(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
C07K 16/18
G01N 33/68

(11) 공개번호 10-2005-0010081
(43) 공개일자 2005년01월26일

(21) 출원번호 10-2005-7000518 (분할)
(22) 출원일자 2005년01월11일
(62) 원출원 특허 10-1998-0709523
원출원일자 : 1998년11월24일 심사청구일자 2002년05월20일
번역문 제출일자 2005년01월11일
(86) 국제출원번호 PCT/GB1997/001412 (87) 국제공개번호 WO 1997/45544
(86) 국제출원출원일자 1997년05월23일 (87) 국제공개일자 1997년12월04일

(30) 우선권주장 9610967.3 1996년05월24일 영국(GB)

(71) 출원인 필로젠 에스.알.엘.
이탈리아, 아이-53100 시에나, 비아 로마 22

(72) 발명자 네리다리오
스위스 체하-8093 쮜리히 에흐-휀게르베르크 인스티튜트 퓌어 몰레큘라르비올로지 운트 비오피지크

카르네몰라바르바라
이탈리아 아이-16132 제노바 라르고 로산나 벤치 10 인스티튜트 나찌오날레 페르 라 리체르카 술 칸크로 라보라토리오 디 비올로지아 첼룰라레

시리아날리지
이탈리아 아이-16132 제노바 라르고 로산나 벤치 10 인스티튜트 나찌오날레 페르 라 리체르카 술 칸크로 라보라토리오 디 비올로지아 첼룰라레

발차엔리카
이탈리아 아이-16132 제노바 라르고 로산나 벤치 10 인스티튜트 나찌오날레 페르 라 리체르카 술 칸크로 라보라토리오 디 비올로지아 첼룰라레

카스텔라니파트리치아
이탈리아 아이-16132 제노바 라르고 로산나 벤치 10 인스티튜트 나찌오날레 페르 라 리체르카 술 칸크로 라보라토리오 디 비올로지아 첼룰라레

피니알레산드로
이탈리아 아이-53100 시에나 센트로 디다티코 록. 레 스코테 유니베르시따 디 시에나 디파르티멘토 디 비올로지아 몰레콜라레

자르디루치아노
이탈리아 아이-16132 제노바 라르고 로산나 벤치 10 인스티튜트 나찌오날레 페르 라 리체르카 술 칸크로 라보라토리오 디 비올로지아 첼룰라레

윈터그레그
영국 캠브릿지 씨비2 2큐에이치 힐즈 로드 엠알씨 센터 캠브릿지 센터 포 프로테인 엔지니어링

네리지오반니

이탈리아 아이-53100 시에나 센트로 디다티코 록. 레 스코테 유니베르시따 디 시에나 디파르티멘토 디 비올로지아 몰레콜라레

보르시라우라
이탈리아 아이-16132 제노바 라르고 로산나 벤치 10 인스티튜트 나찌오날레 페르 라 리체르카 술 칸크로 라보라토리오 디 비올로지아 첼룰라레

(74) 대리인 이영필

심사청구 : 있음

(54) 피브로넥틴 ED-B 도메인에 대한 항체, 그 제조방법 및용도

요약

본 발명에서는 피브로넥틴(FN)의 종양 태아 도메인에 특이성이 있고 여기에 직접 결합하는 특이적 결합 요소가 제공된다. 또한 본 발명에서는 상기 요소를 생산하는 물질 및 생산방법이 제공된다.

대표도

도 1a

색인어

ED-B, 피브로넥틴, 항체

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 scFv CGS-1 및 CGS-2의 VH 및 VL에 대한 아미노산 서열을 정렬시켜 도시한 것이다. 도 1(a)는 VH 서열을 도시한 것이고; 도 1(b)는 VL 서열을 도시한 것이다. CDR(1, 2 및 3)이 표시되어 있다. 상기 두 종류의 scFv에 대해 가장 상동성이 있는 인간의 점라인(germline) VH는 VH3 류의 DP47 절편이고; 상기 두 클론에 대해 가장 상동성 있는 VL 절편은 DPL16인데, 이는 원래의 scFv 라이브러리를 형성하는데 사용된 경사슬이다(Nissim 등, 1994). 상기 두 개의 클론을 구별시키는 잔기를 밑줄로써 표시하였다.

도 2중 도 2a는 인간의 FN 서브유니트 도메인 구조 모델을 도시한 것이다. 상기 FN pre-mRNA의 선택적 스프라이싱으로 인해 생성된 IIICS, ED-A 및 ED-B 가변 영역이 표시되어 있다. 도 2에는 또한 내부 상동성 뿐 아니라 ED-B를 포함하는 터몰리신의 주요 분해(digestion) 산물(Zardi 등, 1987)이 표시되어 있다. 도 2b는 혈장과 WI38VA FN에 대한 4-18%의 SDS-PAGE, 쿠마실 블루로 염색된 터몰리신 분해물 및 BC-1, IST-6, CGS-1 및 CGS-2로 탐침된 면역점을 보이고 있다. 분해되지 않은 혈장 FN(레인 1)과 1μg/㎎의 FN(레인 3) 및 10μg/㎎의 FN(레인 4) 농도에서 터몰리신을 이용하여 분해시킨 혈장 FN이 나타나 있다. 분해되지 않은 혈장 FN(레인 2)과 1μg/㎎의 FN(레인 5), 5μg/㎎의 FN(라인 6) 및 10μg/㎎의 FN(레인 7) 농도에서 터몰리신을 이용하여 분해시킨 WI38VA FN이 나타나 있다. 오른쪽에 나타나 있는 숫자는 도 2a에 도시된 터몰리신 분해 산물을 나타내는 것이다. 왼쪽에 있는 수치는 킬로달톤(kD)으로 표시된 분자량 기준을 나타내는 것이다.

도 3중 도 3a는 E. coli에서 발현된 융합 단백질 및 재조합 단백질에 포함되어 있는 FN III형 반복 서열 및 CGS-1, CGS-2, mAbs BC-1 및 IST-6에 대한 상기 단백질의 반응성을 도시한 것이다. 도 3b는 쿠마실 블루로 염색된 겔 및 그 옆에 나란히 도시되어 있는 CGS-1, CGS-2, BC-1, IST-6으로 탐침된 면역점을 도시한 것이다. 레인에 매겨져 있는 번호는 도면의 상부에 있는 펩티드 구조체의 번호에 상응 하는 것이다. 왼쪽에 있는 수치는 kD으로 표시된 분자량 기준을 나타낸 것이다.

도 4는 적외선 마우스 이미징장치를 도시한 것인데; 표적화 실험에 사용된 마우스 이미징장치는 텅스텐 할로겐 램프

가 장착되어 있는 검은색의 비형광성 상자, CY7 적외선 형광단에 대해 특이성이 여기 및 방사 필터 및 컴퓨터로 제어되는 8-비트 단색 CCD-카메라로 이루어져 있다.

도 5는 B-FN에 대한 단량체 scFv(CGS-1) 및 이량체 scFv(CGS-1)2를 이용하여 형광표지된 항체 단편을 쥐의 F9 기형암종에 표적화시킨 것을 도시한 것이다. 리소자임에 대해 결합 특이성을 갖는 이량체 scFv(D1.3)2를 음성 대조군으로 사용하였다.

도 6은 B-FN의 동일 에피토프에 대해 친화성이 충분한 scFv(CGS-2) 및 친화성이 낮은 scFv(28SI)를 이용하여 형광표지된 항체 단편을 쥐 F9 기형종양에 표적 화시킨 것을 도시한 것이다. 부분적으로 영상을 흐리게만드는 블랙 크러스트를 사용하여 48시간에 걸쳐, 큰 종양(약 0.6g) 및 작은 종양(약 0.2g)에서의 표적화를 검출(측정)하였다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은, 피브로넥틴의 태아성 동형(foetal isoform)인 ED-B와 특이적으로 결합하는 요소에 관한 것으로, 상기 ED-B는 형성중인 종양의 신생혈관에서 발현되는데, 이는 면역세포화학 및 생체내 종양 표적화 연구에 의해 증명된다. 또한 본 발명은 상기 특이적 결합 요소 (specific binding member)의 생산과 관련된 물질 및 그 생산 방법에 관한 것이다.

현재의 종양 치료법들의 일차적인 목표는 가능한 한 많은 종양 구성 세포들을 죽이는 것이다. 화학요법과 방사선요법에서 경험한 성공의 한계는, 상대적으로 특이성이 결여된 치료방법과 정상조직에 대한 독성 부작용 경향과 관련있다. 치료법의 종양 선택성을 개선하기 위한 한가지 방법은, 종양 세포표면에서 발현되는 마커 항원에 대해서는 특이성이 있으나 정상 세포에 대해서는 특이성이 없는 항체에 대한 결합 도메인을 통상적으로 포함하고 있는 결합 단백질을 이용하여 치료제를 종양부위까지 운반하는 방법이다. 이러한 형태의 표적화 요법은, 대충 '마술총(magic bullet)'이라 불리는데, 이 요법은 세포 표면에서 발현되는 일명 종양-관련(associated) 항원에 특이성이 있고 설치류로부터 얻어지는 단일클론 항체(mABs)에 의해 주로 예시되어 왔다. 이러한 mABs는, 세포독성 성분(예를 들어, 독소 또는 약물)에 화학적으로 컨쥬게이트되어 있거나 재조합 융합 단백질로서 생산될 수 있는데, 여기서 mAB와 독소를 코딩하는 유전자가 함께 연결되어 나란히 발현된다.

상기 '마술총' 접근 방법은, 인간의 암을 치료하는데 현저하고도 제한된 효과를 가지고 있다. 효과가 가장 두드러지는 경우가 임파 기원의 종양을 표적화하는 경우인데, 악성 세포는 순환을 통해 가장 자유롭게 치료용량에 접근하게 된다. 그러나, 고형 종양의 치료는 심각한 임상 문제로 남아있는데, 그 이유는 전체 세포 덩어리중 미소한 부분만이, 주로 종양의 최외층 말단에 있는 세포만이 순환중인 면역접합체에 노출되기 때문이다; 이러한 말초 표적은 종양 내부에 대한 일명 '결합 부위 장벽'을 형성한다(Juweid 등, 1992, *Cancer Res.* 52, 5144-5153). 고형 종양 내부는 조직 구조가 일반적으로 섬유간질과 밀집된 종양 세포로 인해 밀도가 너무 높아서 항체 정도의 크기를 갖는 분자가 통과할 수 없다. 더욱이, 고형 종양은 임파성 방출계가 결여되어 있어 간질내압이 상승되어 있는 것으로 알려져 있는데, 이로 인해 외부 분자의 유입이 방해를 받는다. 치료제가 종양부위로 흡수(uptake)되는데 영향을 미치는 인자에 관한 최근의 보고서로는 제인의 논문을 참조할 수 있다(Jain, R(1994), *Sci. Am* . 271, 58-65).

종양-관련 항원을 표적화하는 방법으로 고형 종양을 치료하는데는 분명히 한계가 있긴 하지만, 고형 종양은 항체 요법에 대해 또 다른 항원 표적을 제공하는 공통 특성을 갖는다. 종양이 일단 일정 크기 이상으로 성장하면, 일반적으로 성장에 필요한 적절한 산소 및 영양소의 공급을 위해 독자적인 혈액 공급에 의존한다. 만일 이러한 혈액 공급이 방해를 받거나 폐쇄되면, 성장중에 있는 수천의 종양 세포들이 실제로 굶어죽게 될 가능성이 있다. 종양은 성장함에 따라, 혈관형성 표현형으로 전환되어, 인접하는 모세혈관의 내피세포에 작용하는 다양한 항원 인자들을 생산하고 이들의 증식 및 이주를 유도한다. 이러한 신생 혈관의 구조는 조직화가 되어 있지 않아서 말단부가 보이지 않고 혈관에 구멍이 있어 누출이 증가되는데, 이는 정상 조직의 규칙적인 모세혈관과 두드러지게 대조되는 점이다. 일부 세포 표면 항원의 발현이 증가됨으로써 신생혈관 생성이 유도되는데, 상기 세포 표면 항원중 다수는 정상 조직의 혈관에도 공통적으로 존재한다. 종양 신생혈관에 독특한 항원을 확인하는 문제가 혈관 표적화를 통해 고형 종양을 치료하는 방법을 발전시키는데 있어 제한 요소가 되어왔다. 본 발명의 주제가 되는 항원은 이러한 문제를 직접적으로 해결하고 있다.

종양이 진행되는 동안, 주위 조직의 세포외 간질은 다음 두가지 주요 과정을 통해 재모델링된다: (1) 정상 조직에 있는 세포외 간질 성분의 단백분해 (2) 종양 세포 및 종양-유도 시토킨에 의해 활성화된 간질 세포에 의한 세포외 간질

성분의 새로운 합성. 상기 두가지 과정은, 정상상태에서 '종양성 세포외 간질'을 생성하고 이것은 종양이 진행되는데 더욱 적합한 환경을 제공하게 되는데, 이것이 정상 조직과 질적 양적으로 다른 점이다. 상기 매트릭스 성분 중에는 테나신과 피브로넥틴(FN)의 거대 동형 (large isoform)이 있다; 상기 단백질을 동형으로 기술하는 것은 전사, 전사후 및 번역후 단계에서 발생하는 이들의 강한 구조적 이종성 (heterogeneity)을 인정하는 것이다(후술하는 부분 참조). 본 발명의 주제는, 일명 B+ 동형(B-FN)으로 불리는 피브로넥틴의 동형중 하나이다.

피브로넥틴(FN)은 세포외 간질 및 체액중에 있는 고 분자량의 당단백 성분으로서 다기능성을 갖는다. 이들은 정상 세포 형태의 확립 및 유지, 세포 이주, 항상성 및 혈전증, 상처 치료 및 발암유전자의 형질전환과 같은 서로 다른 여러 생물학적 과정에 관여한다(Alitalo 등, 1982; Yamada, 1983; Hynes, 1985; Ruoslahti 등, 1988; Hynes, 1990; Owens 등, 1986). FN에 있어서 구조적인 다양성은 초기 FN 전사체의 세 영역(ED-A, ED-B 및 IIICS)을 선택적으로 스플라이싱하기 때문인데(Hynes, 1985; Zardi 등, 1987), 이로써 20개 이상의 서로 다른 동형이 생성되고 이중 일부는 종양 및 정상 조직에서 서로 다르게 발현된다. 상기 FN-pre-mRNA의 스프라이싱 패턴은, 조직-특이적 방법 또는 발육-특이적 방법으로 조절될 뿐 아니라 형질전환된 세포 및 악성세포에서는 조절되지 않는다는 것이 알려져 있다(Castellani 등, 1986; Borsi 등, 1987; Vartio 등, 1987, Zardi 등, 1987; Barone 등, 1989; Carnemolla 등, 1989; Oyama 등, 1989, 1990; Borsi 등, 1992b). 사실, ED-A, ED-B 및 IIICS 서열을 포함하는 FN 동형들은 정상 세포에서보다는 형질전환 세포 및 악성 종양 세포에서 더 상당한 정도로 발현된다. 특히, ED-B 서열을 포함하는 FN 동형(B+ 동형)은, 상처 치유 동안 뿐 아니라 태아성조직 및 종양 조직에서는 발현정도가 높으나, 성인의 정상 조직에서의 발현은 제한된다(Norton 등, 1987; Schwarzbauer 등, 1987; Schwarzbauer 등, 1987; Gutman 및 Kornblihtt, 1987; Carnemolla 등, 1989; ffrench-Constant 등, 1989; ffrench-Constant and Hynes, 1989; Laitinen 등, 1991). B+ FN 분자는 성숙된 혈관에서는 검출되지 않으나 정상 조직(예, 자궁내막의 발육), 병소(예, 당뇨병성 망막증) 및 종양 발육 부위의 맥관형성 혈관에서는 상승된다(Castellani 등, 1994).

ED-B 서열은 단일 엑손에 의해 코딩되는 완전한 III형-상동 반복단위이고 91개의 아미노산을 포함한다. 세포-특이적 결합 부위를 포함하는, 택일적으로 스플라이싱된 IIICS 동형과는 달리, A+ 및 B+ 동형의 생물학적 기능은 여전히 고찰되어야 할 문제로 남아있다(Humphries 등, 1986).

