

【명세서】

【발명의 명칭】

탄산탈수소 효소에 결합하는 항체 및 이의 용도

5 【기술분야】

본 발명은 탄산탈수소 효소를 인식하고 결합하는 항체, 상기 항체 또는 항원결합단편을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자를 포함하는 벡터 및 숙주세포 및 상기 항체 또는 항원결합단편의 탄산탈수소 효소 관련 질병, 예를 들면 고혈압 경감, 예방, 치료 또는 진단 용도에 관한 것이다.

10

【배경기술】

탄산탈수소 효소 (Carbonic anhydrase, CA)는 탄산수소염 및 플로톤으로의 탄산의 가역적 수화를 촉매하여, 이와 같이 생체 내의 pH 항상성의 유지에 관여하는 효소 패밀리에 속하는 효소이다. 대부분의 탄산탈수소 효소는 활성 부위에 아연 이온을 함유하기 때문에, 이들은 금속 효소와 분류된다.

탄산탈수소 효소의 패밀리는 몇 개의 그룹으로 구분되며, 적어도 5의 특이한 CA서브 패밀리가 있다(α , β , γ , δ , ϵ). α -탄산탈수소효소(CA)는 포유동물에 있어서 볼 수 있다. α -CA효소는 4개의 넓은 소그룹, 즉 세포질 기질 CA(CA-I, CA-II, CA-III, CA-VII 및 CA-XIII), 미토콘드리아 CA(CA-VA 및 CA-VB), 분비 CA(CA-VI) 및 막 결합형 CA(CA-IV, CA-IX, CA-XII, CA-XIV 및 CA-XV)로 분류된다.

CA-II, CA-IX 및 CA-XII는 종양과 관련되어 있어 이들은 다양한 종양에 대한 잠재적인 조직학적이고 예후적인 바이오마커이다[Nordfors et al. (2010), BMC cancer; 10:148]. CA-II는 가장 광범위하게 발현되어 있는, α -CA유전자 패밀리의 멤버이며 인간 조직 및 장기에서도 실질적으로 존재한다. 막관통 효소인 CA-IX는 여러 종류의 사람 암종양 및 정상 위장 조직에 있어서 발현하는 종양 관련 항원으로 인지되었다. CA-IX는 세포 접착, 분화, 증식 및 발암 프로세스에 기능적으로 관련되어 있어 그 효소

활성은 CA-II에 필적한다. 다른 막관통 CA 아이소자임인 CA-XII는 정상
 신장 조직 및 신장 세포 암종양에 있어서 최초로 발견되었다. 새로운
 연구에 의해 CA-XII는 기타 몇 개의 종양[Ulmasov, B., (2000).
 Purification and kinetic analysis of recombinant CA XII, a membrane
 5 carbonic anhydrase overexpressed in certain cancers. Proc Natl Acad
 Sci USA 97, 14212-14217]에 있어서 그러나 결장 및 자궁 등의 몇 개의
 정상 장기에 있어서도 발현하고 있는 것이 나타났다. 특히 저산소 조건
 하에서 종양에서는 CA-II, CA-IX 및 CA-XII가 고발현하고 있는 것에서
 이들의 효소가 세포 외 공간의 산성화에 의해 촉진되는 침윤 프로세스에
 10 기능적으로 관여할 가능성이 있는 것이 또한 시사되어 있다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 일예는 탄산탈수소 효소에 결합하는 항체 및 이의
 15 항원결합단편에 관한 것이다.

본 발명의 일예는, 상기 항체 또는 항원결합단편을 코딩하는
 핵산분자, 상기 핵산분자를 포함하는 벡터 및 숙주세포에 관한 것이다.

본 발명의 일예는, 상기 항체, 핵산분자, 벡터, 및/또는 숙주세포를
 포함하는 탄산탈수소 효소 관련 질환의 탐지 또는 진단 방법, 또는 진단
 20 키트에 관한 것이다.

본 발명의 일예는, 상기 항체, 핵산분자, 벡터, 및/또는 숙주세포를
 포함하는 탄산탈수소 효소 관련 질환의 예방, 치료, 또는 경감용 조성물
 또는 용도에 관한 것이다.

본 발명의 일예는, 상기 항체, 핵산분자, 벡터, 및/또는 숙주세포를
 25 포함하는 조성물을 탄산탈수소 효소 관련 질환을 갖는 대상에게 투여하는
 단계를 포함하는, 탄산탈수소 효소 관련 질환의 예방, 치료, 또는
 경감방법에 관한 것이다.

본 발명의 일예는, 상기 항체, 핵산분자, 벡터, 및/또는 숙주세포를
 포함하는 고형암 또는 고형암 세포의 크기를 감소시키거나 종양 퇴화를

유도 또는 촉진용 조성물, 또는 방법에 관한 것이다.

【기술적 해결방법】

본 발명은 탄산탈수소 효소를 인식하고 결합하는 항체, 상기 항체
5 또는 항원결합단편을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자를 포함하는 벡터
및 숙주세포 및 상기 항체 또는 이의 항원결합단편의 CA-XII 양성인
고형암의 경감, 예방, 치료 또는 진단 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 항체는 탄산탈수소 효소를 특이적으로 인식하고
결합하는 항체이다. 구체적으로, 본 발명의 항체는 CA-XII에 결합하며,
10 구체적으로는 항체가 결합하는 부위인 항원 결정부위는 N-말단에 위치하는
CA-XII의 비촉매적 부위(non-catalytic region)이다. 상기 CA-XII는 사람
유래 효소인 것이 바람직하다. 구체적으로, 사람 유래 CA-XII의 아미노산
서열을 서열번호 5에 나타낸다.

본 발명에 의한 "촉매 도메인"이란 용어는 당해 기술 분야에 있어서
15 주지의 용어이며 한층 더 또한 본 발명과의 균형에서는 탄산에서 중탄산염
및 플로톤으로의 촉매가 발생하는, CA-XII의 영역에 관한 것이다. 이에 본
발명에 따른 "비촉매적 도메인"이라 함은 상기 탄산에서 중탄산염 및
플로톤으로의 촉매가 발생하는 영역인 촉매 도메인 이외의 영역을 말한다.
본 명세서에서, 상기 CA-XII의 비촉매적 도메인은 N-말단의 비촉매적
20 도메인이며, 바람직하게는 상기 비촉매적 부위는 사람 유래 CA-XII
이소타입 I의 아미노산 서열(서열번호 5)에서 N-말단의 1번 내지 93번
아미노산으로 구성된 펩타이드 또는 이의 단편을 의미할 수 있다.

본 발명에 따른 항체가 결합하는 항원의 부위는 상기 비촉매적 부위
또는 이의 단편일 수 있으며, 즉 사람 유래 CA-XII 이소타입 I의 아미노산
25 서열(서열번호 5)에서 N-말단의 1번 내지 93번 아미노산으로 구성된
펩타이드 또는 이의 단편, 서열번호 5의 아미노산 서열 중에서 N-말단의
25번 내지 93번, 또는 25번 내지 57번 아미노산으로 구성된 펩타이드 또는
이의 단편일 수 있다.

구체적인 예로서, 본 발명에 따른 항체가 결합하는 항원의 부위 또는

항원결정부위(epitope)는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 연속적인 7개 아미노산 내지 93개 아미노산 길이, 7개 아미노산 내지 69개 아미노산 길이, 7개 아미노산 내지 33개 아미노산 길이, 14개 아미노산 내지 93개 아미노산 길이, 14개 아미노산 내지 69개 아미노산 길이, 14개 아미노산 내지 33개 아미노산 길이, 19개 아미노산 내지 93개 아미노산 길이, 19개 아미노산 내지 69개 아미노산 길이, 또는 19개 아미노산 내지 33개 아미노산 길이를 갖는 펩타이드일 수 있다.

더욱 구체적으로, 상기 항체가 결합하는 항원의 부위 또는 항체의 항원결정부위(epitope)는, 서열번호 5의 아미노산 서열 중에서 서열번호 1의 아미노산 서열을 필수적으로 포함하며 연속하는 7개 아미노산 내지 93개 아미노산의 길이 또는 7개 아미노산 내지 69개 아미노산 길이를 갖는 펩타이드일 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 5의 아미노산 서열 중에서 서열번호 2의 아미노산 서열을 필수적으로 포함하며 연속하는 14개 아미노산 내지 93개 아미노산의 길이 또는 14개 아미노산 내지 69개 아미노산 길이를 갖는 펩타이드, 더욱 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산 서열 중에서 서열번호 1의 아미노산 서열을 필수적으로 포함하는 연속하는 7개 내지 14개 아미노산의 길이를 갖는 펩타이드, 가장 바람직하게는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드일 수 있다.

사람 유래 CA-XII의 아미노산 서열인 서열번호 5의 아미노산 서열 중에서, 서열번호 1의 아미노산 서열은 32번 내지 38번 아미노산을 포함하며, 서열번호 2의 아미노산 서열은 25번 내지 38번 아미노산을 포함한다.

또는, 상기 항체가 결합하는 항원의 부위 또는 항체의 항원결정부위(epitope)는, 서열번호 5의 아미노산 서열 중에서 서열번호 3의 아미노산 서열을 필수적으로 포함하며 연속하는 14개 아미노산 내지 93개 아미노산의 길이 또는 14개 아미노산 내지 69개 아미노산 길이를 갖는 펩타이드일 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 5의 아미노산 서열 중에서

서열번호 4의 아미노산 서열을 필수적으로 포함하며 연속하는 19개 아미노산 내지 93개 아미노산의 길이 또는 19개 아미노산 내지 69개 아미노산 길이를 갖는 펩타이드, 더욱 바람직하게는 서열번호 4의 아미노산 서열 중에서 서열번호 3의 아미노산 서열을 필수적으로 포함하는 연속하는 5 14개 내지 19개 아미노산의 길이를 갖는 펩타이드, 가장 바람직하게는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드일 수 있다.

사람 유래 CA-XII의 아미노산 서열인 서열번호 5의 아미노산 서열 중에서, 서열번호 3의 아미노산 서열은 39번 내지 52번 아미노산을 10 포함하며, 서열번호 4의 아미노산 서열은 39번 내지 57번 아미노산을 포함한다.

본 발명에서 항원인 사람 유래 CA-XII의 아미노산 서열인 서열번호 5의 아미노산 서열과, 서열번호 1 내지 4의 항원결정부위 아미노산 서열을 하기 표 1에 정리한다.

