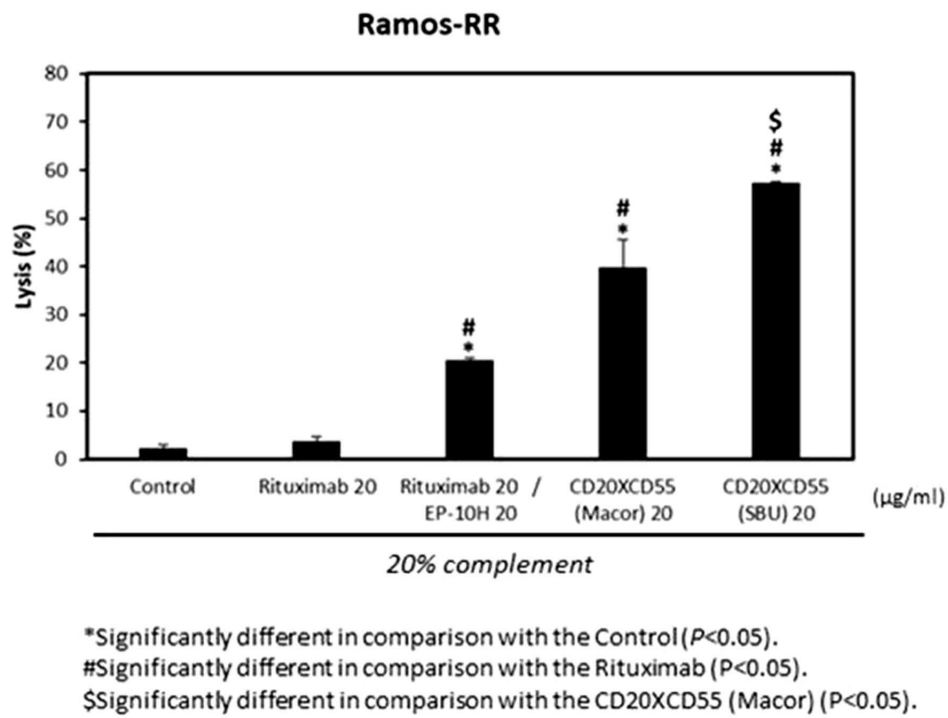
#Significantly different in comparison with the Rituximab ($P<0.05$).

\$Significantly different in comparison with the CD20XCD55 (Macor) ($P<0.05$).

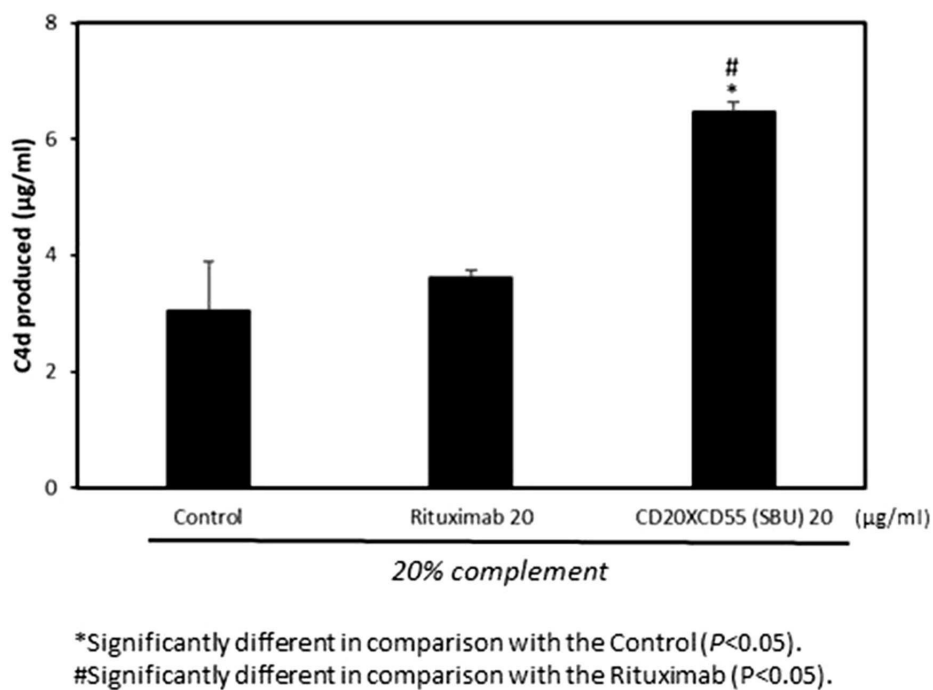
도면13a



도면13b



도면14



서열목록

- <110> SG medical
- <120> A Novel Antibody Specific for CD55 and Use Thereof
- <130> HPC-10439
- <150> KR 10-2021-0004196