B+ 동형 자체의 존재는 종양-유도성 신생항원을 구성하나, 여기에 덧붙여 ED-B의 발현은 III형 반복단위 7(전술한 ED-B)안에 정상적으로는 은폐된 항원을 노출시킨다; 이러한 에피토프는 ED-B가 결여된 FN 분자에서는 노출되지 않으므로 ED-B의 발현은 신생항원의 발현을 직접, 간접적으로 유도한다. 상기 은폐 항원 부위는 BC-1으로 불리는 단일클론 항체(mAb)의 표적이 된다(Carnemolla 등, 1992). 상기 mAb의 특이성 및 생물학적 활성이 EP 0 344 134 B1에 기재되어 있는데, 영국의 세포주 기탁기관(European Collection of Animal Cell Cultures, 살리스버리, 포르톤 다운)에 기탁번호 88042101로 기탁된 하이브리도마로부터 얻을 수 있다. 상기 mAb는 성숙된 혈관 내피에 대한 교차반응성 없이 종양의 맥관형성 혈관을 국재시키는데 성공적으로 사용되어 왔고, 이는 항체를 이용한 혈관 표적화에 있어서의 FN 동형의 잠재성을 보여주는 것이다.

그러나, BC-1 mAb의 특이성에 대해서는 어떤 경고성이 남아있다. BC-1이 B+ 동형을 인식하지 않는다는 사실은, 일부 조직에서 BC-1에 의해 인식되는 에피토프가 ED-B 없이도 노출될 것인지, 그래서 BC-1의 바람직하지 못한 교차반응을 간접적 으로 유도할 것인지에 대한 문제를 불러일으켰다. 더욱이, BC-1은 인간의 B+ 동형에 대해 엄격한 특이성을 가지는데, 이는 동물에 대해 BC-1의 생체분포 및 종양 국재성에 관한 연구를 하는 것이 불가능하다는 것을 의미한다. 비록 B+를 포함하는 재조합 융합 단백질에 대한 다중클론 항체가 생산되었지만(Peters 등, 1995), 상기 항체는 에피토프를 노출시키는 N-글리카나아제로 처리한 FN에만 반응한다.

마우스 단일클론 항체를 사용하는데 있어서 또 다른 일반적인 문제는 인간의 항-마우스 항체(HAMA) 반응이다(Schroff 등, 1985; Dejager 등, 1988). HAMA 반응은 일정 범위의 효과를 갖는데, 투여된 항체를 중화시켜 치료용량을 감소시키는 것에서부터 알러지 반응, 혈청병 및 신장 손상에까지 이른다.

비록 재조합 ED-B에 반응하는 다중클론 항혈청이 확인되었지만(전술한 부분 참조), 마우스 면역후 BC-1의 특이성과 동일한 특이성을 가진 mAb를 분리하는 것은 일반적으로 어렵다는 것이 증명되었는데, 그 이유는 인간과 마우스의 ED-B 단백이 사실상 100%의 서열 상동성을 보이기 때문이다. 따라서, 마우스한테는 인간 단백질이 자기-항원으로 보일 수 있고 이에 대해 면역 반응을 일으키지 않을 수 있다. 사실, 이 분야에서의 10년 이상에 걸친 심도있는 조사 결과, 단일 mAb만이 B+ FN 동형(BC-1)에 대한 간접 반응성을 가지고 있고 직접 ED-B를 인식하지 않는 것으로 확인되었다. 대체적으로 확실히 중요한 것은, BC-1의 특이성이 ED-B 자체의 일부에 대한 것이라기 보다는 ED-B의 결과로 노출된, 은폐 에피토프에 대한 것이라는 사실인데, 상기 에피토프는 마우스의 FN에는 없을 가능성이 크고 따라서 마우스의 면역 시스템에 의해 "자기 항원"으로 인지되지 않을 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 피브로넥틴의 태아성 동형인 ED-B와 특이적으로 결합하는 요소를 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은 상기 요소를 포함하는 약제학적 조성물 및 용도를 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은 상기 요소를 코딩하는 핵산, 및 상기 핵산을 포함하는 숙주세포를 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은 상기 요소를 포함하는 진단 키트를 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은 상기 요소를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은, 이전 방법의 대체방법으로서 피브로넥틴 또는 ED-B로 미리 면역시킬 필요가 없는 치료방법에 의해 구현되었다; ED-B 동형에 특이성이 있는 항체는, 필라멘트성 박테리오파지 표면상의 인간 항체 가변 영역 라이브러리로부터 단일 사슬 Fv(scFv)로서 얻었다(Nissim 등, 1994; WO 92/01047, WO 2/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172).

항체 파지 라이브러리를 사용하여 다음 사실을 알았다; 고형 표면에 항원들이 코팅되어 있는 경우('패닝“), 그 ED-B 도메인을 포함하는 재조합 FN-단편 및 재조합 ED-B 자체상에 있는 것을 직접 선택함으로써 특이적 scFv를 분리할 수 있다. 이러한 동일 소스의 항원들은 또한 “친화성 성숙” 과정을 통해 모체 클론에 비해 성질이 개선된 “2세대” scFv를 생산하는데 성공적으로 사용되어 왔다. 분리된 scFv는 N-글리카나아제로 사전 처리되지 않고도 인간 FN의 B+ 동형과 강하게 그리고 특이적으로 반응한다는 것을 알았다.

항-종양 치료에 적용함에 있어서, 본 발명에서 제공되는 인간 항체의 항원 결합 도메인은 HAMA 반응을 거치지 않는다는 잇점이 있다. 나아가 본 명세서에서 예시한 바와 같이, 상기 본 발명의 항체 항원 결합 도메인은 종양 조직에 대한 생체 내 및 시험관내 면역조직화학 분석에도 유용하다. 이러한 용도 및 기타 용도에 대해서는 이후 더 상세히 설명하기로 하며, 이러한 용도는 당업자에게 명백하다.

용어

특이적 결합 요소

서로 특이적으로 결합하는, 분자쌍 중 한 요소를 말한다. 상기 특이적 결합쌍 요소들은 자연에서 유래할 수도 있고 일부 또는 전부가 합성될 수도 있다. 분자쌍 중 한 요소는 그 표면 또는 강(cavity)에, 분자쌍 중 다른 한 요소의 특정 공간 및 극성 조직(organization)에 특이적으로 결합하고 이에 상보적인 하나의 영역을 갖는다. 따라서 상기 분자쌍 요소는 서로 특이적으로 결합하는 성질을 갖는다. 특이적 결합쌍 종류의 예로는 항원-항체, 비오틴-아비딘, 호르몬-호르몬 수용체, 수용체-리간드, 효소-기질이 있다.

항체

자연적으로 또는 일부 또는 전부가 합성방법을 통해 생성되는 면역글로불린을 말한다. 이 용어는 또한 결합 도메인을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드를 모두 포 함하는데 상기 도메인은 항체 결합 도메인이거나 이에 상동인 도메인이다. 이들은 자연 소스로부터 유래할 수도 있고 부분 또는 전체가 합성방법을 통해 생산될 수도 있다. 항체의 예로는 면역글로불린 동종(isotype) 및 그 동종성 아류들이 있는데; Fab, scFv, Fv, dAb, Fd를 포함하는 단편과; 디아바디(diabody)가 있다.

단일클론 항체 및 다른 항체를 택할 수 있고, 재조합 DNA 기술을 이용하여 다른 항체를 생산하거나 초기 항체의 특이성을 유지하는 키메라 항체를 생산할 수도 있다. 이러한 기술에는, 항체의 면역글로불린 가변 영역 또는 상보성 결정 영역(CDRs)을 코딩하는 DNA를, 다른 면역글로불린의 불변 영역 또는 불변 영역 및 골격(framework)영역으로 도입하는 과정이 포함될 수 있다(EP-A-184187, GB 2188638A 또는 EP-A-239400). 하이브리도마 또는 항체를 생산하는 다른 세포가 유전적 돌연변이 또는 다른 변형의 대상이 될 수 있는데, 상기 변형으로 인해 생산된 항체의 결합 특이성이 달라질 수도 있고 아닐수도 있다.

항체는 여러 방법으로 변형될 수 있기 때문에, “항체”라는 말은 필요한 특이성과 함께 결합 도메인을 포함하는 특이적 결합 요소 또는 물질을 모두 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 그러므로 이 용어는, 자연에서 유래한 것 또는 반합성 또는 전합성된 면역글로불린 결합 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 포함하여, 항체 단편, 유도체, 항체에 대한 기능 동등체 및 상동체를 포함한다. 따라서, 다른 폴리펩티드에 융합된 면역글로불린 결합 도메인 또는 그 동등체를

포함하는 키메라 분자가 포함된다. 키메라 항체의 클로닝 및 발현에 대해서는 EP-A-0120694 및 EP-A-0125023에 기재되어 있다.

전항체(whole antibody) 단편들은 항원 결합 기능을 수행할 수 있는 것으로 밝혀져왔다. 결합 단편의 예로는 (ⅰ) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fab 단편; (ⅱ) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) VH 도메인으로 이루어지는 dAb 단편(Ward 등, 1989); (ⅴ) 분리된 CDR 영역; (vi) 두 개의 연합된 Fab 단편을 포함하는 2가(bivalenat) 단편인 F(ab')2 단편; (vii) VH 도메인과 VL 도메인이 펩티드 연결제에 의해 연결되어 있고 이로써 상기 두 도메인이 연합하여 항원 결합 부위를 형성하고 있는, 단일 사슬 Fv 분자(scFv)(Bird 등, 1988; Huston 등, 1988); (viii) 이특이적 단일 사슬 Fv 이량체(PCT/US92/09965) 및 (ix) 유전자 융합에 의해 구성된 다가 또는 다중특이적 단편인 “디아바디”(WO 94/13804; Holliger 등, 1993)가 있다.

디아바디는 폴리펩티드 다량체로서, 각 폴리펩티드는 면역글로불린 경사슬(light chain)의 결합 영역을 포함하는 제 1도메인과 면역글로불린 중사슬(heavy chain)의 결합 영역을 포함하는 제 2도메인을 포함하고 있고, 상기 두 도메인은 연결되어 있긴하나(예, 펩티드 연결제에 의해) 항원 결합 부위를 형성하기 위해 상호 연합하지는 못한다; 항원 결합 부위는 다량체내에 있는 하나의 폴리펩티드인 제 1도메인과 다량체내에 있는 다른 폴리펩티드인 제 2도메인이 연합함으로써 형성된다(WO 94/13804).

이중특이적 항체가 사용되는 경우, 상기 이중특이적 항체는 종래의 이중특이적 항체로서 예컨대 화학적으로 제조되거나 하이브리드 하이브리도마로부터 제조되는 등의 다양한 방법으로 제조될 수도 있고(Holliger and Winter, 1993), 전술한 이중특이적 항체 단편중 하나일 수도 있다. 전항체를 사용하기 보다는 scFv 이량체 또는 디아바디를 사용하는 것이 바람직하다. 디아바디 및 scFv는 가변 도메인만을 사용하여 Fc영역 없이 구성될 수 있는데, 이로써 잠재적으로 항-유전자형 반응 효과가 감소된다. 다른 형태의 이중특이적 항체로는 단일 사슬 “야누신(Janusins)'이 포함된다(Traunecker 등, 1991).

이중특이적 전항체와 달리, 이중특이적 디아바디가 특히 유용할 수 있는데 이는 제조하기가 용이하고 *E. coli* 에서 발현될 수 있기 때문이다. 적절한 결합 특이성을 가진 디아바디(및 항체 단편은 기타 다른 많은 폴리펩티드들)는, 라이브러리로부터 파지 디스플레이(WO 94/13804)를 이용하여 용이하게 선택될 수 있다. 다아바디의 한쪽 팔이 예컨대 항원 X에 대한 특이성을 가지며 불변인 경우 라이브러리는 그 나머지쪽 팔이 변화되도록 만들어질 수 있고 적절한 특이성을 가진 항체가 선택된다.

항원 결합 도메인

항원의 일부 또는 전부에 결합하고 이에 상보적인 영역을 포함하는 항체의 일부를 말한다. 항원이 크기가 큰 경우에 항체는 항원의 특정 부위에만 결합할 수 있는데, 이 부위를 에피토프라고 부른다. 항원 결합 도메인은 하나 이상의 항체 가변 도메인에 의해 제공될 수 있다. 바람직하기로는, 항체 결합 도메인은 항체의 경사슬 가변영역(VL)과 항체의 중사슬 가변영역(VH)을 포함한다.

특이적

특이적 결합쌍중 한 요소가 그의 특이적 결합 파트너 이외의 분자에는 어떠 한 유의성있는 결합을 하지 않는 상황을 말한다. 또한 이 용어는 예컨대 항원 결합 도메인이 다수의 항원이 가지고 있는 특정 에피토프에 특이성이 있는 경우에도 적용되는데, 이 경우 항원 결합 도메인을 갖는 상기 특이적 결합 요소는 상기 에피토프를 가진 다양한 항원에 결합될 수 있을 것이다.

기능적으로 동등한 변종형

다른 분자(모체)와 구조적인 차이는 있으나 어느정도 유의성있는 상동성을 유지하고 있고, 또한 적어도, 예컨대 특정 항원 또는 에피토프에 대한 결합능과 같은 모체 분자의 생물학적 기능을 어느정도 유지하고 있는 분자(변종)를 말한다. 변종은 단편, 유도체 또는 돌연변이체 형태일 수 있다. 변종, 유도체 또는 돌연변이체는, 하나 이상의 아미노산이 첨가, 결손, 치환 또는 삽입되거나 다른 분자가 연결되어 모체 분자를 변형시킴으로써 얻어질 수 있다. 이러한 변화는 뉴클레오티드 또는 단백질 수준에서 이루어질 수 있다. 예를 들어, 코딩된 폴리펩티드가 Fab 단편일 수 있는데 이 단편은 다른 소스로부터 유래된 Fc꼬리와 연결된다. 다르게는, 효소, 플루오레신 등과 같은 마커가 연결될 수도 있다.

본 발명의 개요

본 발명에서는 피브로넥틴(FN)의 ED-B 종양 태아 도메인에 특이성을 갖는 특이적 결합 요소가 제공된다.

본 발명에 따른 특이적 결합 요소는 ED-B 도메인과 직접 결합한다. 일실시예에서, 특이적 결합 요소는 프로테아제

터몰리신에 의한 FN 처리 후, ED-B를 포함하는 하나, 일부 또는 모든 FN에 결합한다. 다른 일실시예에서, 특이적 결합 요소는 ED-B 도메인을 함유하는 III형 상동성 반복단위를 포함하는 하나, 일부 또는 모든 FN에 결합한다. 공지의 FN들이 카네몰라의 두 논문(Carnemola 등, 1989; 1992)에서 확인되었다. “ED-B를 포함하는 모든 FN”에 대한 참고문헌들은, 상기 논문에서 확인된 ED-B를 포함하는 모든 FN에 대한 참고문헌으로서 채택될 수 있을 것이다.

특이적 결합 요소는 바람직하기로는 인간의 ED-B에 결합하고, 바람직하기로는 마우스, 랫트 및/또는 닭과 같은 하나 이상의 다른 종 B+FN에 결합한다. 바람직하기로는, 상기 특이적 결합쌍 요소는 인간의 피브로넥틴 ED-B 및 마우스와 같은 비-인간형 피브로넥틴 ED-B에 대해 결합할 수 있는데, 이로써 동물 모델을 대상으로 sbp 요소를 시험하고 분석할 수 있다.

본 발명에 따른 특이적 결합쌍 요소는, 본 발명의 다른 부분에서 기술된 바 있는, 공중이 이용가능하도록 기탁된 항체 BC-1과 경합함이 없이 피브로넥틴 ED-B와 결합한다. BC-1은 인간의 B+ 동형에 대해 엄격한 특이성을 갖는다. 본 발명에 따른 특이적 결합쌍 요소는 BC-1과 동일한 에피토프에는 결합하지 않는다.

본 발명에 따른 특이적 결합 요소와 B+FN의 결합은 ED-B 도메인에 의해 저해될 수 있다.