15 [표 1]

설명	아미노산 서열	서열 번호
항원결정부위 Humanized 27B6	WTYFGPD	1
항원결정부위 Humanized 27B6	APVNGSKWTYFGPD	2
항원결정부위 Humanized 4B4	GENSWSKYPSCGG	3
항원결정부위 Humanized 4B4	GENSWSKYPSCGGLQSP	4
사람 유래 CA XII의 아미노산 서열	MPRRSLHAAVLLLVILKEQPSSPAPVNGSKWTYFGPDGENSWSK KYPSCGGLQSPIDLHSDILQYDASLTPLFQGYNLSANKQFLLT NNGHSVKLNLPSDMHIQGLQSRYSATQLHLHWGNPNDPHGSEHTV SGQHFAAELHIVHYNLDLYPDASTASNKSEGLAVLAVLIEMGSFN	5

	PSYDKIFSHLQHVYKKGQEA FVPGFNIEELLPERTAEYYRYRGS L TTPPCNPTVLWTVFRNPVQISQEQLLALETALYCTHMD DPSPREM INNFRQVQKFDERLVYTSFSQVQVCTAAGLSLGIILSLALAGILG ICIVVVVSIWLFRRKSIKKGDNKGVYKPKATKMETEAHA	
--	---	--

본 발명에 따른 항체는 탄산탈수소화 효소의 비촉매적 부위를 특이적으로 인식하고 결합하는 항체로 마우스 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체를 포함한다. 탄산탈수소화 효소의 비촉매적 부위는 사람 유래

5 CA-XII 이소타입 I의 아미노산 서열(서열번호 5)에서 N-말단의 1번 내지 93번 아미노산으로 구성된 펩타이드 또는 이의 단편, 25번 내지 93번 아미노산으로 구성된 펩타이드, 또는 25번 내지 57번 아미노산으로 구성된 펩타이드 또는 이들 펩타이드의 단편일 수 있다.

상기 항체의 일예는, 사람 유래 CA-XII 이소타입 I의 아미노산

10 서열(서열번호 5)에서 N-말단의 1번 내지 93번 아미노산으로 구성된 펩타이드, 또는 서열번호 5의 아미노산 서열 중에서 서열번호 1, 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산 서열을 필수적으로 포함하는 펩타이드 단편에 결합할 수 있다.

본 발명의 일예에서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는

15 펩타이드에 결합하는 항체로서, 상기 항체의 일예는 수탁번호 KCLRF-BP-00280 하이브리도마 세포에 의해서 생산된 항체의 중쇄 가변부위의 CDR1 내지 CDR 3과 경쇄 가변부위의 CDR1 내지 CDR3을 포함할 수 있다. 상기 하이브리도마 세포주는 대한민국 서울시 종로구 연건동 28에 주소를 둔 서울대학교 암연구소 한국세포주연구재단에 2012.02.14일자로 기탁하여

20 2012.02.20일자 수탁번호 KCLRF-BP-00280을 부여받았다. 상기 수탁번호 KCLRF-BP-00280 하이브리도마가 생산하는 항체를 27B6으로 명명하며, 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역과 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체이다.

25 구체적으로, 본 발명에 따른 항체의 일예는 서열번호 6 내지 8의

아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역의 CDR 및 서열번호 9 내지 11의 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역의 CDR 로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 V_H 영역의 CDR를 결정하는 아미노산 서열로서 서열번호 6(CDR1), 서열번호 7(CDR2) 및 서열번호 8(CDR3) 및/또는 V_L 영역의 CDR를 결정하는 아미노산 서열인 서열번호 9(CDR1), 서열번호 10(CDR2) 및 서열번호 11(CDR3)의 아미노산 서열을 포함한다. 또한, 본 발명에 따른 항체는 서열번호 12의 아미노산을 포함하는 V_H 영역 및 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역을 포함할 수 있다.

10 상기 항체의 일예는, 사람 유래 CA-XII 이소타입 I의 아미노산 서열(서열번호 5)에서 N-말단의 1번 내지 93번 아미노산으로 구성된 펩타이드, 또는 서열번호 5의 아미노산 서열 중에서 서열번호 3, 바람직하게는 서열번호 4의 아미노산 서열을 필수적으로 포함하는 펩타이드 단편에 결합할 수 있다.

15 본 발명의 일예에서, 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드에 결합하는 항체로서, 상기 항체의 일예는 수탁번호 KCLRF-BP-00279 하이브리도마 세포에 의해서 생산된 항체의 중쇄 가변부위의 CDR1 내지 CDR 3과 경쇄 가변부위의 CDR1 내지 CDR3을 포함할 수 있다. 상기 하이브리도마 세포주는 대한민국 서울시 종로구 연건동 28에 주소를 둔
20 서울대학교 암연구소 한국세포주연구재단에 2012.02.14일자로 기탁하여 2012.02.20일자 수탁번호 KCLRF-BP-00279를 부여받았다. 상기 수탁번호 KCLRF-BP-00279를 갖는 하이브리도마가 생산하는 항체를 4B4으로 명명하며, 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역과 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체이다.

25 구체적으로, 본 발명에 따른 항체의 일예는 서열번호 14 내지 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR 및 서열번호 17 내지 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 CDR을 포함하는 항체일 수 있으며, 바람직하게는 V_H 영역의 CDR를 결정하는 아미노산 서열로서 서열번호 14(CDR1), 서열번호 15(CDR2) 및 서열번호 16(CDR3)

및/또는 V_L 영역의 CDR를 결정하는 아미노산 서열인 서열번호 17(CDR1), 서열번호 18(CDR2) 및 서열번호 19(CDR3)의 아미노산 서열을 포함한다. 또한, 본 발명에 따른 항체는 서열번호 20의 아미노산을 포함하는 V_H 영역 및 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역을 포함할 수 있다.

5. 상기 마우스 항체 또는 키메라 항체의 일예에 따른 CDR 서열과 가변영역 서열을 하기 표에 정리한다.

【표 2】

명명	아미노산 서열	서열 번호
27B6 V_H -CDR1	GYSFTNYW	6
27B6 V_H -CDR2	IDPSDSET	7
27B6 V_H -CDR3	TRGIRGGYYA MDY	8
27B6 V_L -CDR1	QDISNY	9
27B6 V_L -CDR2	YTS	10
27B6 V_L -CDR3	QQGDTLPRT	11
27B6 V_H	QVQLQQSGPQ LVWPGASVKI SCNTSGYSFT NYWIHWVKQR PGQGLEWIGM IDPSDSETRL NQKFKDKTTL TVDRSSSTAY MQVSSSTSED SAVYYCTRGI RGGYYAMDYW GQGTSTVTSS	12
27B6 V_L	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP EGTVKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GDTLPRTFGE GTKLEIR	13
4B4 V_H -CDR1	GYSYTDYN	14
4B4 V_H -CDR2	IDPANGDT	15
4B4 V_H -CDR3	ARPIYYGVYW YFDV	16
4B4 V_L -CDR1	KSLHNSGNT Y	17
4B4 V_L -CDR2	RMS	18
4B4 V_L -CDR3	MQHLEYPFT	19
4B4 V_H	EIQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYSYD DYNIVWVRQS QGKSLDWIGY IDPANGDTTY NQKFKGKATL TVDKSSSTAF MHLNSLTSDG SAVYFCARPI YYGVVWYFDV WGAGTTVTVS	20

4B4 V _L	DIVMTQAAPS VPVTPGESVS ISCRSSKSLL HSNNGNTYLYW FLQRPQGSPQ LLIYRMSNLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP FTFGSGTKLE IK	21
--------------------	--	----

본 발명의 구체적 일예에 따라 서열번호 1을 포함하는 항원결정부위에 결합하는 항체와, 서열번호 3을 포함하는 항원결정부위에 결합하는 항체는 하나의 항원에 함께 결합 가능하다. 따라서, 상기 두 가지 항체를 사용하여 CA-XII 항원에 대한 샌드위치 ELSIA 분석 등을 수행할 수 있으며, 특히 샌드위치 ELISA 분석에서 서열번호 1을 포함하는 항원결정부위에 결합하는 항체, 예를 들면 27B6 항체를 CAPTURE 항체로, 서열번호 3을 포함하는 항원결정부위에 결합하는 항체, 예를 들면 4B4 항체를 DETECTOR 항체로 사용하는 것이 더욱 바람직하다.

본 발명에 따라 CA-XII 항원에 결합하는 인간화 항체(이하, DNP004라 함)는 CA-XII에 특이적으로 결합하는 마우스 단클론 항체 4B4(수탁번호 KCLRF-BP-00279)의 경쇄 및 중쇄 가변영역 유전자를 주형으로 제작한 항체로서, 일예는 서열번호 14, 15 및 28의 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역의 CDR 및 서열번호 29, 30 및 31의 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역의 CDR 로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항체일 수 있다.

서열번호 29: ASSX₁VTY (X₁=P or S)

서열번호 30: X₂TSX₃LX₄X₅ (X₂=A, G or R; X₃=S, R, H, Q, D, E, M; X₄=A, V, I or M; X₅=P or S)

상기 항체의 V_L영역의 CDR1은 서열번호 29의 일반식으로 표현되며, 구체적인일예는 서열번호 32 또는 33의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, V_L영역의 CDR2는 서열번호 30의 일반식으로 표현되며, 구체적인 일예는 서열번호 33 내지 42로 이루어지는 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

상기 인간화 항체(DNP004)의 일예에 따른 CDR 서열과 가변영역 서열을 하기 표에 정리한다. 하기 표 3의 서열번호 32번 내지 42번

서열에서, 진하게 표시한 부분은 변형된 아미노산 서열을 나타낸다.