<151> 2021-01-12
 <160> 48
 <170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCDR2
 <400> 1
 Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1
 <400> 2
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3
 <400> 3
 Gly Gly Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Ala Ile
 1 5 10

<210> 4
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> G4-1H_VL
 <400> 4

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Gly Trp Tyr
20 25 30

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Thr Val Ile Tyr Trp Asn Asp
35 40 45

Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
50 55 60

Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala
65 70 75 80

Asp Tyr Tyr Cys Gly Gly Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Ala Ile Phe Gly

85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100

<210> 5

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G4-1H_VH

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg
20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Asn Ala Gly Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G4-1H VH F primer

<400> 6

cttcctgtca gtaactacag gtgtccactc ccaggtgcaa ctgcagcagt c 51

<210> 7

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G4-1H VH R primer

<400> 7

ccagcgtgac cgtatccagc gcctccacca agggcccca 39

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G4-1H CH F primer

<400> 8

gcctccacca agggccc 17

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G4-1H CH R primer

<400> 9

tccccggca agtgagcggc cgctcac 27

<210> 10

<211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G4-1H HC F primer
 <400> 10
 cagaattcac tctaaccatg gaatggagct gggctcttct cttcttctg tcagtaacta 60

 cag 63
 <210> 11
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G4-1H VL F primer
 <400> 11
 ggtcttttga tacatgttgc tgtggttgc tgggttgaa ggaagctacg agctgacac 59
 <210> 12
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G4-1H VL R primer
 <400> 12
 caagctcacc gtcttgcgga ccgtggcc 28
 <210> 13
 <211> 20
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G4-1H CK F primer
 <400> 13
 cggaccgtgg ccgccccctc 20
 <210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G4-1H CK R primer

<400>	14	
cggggcgagt gctagttcta gaacta		26
<210>	15	
<211>	100	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	G4-1H LC F primer	
<400>	15	
gggaattcta gaggatcgaa ccctttgcaa gcttcggcac gagcagacca gcatgggcat		60
caagatggag acacattctc aggtctttgt atacatgttg		100
<210>	16	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	scFv primer 1	
<400>	16	
acactttatg cttccggc		18
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	scFv primer 2	
<400>	17	
caaaatcacc ggaaccagag		20
<210>	18	
<211>	104	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	EP-1E_VL	
<400>	18	
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln		
1 5 10 15		
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Gly Trp Phe		

20 25 30
Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Thr Val Ile Tyr Trp Asn Asn
35 40 45
Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
50 55 60

Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala
65 70 75 80
Asp Tyr Tyr Cys Gly Gly Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Ala Ile Phe Gly
85 90 95
Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100

<210> 19
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> EP-1E_VH

<400> 19
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg
20 25 30
Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val
50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Lys Asn Ala Val Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120
 <210> 20
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EP-1F_VH
 <400> 20
 Glu Val Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg
 20 25 30
 Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Lys Asn Ala Val Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120
 <210> 21
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EP-9B_VH
 <400> 21
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg

20 25 30
 Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Lys Asn Ala Val Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 22

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3R-2-1H_VH

<400> 22

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Arg Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val

50 55 60

Lys Gly Arg Thr Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asn Ala Val Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 23

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH F primer

<400> 23

cttcctgtca gtaactacag gtgtccactc cgaggtccag ctggtc 46

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH R primer

<400> 24

gtgaccgtgt ccagcgcctc caccaaggg 29

<210> 25

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10H(A)_VH

<400> 25

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

Ala Lys Asn Ala Ala Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala

100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 26

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10H(I)_VH

<400> 26

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asn Ala Ile Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala

100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 27

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10H(L)_VH

<400> 27

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asn Ala Leu Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 28

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10H(F)_VH

<400> 28

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asn Ala Phe Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 29

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10H(M)_VH

<400> 29

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asn Ala Met Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 30