본 발명의 일실시예에서, 상기 결합 도메인은, 정제된 단량체로서 측정된 경우에, ED-B FN에 대한 해리상수(Kd)가 $6x10^{-8}$ M 이하이다.

본 발명의 일실시예에서 상기 결합 도메인은, N-글리카나아제로 피브로넥틴 ED-B를 전처리하지 않은 경우에도 피브로넥틴 ED-B와 반응, 즉 결합할 수 있다.

본 발명에 따른 특이적 결합쌍 요소는 분리형 또는 정제형으로 제공될 수 있는데, 다시말하면 예컨대 항체 또는 항체 단편과 같은 다른 특이적 결합쌍 요소가 없는, 또는 피브로넥틴 ED-B에 결합할 수 있는 다른 특이적 결합쌍 요소가 없는 제제 도는 제형으로서 제공될 수 있다. 바람직하기로는, 본 발명에 따른 특이적 결합 요소가 실질적으로 순수한 형태로 제공되는 것이다. 이들은 종래의 하이브리도마 기술을 이용하여 얻은 항체에 국한되기 보다는 단일의 클론으로부터 얻은 것이라는 의미에서 “단일클론”일 수 있다. 전술한 바와 같이, 본 발명에 따른 특이적 결합 요소는 박테리오파지 디스플레이 기술 및/또는 박테리아 세포 또는 숙주 세포와 같은 재조합 세포에서의 발현을 이용하여 얻을 수 있다. 피브로넥틴 ED-B와 직접 결합하는 단일클론의 특이적 결합쌍 요소에 대해 개시하고 있는 선행문헌은 없다.

바람직하기로는, 상기 특이적 결합 요소는 항체를 포함한다. 특이적 결합 요소는 단일 사슬 Fv(scFv)와 같은 항체 단편 형태의 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있다. Fab, Fab', F(ab')2, Fabc, Facb 또는 디아바디와 같은 다른 종류의 항체 단편들도 사용될 수 있다(Winter and Milstein, 1991; WO 94/13804). 상기 특이적 결합 요소는 전항체 형태일 수도 있다. 상기 전항체는 예컨대 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM과 같은 항체 동형중 하나의 형태이거나 예컨대 IgG1 또는 IgG4와 같은 동형의 아류중 하나의 형태일 수 있다.

상기 항체는 예컨대 인간, 쥐 또는 토끼로부터 유래된 것일 수 있다. 다른것에서 유래하는 것 역시 당업자에게 명백할 것이다. 바람직하기로는, 상기 항체는 인간으로부터 유래한 것이다. “인간”이라는 말은 항체가 인간의 cDNA, 단백질 또 는 펩티드 라이브러리로부터 일부 또는 전부가 유래된 것을 말한다. 상기 용어에는, 인간으로부터 유래하지 않은 것으로서 항체 분자가 인체 면역 시스템 장벽을 통과할 수 있도록 항체 분자에 인간 특성을 부여하기 위해 변형시킨 인간형 펩티드 및 단백질이 포함된다.

상기 특이적 결합 요소는 또한 예컨대 이중특이적 항체 분자 (또는 F(ab')2와 같은 단편)처럼, 전술한 바와 같이 피브로넥틴 ED-B에 대한 항원 결합 팔(즉 특이적 도메인)과는 다른 특이성을 가진, 공학적으로 만들어진 항체형일 수 있고, 또는 이가 또는 다가 분자형태일 수 있다.

항체 서열외에도, 특이적 결합 요소는 다른 아미노산, 예컨대 펩티드 또는 폴리펩티드를 형성하는 아미노산, 또는 상기 분자에 항원 결합 능력이외의 다른 기능적 특성을 부여하는 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 특이적 결합 요소는 라벨, 효소 또는 그 단편 등을 포함할 수 있다.

결합 도메인은 점 라인(germ line) 구획 또는 재배열 유전자 구획에 의해 코딩되는 VH 도메인의 일부 또는 전부를 포함할 수 있다. 상기 결합 도메인은 VL 캅파 도메인 또는 VL 람다 도메인의 일부 또는 전부를 포함할 수 있다.

상기 결합 도메인은 VH1, VH3 또는 VH4 점-라인 유전자 서열 또는 그 재배열 형태를 포함할 수 있다.

본 발명에 따른 특이적 결합 요소는 인간의 점 라인 DP47로부터 유래하는 중사슬 가변 영역('VH' 도메인)을 포함할 수 있는데, 상기 영역의 서열은 도 1(a)에 도시되어 있고 1번에서 98번까지의 잔기를 갖는다. 상기 ‘DP'의 명명법은 톰린슨 (Tomlinson 등, (1992))의 문헌에 기재되어 있다. CDR3의 아미노산 서열은 Ser Leu Pro Lys 일 수 있다. C

DR3의 아미노산 서열은 Gly Val Gly Ala Phe Arg Pro Tyr Arg Lys His Glu 일 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 특이적 결합 요소의 결합 도메인은 CGS1 및 CGS2에 대해 도 1(a)에서 보인 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함할 수 있다.

결합 도메인은 인간의 점 라인 DPL16에서 유래된 경사슬 가변 영역('VL' 도메인)을 포함할 수 있는데, 상기 영역의 서열은 도 1(b)에서 코돈 1번 내지 90번으로서 도시되어 있다.

상기 VL 도메인은 CDR3 서열 Asn Ser Ser Pro Val Val Leu Asn Gly Val Val을 포함할 수 있다. 상기 VL 도메인은 CDR3 서열 Asn Ser Ser Pro Phe Glu His Asn Leu Val Val을 포함할 수 있다.

본 발명의 특이적 결합 요소는 도 1에 도시된 서열에 대해 기능적으로 동등한 변종, 예컨대 본 발명에서 밝힌 성질은 유지하면서도 하나 이상의 아미노산이 삽입, 결손, 치환 또는 첨가된 변종을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 CDR3 서열은 특이적 결합 요소가 ED-B와 결합하는 조건하에, 달라지거나, 골격 영역에 대해 하나 이상의 변화가 있거나, 골격 영역이 다른 골격 영역 또는 변형된 형태로 치환될 수 있다.

본 발명에 개시된 항체의 항원 결합 도메인의 VL 또는 VH 도메인으로부터 유래된 하나 이상의 CDR은 일명 “CDR-이식”에 사용될 수 있는데, 상기 이식에서는 제 1항체의 하나 이상의 CDR 서열이 그 항체의 서열이 아닌 서열의 골격, 예를 들 면 EP-B-0239400에 개시된 다른 항체의 골격내에 위치한다. CGS1 및 CGS2에 대한 CDR 서열이 도 1(a) 및 1(b)에 도시되어 있다.

본 발명에 따른 특이적 결합 요소는, 피브로넥틴 ED-B와 결합하기 위해 본 발명에서 기재한 바 있는 항체 또는 scFv와 경합하는 것일 수 있다. 결합 요소들 사이의 경합은 시험관내에서 쉽게 시험될 수 있는데, 예를 들면 특이적 리포터 분자를 하나의 결합 요소에 붙여서 꼬리표가 붙어있지 않은 다른 결합 요소(들)이 존재하는 경우에도 검출가능하게 함으로써, 동일한 에피토프 또는 오버랩되는 에피토프에 결합하는 특이적 결합 요소를 확인할 수 있다.

본 발명에 따른 특이적 결합 요소는, 특이적 결합 요소가 그 에피토프에 결합하게 하거나 결합할 수 있게 하는 단계를 포함하는 방법에 사용될 수 있다. 결합은, 특이적 결합 요소를 포유동물, 예컨대 인간 또는 마우스와 같은 설치류에 투여한 후에 일어난다.

본 발명은 상기와 같이 종양 진단 시약으로 사용되는 특이적 결합 요소의 용도를 제공한다. 후술하는 동물 모델 실험은, 본 발명에 따른 결합 요소가 생체내 종양 국재화에 유용하다는 것을 증명해준다.

본 발명에 따른 바람직한 특이적 결합 요소로는 예컨대 저온유지 절편 상태의, 침윤성 및 맥관형성 표현형을 보이는 인간 종양과 결합하는 요소와, 예컨대 저온유지 절편 상태의 태아조직에 결합하는 요소를 포함한다. 면역세포화학 염색법에 의해 상기 결합을 증명할 수 있다.

본 발명의 바람직한 실시예에서, 특이적 결합 요소는 세포외 간질 단백질인 테나신에는 결합하지 않거나 결합하더라도 유의성 있을 정도로는 결합하지 않는다.

본 발명의 다른 바람직한 실시예에서, 특이적 결합 요소는 예컨대 저온유지 절편 상태에서 및/또는 면역세포화학 염색법을 이용하여 증명된 바와 같이, 인간의 정상 피부에는 결합하지 않거나 결합하더라도 유의성있을 정도로는 결합하지 않는다.

본 발명에 따른 특이적 결합 요소에 대한 다른 실시예에서도, 간, 비장, 신장, 위, 소장, 대장, 난소, 자궁, 방광, 췌장, 부신선, 골격근, 심장, 폐, 갑상선 및 뇌로부터 선택된 하나 이상의 정상 조직(예컨대 저온유지 상태의 절편에 있어서 및/또는 면역세포화학 염색법에 의해 증명된 바와 같이)에는 결합하지 않거나 결합하더라도 유의성있을 정도로는 결합하지 않는다.

ED-B에 대한 특이적 결합 요소는 생체내 표적화제로 사용될 수도 있는데, 상기 표적화제는 피브로넥틴 ED-B를 발현시키거나 이와 관련된 종양의 존재 및 위치를 특이적으로 증명하기 위해 사용될 수도 있다. 상기 특이적 결합 요소는 또한 이미징제로서도 사용될 수 있다. 본 발명에서는, 피브로넥틴 ED-B를 발현시키거나 피브로넥틴 ED-B의 발현과 관련된 세포 또는 종양의 존재여부를 결정하는 방법이 제공되는데, 이 방법은 제공된 특이적 결합 요소와 세포를 접촉시켜 세포에 대한 특이적 결합 요소의 결합성을 결정하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 체내로부터 분리된 시험용 세포샘플에 대하여 생체내 시험 또는 시험관내 시험으로 실시될 수 있다.

세포 샘플에 대한 항체의 반응성은, 적절한 방법을 이용하여 결정될 수 있 다. 개별 리포터 분자로 꼬리표(tag)를 부착하는 것도 가능한 한가지 방법이다. 상기 리포터 분자는, 검출가능하고 바람직하게 측정될 수 있는 신호를 직접 또는 간접적으로 생성할 것이다. 상기 리포터 분자는 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있고, 예컨대 펩티드 결합과 같은 공

유결합에 의해 또는 비공유결합에 의해 연결될 수도 있다. 펩티드 결합에 의한 연결은, 항체와 리포터 분자를 코딩하는 유전자 융합의 재조합적 발현의 결과일 것이다.

한가지 바람직한 방법은, 분광학적으로 분리되는 흡광성 또는 방사 특성이 있는 각 형광색소, 형광체 또는 레이저 염료를 사용하여 각각의 항체를 공유결합적으로 연결시키는 것이다. 적합한 형광색소로는 플루오레신, 로다민, 피코에리스린 및 텍사스 레드가 있다. 적합한 색소원 염료로는 디아미노벤지딘이 포함된다.

다른 리포터 분자로는, 거대분자성 콜로이드 입자 또는 염색된 라텍스 비드와 같은 미립자성 물질, 자기성 또는 상자기성 물질, 그리고 눈으로 관찰될 수 있는 검출 신호를 직간접적으로 유발시키거나 전자 검출되거나 또는 다른 방법으로 기록될 수 있는 생물학적 또는 화학적 활성제가 포함된다. 이러한 분자들은, 예컨대 발색 또는 변색 반응을 촉매하거나 전기 성질을 변화시키는 효소일 수 있다. 이들은 분자가 여기상태로 되기쉬워 전자가 에너지 준위 사이를 이동함으로써 특징적인 분광학적 흡광성 또는 방사성을 나타낼 수 있다. 여기에는 바이오센서와 함께 사용되는 화학물질이 포함될 수 있다. 비오틴/아비딘 또는 비오틴/스트렙타비딘 및 알칼리 포스파타아제 검출 시스템이 사용될 수 있다.

결합성을 결정하는 방법은 본 발명의 특징이 아니며, 당업자는 그들의 선호 도 및 일반지식에 따라 적절한 방법을 선택할 수 있다.

각각의 항체-리포터 컨쥬게이트에 의해 생성된 신호는, 세포샘플(표준샘플 및 시험샘플)에서 관련 항체 결합에 대한 정량가능한 절대 데이터 또는 비교 데이터를 도출해내는데 사용될 수 있다. 뿐만 아니라, 프로피듐 요오드와 같은 염료를 이용한 일반적인 핵염색은 샘플내에 존재하는 총 세포군집을 계산하는데 사용될 수 있는데 이로써 전체 세포에 대한 각 세포군집의 양적 비율을 알 수 있게 된다. ^{125}I, ^{111}In 또는 ^{99m}Tc와 같은 방사성뉴클레오티드를 항체에 부착시키는 경우, 만일 상기 항체가 정상조직 보다는 종양 조직에 우선적으로 국재하면, 감마 카메라를 이용하여 종양조직내에 존재하는 방사선표지의 존재를 검출 및 정량할 수 있다. 얻어진 종양 이미지의 품질은, 신호:노이즈 비율과 직접적인 관련이 있다.

상기 항체는 또한, 새로 맥관이 형성된 종양을 추적하기 위한 진단제로서 사용될 수 있고, 또 예컨대 변형된 형태로서, 세포독성 물질을 운반하거나 새로운 혈관안에서 혈액응고를 일으키는데 사용될 수 있는데, 이렇게 함으로써 발육중인 종양으로부터 산소와 영양물을 고갈시킴으로써 간접형태의 종양요법을 이룬다.

본 발명은 또한 작동체 기능을 가질 수 있도록 융합단백질로서 커플링, 결합 또는 공학적 처리되면 치료제로서 사용되는 특이적 결합 요소의 용도를 제공한다. 본 발명에 따른 특이적 결합 요소는 독소, 방사선활성제, T-세포, 킬러 세포 또는 기타 분자가, 목적 항원을 발현하거나 목적 항원과 연관되어 있는 종양을 표적화하도록 하는데 사용된다.

따라서, 본 발명의 다른 목적은 본 발명에서 제공되는 특이적 결합 요소를 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법, 상기 특이적 결합 요소를 포함하는 약제학적 조성물, 및 예컨대 약제학적으로 허용가능한 부형제를 사용하여 특이적 결합 요소를 제형화하는 단계를 포함하는 약제학적 조성물 또는 약제의 제조 방법에 있어서 투여용 약제 제조에 사용되는, 특이적 결합 요소의 용도를 제공하는 것이다.

본 발명에 따라, 제공된 조성물은 환자 개체에게 투여될 수 있다. 투여는 “치료학적 유효량”으로 투여되는 것이 바람직한데, 여기서 유효량이란 환자에게 유리한 효과를 보이기에 충분한 양이다. 상기 유리한 효과란 적어도 하나의 증상을 최소한 경감시키는 정도 이상은 되어야 함을 의미하는 것일 수 있다. 실제 투여량, 투여 속도 및 투여 시간은 치료 대상이 되는 질병의 성질 및 심각성에 따라 좌우될 것이다. 치료 처방, 예컨대 용량 결정 등과 같은 것은 일반의 또는 다른 의사의 책임하에 결정된다. 적절한 항체용량은 당업계에 공지되어 있다(Ledermann 등, (1991); Bagshawe K.D. 등(1991)).

조성물은 단독투여될 수도 있고 다른 치료제와 복합되어 투여될 수 있는데, 복합투여 되는 경우 치료하고자 하는 질병의 상태에 따라 동시에 또는 순차적으로 투여된다.

본 발명에 따른, 그리고 본 발명에 따른 용도를 위한 약제학적 조성물은 활성 성분외에도, 약제학적으로 허용가능한 부형제, 담체, 완충제, 안정제 또는 기타 당업계에 주지된 물질을 포함할 수 있다. 이러한 물질들은 독성이 없어야 하고 활성 성분의 효능을 방해해서는 안된다. 담체 또는 다른 물질의 정확한 성질은, 경구 투여 또는 예컨대 정맥주사와 같은 주사투여와 같은 투여 경로에 따라 좌우될 것이다.