【표 3】

명명	CDR	아미노산 서열	서열번호
DNP004 V _H	CDR1	GYSYTDYN	14
DNP004 V _H	CDR2	IDPANGDT	15
DNP004 V _H	CDR3	SRPIYGAYWYFDV	28
DNP004 V _L 일반식	CDR1	ASSX ₁ VTY (X ₁ =P or S)	29
DNP004 V _L 일반식	CDR2	X ₂ TSX ₃ LX ₄ X ₅ (X ₂ =A, G or R; X ₃ =S, R, H, Q, D, E, M; X ₄ =A, V, I or M; X ₅ =P or S)	30
DNP004 V _L	CDR3	QQWSSNPLT	31
DNP004 V _L	CDR1	ASSPVTY	32
DNP004 V _L	CDR1	ASSSVTY	33
DNP004 V _L	CDR2	ATSSLAP	34
DNP004 V _L	CDR2	ATSSLVS	35
DNP004 V _L	CDR2	GTSRLVS	36
DNP004 V _L	CDR2	ATSHLVS	37
DNP004 V _L	CDR2	GTSQLVS	38
DNP004 V _L	CDR2	RTSDLIS	39
DNP004 V _L	CDR2	ATSELMs	40
DNP004 V _L	CDR2	GTSMLAS	41
DNP004 V _L	CDR2	ATSSLAS	42

- 본 발명에 따른 인간화 항체(DNP004)의 일예가 포함하는 프레임 워크
- 5 서열을 하기 표 4에 정리하며, 상기 항체는 중쇄 가변영역 프레임워크 1 내지 4 및 경쇄 가변영역 프레임워크 1 내지 4의 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 프레임워크서열을 포함하는 항체일 수 있다. 중쇄 가변영역의 프레임 워크 1 내지 4의 아미노산 서열은 각각 서열번호 43 내지 46을 포함할 수 있으며, 경쇄 가변영역의 프레임워크 1
- 10 내지 4의 아미노산 서열은 각각 서열번호 47, 48, 51 및 52를 포함할 수 있다. 상기 경쇄 가변영역의 프레임워크 2는 서열번호 48의 일반식으로

표현되며, 구체적인 일예는 서열번호 49 또는 50의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

서열번호 48: MHWYX₆QKPGKAPX₇PWIIY (X₆= Q or H; H₇=R orK)

상기 인간화 항체(DNP004)의 일예에 따른 프레임워크 서열을 하기

5 표에 정리한다.

【표 4】

명명	아미노산 서열	서열 번호
Frame work #1 of V _H -humanized	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	43
Frame work #2 of V _H -humanized	IYWVRQAPGKGLEWVG	44
Frame work #3 of V _H -humanized	TYNQKFGRATISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC	45
Frame work #4 of V _H -humanized	WGQGTLLTVSS	46
Frame work #1 of V _L -humanized	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR	47
Frame work #2 of V _L -humanized	MHWYX ₆ QKPGKAPX ₇ PWIIY	48
일반식	(X ₆ = Q or H; H ₇ =R orK)	
Frame work #2 of V _L -humanized	MHWYQQKPGKAPRPWIIY	49
Frame work #2 of V _L -humanized	MHWYHQKPGKAPKPWIIY	50
Frame work #3 of V _L -humanized	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	51
Frame work #4 of V _L -humanized	FGQGTKVEIK	52

일 예로서, 본 발명에 따른 인간화 항체(DNP004)는 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역과, 서열번호 54 내지 63으로 이루어지는 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

본 발명에 따른 인간화 항체(DNP004)는 도 31에 나타난 바와 같이 키메릭 4B4 항체보다 항원 결합력이 높은 항체를 후보군중에서 선정하였으며(실시예 16), 이는 다양한 세포주에서도 보다 높은 세포 결합력을 나타내어(실시예 18), 마우스 또는 키메릭 항체에 내재된 면역원성 가능성을 상당히 감소시킴과 함께, 인간화 항체(DNP004)가 키메릭 4B4 항체보다 우월함을 나타낸다.

본 발명에 따른 항체 또는 이의 단편은, 종양 퇴화 (tumor

regression) 활성 및 종양 세포주에 대해 직접적인 억제 효과를 갖는
 갖는다. 본 명세서에서 종양의 퇴화는 종양 크기의 감소 및/또는 종양
 세포의 성장 저해, 중단 또는 감소 등을 유도 또는 촉진하는 것을 포함한다.
 종양의 크기 감소는 예를 들면, 본 발명의 항체 또는 이의 단편을 포함하는
 5 조성물을 처리하기 전을 100%를 기준으로, 상기 항체 또는 이의 단편을
 포함하는 조성물을 투여한 경우에 얻어진 종양의 크기가 97%이하, 95%이하,
 90%이하, 85%이하, 80%이하, 75% 이하의 크기를 갖는 경우 등을 들 수 있다.

본 발명에 따른 항체는 항체-의존성 세포매개성 세포독성(ADCC,
 Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)과 보체계 의존(CDC,
 10 complement-dependent cytotoxicity)을 가진다.

본 발명에 따른 항체는 항체에 결합된 당잔기인 FUCOSE를 일부
 또는 전부 제거한 것일 수 있다. 본 발명에 따른 푸코오스 제거 항체도
 고형암에 대한 성장 억제 및 종양 퇴화 활성을 유지한다. 일례에서
 27B6항체와 4B4항체 모두 defucose형태의 항체가 fucose형태의 항체에 비해
 15 종양에 대한 효능이 우수하다(도14, 17참조).

본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편은 생체에서 분리된
 (생체에 존재하지 않는) 것 또는 비자연적으로 생산(non-naturally
 occurring)된 것일 수 있으며, 예컨대, 합성적 또는 유전공학기술로 생산된
 것일 수 있다. 상기한 방법은 공지의 기술로 용이하게 실시할 수 있다.

20 또한 본 발명은 CA-XII 항원결정부위를 인지하는 물질을 제공한다.
 이 물질은 항체, 항체 절편, 리간드 등으로 이루어진 군에서 선택될 수
 있으며, 항체는 단클론 또는 다클론 항체일 수 있으며, 바람직하기로는
 사람과 동물에서 기원한 것이다. 다클론 항체 또는 단클론 항체일 수
 있으며, 예컨대, 단클론 항체일 수 있다. 단클론 항체는 당 업계에 널리
 25 알려진 방법대로 제조될 수 있다. 예컨대, phage display 기법을 이용해서
 제조될 수 있다. 본 발명에 따른 항체는 상기 마우스 항체, 키메라 항체를
 포함한다.

용어, "CDR(complementarity determining region)"은 면역글로불린의
 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역(hypervariable region)의 아미노산 서열을

의미한다. 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR을 포함할 수 있다(CDRH1, CDRH2, CDRH3 및 CDRL1, CDRL2, CDRL3). 상기 CDR은 항체가 항원 또는 에피토프에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공할 수 있다. 한편, 본 명세서에 있어서, 용어, "특이적으로 결합" 또는 "특이적으로 인식"은

5 당업자에게 통상적으로 공지되어 있는 의미와 동일한 것으로서, 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 면역학적 반응을 하는 것을 의미한다.

용어, "항원 결합 단편"은 면역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩타이드의 일부를 의미한다. 예를 들어, scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab' 또는 F(ab')₂일

10 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

상기 항 CA-XII 항체는 단클론 항체일 수 있다. 단클론 항체는 당 업계에 널리 알려진 방법대로 제조될 수 있다. 예컨대, phage display 기법을 이용해서 제조될 수 있다. 또는, 항 CA-XII 항체는 이용해서 통상의 방법에 의하여 마우스 유래의 단클론 항체로 제조될 수 있다.

15 한편, 전형적인 ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 포맷을 이용하여 CA-XII와의 결합능에 기초하여 개별 단클론 항체들을 스크리닝할 수 있다. 결합체들에 대해 분자적 상호작용을 검정하기 위한 경쟁적 ELISA(Competitive ELISA)와 같은 기능성 분석 또는 세포-기반 분석(cell-based assay)과 같은 기능성 분석을 통해 저해 활성에 대해

20 검정할 수 있다. 그런 다음 강한 저해 활성에 기초하여 선택된 단클론항체 멤버들에 대해 CA-XII에 대한 각각의 친화도(K_d values)를 검정한다.

최종 선택된 항체들은 항원결합부를 제외한 나머지 부분이 인간의 면역글로불린 항체화된 항체뿐만 아니라, 인간화 항체로서 제조하여 사용할 수 있다. 인간화 항체의 제조방법은 당 업계에 잘 알려져 있다 (Almagro, J. C. and Fransson, J., "Humanization of antibodies," *Frontiers in Bioscience*, 13(2008), 1619-1633).

25

다른 예는 상기 항 CA-XII 항체를 생산하는 하이브리도마를 제공한다. 구체예에 있어서, 상기 하이브리도마는 기탁번호 KCLRF-BP-00279 또는

KCLRF-BP-00280인 것일 수 있다.

다른 예는 상기 하이브리도마가 생산하는 항 CA-XII 항체 또는 이의 항원결합단편을 제공한다.

다른 예는 상기 하이브리도마가 생산하는 항 CA-XII 항체의 중쇄
 5 상보성결정부위 (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, 또는 이들의 조합), 경쇄
 상보성결정부위 (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, 또는 이들의 조합), 또는 이들의
 조합; 또는 상기 하이브리도마가 생산하는 항 CA-XII 항체의 중쇄 가변영역,
 경쇄 가변영역, 또는 이들의 조합을 포함하는 항 CA-XII 항체 또는 이의
 항원결합단편을 제공한다. 이 때, 상기 상보성결정부위는 통상적인 모든
 10 방법에 의하여 결정될 수 있으며, 예컨대, IMGT definition
 (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/) 또는 Cabat definition
 (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>)에 의하여 결정될 수 있으나, 이에
 제한되는 것은 아니다.

CA-XII 항체 또는 항체 절편은 다양한 표지기(labeling agent), 독성
 15 물질 또는 항종양제와 결합할 수 있다. 당해 기술 분야에 있어서 주지
 방법에 의해 본 발명의 항체는 상기 표지기, 독소, 또는 항종양제와 결합될
 수 있는 것은 당업자에게 분명하다. 이러한 결합은 항체 또는 항원의 발현
 후, 부착부위에 화학적으로 수행하는 것도 가능하고, 혹은 DNA 레벨로 본
 발명의 항체 또는 항원 내에 결합 산물을 조작해 넣어도 괜찮다. 이어서 본
 20 명세서에 있어서 이하로 기재하는 적절한 숙주계에 있어서 DNA를
 발현시키고 그리고 발현시킨 단백질을 회수해, 필요에 따라 재생시킨다.
 결합은 당해 기술 수준에 있어서 알려진 링커를 통해 달성해도 괜찮다.
 특히 이 기술과 함께 산성 조건 혹은 환원 조건 하에서 또는 특정
 프로테아제에 대한 노출시에 독소 또는 항종양제를 방출하는, 다양한
 25 링커를 이용할 수 있다. 특정 양태에 있어서는 표지기, 독소, 또는 항종양
 약제를 다양한 길이의 스페이서 암에 의해 결합시키고 잠재적인 입체
 장애를 감소시키는 것이 바람직한 경우도 있다.