<211> 16

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HC1 R primer	
<400>	30	
gtactactgc gccaag		16
<210>	31	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HC2 F1 primer	
<400>	31	
gtactactgc gccaagaacg ccgcggccgg ggggtggcac gc		42
<210>	32	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HC2 F2 primer	
<400>	32	
gtactactgc gccaagaacg ccattgccgg ggggtggcac gc		42
<210>	33	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HC2 F3 primer	
<400>	33	
gtactactgc gccaagaacg ccctggccgg ggggtggcac gc		42
<210>	34	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HC2 F4 primer	
<400>	34	
gtactactgc gccaagaacg ccatggccgg ggggtggcac gc		42

<210> 35
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HC2 F5 primer
 <400> 35
 gtactactgc gccagaacg cctttgccgg ggggtggcac gc 42
 <210> 36
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD55-scFv-knob_VL F primer
 <400> 36
 cagcgcgcac tccagctacg agctgacaca gcc 33
 <210> 37
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD55-scFv-knob_VL R primer
 <400> 37
 gaccaagctc accgtcttgg gcggaggcgg gagggtgggt ggcggtagcg gtggaggagg 60
 c 61
 <210> 38
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD55-scFv-knob_VH F primer
 <400> 38
 gtggaggagg cagtggatct ggcggctctg aggtccagct ggtcg 45
 <210> 39
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD55-scFv-knob_VH R primer

<400>	39	
ggcacaaccg tgaccgtgtc cagcggcggc tcagacaaaa ctcacac		47
<210>	40	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CD55-scFv-knob_CH F primer	
<400>	40	
cgtgtccagc ggcggctcag acaaaactca cacatgc		37
<210>	41	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CD55-scFv-knob_CH R primer	
<400>	41	
ctctccctgt ccccggttaa atgactagaa cta		33
<210>	42	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CD20-Fab-hole VL-CK F primer	
<400>	42	
cgcagcgagc gcgcactccc agattgtcct gtctcagtct cctgc		45
<210>	43	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CD20-Fab-hole VL-CK R primer	
<400>	43	
cggccgccgt gcgagatctt ttgatttcca gtttagttcc gccg		44
<210>	44	
<211>	23	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD20-Fab-hole VH F primer

<400> 44

caagtccaac tgcaacaacc ggg 23

<210> 45

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD20-Fab-hole VH R primer

<400> 45

ggaagaccga tgggcccttg aagctagcgg cggaaccgt tgtgccagag 50

<210> 46

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD20-Fab-hole CH F primer

<400> 46

gcaagcttca agggc 15

<210

> 47

<211> 477

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD55-scFv-knob

<400> 47

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Gly Trp Tyr

20 25 30

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Thr Val Ile Tyr Trp Asn Asp

35 40 45

Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly

50

55

60

Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala
 65 70 75 80
 Asp Tyr Tyr Cys Gly Gly Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Ala Ile Phe Gly
 85 90 95
 Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 115 120 125

 Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 130 135 140
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg Gly Met Ala Trp
 145 150 155 160
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser
 165 170 175
 Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val Lys Gly Arg Ala
 180 185 190
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn

 195 200 205
 Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn Ala
 210 215 220
 Val Ala Gly Gly Trp His Ala Ala Tyr Ile Asp Ala Trp Gly Gln Gly
 225 230 235 240
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 245 250 255
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 260 265 270

 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 275 280 285
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 290 295 300
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 305 310 315 320

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
325 330 335
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
340 345 350
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
355 360 365
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
370 375 380
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
385 390 395 400
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
405 410 415
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
420 425 430
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
435 440 445
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
450 455 460
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475
<210> 48
<211> 706
<212> PRT
<
213> Artificial Sequence
<220><223> CD20-Fab-hole
<400> 48
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Arg Thr Ala Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
210 215 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ser Gln
245 250 255

Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
260 265 270

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

275 280 285

Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly

290 295 300
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 305 310 315 320
 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 325 330 335
 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 340 345 350

 Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala
 355 360 365
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Phe Lys Gly Pro Ser Val
 370 375 380
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 385 390 395 400
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 405 410 415
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

 420 425 430
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 435 440 445
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 450 455 460
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 465 470 475 480
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 485 490 495

 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 500 505 510
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 515 520 525
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 530 535 540
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

610 615 620

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

625 630 635 640

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

645 650 655

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp

660 665 670

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

675 680 685

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

690 695 700

Gly Lys

705