경구 투여를 위한 약제학적 조성물은, 정제, 캅셀제, 분말제 또는 액제일 수 있다. 정제는 젤라틴 또는 보조제와 같은 고형 담체를 포함할 수 있다. 액상의 약제학적 조성물은 일반적으로 물, 석유, 동식물유, 미네랄오일 또는 합성오일과 같은 액체 담체를 포함한다. 생리 식염수, 덱스트로스 또는 기타 사카라이드 용액 또는 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 글리콜이 포함될 수 있다.

정맥 주사 또는 병소 부위에의 주사를 위해서는, 활성 성분이 비경구적으로 허용가능한 액상 용액으로서 발열물질이 없고 적절한 pH와 등장성과 안정성을 가진 용액형태가 될 것이다. 당업자는 예컨대 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 젖산염이 첨가된 링거 주사액과 같은 등장성 운반체를 이용하여 적절한 용액을 제조할 수 있을 것이다. 보존제, 안정화제, 완충제, 항산화제 및/또는 기타 첨가제가 필요에 따라 포함될 수 있다.

본 발명에 따른 특이적 결합 요소는 이를 코딩하는 핵산으로부터의 발현에 의해 제조될 수 있다. 특이적 결합 요소를 코딩하는 핵산은 그 자체로서 본 발명의 일면을 형성하며, 코딩 핵산으로부터의 발현 단계를 포함하는 특이적 결합 요소의 생산 방법 역시 본 발명의 일면을 형성한다. 발현은, 적절한 조건하에서 상기 핵산을 포함하는 재조합 숙주 세포를 배양시킴으로써 간편하게 이루어질 수 있다.

상기 핵산은, 본 발명에서 기재된 항체의 항원 결합 도메인에 대한 아미노산 서열 및 그 기능적 동등체는 모두 코딩할 수 있다. 하나 이상의 뉴클레오티드를 첨가, 치환, 결손 또는 삽입시킴으로써, 뉴클레오티드 수준에서의 변형을 일으킬 수 있는데, 상기 변형은 유전자 코드의 퇴화정도에 따라 아미노산 수준에 반영될 수 도 있고 아닐 수도 있다.

다양한 여러 숙주 세포내에서 폴리펩티드를 클로닝 및 발현시키기 위한 시스템이 주지되어 있다. 적절한 숙주 세포로는 박테리아, 포유동물 세포, 효모 및 바쿨로바이러스 시스템이 포함된다. 이종성 폴리펩티드의 발현을 위하여 당업계에서 이용할 수 있는 포유동물 세포주로는 중국 햄스터 난소 세포, HeLa 세포, 베이비 햄스터 신장 세포 및 기타 다른 세포들이 포함된다. 흔하고도 바람직한 박테리아 숙주 세포는 대장균(*E. coli*)이다.

E. coli와 같은 원핵세포내에서 항체 및 항체 단편을 발현시키는 방법에 대해서는 당업계에 잘 확립되어 있다(Pluckthun, (1991)). 배양중인 진핵 세포에서의 발현 역시 당업자가 특이적 결합 요소를 생산하기 위한 방법으로서 이용할 수 있다(Reff, (1993); Trill 등(1995)).

적합한 벡터는, 선택될 수도 있고 프로모터 서열, 종결 서열, 폴리아데닐화 서열, 인헨서 서열, 마커 유전자 및 기타 적절한 서열을 포함하여 적절한 조절 서열을 포함시켜서 제조될 수도 있다. 벡터는 플라스미드, 파지와 같은 바이러스 또는 파지미드 등 적절한 것일 수 있다(Molecular Cloning: a Laboratory Manual; 제 2판, Sambrook 등, 1989, 콜드 스프링 하버 라보라토리 출판사). 핵산 조작을 위한 다수의 공지 기술 및 프로토콜들, 예컨대 핵산 구조체의 제조, 돌연변이 유발, 시 퀀싱, 세포에로의 DNA 도입과 유전자 발현 및 단백질 분석과 같은 기술들이 문헌에 상세히 기재되어 있다(Short Protocols in Molecular Biology, 제 2판, Ausubel 등 eds., John Wiley amp; Sons, 1992). 상기 문헌들 중 삼부룩(Sambrook) 등의 논문과 아우스벨(Ausubel) 등의 논문은 본 발명에 참고문헌으로서 도입되어 있다.

따라서, 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 개시된 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 이러한 핵산을 숙주 세포에 도입하는 단계를 포함하는 방법을 제공하는 것이다. 상기 도입법으로는 이용가능한 기술이 모두 사용될 수 있다. 진핵 세포의 경우, 적절한 기술로는 인산칼슘 형질감염, DEAE-덱스트란, 일렉트로포레이션, 리포좀-매개 형질감염 및 레트로바이러스 또는 예컨대 종두 바이러스나 곤충 세포를 위한 바쿨로바이러스와 같은 다른 바이러스를 이용한 형질도입등이 포함될 수 있다. 박테리아 세포의 경우에, 적합한 기술로는 염화칼슘을 이용한 형질전환, 일렉트로포레이션 및 박테리오파지를 이용한 형질감염이 포함된다.

상기 도입 후, 예컨대 유전자 발현 조건하에서 숙주 세포를 배양시킴으로써 핵산으로부터의 발현을 유발시킬 수 있다.

본 발명의 일실시예에서, 본 발명의 핵산은 숙주 세포의 게놈(예, 염색체)에 통합된다. 이러한 통합은, 표준 기술에 따라 게놈과의 재조합을 촉진시키는 서열을 봉입시킴으로써 촉진될 수 있다.

특이적 결합 요소를 생산한 다음, 상기 요소는 예컨대 특이적 결합 요소이외에 앞서 설명한 바와 같은 세포에 대한 상기 요소의 결합성을 결정하기 위한 시약 을 하나 이상 포함하는 키트 등의 약제학적 제제 또는 진단제를 제조하는데 사용되는 등, 본 발명에서 개시한 여러 방법으로 사용될 것이다.

본 발명의 다른 목적과 실시예들은 당업자에게 명백히 이해될 것이다. 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 본 발명을 한정하지 않고 단지 예시하는 것으로서의 하기 실시예를 제공하고자 한다.

본 명세서에서 언급된 모든 문서는 본 명세서에 참고문헌으로서 도입되어 있다.

실시예

실시예 리스트

실시예 1 - 인간 FN의 ED-B 도메인에 특이성이 있는 인간 scFv의 분리

실시예 2 - 인간 FN의 ED-B 도메인에 특이성이 있는 인간 scFv의 친화성 성숙화

실시예 3 - ED-B-함유 피브로넥틴에 대한 친화성이 성숙된 scFv의 특이성

실시예 4 - 인간 및 마우스 종양 절편에 대한 면역세포화학 염색에 사용되는 친화성 성숙 항-ED-B scFv의 용도.

실시예 5 - 인간 종양에 대한 생체내 표적화에 사용되는 친화성 성숙 항-ED-B의 용도

실시예 6 - 누드 마우스에 있어서 쥐의 F9 기형암종 이식종에 대한 표적화

실시예 1 - 인간 FN의 ED-B 도메인에 특이성을 갖는 인간 scFv의 분리

인간의 scFv 파지 라이브러리(Nissim 등, 1994)를 이용하여, 재조합 항체를 선택하였다. 선택에 사용되는 항원 소스로서 서로 다른 두가지 형의 ED-B 동형을 사용하였는데, 상기 두가지 경우의 동형은 재조합 인간 단백질이었다.

III형 반복단위 2-11(B-) 및 2-11(B+)를 포함하는 재조합 FN 펩티드를 대장균 (*Escherichia coli*)에서 발현시켰다.

pFH154(Kornblihtt 등, 1985), λF10 및 λF2(Carnemolla 등, 1989) 클론으로부터 얻은 FN cDNA를 이용하여 구조체를 만들었다. Qiagen(채츠워스, 캘리포니아)로부터 얻은 QIA 발현 키트를 이용하여 염기 2229~4787에 걸친 cDNA 구조체를 벡터 pQE-3/5내에 삽입시켰다. 세파로스 4B(파마시아)와 컨쥬게이트된 mAb 3E3(Pierschbacher 등 1981)을 이용하여 면역친화성 크로마토그래피법으로 FN-III 2-11 (B-) 및 (B+)를 정제하였다. FN 2-11(B+) 및 FN 2-11(B-)로부터의 cDNA를 주형으로 사용하고 UltMa DNA 폴리머라아제를 이용하여 PCR 반응(폴리머라아제 사슬 반응)에 의하여, III형 상동 반복단위 7B89, 789, ED-B 및 FN-6을 포함하는 제조합 FN 단편 제조용 DNA 단편을 생산하였다. QIA 발현 키트(Qiagen)를 이용하여, PCR 생성물이 pQE-12에 클로닝되도록 프라이머를 디자인 하였다. 이어서 이들을 *E. coli* 에 형질전환시킨 후 발현시켰다. Sequenase 2.0 DNA 시퀀싱 키트(USB)를 이용하여 cDNA 클론을 모두 서열화하였다.

FN 단편 카르복시 말단에 있는 헥사히스티딘 태그를 이용하고, 제조업자의 설명서에 따라(Qiagen), Ni-NTA 크로마토그래피(IMAC)법으로 재조합 단백질을 정제하였다. ED-B cDNA를 λgt11 박테리오파지 벡터안으로 클로닝시켜 ED-B-βGal 융합 단백질을 제조하여 λED-B 클론을 형성하였다. 클론 λchFN60(ED-B 서열의 일부를 포함함)은 닭의 클로닝된 FN인 pchFN60 클로닝(Norton 등, 1987)으로부터 융합 단백질의 형태로 유래되었다.

인간 scFv 파지 라이브러리의 선택을 위해, 서로 다른 두 개의 재조합 항원(7B89 및 ED-B) 각각을 3회에 걸쳐 패닝시켰다. PBS(20mM 인산염 완충액, 0.15M NaCl, pH 7.2)중, 50μg/㎖의 농도에서 밤새도록 상기 항원을 면역튜브(Nunc; 멕시소프, 로스킬데, 덴마크)에 코팅시켰다. 상기 항원중 첫 번째 항원은 재조합 FN 단편 7B89이었는데, 이 단편은 인접하는 III형 FN 상동 반복단위를 ED-B 도메인 양측면에 가지고 있는데, 이 단편을 4℃에서 밤새도록 면역튜브에 코팅시켰다. 사용된 두 번째 항원은 카르복시 말단에 헥사히스티딘 태그를 가진 재조합 ED-B(Zardi 등, 1987)인데, 이 단백질은 리신 잔기를 포함하지 않기 때문에 ED-B를 반응성 ELISA 플레이트(Nunc; Covalink)에 부위-특이적 공유결합으로 고정화시키기 위해서는 첫 번째 아미노산의 말단 아미노 그룹을 이용할 수 있다. 코팅은 실온에서 밤새도록 수행되었다.

3회에 걸친 패닝후, 용리된 파지를 HB2151 E. coli 세포에 감염시켜 문헌에 기재된 바대로(Nissim 등, 1994) 플레이팅하였다. 각 선택 단계 후, 암피실린-저항성 단일 콜로니 95개를 스크리닝하고 ELISA법을 이용하여 항원-특이적 scFv를 확인하였다. 패닝에 사용된 항원에 대해 가장 높은 ELISA 신호를 보이는 클론들을 선택하여 다른 분석 및 친화성 성숙 시험에 이용하였다. 이 클론들 역시, 실시예 4에서 더욱 상세히 설명될 면역화학 염색법에 의해, 유방종양과 신경교아세포종 다형 절편을 특이적으로 염색하는 것으로 증명되었다.

실시예 2- 인간 FN의 ED-B 도메인에 특이성이 있는 인간 scFv의 친화성 성숙화

클론 35GE(7B89를 이용하여 선택됨)와 28SI(ED-B 도메인만을 이용하여 선택됨)를 친화성 성숙화를 위한 후보 항체로 선택하였다. 친화성을 개선시키는 수단의 하나로서 L사슬을 변화시키고자 단순 친화성 성숙화 방법을 조사하였는데, 이는 퇴화 올리고뉴클레오티드 및 PCR(도 1)을 이용하여 L사슬 CDR3의 가운데 잔기 6개(DSSGNH)를 무작위화(randomising)함으로써 $20^{6} = 6.4 \times 10^{7}$ 개의 서열 다양화가 가능한 방법에 기초하였다. H사슬 CDR3와 함께 존재하는 상기 영역은 항원 결합 부위의 중심에 위치한다(Padlan, 1994). 또한 상기 선택에 미치는 정전기 영향의 가능성을 회피하고자, 상기 6개의 잔기에 선행하는 아르기닌 잔기를 세린으로 직접 돌연변이 시켰다.

프라이머 LMB3(5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3') 및 CDR3-6-VL-FOR(5' CTT GGT CCC TCC GCC GAA TAC CAC MNN MNN MNN MNN MNN MNN AGA GGA GTT ACA GTA ATA GTC AGC CTC 3')를 이용하여 "모체" scFv 단편을 발현하는 박테리아 단일 콜로니로부터 얻은 플라스미드를 PCR로 증폭시켰다(94C[1']-55C[1']-72C[1'30'], 25사이클; 완충제와 조건에 대해서는 Marks 등, 1991 참조). 그 결과 생성된 생성물을 겔-정제하고 (원래의 scFv 유전자를 함유하는 플라스미드 흔적물의 제거), 프라이머 LBM3 및 J1-Not-FOR(5' ATT GCT TTT CCT TTT TGC GGC CGC GCC TAG GAC GGT CAG CTT GGT CCC TCC GCC 3')를 이용한 두 번째 증폭 단계용 주형으로 사용하였다(94C[1']- 55C[1']-72C[1'30'], 25사이클). 상기 비정제 PCR 생성물은, 아가로스 겔에서 정확한 분자량의 단일 밴드로 펼쳐지는데, Spin-Bind(FMC, 록클랜드, 메인, 미국)을 이용하여 PCR 혼합물로부터 직접 정제하고, Nco1/Not1로 이중 분해한 다음, 단일-분해된 벡터로부터 이중-분해된 벡터의 분리를 용이하게 하기위하여 더미 (dummy) Ncol/Not1 삽입물을 포함하고 있는 겔-정제 Nco1/Not1-분해 파지미드 pHEN1(Hoogenboom 등, 1991)에 연결시켰다. 상기 벡터는 Qiagen(채츠워스, 캘리포니아, 미국) 플라스미드 맥시프렙 키트를 이용하여 제조되었다. 상기 연결을 위한 혼합물에 약 5μg의 플라스미드 및 삽입물이 사용되었고, 상기 혼합물을 페놀로 1회, 페놀/클로로포름/이소아밀 알콜(25:25:1)로 1회 추출한 다음, 글리코겐(베링거 만하임, 독일)을 담체로 사용하여 에탄올에서 침전시킨 후, 건조시켰다(speed-vac). 상기 펠렛을 20μℓ의 물에 재현탁시킨 후 전기수용성이 있는 TG1 E. coli세포(Gibson, 1984)안으로 일렉트로포레이션시켰다. 통상적으로는, 글리세롤 보관주를 사용하는 경우에는 10^9 형질전환체/μg의 농도를 가진 전기수용성 세포를 사용하거나, 또는 신선하게-제조된 전기수용성 세포를 사용하는 경우에는 10^{10} 형질전환체/μg의 농도로 사용하였다. 이러한 값은 본 발명에서 기재한 방법으로 통상 $> 10^7$ 클론을 생산하였다.