상기 표지기로서는 방사선동위원소, 합텐, 형광 물질,
 크로모젠(chromogen) 및 염색 물질로 이루어진 군으로부터 선택된 물질들로

표지될 수 있으며, 구체적으로, 플래그(FLAG), GFP, YFP, RFP, d토마토(dTomato), 체리(cherry), Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7, DNP, AMCA, 비오틴, 디곡시게닌, 탐라(Tamra), 텍사스 레드, 로다민, 아렉사 플로우(Alexa fluors), FITC, TRITC에서 선택된다. 혹은 표지기는 예를
 5 들면 ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, 또는 ¹³¹I 등의 방사성 동위체 있어도 괜찮다. 적절한 표지기의 새로운 예는 효소기(예를 들면 서양 호스래디시 페록시다아제, 서양 와사비 갈락토시다제, 루시페라제, 알칼리포스파타아제); 화학 발광기, 비오틴닐기, 또는 제2의 리포터에 의해 인식된다, 미리 결정된 폴리펩타이드 에피토프이다

10 상기 독성 물질로서는 세포 또는 생물에 대해서 독성을 가지는 임의의 화합물에 관한다. 따라서, 독소는 예를 들면 방사선동위원소, 소분자, 펩타이드, 또는 단백질이라도 좋다. 항체 혹은 항체 절편은 독성 물질들과 결합되어 융합단백(fusion protein)을 형성할 수 있다. 독소 단백질로는 리신(ricin), 사포린(saporin), 젤로닌(gelonin),
 15 모로딘(momordin), 디프테리아독소, 또는 녹농균독소(pseudomonas toxin)일 수 있으며, 방사선동위원소로는 ¹³¹I, ¹⁸⁸Rh와 ⁹⁰Y가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 “항종양제” 용어는 본 발명에 의하면 조직의 이상 증식을 정지시키거나 또는 지연시키는지 어느 하나가 가능한 약제를 특정한다.
 20 따라서, 항종양제는 특히 암을 치료할 때 유용하다. 항종양제는 혈관 신생 억제제, DNA 삽입제 혹은 DNA 가교제, DNA 합성 억제제, DNA-RNA 전사 제어인자, 효소 억제제, 유전자 제어인자, 미소관 억제제, 또는 기타 항종양제일 수 있다.

본 발명은 본 발명에 의한 항체를 코딩하는 핵산 분자에 관한다. 본
 25 발명의 항체를 코딩하는, 본 발명의 핵산 분자는 예를 들면 DNA, cDNA, RNA 또는 합성에 의해 생성되는 DNA 혹은 RNA, 혹은 이들의 핵산 분자의 어느 하나를 단독으로 또는 조합해 포함한 재조합 기술에 의해 생성되는 키메라 핵산 분자라도 좋다. 핵산 분자는 또한 유전자 전체 혹은 그 상당 부분, 또는 그 단편 및 유도체에 대응하는 게놈 DNA라도 좋다. 항체의 아미노산

서열중에서 하나의 아미노산이 치환되어 있는 이들 서열을 코드하는 핵산을 포함하는데 필요한 단일 또는 복수의 뉴클레오타이드 치환, 결실 또는 부가를 뉴클레오타이드 서열이 함유해도 무방하다. 본 발명의 특히 바람직한 실시 형태에 있어서는 핵산 분자는 cDNA 분자이다.

5 본 발명의 일 실시 형태는 또한 핵산 분자가 발현 가능한 형태로 포함한 벡터에도 관한다. 본 발명의 벡터는 예를 들면 파지 벡터, 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터라도 좋다. 레트로바이러스 벡터는 복제 가능해도 괜찮고 혹은 복제 결손이라도 좋다. 후자의 경우, 바이러스 증식은 일반적으로 보완 숙주/세포(complementing
10 host/cells)에서 발생한다.

 상기에 인용하는 핵산 분자를 다른 폴리뉴클레오타이드라는 번역 용합이 발생하도록, 벡터 내에 삽입할 수 있다. 일반적으로 벡터는 1 이상의 복제 기점(ori) 및 클로닝 또는 발현에 관한 유전계(inheritance systems for cloning or expression), 숙주의 선택을 위한 1 이상의 마커,
15 예를 들면 항생 물질 내성 및 1 이상의 발현 카세트를 함유할 수 있다. 적절한 복제 기점(ori)에는 예를 들면 Col E1, SV40 바이러스 및 M13의 복제 기점이 포함된다.

 본 명세서에 있어서 상술하는 핵산 분자는 숙주로의 직접 도입, 혹은 리포솜, 파지 벡터 또는 바이러스 벡터(예를 들면 아데노바이러스 벡터,
20 레트로바이러스 벡터)를 통한 도입을 위해서 설계될 수 있다. 또한 바큇로바이러스 시스템, 또는 백시니아 바이러스 혹은 샘리키 포레스트 바이러스에 기초한 시스템을 본 발명의 핵산 분자를 위한 진핵생물 발현 시스템으로 이용할 수 있다.

 본 발명의 다른 실시 형태는 본 발명의 벡터를 포함한 비인간 숙주에
25 관한다. 상기 숙주는 원핵세포 또는 진핵세포라도 좋다. 숙주 세포 중에 존재하는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터는 숙주 세포의 계층 내에 결합되고 있어도 괜찮고 혹은 염색체 외로 유지되어 있어도 어느 것이라도 좋다.

 본 발명은 또한 본 발명의 항체를 생산하는데 이용될 수 있는, 본

발명의 1 이상의 핵산 분자를 포함한 유전자이식 비인간 동물에도 관한다. 염소, 소, 말, 부타, 래트, 마우스, 토끼, 햄스터 또는 기타 포유동물의 조직, 또는 우유, 혈액 혹은 소변 등의 체액에 있어서 항체를 생산해, 이들에서 회수하는 것도 가능하다.

- 5 또한, 본 발명은 CA-XII 항원결정부위를 선택적으로 인지하는 물질을 생산하는 방법과, 항체를 생산하는 생산주를 제공한다. CA-XII의 항원결정부위에 대한 항체 또는 항체 절편은 CA-XII 단백질, CA-XII의 항원결정부위, CA-XII의 항원결정부위를 포함하는 CA-XII 단백질 일부, 또는 CA-XII의 항원결정부위를 발현하는 세포를 항원으로 이용하여 통상의
- 10 방법으로 제조가능 하다. 일례로, CA-XII 항체 제조방법은, (a) CA-XII 단백질, CA-XII의 항원결정부위, CA-XII의 항원결정부위를 포함하는 CA-XII 단백질 일부, 또는 CA-XII의 항원결정부위를 발현하는 세포를 동물에 주입하여 면역화 시키는 단계, (b) CA-XII에 특이적인 항체를 생산하는 비장세포를 수득하는 단계 및 (c) 상기 비장세포를 골수종세포와 융합 시켜,
- 15 CA-XII에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 선별하는 단계를 포함하는 CA-XII 항체를 생산하는 생산주 제조방법으로 통하여 실시가능 하다. 상기 생산주는 생체의외(in vitro)에서 배양하거나, 생체내 주입하여 항체를 분리할 수 있다. 일례로, 마우스의 복강내에 삽입하고 복수로부터 분리, 정제한다. 단클론 항체의 분리 및 정제는 배양 상층액 또는 복수를
- 20 이온교환 크로마토그래피(DEAE 또는 DE52 등), 항 면역글로불린 칼럼 또는 프로테인 A 칼럼 등의 친화성 크로마토그래피를 이용하여 실시할 수가 있다.

- 본 발명에 따른 항체가 결합하는 항원결정부위는 고형암 특이적인 발현을 나타낸다. 따라서, CA-XII 항체는 종양세포의 검출에 유용하게 사용할 수 있을 뿐만 아니라 독성물질을 포함시켜 종양세포만 특이적으로
- 25 세포살상(cytotoxicity) 시킬 수 있다.

다른 예는 CA-XII, 구체적으로 CA-XII의 비촉매적 영역에 위치하는 항원결정부위의 고형암의 검출을 위한 마커로서의 용도를 제공한다. 항원결정부위와 상호작용하는 물질을 포함하는 고형암의 암줄기세포 검출용 조성물을 제공한다. 상기 상호작용하는 물질은 CA-XII, 구체적으로 CA-

XII의 비촉매적 영역에 위치하는 항원결정부위와 상호작용 가능한 모든 물질, 예컨대, 화학물질(small molecular chemical), 항체, 항체의 항원결합단편, 앵타머 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

- 5 다른 실시 형태에 있어서 본 발명은 본 발명의 항체, 본 발명의 핵산 분자, 본 발명의 벡터 또는 본 발명의 숙주를 포함한 진단 조성물에 관한다. 본 명세서에 있어서 이용되는 조성물이라 함은 본 발명의 적어도 하나의 항체, 핵산 분자, 벡터 및/또는 숙주를 포함한 조성물을 정의하는 것이다.

- 본 발명 진단 조성물은 다양한 세포, 조직 또는 다른 적절한 시료에 있어서의, CA, 특히 CA-XII의 바람직하지 않은 발현 또는 과잉 발현의 10 검출로서, 시료를 본 발명의 항체와 접촉시키는 것 및 시료에 있어서 CA, 특히 CA-XII의 존재를 검출하는 것을 포함한 검출에 유용하다. 따라서, 본 발명 진단 조성물을 이하로 정의하는 발병 또는 질환상태를 평가하기 위해 이용해도 괜찮다. 특히 CA, 특히 CA-XII를 발현하는, 암 세포 등의 악성 세포를 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 유도체로 타겟팅해도 괜찮다. 본 15 발명의 항체가 결합한 세포는 그러므로 보체계 등의 면역계 기능에 의해 또는 세포 매개성 세포 독성에 의해 공격되고 따라서, CA, 특히 CA-XII의 바람직하지 않은 발현 또는 과잉 발현을 나타내는 세포의 수가 감소하거나 또는 이러한 세포가 근절된다.

- 본 발명의 일 양태에 있어서는 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 20 유도체를 표지기에 결합시킨다. 이러한 항체는 진단 애플리케이션에 특히 적합하다.

본 발명 진단 조성물은 단독 활성 약제로서 투여 할 수 있고, 또는 다른 약제와 조합하여 투여될 수 있다.

- 종양세포 검사방법은 (a) CA-XII 항체를 종양세포를 포함하는 시료에 25 반응시키고, (b) 상기 항체에 대하여 양성반응을 나타내는 시료를 종양으로 판단하는 것이다. 상기 시료는 림프액, 골수, 혈액 또는 혈구일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 종양세포는 바람직하기로는 유방암, 폐암, 대장암, 위암, 전립선암, 또는 간암 세포일 수 있다.

상기 CA-XII 항체를 이용하여 종양세포를 검사하는 경우, 상기 CA-

XII 항체는 항원-항체 반응성을 확인할 수 있는 물질로 표지된 것일 수 있다. 사용가능한 상기 물질로는 방사성동위원소, 형광물질, 발광물질, 크로모젠(chromogen), 또는 기타 염색 물질 등이 있다.