다음, 상기 성숙화 라이브러리를 니심 라이브러리(Nissim 등, 1994)에서와 같이 가공처리하여 파지 입자를 생산하였고, 이를 7B89(10μg/㎖)를 항원으로 사용하여 면역튜브에서 1회의 선택을 위해 사용하였고, 다음으로 1회의 속도론적 선택 을 하였다(Hawkins 등, 1992). 이러한 선택 단계는, 비오티닐화 7B89(10nM)와 파지 현탁액(약 1012 t.u.)을 2%의 밀크-PBS(2% MPBS)중에서 5분 동안 항온배양시킨 다음, 비-비오타닐화 7B89(1 μM)를 첨가하여 경합이 일어나도록 30분간 방치함으로써 이루어졌다. 2% MPBS에서 미리블록킹시킨 스트렙타비딘-코팅 다이나비드(Dynal: M480) 100μℓ를 상기 반응 혼합물에 부가한 다음, 2분간 혼합시켜 자석에 포획시킨 후, (PBS + 0.1% Tween-20)과 PBS로 번갈아 10회 세척하였다. 100mM 트리에틸아민 5㎖를 사용하여 비드로부터 파지를 용리시켰다. 다음, 상기 용액을 pH 7.4인 0.25㎖의 1M 트리스로 중화시켜서, 지수함수적으로 증가하는 HB2151 세포(Nissim 등, 1994)를 감염시키는데 사용하였다. 95개의 암피실린-저항성 단일 콜로니를 사용하여 scFv-함유 상등액을 생산하여(Nissim 등, 1994), ELISA, 면역조직화학 및 BIA코아법을 이용하여 스크리닝하여 최적의 바인더를 확인하였다. 다음, 이들을 pDN268 발현 벡터(Neri 등, 1996)의 Sfi1/Not1 부위 사이에 서브클로닝시켰는데, 상기 벡터에는 인산화가 가능한 태그, FLAG 에피토프 및 헥사히스티딘 태그가 scFv의 C-말단에 부착되어 있다.

pDN268에 서브클로닝된 관련 항체의 단일 콜로니를, 100mg/ℓ의 암피실린과 0.1%의 글루코스를 포함하는 2xTY 중에서, 37℃에서 성장시켰다. 상기 세포 배양물이 OD600 = 0.8에 이를 때, IPTG를 부가하여 최종 농도가 1mM이 되도록 한 다음 30℃에서 16 내지 20시간 동안 계속하여 성장시켰다. 원심분리(GS-3 Sorvall rotor, 7000rpm, 30분)후, 상등액을 여과 및 농축시키고, 접선흐름 (tangential flow) 장치(Minisette(필트론))를 사용하여 로딩 완충액(50mM 인산염, pH 7.4, 500mM NaCl, 20mM 이미다졸)으로 교체하였다. 이렇게 하여 얻은 용액을 1ml Ni-VTA 수지(Qiagen)에 로딩하여 50ml의 로딩 완충액으로 세척한 다음 용리 완충액 (50mM 인산염, pH 7.4, 500mM NaCl, 100mM 이미다졸)을 이용하여 용출시켰다. 정제된 항체를 SDS-PAGE(Laemmli, 1970)로 분석하고 4℃에서 PBS에 대해 투석하였다. 정제된 scFv 제제를, S-75 칼럼이 장착된 FPLC 장치(파마시아)를 이용하여 겔-여과법으로 더욱 가공처리하였는데, 이는 결합성 효과로 인하여(Nissim 등, 1994; Crothers and Metzger, 1982) 다가의 scFv 단편이 BIA코아에 대해 양호한 인위적 결합을 보이는 것으로 알려져 있기 때문이다. FPLC-정제형 단량체 분획에 있는 항체의 농도는, 1mg/㎖의 scFv 용액에 대하여 280nm에서 1.4단위의 흡광도를 보이는 것으로 가정하여 분광광도법에 의해 결정하였다.

하기 (ⅰ) 내지 (iii)항원을 이용하여, PBS중에 0.1 내지 1μM 범위로 용해되어 있는 다양한 농도 범위의 1가 scFv의, BIA코아 기계(파마시아 바이오센서)에 대한 결합성을 측정하였다: (ⅰ) 스트렙타비딘으로 코팅된 칩에 고정화된 비오티닐화 재조합 FN 단편 7B89 1000 Resonance Units(RU), 이는 250RU의 scFv에 의해 특이적으로 결합되었다; (ⅱ) N-말단 아미노 그룹에 화학적으로 고정화된 재조합 ED-B 200RU, 이는 600RU의 scFv에 의해 특이적으로 결합되었다; (iii) ED-B-풍부성 피브로넥틴 WI38VA(실시예 3참조) 3500RU, 이는 150RU의 scFv에 의해 특이적으로 결합되었다. 제조업자의 설명서에 따라, 데이터에 대한 속도론적 분석을 실시하였다. 항체-함유 상등액에 대한 BIA코아 정량 분석에 기초하여, 각 scFv에 대하여 하나의 친화성-성숙 버전을 선택하였는데: 7B89 단편을 이용하여 선택한 것으로부터 유래 하는 클론 CGS-1과 ED-B 재조합 FN 단편을 이용하여 선택한 것으로부터 유래하는 CGS-2가 그것이다. 회합속도상수(kon)와 해리속도상수(koff)가 scFv 및 초기 클론 28SI에 대해 계산된 평형해리상수(Kd)와 함께 [표 1]에 나타나 있다. 비록 CGS-1 및 CGS-2 클론이 나노몰 단위의 평형해리상수를 갖는다고는 하나, 클론 CGS-2는 센서 칩에 대해 시험한 세 종류의 단백질 모두에 비하여 1nM(110nM에서 개선된 것임)의 Kd를 보임으로써 그 모체 클론에 대하여 가장 개선되었다는 것을 보이고 있다(표 1). 상기 개선의 원인은 주로 속도론적 해리상수가 더 느리기 때문인데($\sim 10^{-4}\ s^{-1}$), 이는 단량체 항체 제제로 측정되었다(미도시).

성숙화 전략은 일반적인 것으로 보이며, 따라서 말토스 결합 단백질, 시토크롬 C, 쥐의 세포외 도메인 엔도글린(D.N., L. Wyder, R. Klemenz), 거대세포바이러스(A.P., G. Neri, R. Botti, P.N.), 핵 종양 마커 HMGI-C 단백질(A.P., P. Soldani, V. Giancotti, P.N.) 및 난소 종양 마커 태반 알칼리 포스파타아제(M. Deonarain and A.A. Epenetos)에 대한 친화성 개선 항체를 수득하였다. 따라서, 상기 전략은 적어도 다른 돌연변이 전략(Marks 등, 1992; Low 등, 1996)만큼은 효과가 있는 것으로 보이고, 매우 큰 파지 항체 라이브러리(Griffiths 등, 1994; Vaughan 등, 1996)로부터 유래한 것과 유사한 친화성을 갖는 항체를 수득하게 된다.

친화성이 성숙된 클론 CGS-1 및 CGS-2를 서열화하여 인간의 점라인 항체 V 유전자(V-BASE) 데이터베이스에 정렬시킨 다음, MacVector 소프트웨어를 이용하여 번역하였다. 상기 두 클론의 VH유전자가 인간 점라인 DP47(VH3)에 가장 상동성이 컸고, 더욱이 각 클론은 서로 다른 VH CDR3 서열(도 1)을 갖고 있었다. 상기 두 클론의 VL 유전자는, 니심 등의 논문(Nissim, 1994)에 기재된 인간의 합성 scFv 레퍼토리 구성에 사용된 DPL16 점라인이었다. 상기 VL CDR3 서열은 무작위 서열의 6개중 4개가 차이났다(도 1b).

[표 1]

ED-B 도메인-함유 단백질에 대한 단량체 scFv 단편 CGS-1 및 CGS-2의 속도론 및 해리 상수

항원	ED-B			7B89			FN WI38VA		
scFv	CGS-1	SI28	CGS-2	CGS-1	SI28	CGS-2	CGS-1	SI28	CGS-2
$k_{off}(s^{-1})$*	$7.0x10^{-3}$	$2.7x10^{-2}$	$1.5x10^{-4}$	$3.9x10^{-3}$	$3.0x10^{-2}$	$2.3x10^{-4}$	$5.0x10^{-3}$	$7.1x10^{-2}$	$6.5x10^{-4}$
$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$*	$1.3x10^{5}$	$2.5x10^{5}$	$1.3x10^{5}$	$1.1x10^{5}$	$2.9x10^{5}$	$1.1x10^{5}$	$4.1x10^{5}$	$1.2x10^{6}$	$2.9x10^{5}$
Kd(M)*	$5.4x10^{-8}$	$1.1x10^{-7}$	$1.1x10^{-9}$	$3.5x10^{-8}$	$1.0x10^{-7}$	$2.1x10^{-9}$	$1.2x10^{-8}$	$5.9x10^{-8}$	$2.4x10^{-9}$

[표 1]에 대한 설명

실험은 재료 및 방법 부분에서 기재한 바 대로 실시되었다.

* koff와 kon값은 ±30%정도로 정확한데, 농도 결정 정밀도에 기초한 것이고, 결과가 약간 다른 경우에 관해서는 피팅(fitting) 과정에 상이한 센소그램 영역이 사용된 경우에 이러한 결과가 얻어졌다. Kd = koff/kon.

실시예 3 - ED-B-함유 피브로넥틴에 대한 친화성이 성숙된 scFv의 특이성

먼저, ELISA법을 이용하여 두 개의 친화성 성숙 scFv인 CGS-1 및 CGS-2의 면역반응성을 평가하고, 이를 mAb BC-1(B-FN 동형을 인식함) 및 ED-B가 결여된 FN만 을 인식하는(Carnemolla 등, 1989; 1992) mAb IST-6과 직접 비교하였다. 이들 mAb의 특성에 대해서는 이미 보고된 바 있다(Carnemola 등, 1989; 1992). 그 후, 터몰리신 처리로 유도된 광범위 FN 단편 패널 및 재조합 융합 단백질을 이용하여, 특이성에 대한 정밀 분석을 하였다.

ELISA법 및 면역블랏팅법에 사용되는 항원을 다음과 같이 제조하였다. 이미 보고된 바에 따라(Zardi 등, 1987), 인간의 혈장 및 WI38VA13 세포주의 조절된 배지 (conditioned medium)로부터 FN을 정제하였다. 정제형 FN을 카네몰라 논문(Carnemolla 등, 1989)에서 보고된 바에 따라 터몰리신(프로테아제 X형; 시그마 케미칼)으로 분해하였다. 이미 보고된 바(Borsi 등,1991)에 따라, FN 분해물(digest)로부터 본래의 FN 110kD(B-) 및 본래의 FN 120kD(B+) 단편(도 2 참조)을 정제하였다. 사지나티의 논문(Saginati 등, 1992)에서 보고된 바와 같이, 테나신-C의 거대 동형을 정제하였다. 재조합 단백질을 실시예 1에 기재한 바에 따라 발현시키고 정제하였다. 카네몰라의 논문(Carnemolla 등, 1989)에 기재된 바와 같이 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏팅을 실시하였다.

ELISA법에 사용된 항원 모두를 PBS중에 희석시켜 50 내지 100μg/㎖의 농도로 하고, 4°C에서 밤새도록 면역-플레이트 웰(Nunc, 록스킬데, 덴마크)에 코팅시켰다. 비결합형 항원은 PBS로 제거하고, 3%(w/v)의 소 혈청 알부민(BSA)을 함유하는 PBS로 37°C에서 2시간 동안 상기 플레이트를 블록킹하였다. 다음, 0.05%의 트윈 20을 함유하는 PBS (PBST)로 4차례 세척하였다. 다음, 항체가 결합되도록 37°C에서 1.5시간 동안 방치하였는데; 태그 서열에 대한 항혈청과 함께 scFv를 미리 항온배양시 켰다: 즉 FLAG 태그를 위해서는 mAb M2[코닥, 뉴 헤이븐, 코네티컷]를, myc 태그를 위해서는 9E10[ATCC, 록크빌, 메릴랜드]를 사용하였다. 시험에 사용된 대조군 항체는 mAbs BC-1과 IST-6이었다

. PBST로 4회 세척한 후, 상기 플레이트를 1:2000으로 희석된(PBST + 3% BSA중에 희석됨) 염소의 비오티닐화 항-마우스 IgG(Bio-SPA 디비젼, 밀란, 이태리)와 함께 37℃에서 1시간 동안 항온배양하였다. 반복하여 세척하고, 스트렙타비딘-비오티닐화 알칼리 포스파타아제 복합체(Bio-SPA 디비젼, 밀란, 이태리)를 37℃에서 1시간에 걸쳐 부가(2mM MgCl2를 함유하는 PBST중에 1:800으로 희석됨)하였다. 정제 타잎으로 되어 있는 포스파타아제 기질(시스마)을 이용하여 pH 7.8의 디에탄올아민 10%중에서 상기 반응을 전개시키고, 405nm에서의 광학 밀도를 기록하였다. 그 결과가 하기 [표 2]에 나타나 있다.

[표 2]

	CGS-1	CGS-2	BC-1	IST-6
혈장 FN	0.07	0.04	0.09	1.73
WI38VA FN	1.16	0.72	1.20	1.12
n110 kD(B-)	0.03	0.01	0.05	1.20
n120 kD(B+)	0.82	0.81	1.20	0.02
rec FN7B89	1.11	1.02	1.02	0.01
rec FN789	0.01	0.01	0.05	1.25
rec ED-B	1.12	1.32	0.15	0.04
rec FN-6	0.01	0.01	0.08	0.03
테나신	0.01	0.02	0.06	0.02

피브로넥틴-유래 항원에 대한 scFv 및 단일클론 항체의 면역반응성을 ELISA 법을 이용하여 측정하였다. 측정치는 405nm에서 측정된 값으로 기저 신호를 공제한 후의 OD값을 나타낸다. 데이터는 4회의 실험값의 평균치이고 최대 10%의 표준 편차를 보인다.

실험에 사용된, 서로 다른 형의 피브로넥틴은 다음과 같다: 혈장 FN = 인간 혈장 피브로넥틴; WI38-VA FN = SV40-형질전환 섬유아세포의 상등액으로부터의 피브로넥틴(Zardi 등, 1987); n110kD = ED-B가 없이, 터몰리신으로 처리된 FN 도메인 4; n120kD = ED-B를 포함하는, 터모리신으로 처리된 FN 도메인 4; rec FN7B89 = 인접하는 III형 FN 상동 반복단위가 ED-B 도메인 양 측면에 존재함; rec FN789 = ED-B 도메인을 갖는 III형 FN 상동성 반복단위; rec ED-B = 재조합 ED-B 단독; rec FN6 = 재조합 FN 도메인 6임.

CGS-1 및 CGS-2는 모두 재조합 ED-B 펩티드를 인식할 뿐만 아니라 ED-B 서열을 함유하는 본래의 FN 단편 및 재조합 FN 단편을 인식하는 한편, ED-B가 결여된 FN 단편은 인식하지 않는다. 게다가, CGS-1 및 CGS-2는 테나신(이는 15개의 III형 상동성 반복단위를 포함한다: Siri 등, 1991) 및 혈장 FN과는 반응하지 않는데, 이들은 터몰리신 분해 산물 중에 검출될 정도의 ED-B 서열을 포함하고 있지 않다(Zardi 등, 1987). 반면, CGS-1 및 CGS-2는 SV40-형질전환 세포주 WI38VA로부터 정제된 FN과는 강하게 반응한다. 상기 세포주로부터 유래하는 FN 분자의 약 70 내지 90%의 FN 분자가 ED-B를 포함하는데, 이는 세포주로부터 제조된 정제형 FN과 전체 RNA를 이용하여 실시한 터몰리신 분해 실험 및 S1 뉴클라아제 실험에 의해 알 수 있다(Zardi 등, 1987; Borsi 등, 1992). FN의 ED-B 성분에 대한 scFv의 특이성은, WI38VA 세포상의 FN에 CGS-1 및 CGS-2가 결합하는 것을 저해하는 가용성 재조합 ED-B를 이용하여 더욱 상세히 증명되었다(데이터는 미도시).

상기 데이터에 의해, CGS-1과 CGS-2만이 ED-B 도메인을 포함하고 있는 FN 유도체와 특이적으로 반응한다는 것을 확실히 알 수 있었다. 재조합 ED-B의 경우만을 제외하고는, 이들은 모두 mAb BC-1의 반응성과 동일한 반응성을 보이는데, 상기 재조합 ED-B는 BC-1에 의해 인식되지 않는다. mAb 대조군에 대한 상대적인 값으로 얻어진 ELISA 신호의 강도는, 상기 두 scFv가 ED-B-함유 항원에 대해 높은 특이성을 갖는다는 것을 반영해 주고 있다.

CGS-1과 CGS-2의 특이성은, 혈장 및 WI38VA 세포로부터 유래된 FN 및 그 터몰리신 분해물을 이용하여 면역블랏에 대해 더욱 상세히 조사되었다. 터몰리신에 의한 분해시, WI38VA 세포로부터 얻은 FN(이의 대다수가 ED-B를 포함한다)은 120kD 단편(ED-B를 포함함)과 ED-B가 결여된 소수의 110kD 단편을 생성한다(도 2a; Zardi 등, 1987). 상기 120kD 도메인을 더욱 분해하면 두 개의 단편이 생성되는데: 카르복시 말단에 거의 전체 ED-B 서열을 포함하는 85kD 단편과 35kD 서열을 생성한다(도 2a; Zardi 등, 1987).

도 2b의 왼쪽편에는 면역블랏팅법에 의해 분석된 단백질 분획에 대한 쿠마실 염색 겔이 도시되어 있다. 혈장 FN(레인 1)과 단백질의 터몰리신 분해물(110kD 단백질을 포함하는 레인 3과 분해된 110kD 단백질을 포함하는 레인 4)은 CGS-1 및 CGS-2에 의해 인식되지 않았다. 반면, WI38VA 세포로부터 얻은 ED-B-풍부 FN은, 손상되지 않은 형태(레인 2) 및 이후 터몰리신 분해물(레인 5, 6 및 7) 모두 두 scFv 단편에 의해 인식되었다. CGS-1에 의해 특이적으로 인식될 수 있는 가장 작은 FN-유래 단편은 120kD 단백질(III형 반복단위 2-11에 걸쳐 있는 부분을 포함함)인 반면, CGS-2는 ED-B N-말단외에 반복단위 2-7에 이르는 85kD 단편을 인식할 수 있다(도 2b; Zardi 등, 1987). 이러한 결과는, 두 종류의 scFv가 ED-B 서열내에 있는 별개의 에피토프와 반응한다는 것을 나타낸다. CGS-2가 85kD 단편에 결합한다는 사실은 이 클론에 대한 에피토프가 ED-B의 아미노 말단에 존재한다는 것을 나타낸다. 반면, 120kD 단편이 85kD 단편으로 분해되었을 때 CGS-1와 결합하지 않는다는 사실은, CGS-1은 ED-B 분자의 좀더 카르복시 말단쪽에 위치한 에피토프를 인식한다는 것을 나타낸다.

ED-B서열을 포함하는 또는 포함하지 않는 재조합 FN 단편 및 융합 단백질을 이용하여, 면역블랏팅법에 의해, CGS-1 및 CGS-2의 미세한 특이성을 더욱 상세히 조사하였다. 상기 FN 융합 단백질은 카네몰라의 문헌(Carnemolla 등, 1989)에 기재된 방법에 따라 제조하였다. 이 실험 결과가 도 3에 도시되어 있다; 인간의 FN 도메인 구조에 대한 개략도와의 비교를 위해서는 카네몰라의 문헌(Carnemolla 등, 1992)을 참조할 수 있다. 얻어진 결합 프로필은, 이전에 ELISA법 및 면역블랏팅법에 의하여 정제형 FN 및 단백분해 절단 생성물에 대해 밝혀진 사실: CGS-1 및 CGS-2는 ED-B-함유 FN 단편(레인 2 및 4)과는 강하게 반응하나 ED-B가 결여된 FN 서열(레인 1 및 3)에는 반응성을 보이지 않는다는 것을 본질적으로 확인해주었다. CGS-1은 인간의 ED-B 융합 단백질(레인 5) 또는 닭의 ED-B 융합 단백질(레인 6)과는 반응하지 않지만, CGS-2는 상기 두 단편과 강하게 반응하였다(도 3). 이러한 결과는, CGS-1에 의해 인식되는 ED-B-함유 FN중에 존재하는 에피토프의 어떤 구조적인 제약성을 반영하는 것일 수 있다; 예를 들면, 상기 에피토프는 단백질 변성에 대해 민감하거나, SDS-PAGE에 의해 분획화되어 니트로셀룰로스와 같은 고형 지지체로 전이되는 경우에 제대로 제공되지 못할 가능성이 있다.

상기 결과들은 종합적으로, CGS-1 및 CGS-2가 ED-B-함유 FN에 강하게 그리고 특이적으로 결합하며 그 결합부위는 상호 구별되는 영역이면서도 mAb BC-1에 의해 인식되는 ED-B 구조와도 구별되는 영역이라는 것을 증명해준다.

실시예 4 - 인간 및 마우스 종양 절편에 대한 면역세포화학 염색에 사용되는 친화성 성숙 항-ED-B scFv의 용도

CGS-1과 CGS-2는 모두, 인간의 여러 정상 조직 및 신생(종양) 조직에 존재하는 ED-B-함유 FN 분자를 면역학적으로 국재화하는데 사용되어 왔다. B-FN 동형이 피부 상처 치유중에 마크로파지 및 섬유아세포에서 발현된다고 알려져 있으므로(Carnemolla 등, 199; Brown 등, 1993) 정상 조직으로서 피부를 선택하였다. 선택된 두 종류의 종양에 대해 항-피브로넥틴 mAbs를 이용하여 미리 염색 특이성을 분석하였는데: 신경교아세포종 다형은 이 종양의 혈관에 존재하는 내피세포가 상당한 증식상태에 있고 또 B-FN 동형의 발현을 포함하는 맥관형성 과정이 증가상태에 있기 때문에 더 상세히 연구되었다(Castellani 등, 1994). 게다가, 인간의 다양한 정상, 과증식, 신생 유방 조직을 이용한 연구 결과는 맥관형성과 B-FN 발현사이의 상관성에 대해 더 상세한 증거를 제공해주었다(Kaczmarek 등, 1994).

여기 기재된 실험을 위해, CGS-1 및 CGS-2에 대한 면역조직화학 염색을 실시 하여 그 결과를, mAb BC-1(B-FN 동형을 인식함)에 대한 염색 및 모든 공지된 FN 동형 변종(IST-4) 모두에 반응하거나 ED-B가 결여된 FN 동형(IST-6)에만 반응하는 것으로 알려진 다른 mAbs에 대한 염색 결과와 비교하였다. 이러한 모든 대조군 항체의 특성에 대해서는 이전에 보고된 바 있다(Carnemolla 등, 1989; 1992).

수술중에 취한 샘플로부터 정상 조직 및 종양 조직을 얻었다. FN-함유 분자를 정확하고 감도높게 검출하는데는 조직의 준비 및 고정화가 중요하다는 것이 이미 확립된 사실이다(Castellani 등, 1994). 면역조직화학을 위해, 5㎛두께의 저온유지 절편을 공기 건조시키고 차가운 아세톤중에서 10분 동안 고정시켰다. 스트렙타비딘-비오틴 알칼리 포스파타아제 복합체 염색 키트(Bio-SPA 디비젼, 밀란, 이태리)와 나프톨-AS-MX-인산염과 Fast Red TR(시그마)를 이용하여 면역염색을 실시하였다. 역염색으로서 길(Gill)의 헤마톡실린을 사용한 다음, 카스텔라니(Castellani 등, 1994)에 의해 이미 보고된 바와 같이 글리세르겔(Dako, 카펜테리아, 캘리포니아)중에서 슬라이드에 고정(mount)시켰다. 조직 염색에 대한 양성 반응이 얻어지는 실험에서 특이성을 더 깊이 분석하기 위하여, 재조합 ED-B 도메인과 함께 항체를 미리항온배양시킨 다음 앞서 기술한 바대로 검출하여 ED-B에 대한 특이성을 조사하였다.

상기 실험 결과는 모두 CGS-1 및 CGS-2가 mAb BC-1과 동일한 조직학적 구조에 반응한다는 것을 보여주었다. CGS-1, CGS-2 및 BC-1을 이용하여 피부로부터 얻은 염색 패턴은, 진피에서 발현된 FN중에 ED-B가 없다는 것을 반영한다. 침윤성 관 암종 절편의 염색에서, CGS-1, CGS-2 및 BC-1은 제한된 염색 분포를 보였는데, 그 분포는 신생 세포와 간질 사이의 경계에 국한되었다. 이는, 비록 전체 FN이 종양 간질에 균일하게 분포되긴 해도 B-FN의 발현은 특정 영역으로만 국한된다는 사실과 일치하며, 그 영역은 전에 침윤성 관 암종에서 mAb BC-1을 이용하여 성공적으로 국재시킨(95%의 경우) 영역이다(Kaczmarek 등, 1994).

신경교아세포종 다형 종양의 BC-1의 염색에서 전에 발견된 사실이 확인되었다. 카스텔라니 등(1994)은 신사구체-

유사 혈관 구조의 전형적인 염색 패턴을 관찰하였고, 본 발명자들이 실시한 실험에서 CGS-1 및 CGS-2는 정량적으로 이와 동일한 결과를 내는 것으로 관찰되었다.

그러나, CGS-1 및 CGS-2와 mAb BC-1사이에는 중요한 차이점이 있는데: 상기 두 종류의 인간 scFv는 닭의 B-FN 및 마우스의 B-FN 모두에 결합하는 반면 BC-1은 엄격하게 인간 B-FN에만 특이성을 보인다는 것이 증명되었다. CGS-2는 닭의 태아(embryo)에 반응하나(데이타는 미도시) CGS-1 및 CGS-2는 모두 마우스 종양에 반응한다.

쥐의 F9 기형암종 절편에 있는 혈관구조 역시 CGS-1 염색을 나타냈다. 반면, 마우스의 모든 정상 시험 조직(간, 비장, 신장, 위, 소장, 대장, 난소, 자궁, 방광, 췌장, 부신선, 골격근, 심장, 폐, 갑상선 및 뇌)은 CGS-1 및 CGS-2 염색에 대해 음성 반응을 보였다(데이타는 미도시). F9 기형암종 섹션에서 염색된 구조는, 염색을 완전히 저해하는 재조합 ED-B 도메인을 이용함으로써 ED-B에 특이적인 것으로 밝혀졌다(데이타는 미도시).

실시예 5 - 인간 종양에 대한 생체내 표적화에 사용되는 친화성 성숙 항-ED- B의 용도

인간 흑색종 세포주 SKMEL-28을 사용하여, 6 내지 10주된 늙은 누드 마우스(Balb-c 또는 MF-1; 할란, 영국)의 한쪽 옆구리에 1x107세포/마우스를 피하 주사하여, 이식된 종양을 발육시켰다. 종양을 가진 마우스 꼬리에, 상기 종양의 지름이 약 1㎝에 이르렀을 때, PBS중에 1㎎/㎖으로 용해되어 있는 scFv1-Cy71 용액을 100㎕ 정맥 주사하였다.

pH = 9.3의 1M 중탄산나트륨 100㎕와 200㎕의 CY7-bis-OSu(Amersham; Cat. Nr. PA17000; DMSO중 2㎎/㎖)를 PBS중에 용해된(1㎎/㎖) 항체 용액 1㎖에 부가시킴으로써 재조합 항체를 CY7로 표지시켰다. 실온에서 30분 경과 후, pH = 7.4의 1M 트리스 100㎕를 상기 혼합액에 부가한 다음, PBS로 평형시킨 1회용 PD10 칼럼(파마시아 바이오텍, 피스카타웨이, 뉴저지, 미국)을 이용하여 상기 표지된 항체를 비반응 염료로부터 분리하였다. Centricon-10 튜브(아미콘, 비벌리, 매사추세츠, 미국)를 이용하여, 용리된 녹색 항체 분획을 대략 1㎎/㎖까지 농축시켰다. 달성된 표지 비율은 일반적으로 CY7 1분자: 항체 1분자에 가까웠다. 이는, 1㎎/㎖의 항체 용액이 280nm에서 1.4단위의 흡광도를 낸다고 가정하여, 1㎝ 큐벳을 이용하여 분광학적 방법으로 측정되었는데, 747nm에서 CY7의 몰흡광계수 (molar extinction coefficient)는 200,000($M^{-1}\,cm^{-1}$)이었고 280nm에서의 CY7 흡광도는 무시되었다, 띠-이동(Neri 등, 1996b), 항원 칼럼에서 실시된 친화성-크로마토그래피, 또는 BIA코아 분석을 이용하여, 표지 후 항체 샘플의 면역반응성을 확인하였다. 산소/플루오 로메탄 혼합물로 마우스를 흡입 마취시킨 다음, 집에서 설치한 마우스-이미징장치로 일정 시간 간격으로 마우스를 이미징하였다. 결과의 재현성을 보장하기 위해 각 샘플에 대해 2 내지 8마리의 동물을 시험하였다. 상기 과정은 D. Neri(UK PPL 80/1056)에게 발행된 영국 프로젝트 라이센스 “종양 표적화‘에 따라 실시되었다.

적외선 마우스-이미징장치는, 적외선 플루오로포아 CY7의 사용이 가능한, 폴리 등(Folli 등, 1994)의 광검출 시스템을 변형시켜 제조하였다. 조직투과성을 더 좋게 하기 위하여 적외선 조명을 선택하였다. CY7의 형광성(>760nm)은 인간의 눈에는 보이지 않으므로 컴퓨터-제어 CCD-카메라를 사용할 필요가 있었다. 상기 마우스-이미징장치는, 100W 텅스텐 할로겐 램프가 장착되어 있고 CY7에 특이적으로 디자인된 50mm 직경의 여기 필터(크로마 코포레이션, 브라틀보로, 버몬트, 미국; 673-748nm)가 고정되어 있는, 빛이 차단된 흑색 박스로 구성되어 있다. 그 결과, 조명광은 이미징시키려는 마우스가 놓여있는 5x10㎝ 크기 영역 전체를 균일하게 비춘다. 형광성은, C-마운트 렌즈와 50nm 방사 필터(크로마 코포레이션, 브라틀보로, 버몬트, 미국; 765-855nm)가 장착되어 있고 ImageBOX 시스템(키네틱 이미징사., 리버풀, 영국)과 인터페이스로 연결된 8-비트 단색광 Pulnix CCD-카메라를 이용하여 검출되었다. 이 시스템은 프레임-그래버(frame-grabber)와 연속 이미지 포착 및 통합용 소프트웨어가 장착된 컴퓨터로 구성되어 있다. 50ms 간격으로 얻은 3개의 연속 이미지는 통상적으로 평균화 과정에 사용되었다; 이 번호는 한 동물에 대한 일련의 사진에 대해 계속 일정하게 유지되었는데 이로써 서로 다른 시점(points)에서의 종양 표적화를 직접 비교할 수 있었다. 다음, 프로그램 그래픽 컨버터를 이용하 여 TIFF 포맷에서의 화상을 PICT파일로 전환시킨 다음, 매킨토시 7100/66 컴퓨터와 맥드로 프로(MacDraw Pro) 프로그램을 이용하여 화상을 얻었다.

이 장치의 디자인에 대한 개략도가 도 4에 도시되어 있다.

이들 실험은, 육안관찰 수준으로 가시화시켰을 때 scFv가 종양에 국재되어 있다는 것을 보여준다.

이하, 두 종류의 항-EDB scFv를 이용하여 발육중인 종양의 신생혈관을 표적화하는 것에 관한 현미경 수준에서의 확인에 대해 상세히 기재한다.

이식된 SKMEL-28 인간 흑색종 또는 마우스 F9 기형종양을 한쪽 옆구리에 가지고 있는 누드 마우스 및/또는 SCID 마우스에, FLAG 태그로 표지하지 않은 scFv 단편 또는 비오티닐화 scFv 단편을 주사하였다.

주사 후, 서로 다른 시점에서 마우스를 희생시켜 종양 절편 및 비-종양 절편을 얻은 다음, 항-FLAG M2 항체(코닥, 181) 또는 스트렙타비딘계의 검출 시약을 이용하여, 종래의 면역조직화학 프로토콜에 따라 염색하였다. 최적 표적화는

일반적으로 주사 후 12시간 후에 얻어졌다. CGS-1 및 CGS-2는 모두, 인간의 이식 종양 및 마우스의 기형암종 모두의 신생혈관에 결합하는 것으로 밝혀졌다.