또한 본 발명의 CA-XII 항체는 고형암을 진단하기 위한 진단키트로
5 제공될 수 있다.

상기 진단키트는 CA-XII 항체 이외에, 항원-항체반응 검출수단을 포함할 수 있다. 상기 검출수단은 유세포측정, 면역조직화학염색, 효소결합 면역흡착 분석(enzyme linked immunosorbent assay: ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay: RIA), 효소 면역분석(enzyme immunoassay: EIA), 형광면역분석(Florescence immunoassay: FIA) 및
10 발광면역분석(luminescence immunoassay: LIA)으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법을 실시하기 위한 통상의 물질 일 수 있다. 즉, 표지수단으로는 효소의 경우 HRP(horse radish peroxidase)가 있으며, 형광물질로는 FITC (Fluoresceinthiocarbamyl ethylenediamine)가,
15 발광물질로는 루미놀(luminol), 이소루미놀 및 루시게닌(lucigenin)이, 방사선 동위원소로는 125I, 3H, 14C 및 131I가 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 표지수단에 의한 표지여부는 효소의 기질이나, 형광, 발광 또는 방사선을 측정하기 위한 도구를 이용하여 확인 가능하다. 일례로 CA-XII 항체는 ELISA 키트 또는 스트립 키트로 제조될 수 있다.

본 발명의 구체적 일예에 따른 27B6와 4B4항체는 항원결합부위가 중첩되어 있지 아니하여, 하나의 항원에 함께 결합 가능하다. 따라서, 상기
20 두 가지 항체를 사용하여 CA-XII 항원에 대한 샌드위치 ELSIA 분석 등을 수행할 수 있으며, 특히 샌드위치 ELISA 분석에서 27B6 항체를 CAPTURE 항체로, 4B4 항체를 DETECTOR 항체로 사용하는 것이 더욱 바람직하다.

일 실시예에서 본 발명은 본 발명의 항체, 본 발명의 핵산 분자, 본 발명의 벡터 또는 본 발명의 숙주를 포함한 의약 조성물에 관한다. 본 발명의 일 실시 형태에 의하면 본 발명의 항체, 본 발명의 핵산 분자, 본 발명의 벡터 또는 본 발명의 숙주는 고형암을 치료 또는 저해하는데
25 이용하기 위한 것이다. 본 발명의 핵산 분자, 본 발명의 벡터 또는 본

발명의 숙주의 유효량을 투여의 필요가 있는 대상으로 투여함으로써 고형암을 치료 또는 저해하기 위한 방법이다.

본 발명에 의한 "고형암" 용어는 낭포 또는 액체 영역을 통상적으로 함유하지 않는 조직의 비정상인 덩어리를 정의하는 것이다. 고형암은 양성(암이 아니다) 또는 악성(자주 당해 기술 분야에 있어서 암이라고 칭해진다)를 모두 포함한다. 본 발명에 따른 항체를 적용 가능한 고형암의 예는 육종, 신경교종, 암종양, 중피종, 임파종, 신장 종양, 폐종양, 유방 종양, 자궁 경부 종양, 난소 종양, 결장 직장 종양, 간장 종양, 전립선 종양, 췌장 종양 및 머리 경부 종양에서 선택되며, 바람직하게는 유방암, 폐암, 대장암, 위암, 전립선암, 또는 간암이다. 상기 유방암은 바람직하게는 삼중음성 유방암(Triple-negative breast cancers (TNBC))도 포함하며, 상기 삼중음성 유방암은 HER2, estrogen receptor (ER), 및 progesterone receptor (PR)을 포함하는 3가지 유방암 진단 마커에 의해서도 모두 음성으로 검출되는 유방암으로서 검출이 매우 어려운 문제점이 있다. 상기 폐암은 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐의 선암, 폐의 편평상피암일 수 있다.

상기 고형암의 치료 효과는 암세포 (특히, 암줄기세포) 또는 이를 포함하는 암조직의 성장 억제 (양적 감소), 사멸 (apoptosis) 효과뿐만 아니라, 이동(migration), 침습(invasion), 전이(metastasis) 등을 억제하여 이로 인한 암의 악화를 억제하는 효과를 포함한다.

본 명세서에서, "대상" 또는 "환자"는 고형암의 경감, 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자를 의미하는 것으로, 모든 포유류, 예컨대 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류일 수 있고, 고형암을 앓고 있거나 고형암의 증상을 갖거나, 고형암 발병의 위험이 있는 환자일 수 있다.

본 발명에 따른 항체 혹은 항체 절편의 투여는 허용된 모든 약물 투여방법에 의해 시행될 수 있다. 구체적으로 예를 들면, CA-XII 항체를 유효성분으로 포함하는 치료제를 종양세포를 갖는 대상, 즉 인간 또는 동물에 경구 또는 비경구, 바람직하기로는 비경구로 투여하는 것이다.

상기 치료제는 약리학적으로 허용가능한 부형제를 포함할 수 있으며, 이의 투여량은 환자의 상태에 따라 적절히 조절하는 것이 바람직하나, 일례로 1일 3 mg 내지 6,000 mg 일 수 있다. 치료제의 제형은 액제, 산제, 유제, 현탁제 또는 주사제일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- 5 본 발명은 CA-XII 항원결정부위에 대한 항체, 항체 절편(F(ab')₂, Fab 및 Fv 등), 및 리간드 이뤄진 군에서 선택된 항체를 이용하여 급성 백혈병, 모세포 위기가 발생한 만성 백혈병 및 림프모구 림프종을 치료하는 방법을 제공한다.

- 항체 혹은 항체 절편은 바람직하기는 단클론 또는 다클론 항체로 이루어진 군에서 선택되며, 바람직하기로는 사람과 동물에서 기원한 것이다. 10 상기 CA-XII 항체 또는 항체 절편은 상기에서 언급한 독소물질이 더욱 포함된 것일 수 있다. 독소물질은 항체에 융합, 접합, 결합, 또는 링크될 수 있으며, 이는 공지 기술로 실시가능 하다.

- 본 발명의 의약 조성물은 단독 활성 약제로서 투여해도 괜찮고 또는 15 기타 약제와 조합하고, 바람직하게는 당해 기술 분야에 있어서 문제의 질환의 치료에 적합한 것이 알려지는 것과 조합해 투여해도 괜찮다. 또한, 본 발명의 항체를 투여하는 방법은, 다른 항암치료, 예를 들면 화학적 요법, 방사선 요법, 세포치료제와 병행하여 수행할 수 있다. 상기 화학적 요법 또는 세포 치료제에 사용되는 다양한 고형암 치료 항암제는 알려진 20 항암제를 사용할 수 있다.

- 다른 예는 CA-XII, 구체적으로 CA-XII의 비촉매적 영역에 위치하는 항원결정부위 항원결정부위에 후보 화합물을 접촉시키는 단계, 및 상기 항원결정부위에 결합하는 후보 화합물을 선택하여 고형암 치료제 후보물질로 결정하는 단계를 포함하는, 고형암 치료제 또는 저해제의 25 스크리닝 방법을 제공한다. 다른 예에서, 상기와 같이 스크리닝된 고형암 치료제를 유효성분으로 포함하는 고형암의 치료용 약학 조성물을 제공한다.

 상기 후보 화합물은 인공적으로 합성되거나 천연의 각종 화합물, 폴리펩타이드, 올리고펩타이드, 펩타이드 구조체 또는 단백질 구조체 (예컨대, 항체, 항체의 항원 결합 단편, 펩티마디, 나노마디, 등).

폴리뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, shRNA(short hairpin RNA), siRNA(small interference RNA), 압타머, 천연물 추출물 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

상기 후보 화합물과 항원결정부위의 결합은 후보 화합물과 항원결정부위의 복합체 형성을 확인함으로써 수행될 수 있으며, 이는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 수행할 수 있다. 예컨대, 통상적인 효소 반응, 형광, 발광 및/또는 방사선 검출을 통하여 하여 측정될 수 있으며, 구체적으로, 면역크로마토그래피(Immunochromatography), 면역조직화학염색(Immunohistochemistry), 효소결합 면역흡착 분석(enzyme linked immunosorbent assay: ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay: RIA), 효소 면역분석(enzyme immunoassay: EIA), 형광면역분석(Floresence immunoassay: FIA), 발광면역분석(luminescence immunoassay: LIA), 웨스턴블라팅(Western blotting) 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의하여 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

15

【발명의 효과】

본 발명은 탄산탈수소 효소를 인식하고 결합하는 항체, 상기 항체 또는 항원결합단편을 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자를 포함하는 벡터 및 숙주세포 및 상기 항체 또는 이의 항원결합단편의 탄산탈수소화 효소 관련 질병, 예를 들면 고형암 경감, 예방, 치료 또는 진단 용도에 관한 것이다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 실시예 1에 따라 고형암 특이적인 마우스 단클론 항체 27B6의 말초혈액에서의 반응도 검사를 나타낸다.

도 2는 실시예 2에 따라 27B6 키메라 항체의 항원 특이성 및 친화도 확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 실시예 3에 따른 마우스 단클론 항체 4B4의 항원 반응도 스크리닝 과정을 나타낸다.

도 4는 실시예 4에 따라 4B4 키메릭 항체의 항원 특이성 및 친화도 확인한 결과를 나타낸다.

도 5a, 5b 및 5c는 실시예 6에 따라 다양한 유방암 세포에서 4B4 키메릭 항체의 Carbonic anhydrase 12 항원에 대한 발현 양상을 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 실시예 6에 따라 27B6 키메릭 항체 및 4B4 키메릭 항체로 제작한 칼럼으로 폐선암 A549 세포주 용해물에서 각각의 항원을 분리정제하여 얻은 시료를 전기영동으로 확인한 결과이다.

도 7은 실시예 6에 따라 마우스 단클론 항체 4B4 및 마우스 단클론 항체 27B6에 대한 항원이 Carbonic anhydrase 12라는 것을 ELISA assay로 검증한 결과이다.

도 8은 실시예 7에 따라 마우스 단클론 항체 4B4 및 마우스 단클론 항체 27B6에 대한 항원이 Carbonic anhydrase 12라는 것을 Western blotting assay로 검증한 결과이다.

도 9는 실시예 7에 따라 마우스 단클론 항체 27B6 및 마우스 단클론 항체 4B4의 에피토프 매핑을 보여주는 실험 및 결과이다.

도 10은 실시예 8에 따라 27B6 키메릭 항체가 보체 의존성 세포독성을 나타낼 수 있었다.

도 11은 실시예 9-1에 따라 27B6 키메릭 항체의 항체 의존성 세포독성 효과를 확인한 결과이다.