실시예 6 - 누드 마우스에 있어서 쥐의 F9 기형암종 이식종에 대한 표적화

누드 마우스의 한쪽 옆구리에 4x10 ^{6} 개의 쥐 F9 기형암종 세포를 피하주사하여 고형 종양을 발육시켰다. 이 종양은 마우스에서 매우 신속히 성장하여 주사한 지 약 1주일 후에는 지름이 1㎝가 되었고 혈관이 상당히 형성되었다. 항체의 표적 화를 이미징하기 위해, 폴리 등(Folli 등, 1994)의 광검출법에 대한 변형방법을 이용하여, 다양한 시점에서 이미징된 동일 동물에서의 종양 표적화 및 항체 소실에 관한 속도론적 평가를 하였다. 이는 위에서 상세히 기재한 바 있다 (도 4 참조).

종양 표적화 및 항체의 검출 용이성을 위하여, 발현 벡터 pGIN50의 Sfil/Not1 부위에 항체를 서브클로닝함으로써 scFv(CGS-1), scFv(CGS-2) 및 항-리소자임 scFv(D1.3)(McCafferty 등, 1990)에 호모이량체 태그를 부착시켰다. 상기 벡터는 pDN268의 유도체인데(Neri 등, 1996b), 상기 벡터에는 태그의 His6 서열이 서열: GGC LTD TLQ AFT DQL EDE KSA LQT EIA HLL KEK EKL EFI LAA H로 치환되어 있고, 시스테인 잔기 및 항체 단편의 공유결합적 호모이량체화를 위해 양친매성 Fos 단백 나선을 포함한다(Abate 등, 1990). 완전한 공유결합 이량체화는 달성되지 않았다: 대략 30 내지 50%의 항체 단편이 공유결합적으로 연결된 이량체로 이루어져 있다.

암탉의 난 리소자임(D1.3) 또는 7B89(항-ED-B 항체; Carnemolla 등, 1996)와 CNBr-활성화 세파로스(파마시아 바이오텍, 피스카타웨이, 뉴저지, 미국)를 커플링시킴으로써 얻어진 칼럼상에서, 친화성-크로마토그래피를 실시하여 항체 단편을 정제하였다. 상등액을 친화성 지지체에 로딩하였는데, 이를 PBS, PBS + 0.5M NaCl로 세척하고, 100mM Et3N을 이용하여 용리시켰다. 다음, 상기 항체를 PBS에 대해 투석시켰다.

전술한 바와 같이 상기 항체를 표지시킨 후, 종양을 갖고 있는 마우스의 꼬리 정맥에, 상기 종양의 지름이 대략 1㎝가 되었을 때, PBS중에 용해된 1㎎/㎖ scFv $_{1}$ -Cy71 용액 100㎕을 주사하였다.

도 5에 도시된 바와 같이, scFv(CGS-1)는 3일 동안 종양 부위에 국재하였는데, 물론 이 기간 동안에 종양 부위에서의 항체 소실도 신속히 일어났다. 그러나, 대퇴부의 염색도 어느 정도 있었다. CGS-1의 종양 표적화 능력은, 항체 이량체화를 촉진하기 위하여 C-말단에 시스테인 잔기를 포함하는 양친매성 나선을 도입함으로써 극적으로 개선되었다(Pack 등, 1993). 실제로, 상기 이량체 scFv(CGS-2)의 국재화는 24시간 내지 72시간 동안에는 유의성있을 정도로 감소하지 않는것 같았다. 반면, 음성 대조군(이량체 항체 scFv(D1.3)2, 항-리소자임 항체)은 신속한 소실을 보였고 종양 또는 대퇴부에서 검출가능한 국재화를 보이지 않았다.

scFv(28SI)은 6시간에서 미약한 종양 표적화를 보였으나(미도시) 24시간 또는 그 후에는 전혀 검출되지 않았다(도 6). 친화성 성숙화는 표적화를 상당히 개선시켰다; 따라서 scFv(CGS-2)는, 단량체(도 6)든 이량체(미도시)든 크고 작은 F9 종양을 효율적으로 표적화하였다. 이틀 후 종양 1g당 항체 주사량%는, scFv(CGS-2) 단량체의 경우에는 2%였고 scFv(CGS-2) 이량체의 경우에는 3 내지 4%였다. scFv(CGS-2)에 의해 종양으로 운반된 양 역시 scFv(CGS-1)의 경우보다 높았는데(도 5 및 도 6) 이는 이들 각각의 친화성과 관계있다(표 1). 그러나, scFv(28SI)와 scFv(CGS-2)는 모두 단백질 분해효소에 의해 절단되는 경향이 있고 높은 간 흡수를 보이는 반면(도 6), scFv(CGS-1) 항체는 상당한 정도로 더 안정하고 낮은 간 흡수를 보인다(도 5).

참고문헌

Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992; Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition.
Alitalo et al. Adv. Cancer Res. 37, 111-158 (1982).
Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922.
Barone et al. EMBO J. 8, 1079-1085 (1989).
Bird et al, Science, 242, 423-426, (1988).
Borsi et al. J. Cell. Biol. 104, 595-600 (1987).
Borsi et al. Anal. Biochem. 192, 372-379 (1991).
Borsi et al. Int. J. Cancer 52, 688-692 (1992a).
Borsi et al. Exp. Cell Res. 199, 98-105 (1992b).
Brown et al. Amer. J. Pathol. 142, 793-801 (1993).
Carnemolla et al. J. Cell Biol. 108, 1139-1148 (1989).
Carnemolla et al. J. Biol. Chem 24689-24692 (1992).
Castellani et al. J. Cell. Biol. 103, 1671-1677 (1986).
Castellani et al. Int. J. Cancer 59, 612-618 (1994).
Crothers et al. Immunochemistry 9, 341-357 (1972).
DeJager et al (1988) Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 29:377.
Folli, et al (1994), Cancer Res., 54, 2643-2649.
Ffrench-Constant et al. J. Cell Biol. 109, 903-914 (1989).
Ffrench-Constant et al. Development 106, 375-388 (1989).
Gibson TJ (1984) PhD thesis. (University of Cambridge, Cambridge, UK).
Griffiths, et al. (1994), EMBO J. 13, 3245-3260.
Gutman and Kornblihtt. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84, 7179-7182 (1987).
Hawkins et al. J. Mol. Biol. 226, 889-896 (1992).
Holliger et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993).
Holliger, P. and Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993).
Hoogenboom et al. Nucl. Acids Res 19, 4133-4137 (1991).
Humphries et al. J. Cell Biol. 103, 2637-2647 (1986).
Huston et al, PNAS USA, 85, 5879-5883, (1988)
Hynes Ann. Rev. Cell Biol. 1, 67-90 (1985).

Jain RK. Sci. Am. 271, 58-65 (1994).
Jonsson et al. BioTechniques 11, 620-627 (1991).
Juweid et al. Cancer Res 52, 5144-5153 (1992).
Kaczmarek et al. Int. J. Cancer 58, 11-16 (1994).
Kornblihtt et al. EMBO J. 4, 1755 (1985).
Laitinen et al. Lab. Invest. 64, 375-388 (1991).
Ledermann J.A. et al. (1991) Int J. Cancer 47: 659-664; Low et al (1996), J. Mol. Biol., 260, 359-368.
Marks et al (1991), J. Mol. Biol., 222, 581-597.
Marks et al, (1992), Bio/Technology, 10, 779-783.
McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., Chiswell, D.J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature (London), 348, 552-554.
Neri et al (1996a), Bio/Techniques, 20, 708-713.
Neri et al (1996b), Nature Biotechnology, 14, 385-390.
Nissim et al. EMBO J. 13, 692-698 (1994).
Norton and Hynes. Mol. Cell. Biol. 7, 4297-4307 (1987).
Owens et al. Oxf. Surv. Eucaryot. Genes 3, 141-160 (1986).
Oyama et al. J. Biol. Chem. 10331-10334 (1989).
Oyama et al. Cancer Res. 50, 1075-1078 (1990).
Pack et al (1993), Bio/Technology, 11, 1271-1277.
Peters et al. Cell Adhes. Commun. 3, 67-89 (1995).
Pierschbacher et al. Cell 26, 259-267 (1981).
Plückthun, A. Bio/Technology 9: 545-551 (1991).
Reff, M.E. (1993) Curr.. Opinion Biotech. 4: 573-576.
Ruoslahti. Ann. Rev. Biochem. 57, 375-413 (1988).
Saginati et al. Eur J. Biochem. 205, 545-549 (1992).
Schwarzbauer et al. EMBO J. 6, 2573-2580 (1987).
Schroff et al, 1985 Cancer Res 45: 879-885.
Siri et al. Nucl. Acids Res. 19, 525-531 (1991).
Tomlinson I.M. et al, (1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798.
Traunecker et al, Embo Journal, 10, 3655-3659, (1991).
Trill J.J. et al. (1995) Curr. Opinion Biotech 6: 553-560.
Vartio et al. J. Cell Science 88, 419-430 (1987).
Vaughan et al (1996), Nature Biotechnol., 14, 309-314.
Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989).
Winter, G and C. Milstein, Nature 349, 293-299,1991.

WO94/13804Yamada. Ann. Rev. Biochem. 52, 761-799 (1983).

Zardi et al. EMBO J. 6, 2337-2342 (1987).

발명의 효과

본 발명에 따른 분리된 항체 또는 항체 단편은 피브로넥틴 (FN)의 ED-B 종양태아성 도메인에 특이적이고 직접적으로 결합할 수 있다.

본 발명에 따른 상기 분리된 항체 또는 항체 단편은 약제학적 조성물, 종양 표적화 또는 이미화를 위한 약제 및 진단 키트의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 핵산 및 상기 핵산을 포함하는 숙주 세포는 본 발명의 분리된 항체 또는 항체 단편를 제조하는데 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명에 따른 본 발명의 분리된 항체 또는 항체 단편의 제조방법에 의하면, 피브로넥틴 (FN)의 ED-B 종양태아성 도메인에 특이적이고 직접적으로 결합하는 분리된 항체 또는 항체 단편를 효율적으로 제조할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
정제된 모노머로서 측정되었을 경우, ED-B에 대한 해리 상수 (Kd)가 $1x10^{-7}$ M 이하인, 피브로넥틴 (FN)의 ED-B 종양태아성 도메인에 특이적이고 직접적으로 결합하는 분리된 항체 또는 항체 단편.

청구항 2.
제1항에 있어서, 정제된 모노머로서 측정되었을 경우, ED-B에 대한 해리 상수 (Kd)가 $1x10^{-8}$ M 이하인, 분리된 항체 또는 항체 단편.

청구항 3.
제1항에 있어서, 인간 유래의 항체 항원 결합 도메인을 포함하는 것인 분리된 항체 또는 항체 단편.

청구항 4.
제1항에 있어서, 상기 FN을 프로테아제 서모라이신 (thermolysin)으로 처리한 후에 ED-B를 포함하는 모든 FN에 결합하는 것인 분리된 항체 또는 항체 단편.

청구항 5.
제1항에 있어서, 상기 B-FN을 N-글리카나제로 처리함이 없이 B-FN에 결합하는 것인 분리된 항체 또는 항체 단편.

청구항 6.
제1항에 있어서, 인간의 점라인 DP47(도 1의 코돈 1 Glu-코돈 98 Arg를 포 함)로부터 유래된 서열의 중쇄(VH) 가변영역과 CDR3 서열 Ser Leu Pro Lys를 갖는 것인 분리된 항체 또는 항체 단편.

청구항 7.
제1항에 있어서, 인간의 점라인 DP47(도 1의 코돈 1 Glu-코돈 98 Arg를 포함)로부터 유래된 서열의 중쇄(VH) 가변영역과 CDR3 서열 Gly Val Gly Ala Phe Arg Pro Tyr Arg Lys His Glu을 갖는 것인 분리된 항체 또는 항체 단편.

청구항 8.
제1항에 있어서, 인간의 점라인 DPL16(도 1의 코돈 1 Ser-코돈 90 Ser을 포함)로부터 유래된 서열의 경쇄(VL) 가변영역과 나머지 CDR3 서열 Pro Val Val Leu Asn Gly Val Val을 갖는 것인 분리된 항체 또는 항체 단편.

청구항 9.
제1항에 있어서, 인간의 점라인 DPL16(도 1의 코돈 1 Ser-코돈 90 Ser을 포함)로부터 유래된 서열의 경쇄(VL) 가변영역과 나머지 CDR3 서열 Pro Phe Glu His Asn Leu Val Val을 갖는 것인 분리된 항체 또는 항체 단편.

청구항 10.
제1항에 있어서, 인간의 점라인 DP47(도 1의 코돈 1 Glu-코돈 98 Arg을 포함)로부터 유래된 서열의 중쇄(VH) 가변영역과 CDR3 서열을 갖는 것인 분리된 항체 또는 항체 단편.

청구항 11.
제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 scFv 분자를 포함하는 것인 분리된 항체 또는 항체 단편.

청구항 12.
제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 이량체 scFv 분자를 포함하는 것인 분리된 항체 또는 항체 단편.

청구항 13.
제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 분리된 항체 단편.

청구항 14.
약제학적으로 허용가능한 부형제와 함께 유효량의 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 분리된 항체 또는 항체 단편을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 15.
제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 분리된 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 핵산.

청구항 16.
제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 분리된 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 파지.

청구항 17.
제15항에 따른 핵산으로 인 비트로 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포.

청구항 18.
치료에 사용하기 위한 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 분리된 항체 또는 항체 단편.

청구항 19.
종양 표적화를 위한 약제의 제조에 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 분리된 항체 또는 항체 단편의 사용.

청구항 20.
종양 이미지화를 위한 약제의 제조에 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 분리된 항체 또는 항체 단편의 사용.

청구항 21.
인 비트로에서 숙주 세포에서 제15항에 따른 핵산을 발현하여 분리된 항체 또는 항체 단편을 생산하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 분리된 항체 또는 항체 단편을 제조하는 방법.

청구항 22.
제1항에 따른 분리된 항체 또는 항체 단편을 생산하는 방법으로서,

a) 피브로넥틴 단백질로부터 유래된 ED-B 도메인을 포함하는 재조합 피브로넥틴 단편을 이용하여, 파지내에서 발현된 항체 또는 항체 단편 라이브러리를 스크리닝하는 단계;

b) 양성 클론으로 박테리아 숙주 세포를 감염시키는 단계;

c) 양성 파지 클론을 친화성 성숙화시키는 단계;

d) a) 및 b)단계를 반복함으로써 항원에 대한 친화성이 증가된 양성 파지 클론을 선택하는 단계; 및

e) 양성 클론으로 숙주 세포를 감염시키고 상기 숙주 세포로부터 항체 분자 를 정제하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 23.
제22항에 있어서, 상기 단계 a)는 항체 단편이 scFv 분자인 항체 단편 라이브러리를 스크리닝하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 24.
제23항에 있어서, 상기 scFv 분자는 인간 유래의 항체 항원 결합 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 25.
제22항에 있어서, 상기 단계 a)는 재조합 항원 7B89 또는 ED-B로 스크리닝하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 26.
제22항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 양성 클론의 핵산은 인 비트로에서 숙주 세포 내에서 발현에 의하여 상기 핵산에 의하여 코딩되는 산물 항체 또는 항체 단편을 생산하는 데 사용되고, 상기 산물 항체 또는 항체 단편은 피브로넥틴 (FN)의 ED-B 종양태아성 도메인에 특이적이고 직접적으로 결합하는 항체 항원 결합 도메인을 포함하는 것인 방법.