도 12는 실시예 9-2에 따라 27B6 키메릭 항체의 삼중음성유방암 세포주에서의 항체 의존성 세포독성 효과를 확인한 결과이다.

도 13은 실시예 10-1에 따라 다양한 고형암 세포주에서 defucosylated 27B6 키메릭 항체의 항체 의존성 세포독성 검사를 나타낸다.

도 14는 실시예 10-2에 따라 유방암 세포주에서 Luciferase assay를 이용한 Defucosylated 27B6, 4B4 키메릭 항체의 항체 의존성 세포독성 검사를 나타낸다.

도 15는 실시예 11에 따라 삼중음성유방암 세포주에서 CA XII항원의 발현 정도와 27B6, 4B4 키메릭 항체의 결합여부를 확인한 결과이다.

도 16은 삼중음성유방암 동물모델에서 27B6 키메릭 항체 및 4B4 키메릭항체가 종양의 성장을 억제하고 있음을 나타낸 결과이다.

5 도 17 실시예 11에 따라 삼중음성 유방암에 대한 4B4 항체의 유효성 결과를 나타낸다.

도 18 및 도 19는 실시예 12에 따라 4B4 항체 단독의 직접적인 결합은 암세포 성장에 영향을 주지 않음을 나타낸 결과이다.

도 20은 실시예 13에 따라 27B6 항체와 방사선 치료의 병용효과를
10 나타낸 결과이다.

도 21은 실시예 14에 따라 선택된 클론(phage displayed scFv)의 CA-XII에 대한 결합력(affinity)을 ELISA로 테스트한 시험 결과를 나타낸다.

도 22은 실시예 14에 따라 선택된 10개 클론(클론 번호 #1, 2, 8, 11, 15, 19, 22, 25, 26 및 30)의 경쇄 가변영역(VL)의 서열과 CDR1 및 CDR2의
15 배열을 나타낸다.

도 23 및 도 24는 실시예 14에 따라 선택된 10개 클론(클론 번호 #1, 2, 8, 11, 15, 19, 22, 25, 26 및 30)의 전장 IgG의 친화도 시험결과를 나타내는 그래프이다.

도 25은 실시예 15에 따른 인간화 항체 DNP004의 CA-XII 양성
20 삼중음성유방암 세포주 MDAMB-231에서의 결합 확인을 나타내는 것이다.

도 26는 실시예 16에 따라 항체 후보군의 SDS-PAGE를 이용한 물성 분석한 결과를 보여주는 사진이다.

도 27은 실시예 16에 따라 항체 후보군의 CA XII 양성 세포주와의 결합력 평가를 나타낸다.

25 도 28 및 도 29는 실시예 17에 따라 다양한 유방암 세포에서 DNP004 인간화 항체의 carbonic anhydrase 12항원에 대한 결합 양상 확인한 결과이다.

도 30은 실시예 18에 따라 DNP004 인간화 항체의 유방암 세포주에서의 항체 의존성 세포독성 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 31는 실시예 18에 따라 DNP004 인간화 항체의 폐암 세포주에서의 항체 의존성 세포독성 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 32는 실시예 18에 따라 DNP004 인간화 항체의 간암 세포주에서의 항체 의존성 세포독성 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

5 도 33는 실시예 18에 따라 DNP004 인간화 항체의 위암 세포주에서의 항체 의존성 세포독성 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도34 내지 35는 실시예19에 따라 DNP004인간화 항체의 삼중음성 유방암 마우스 모델에서의 항 종양 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

10 도36는 실시예 19에 따라 DNP004인간화 항체의 신장암 세포주 마우스 동물모델에서의 항 종양 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

하기 예시적인 실시예를 들어 본 발명을 더욱 자세히 설명할 것이나, 본 발명의 보호범위가 하기 실시예로 한정되는 의도는 아니다.

15

<실시예 1> 항 CA-XII 단클론 항체(27B6)의 제조

CA-XII에 특이적인 새로운 항체를 개발하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였으며, 개발 항체는 폐선암뿐만 아니라 유방암과 대장암 및 전립선암에서도 일부 발현하며 고행암 특이적 항체로 27B6와 4B4로
20 명명하기로 하였다.

1-1: 27B6 단클론 항체 제작을 위한 타겟 부위 설계

고형암 세포 특이적인 항체를 제작하기 위해, 고행암 세포를 직접 마우스에 면역하고, 이에 대한 단클론 항체를 세포 융합 방법으로
25 확립하였다. 그런 후, 고행암 세포 특이적인 단클론 항체와 결합하는 항원을 분석하여 동정하였다.

1-2: 마우스 면역화

고형암에서 발현되는 특이적인 항원에 대한 단클론 항체를 개발하기

위해, 폐선암 세포주인 A549를 면역화한 후 유세포 측정기를 이용한 하이브리도마 선별 과정을 통해, A549세포에 양성반응을 나타내면서 정상 폐 세포주인 L132에 음성반응을 나타내는 항체 클론을 골라 선별하였다. 단클론 항체에 대한 양성 세포의 퍼센트는 실험대상 5000개 세포 중에서

5 DNP004항체와 결합하는 세포의 수를 %로 계산하여, -(음성)는 양성 세포수가 10% 미만, +은 양성 세포수가 10~30%범위, ++은 양성 세포수가 30~70%범위이고, +++은 양성 세포수가 70~100%로 지정하였다.

고형암 특이적 단클론 항체를 개발하기 위하여 6 주령의 Balb/c 암컷 마우스 한 마리당 폐선암 세포주인 A549(ATCC CCL-185)를 1×10^7 의 수만큼

10 마우스 복강(IP; intraperitoneal cavity)으로 3주간의 간격으로 세 번 주입하고 정맥에서 혈액 검체를 취하여 혈청을 분리하였다. 상기 분리된 혈청에 A549 세포에 희석한 혈청을 넣고 4℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS 3ml을 넣고 1500rpm에서 3분간 원심분리하여 결합하지 않은 항체를 수세하고 결합된 항체를 확인하기 위해 이차항체인 goat anti-Mouse Ig-

15 FITC(Dinona)을 200배 희석하여 넣은 후 4℃에서 15분간 반응 시킨 후 PBS 3ml로 위와 동일한 방법으로 수세한 후 유세포 분석기로 측정하여 A549세포주에 대한 역가를 확인하였다. A549 세포에 대한 역가를 유세포분석기로 확인한 결과 A549 세포를 면역화한 혈청에서 A549세포주에 대한 양성 반응이 높게 나타난 것을 확인하였다(결과 미기재). 구체적으로 세포

20 융합을 실시하기 3일 전 50 ug anti-CA-XII agonist mAb를 넣어 면역반응을 증가시키고 A549(ATCC CCL-185)를 1×10^7 의 수만큼 주입하여 A549 표면 항원에 대한 항체가 증폭되도록 유도하였다.

1-3: 하이브리도마 세포 제조

25 상기와 같이 면역화된 마우스의 비장을 절제하여 단일 세포 부유액을 수득하고 RPMI(GIBCO)으로 2회 정도 세척한 후, 0.4% trypan blue(sigma)를 1:1(v/v)으로 섞은 후 현미경으로 염색되지 않은 세포를 측정하는 트립판 블루(trypan blue) 염색법으로 세포수를 계수하였다. 세포융합 partner 세포로는 X63 mouse myeloma 세포주(ATCC CRL-1580)를 사용하였으며 상기

비장세포와 동일하게 세척 후 세포수를 계수하였다.

상기 골수(myeloma) 세포와 비장세포는 1:5의 비율로 혼합하고 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 미리 37℃로 예열된 50% PEG(polyethylene glycol) 1500 1ml을 1분에 걸쳐 서서히 첨가하였다. 약 5 1분 정도 정체시켰다가 RPMI 배지를 서서히 추가하여 단계적으로 희석하였다. 이를 원심 분리한 후 1xHAT이 포함된 RPMI(20%FBS, hypoxanthine-aminopterin-thymidine)에 부유시키고, 96-웰 플레이트에 150ul/웰로 분주한 후 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 상기 융합 후 일정기간 HAT feeding을 진행하고, 군락을 형성한 웰이 관찰되면 HT 배지를 10 150ul첨가하여 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양 후 3칼라 형광염색을 실행하고, 유세포 측정기로 분석하였다. 각기 다른 파장의 염색약으로 염색한 폐선암 세포주인 A549 세포와 정상 폐세포주인 L132는 각 각 형광 염색약으로 염색 후 1:1로 섞여 준비한 후 준비된 세포에 하이브리도마 배양 상층액을 100ul씩 넣고 4℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS 3ml을 넣고 15 1500rpm에서 3분간 원심분리하여 결합하지 않은 항체를 수세하고 결합된 항체를 확인하기 위해 이차항체인 goat anti-Mouse Ig-APC (Dinona)을 200배 희석하여 넣은 후 4℃에서 15분간 반응시킨 후 PBS 3ml로 위와 동일한 방법으로 수세한 후 유세포 분석기로 측정하였다.

말초 혈액에 대한 결합 정도를 확인하기 위해 PBMC(peripheral blood 20 mononuclear cells, 적십자혈액원)에 하이브리도마 상층액을 100ul 넣고 4℃에서 30분간 반응 시킨 후 PBS 3ml을 넣고 1500rpm에서 3분간 원심분리 하여 결합하지 않은 항체를 washing하고 결합된 항체를 확인하기 위해 이차항체인 goat anti-Mouse Ig-FITC (Dinona)을 200배 희석하여 넣은 후 4℃에서 15분간 반응 시킨 후 PBS 3ml로 위와 동일한 방법으로 washing한 25 후 유세포 분석기로 측정하였고 그 결과를 기재하였다(도 1). 도 1은 폐선암 특이적인 27B6 단클론 항체의 말초혈액에서의 반응도 검사 결과를 나타낸다.

상기 방법에서 폐암 세포주인 A549에 양성이면서 정상 폐세포주인 L132와 말초혈액의 과립구(granulocytes)와 림프구(lymphocytes) 및

단핵세포(monocytes)에 모두 음성인 단클론 항체 (이하 27B6로 명명함)를 선별하고, 최종적으로 제한 희석(limiting dilution)을 통해 단일 콜로니의 27B6 하이브리도마 세포를 확보하였다.

상기 27B6 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주는 대한민국 서울시 종로구 연건동 28에 주소를 둔 서울대학교 암연구소 한국세포주연구재단에 2012.02.14일자로 기탁하여 2012.02.20일자 수탁번호 KCLRF-BP-00280을 부여받았다.