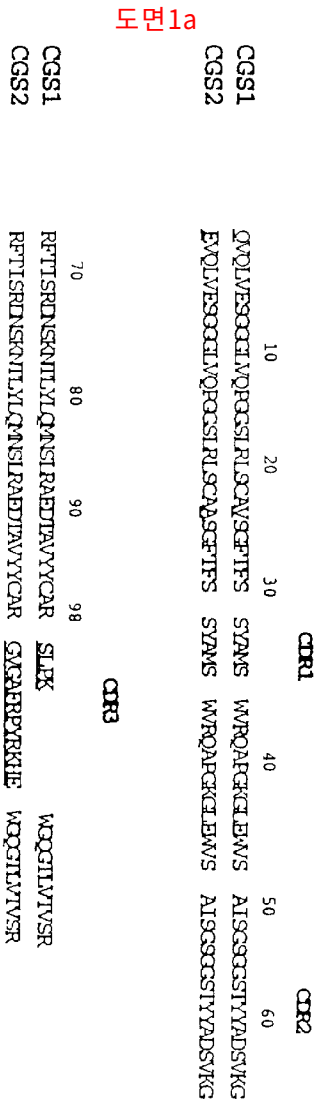
청구항 27.
제26항에 있어서, 상기 산물 항체는 전항체의 형태인 방법.

청구항 28.
제26항에 있어서, 상기 산물 항체 단편은 scFv 분자의 형태인 방법.

청구항 29.
제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 분리된 항체 또는 항체 단편 및 상기 분리된 항체 또는 항체 단편과 세포와의 결합을 결정하도록 하는 하나 이상의 시약을 포함하는 진단 키트.

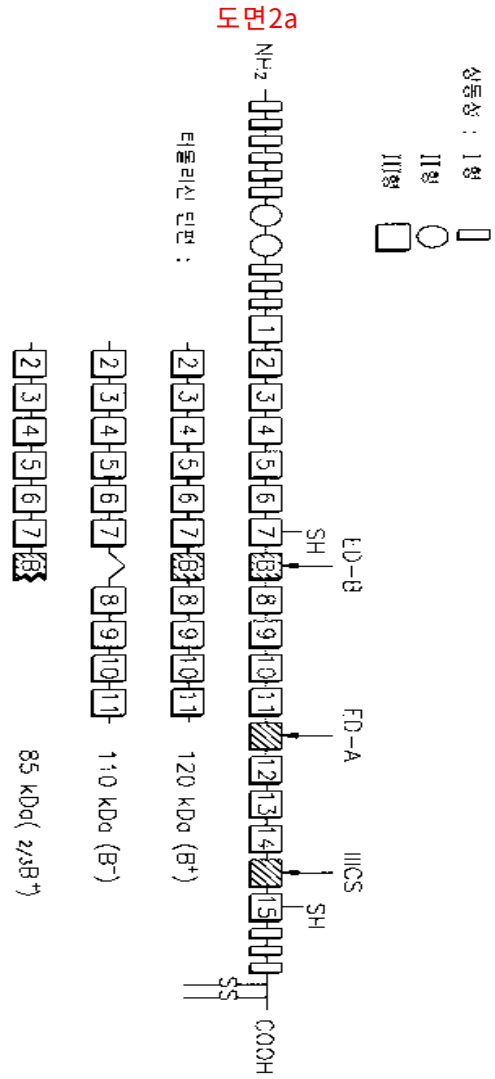
도면

도면1a

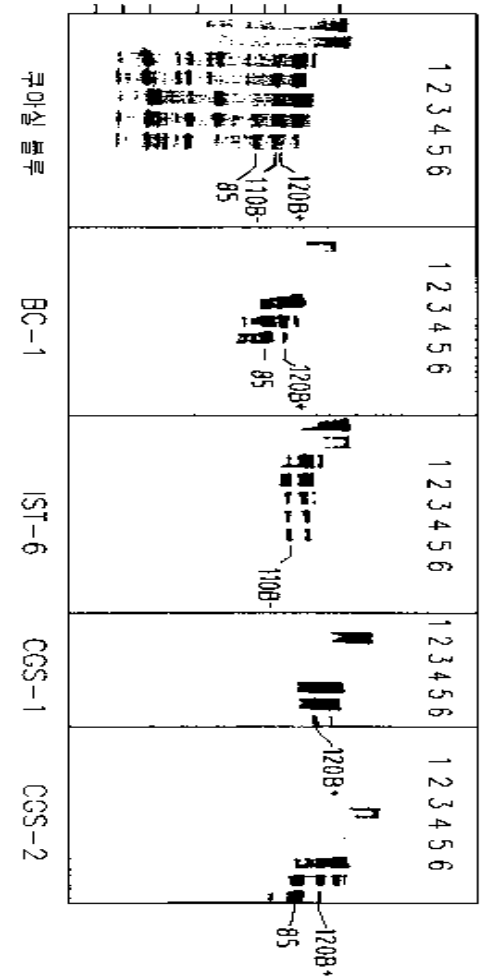


도면1b

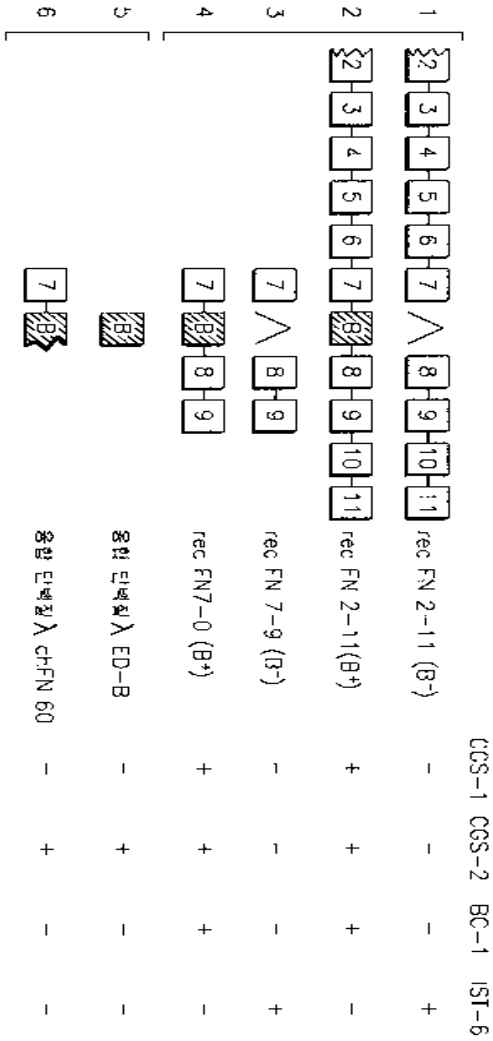
도면2a


상동상 : I형
II형
III형
NH2
SH
ED-B
FD-A
IIICS
SH
COOH
S
S
티올리신 단편 :
120 kDa (B+)
110 kDa (B-)
85 kDa(2/3B+)

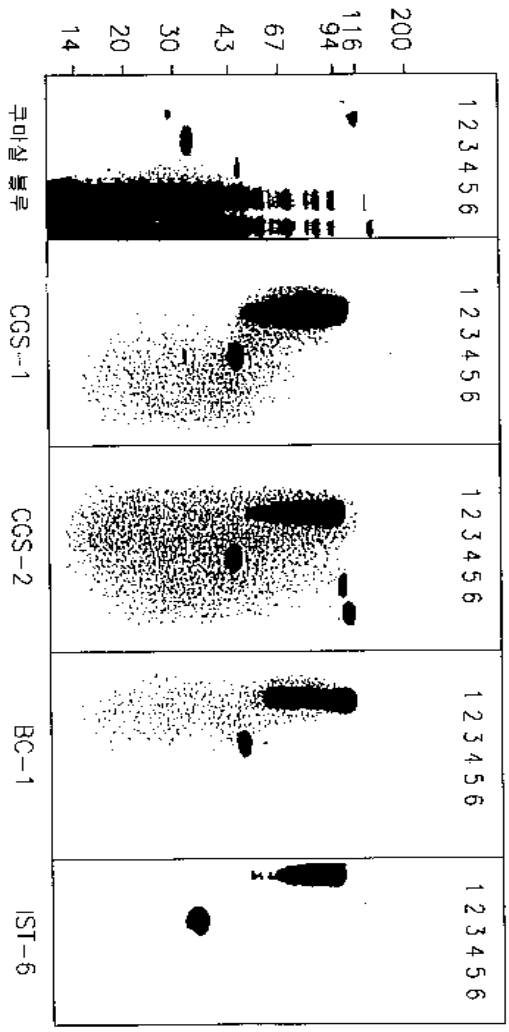
도면2b


200
116
94
67
43
30
20
14
1 2 3 4 5 6
120B+
110B-
85
쿠마실 블루
BC-1
IST-6
CGS-1
CGS-2

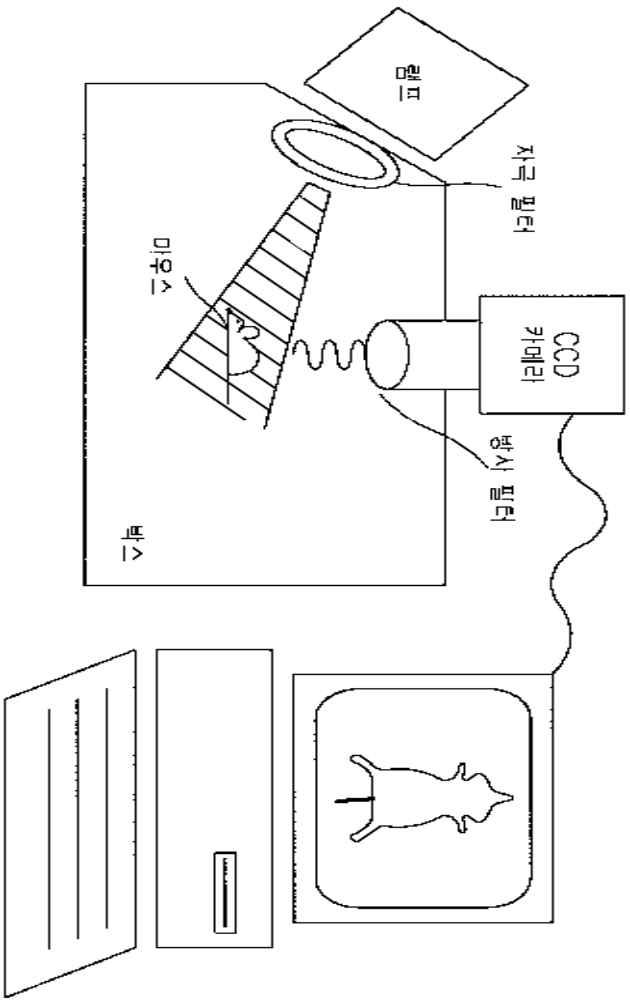
도면3a


CCS-1 CCS-2 BC-1 IST-6
1
rec FN 2-11 (B-) - - - +
2
rec FN 2-11(B+) + + + -
3
rec FN 7-9 (B-) - - - +
4
rec FN7-0 (B+) + + + -
5
중합 단백질 λ ED-B - + - -
6
중합 단백질 λ chFN 60 - + - -

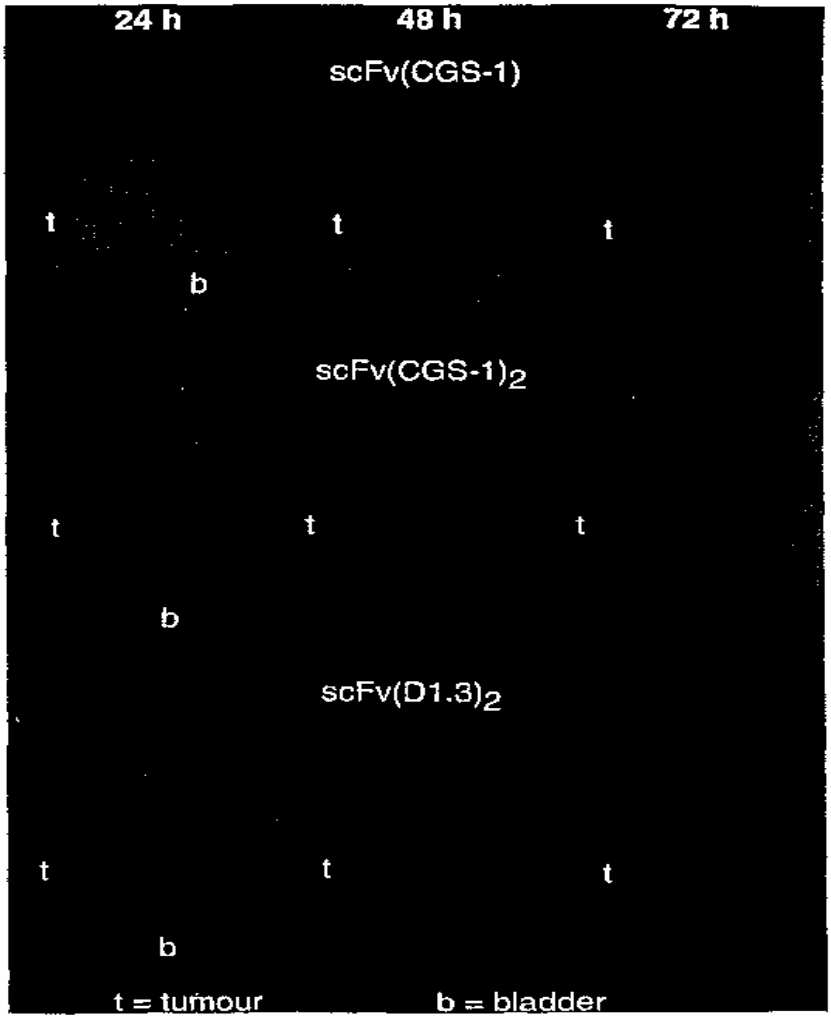
도면3b



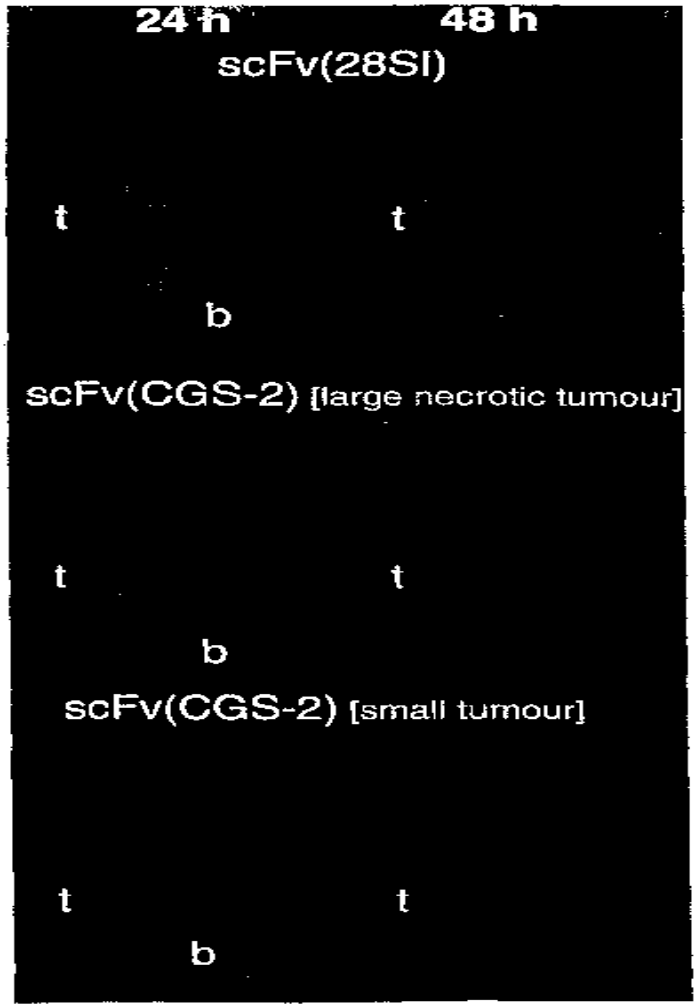
도면4



도면5


24 h
48 h
72 h
scFv(CGS-1)
t
t
t
b
scFv(CGS-1)2
t
t
t
b
scFv(D1.3)2
t
t
t
b
t = tumour
b = bladder

도면6


24 h
48 h
scFv(28SI)
t
t
b
scFv(CGS-2) [large necrotic tumour]
t
t
b
scFv(CGS-2) [small tumour]
t
t
b