1-4: 27B6 단클론 항체의 아이소타입(isotype) 결정

10 <실시에 1-3>에서 제조된 27B6 단클론 항체의 아이소타입을 결정하기 위해 mouse immunoglobulin isotyping ELISA kit (BD Biosciences, USA)로 분석하였다. 구체적으로 isotyping은 rabbit anti-murine isotype specific antisera(IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA, Kappa, Lamda)를 이용하고 secondary antibody는 peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG를
15 사용하였다. 발색 반응은 ortho-phenylenediamine(OPD)와 hydrogen peroxide substrate를 이용해 유도하였으며 450nm의 흡광도를 측정하여 값을 확인하였다.

상기 실험결과, 27B6 단클론 항체는 mouse IgG1/kappa light chain으로 확인되었다(결과 미기재).

20

1-5: 27B6 항체 CDR 서열

항체 클로닝 과정은 도 1에 나타냈다. 구체적으로, 27B6항체 유전자는 Mouse Ig-Primer Set (Millipore, Cat. #: 69831)을 이용하여 클로닝하였다. 27B6 하이브리도마로부터 분리한 RNA로부터 Mouse Ig-Primer
25 Set을 이용하여 PCR을 수행하고, 이를 pGem-T 벡터(Promega, Cat. #: A3600)에 삽입한 후, 시퀀싱을 통해 DNA 염기서열을 확인하였으며, IMGT site (www.imgt.org)를 통해 마우스 항체 유전자를 확인하였다.

27B6 Ab gene CDR sequence의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역 서열을 SEQ ID NO: 12 및 13에 나타냈으며, 중쇄 가변영역의 CDR1 내지

CDR3는 각각 서열번호 6 내지 8에 나타냈으며, 경쇄 가변영역의 CDR1 내지 CDR3는 각각 서열번호 9 내지 11에 나타냈다(상기 표 2 참조).

<실시예 2> 27B6 chimeric antibody 제조

5 생쥐 기원의 단클론 항체를 치료 목적으로 인체에 투여할 경우 인체의 면역체계는 종(species)이 다르기 때문에 이 단클론 항체를 외래 항원으로 인지하여 인간 항-생쥐 항체(human anti-mouse antibody; HAMA) 반응을 일으키게 되어 혈액 내의 생쥐 항체를 빠르게 제거하고 또한 생쥐 항체의 Fc 부분이 인체 내에서 효과적인 생물학적 기능을 수행하지 못하는 등 치료효과가 급감하게 되며, 동시에 심한 알레르기 반응 및 신장 기능 저하 등 부작용이 수반되게 된다. 따라서, 인체 투여 시 27B6항체의 면역원성을 줄이기 위해서 가변영역(variable region)을 제외한 나머지 부분을 인간의 IgG1의 Fc로 대체한 키메릭 항체를 제작한 후 항원 특이성 및 친화도가 본래의 마우스 유래 27B6 항체와 유사함을 확인하였다.

15 키메릭 항체를 개발하기 위해 상기 기술한 방법으로 제조된 27B6-HuIgFc DNA를 CHO세포 유래의 DHFR DG44 세포주에 형질전환 후 선택 배지에서 선택 배양 과정을 거쳐 27B6재조합 항체를 발현하는 안정화 세포주(stable cell line)을 개발하였다. 자세한 실험방법은 아래와 같다.

먼저 DG44 세포주(Invitrogen, Cat No. A1100001)를 형질전환하기 20 3시간 전에 6-웰 플레이트에 1×10^6 cells/ml 농도로 접종하고, GIBCO(상표명) CD DG44 medium(Invitrogen, USA) 1ml를 넣어 37°C, 5% CO₂ 조건에서 3시간 동안 배양 후 상기 에서 제조된 27B6-HuIgFc DNA를 Effectene transfection reagent 키트(QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 준비된 DG 44세포에 형질전환하였다.

25 상기 형질전환한 지 3일 후, 상층액을 취하여 A549 세포에 넣고 4°C에서 30분간 반응시킨 후 PBS 3ml을 넣고 1500rpm에서 3분간 원심분리하여 결합하지 않은 항체를 수세하고 결합된 항체를 확인하기 위해 이차항체인 goat anti-Human Ig-FITC(Dinona)을 150배 희석하여 넣은 후 4°C에서 15분간 반응시킨 후 PBS 3ml로 위와 동일한 방법으로 수세한 후

유세포 분석기로 측정하여 A549세포주에 대한 역가를 확인하였다. 이후 안정적인 세포주를 만들기 위해 30nM MTX(Sigma, USA)과 200ug/ml의 G418(Invitrogen, USA)을 첨가한 PowerCHO(LONZA, Switzerland) 배지로 교체 후 클론 선택과정을 시작하였다. MTX와 G418이 포함된 배지에서의 선택과정은 MTX와 G418 첨가 농도를 점진적으로 높이되, 각 농도별 선택과정 기간은 3주로 고정하였다. 최종적으로 선택과정을 마친 세포주는 1000NM MTX와 400ug/ml G418 이 첨가된 Power CHO배지에서 적응과정을 마친 상태로 선별과정을 마무리하였으며, 선별과정 진행 후 최종적인 세포주를 확립하기 위해 제한 희석(limiting dilution)을 실시하여 단일 콜로니(single colony)를 확보하였다.

상기 기술한 방법대로 개발한 27B6 키메라 항체의 항원 특이성 및 친화도를 유세포 측정기를 이용해 확인한 결과 항원 특이성 및 친화도가 본래의 마우스 유래 27B6 항체와 유사함을 확인하였다(도 2). 도 2는 27B6 키메라 항체의 항원 특이성 및 친화도 확인한 결과를 나타낸다.

<실시에 3> 항 CA-XII 단클론 항체(4B4)의 제조

3-1: 27B6 페어 항체 개발

동일항원에 결합하지만 다른 에피토프를 인지하는 항체를 추가적으로 확보하기 위하여 27B6 페어링 항체를 개발하였다. 우선적으로 27B6 페어링 항체 개발 가능성을 평가하기 위하여, 키메라 27B6와 마우스 혈청을 사용하여 샌드위치 ELISA를 구현하였다.

상기 실시예<1-2>에 기술된 방법과 동일하게 인간 폐선암 세포주 A549 1×10^7 세포를 6주령 암컷 마우스 복강에 3주 간격으로 면역하고 혈청의 취하였다.

구체적으로, 키메라 27B6 정제항체를 100 ng/mL 농도로 microplate에 넣고 37 °C에서 1시간 동안 코팅하였다. 27B6가 코팅된 microplate에 blocking buffer(sigma)을 200ul/well로 넣고 37°C에서 1시간 동안 차단하였다. A549 세포를 1% NP40 lysis buffer를 사용하여 1×10^7 cells/ml 농도 lysate를 준비하였다. 준비된 A549 lysate를 50uL/well로

microplate에 넣고 37℃ 온도에서 1시간 반응한 뒤 PBS로 3회 수세하였다. A549 면역으로 확보한 마우스 혈청 1000배 희석액 100 μ L/well을 microplate에 넣고 37℃에서 1시간 반응한 뒤 PBS로 3회 수세하였다. 마지막으로 이차 항체 goat anti-mouse IgG-HRP(Jackson) 2000 희석액을 5 100 μ L/well로 넣고 37℃에서 30분 반응한 뒤 PBS로 3회 수세하였다. TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)을 50 μ L/well로 넣은 뒤 상온에서 10분간 반응하여 발색을 유도하고 2N H₂SO₄ (Sigma)을 동량 넣어 발색반응을 종료하였다. 이후 450 nm 파장에서 흡광값을 측정하였다.

예상한 바와 같이, 27B6와 마우스 혈청으로 구현한 샌드위치 10 엘리자(sandwich ELISA)에서 양성반응을 확인할 수 있었다.

3-2: 단클론 항체의 제조

상기와 같이 면역화된 마우스의 비장을 절제하여 하이브리도마를 생산하는 방법은 <실시예 1-3>에 기재한 방법과 동일하게 진행하였다.

15 상기 방법에서 폐암 세포주인 A549에 양성되면서 정상 폐세포주인 L132와 말초혈액의 과립구(granulocytes)와 림프구(lymphocytes) 및 단핵세포(monocytes)에 모두 음성인 단클론 항체27B6와 페어되는 단클론 항체 (이하 4B4로 명명함)를 선별하고, 최종적으로 제한 희석(limiting dilution)을 통해 단일 콜로니의 4B4하이브리도마 세포를 확보하였다(도 3).

20 도 3는 4B4항체의 항원 반응도 스크리닝을 나타낸다. 상기 4B4항체를 생산하는 하이브리도마 세포주는 대한민국 서울시 종로구 연건동 28에 주소를 둔 서울대학교 암연구소 한국세포주연구재단에 2012.02.14일자로 기탁하여 2012.02.20일자 수탁번호 KCLRF-BP-00279을 부여받았다.

25 3-3: 4B4 항체 분석

상기 <실시예 1-5>와 실질적으로 동일한 방법으로 항체의 CDR 아미노산 서열을 분석하였다. 상기 <실시예 3-2>에서 얻어진 4B4 항체의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역 서열을 SEQ ID NO: 20 및 21에 나타냈으며, 중쇄 가변영역의 CDR1 내지 CDR3는 각각 서열번호 14 내지 16에 나타냈으며,

경쇄 가변영역의 CDR1 내지 CDR3는 각각 서열번호 17 내지 19에 나타냈다(상기 표 2 참조).

<실시예 4> 4B4 키메라 항체 제조

5 상기 <실시예 2>에서 기술한 바와 같이 인체 투여 시 4B4항체의 면역원성을 줄이기 위해서 가변영역(variable region)을 제외한 나머지 부분을 인간의 IgG1의 Fc로 대체한 키메라 항체를 제작한 후 항원 특이성 및 친화도가 본래의 마우스 유래 4B4 항체와 유사함을 확인하였다.

 4B4 키메라 항체 제조 방법은 <실시예 2>와 동일한 방법으로
10 수행하였으며, 그 결과 개발한 4B4 키메라 항체의 항원 특이성 및 친화도를 유세포 측정기를 이용해 확인한 결과 항원 특이성 및 친화도가 본래의 마우스 유래 4B4 항체와 유사함을 확인하였다(도 5). 도 5는 4B4 키메라 항체의 항원 특이성 및 친화도를 나타낸다.

15 <실시예 5> 다양한 세포주에서 항체 발현 분석

5-1: 다양한 세포주에서 항체 발현

 KCLB(Korean Cell Line Bank)와 SNU(Seoul National University)를
 통해 확보한 다양한 암 세포주에서의 실시예 2 및 실시예4에서 각각 얻은
 키메라 27B6항체와 키메라 4B4항체의 결합 여부를 유세포 분석기(flow
20 cytometry)로 확인하였다.

 구체적으로 암세포주는 KCLB(Korean Cell Line Bank)와 SNU(Seoul
 National University)를 통해 얻었으며 L-132, SW-900, DU145, LNCap, MCF-
 7, Huh7, Hs-578T 는 10% heat inactivated fetal bovine serum(FBS; GIBCO,
 invitrogen)가 첨가된 Dubco's MEM(GIBCO, invitrogen) 배지를 A549, NCI-
25 H460, NCI-H417, DLD-1, HCT116, HT-29, SW-480, SW-620, LS174T, PC-3,
 SNU1, SNU638, SNU719, MKN1, MKN28, MKN45, MKN74, NCI-N87, SK-
 BR3, MDA-MB231, MDA-MB453은 10% heat inactivated FBS이 첨가된 RPMI
 1640(GIBCO, invitrogen) 배지를 이용해 37℃에서 5% CO₂ 상태의 배양기를
 이용해 배양하였다. 또한 Calu-3, Hep3B, SK-HEP-1, C3A, Hep G2,

PLC/PRF/5, BT-20은 10% heat inactivated fetal bovine serum(FBS; GIBCO, invitrogen)가 첨가된 Eagle's MEM(GIBCO, invitrogen) 배지를, KATO III는 20% heat inactivated fetal bovine serum(FBS; GIBCO, invitrogen)가 첨가된 IMDM(GIBCO, invitrogen) 배지를, SW480, MDA-MB468은 10% heat inactivated fetal bovine serum(FBS; GIBCO, invitrogen)가 첨가된 Leibovitz's L-15 Medium 이용해 37℃에서 5% CO₂ 상태의 배양기를 이용해 배양하였다.

상기 배양된 암세포주에 본 발명의 27B6, 4B4 단클론 항체를 각각 넣어 4℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 수세하고, FITC-conjugated goat anti-mouse Ig G(DiNona Inc, Korea)를 넣어 4℃에서 15분간 배양하였다. 다시 PBS로 수세한 후 FACScaliber(Becton Dickinson, USA)로 분석하여 그 결과를 아래에 기재하였다. (표 5) 다양한 고형암 세포주에서의 27B6 및 4B4항체의 반응을 확인하였다.

하기 표 5는 다양한 고형암 세포주에서 carbonic anhydrase 12항원에 대한 발현 양상을 나타낸다. 표 16에서 실험대상 5000개 세포중에서 27B6 및 4B4 단클론 항체에 대한 양성 세포의 퍼센트는 FACS분석법으로 분석하였으며, --는 양성 세포수가 10% 미만, +는 양성 세포수가 10~30%범위, ++는 양성 세포수가 30~70%범위이고, +++은 양성 세포수가 70~100%을 나타내며, -로 표시된 10%미만인 양성세포수를 음성으로 보며, 그 이상의 세포는 모두 양성으로 판단한다.

【표 5】

Origin	Cell line	27B6	4B4
Lung	A549	+++	+++
	NCI-H460	++	++
Colon	HCT116	+	-
	HT-29	+	+
	LS174T	+++	+++
Prostate	LNCap	+	+
Gastric	SNU 719	+	++

	MKN 45	+	+++
Liver	Huh-7	-	++
	Hep3B	-	+
	PLC/PRF/5	+++	+++
	MCF-7	+	+
Breast	SK-BR3	+++	+++
	MDAMB231	+++	+++
	MDAMB453	+++	++
	BT20	+	-
	Lymphocyte	-	-
PBMC	Monocyte	-	-
	Granulocyte	-	-

Cell binding profiling of 4B4 chimeric antibody performed by flow cytometry.

- : less than 10% of positive cells

5 + : 10~30%

++ : 30~70%

+++ : more than 70%

상기 표 5에 기재한 바와 같이, 본 발명의 27B6 및 4B4 단클론 항체는
 10 다양한 종류의 폐선암, 대장암, 위암, 간암 및 유방암 세포주에서
 결합정도의 차이는 보이지만 양성반응을 나타내는 것을 확인하였다. 반면
 말초혈액유래 림프구와 단핵구, 과립구에는 모두 음성인 반응을 확인하였다.
 이는 본 발명의 27B6 및 4B4 항체가 CA XII항원을 발현하는 고형암에 대한
 치료제로서 사용할 수 있음을 나타낸 것이다.

15

5-2: 다양한 유형의 유방암세포에서 발현양상

27B6와 4B4는 ER,PR뿐만 아니라 HER2 양성 유방암 세포에서도 모두
 양성 반응을 보임. 따라서, 삼중 음성 유방암(Triple negative breast

cancer)뿐만 아니라 다양한 유형의 유방암에서도 치료제로 쓰일 수 있다. 따라서, 세 가지 서로 다른 표현형의 유방암 세포주에서의 27B6와 4B4단클론 항체의 결합 여부를 유세포 분석기(flow cytometry)로 확인하였다.

- 5 MCF-7 세포(유방암 세포주, ER positive cell line)는 10% heat inactivated fetal bovine serum(FBS; GIBCO, invitrogen)가 첨가된 Dubco's MEM(GIBCO, invitrogen) 배지를, MDA-MB231(악성 유방암 유래 세포주), SK-BR-3 세포(human breast cancer cell line that overexpresses the Her2 (Neu/ErbB-2) gene product)는 10% heat inactivated FBS이
 10 첨가된 RPMI 1640(GIBCO, invitrogen) 배지를 이용해 37℃에서 5% CO₂ 상태의 배양기를 이용해 배양하였다.

- 상기 배양된 유방암 세포주에 본 발명의 27B6, 4B4 단클론 항체를 각각 넣어 4℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 수세하고, FITC-conjugated goat anti-mouse Ig G(DiNona Inc, Korea)를 넣어 4℃에서 15분간
 15 배양하였다. 다시 PBS로 수세한 후 FACScaliber(Becton Dickinson, USA)로 분석하여 그 결과를 표 6에 기재하였다.

【표 6】

Origin	Cell line	Subtype	Immunoprofile	4B4 Expression
Breast	MCF-7	Luminal	ER+, PR+, HER2-	+++
	SK-BR3	HER2	ER-, PR-, HER2+	++
	MDAMB453	Basal	ER-, PR-HER2-	+++
	MDAMB231	Basal	ER-, PR-HER2-	+++
	MDAMB468	Basal	ER-, PR-HER2-	+
	HS578T	Basal	ER-, PR-HER2-	+
	BT20	Basal	ER-, PR-HER2-	-

- 따라서, 본 발명에 따른 27B6와 4B4항체는 ER,PR뿐만 아니라 HER2
 20 양성 유방암 세포에서도 모두양성 반응을 보이므로, 삼중음성 유방암(Triple negative breast cancer)뿐만 아니라 다양한 유형의

유방암에서도 치료제로 쓰일 수 있다.

5-3: IHC (ImmunoHistoChemistry)

인체의 정상조직에서 27B6와 4B4 단클론 항체의 결합 항원의 분포는
5 면역조직화학염색(Immunohistochemistry, IHC)법으로 확인하였다. 인체의
정상 흉선과 편도조직은 충북대학교 병원에서 얻었으며, 충북대학교 병원
병리과에서 동결절편을 제작했다.

상기 제작된 동결절편 조직에 본 발명의 27B6, 4B4 단클론 항체의
면역조직화학염색은 다음과 같다. -20℃ 이하에서 보관된 흉선과 편도
10 동결절편 조직을 상온에서 30 ~ 60분간 말리고 1x PBS에 60분간 담궈
두었다. 이어서 3% 과산화수소(H_2O_2)에 상온에서 10분간 반응하여 내재성
퍼옥시다제(peroxidase)의 활성을 억제한 뒤 흐르는 물에 수세하고
염소유래 면역글로블린이 포함된 혈청으로 조직을 덮어 상온에서 30분간
반응시켜 마우스 항체에 의한 비특이 염색을 제거하였다. 다음으로 1차
15 항체 (27B6, 4B4)를 상온에서 60분간 반응시켰다. 사용된 항체의 농도는
각각 10ug/ml이다. 이어서 5분간 3회 1x PBS로 수세한 뒤 HRP-conjugated
goat anti-mouse 항체(Dako, Denmark)를 넣어 상온에서 30분간 반응 후
5분간 3회 1x PBST (0.05% Tween20, 1x PBS)로 수세하였다.
Diaminobenzidine(DAB)으로 발색하였고, 흐르는 물에 5분간 수세한 뒤
20 Hematoxylin으로 대조염색을 하고 흐르는 물에 7분간 수세하였다. 염색을
마친 슬라이드는 탈수와 봉입을 한 뒤 염색 결과는 현미경으로 분석하였고,
아래에 기재하였다.

【표 7】

Tissue		27B6	4B4
Thymus	Cortex	-	-
	Medulla	-	-
Tonsil	Inter follicular T cell	-	-
	B cell	-	-

	Geminal center	-	-
	Basal layer	Basal layer +	

- 상기 표 7에 기재한 바와 같이, 본 발명의 27B6 및 4B4 단클론 항체가 인지하는 항원은 정상 흉선과 편도 조직에는 분포하지 않았고, 특히 정상 성숙, 미성숙 T세포와 B 세포에서 발현되지 않는 것을 확인하였다.
- 5 27B6 항체의 경우 편도의 basal layer에 약하게 염색되었으나 이는 비특이 결합의 결과로 파악된다.

<실시예 6> 단클론 항체에 대한 항원분석

6-1: 4B4 및 27B6 단클론 항원의 분리 정제

- 10 4B4 및 27B6 단클론 항체 개발에 사용된 폐선암 A549 세포주를 1×10^8 배양하여 lysis buffer(1% Nonidet P-40; NP-40 in 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 50mM EDTA, and 1mM phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride; PMSF) 50 ml로 현탁한 후, 상온에서 15분간 용해시킨 다음 원심 분리를 통해 세포 잔존물을 제거하고 상층액을 모아 용해물을 준비하였다. 준비된 용해물은
- 15 4B4 및 27B6 항체가 인지하는 항원 분리 재료로 사용되었다.

- 정제된 4B4 및 27B6 단클론 항체 5 mg을 결합 버퍼 (0.2 M sodium bicarbonate, 0.5M sodium chloride, pH8.3)에 투석하여 2종의 항체 용액을 제조하였다. NHS-Activated sepharose 4 Fast Flow resin (GE Healthcare) 2 ml을 5 ml column에 패킹하고 1mM HCl 20 ml을 흘려 세척한 뒤 다시 결합
- 20 버퍼 (20mM sodium bicarbonate, 0.5M sodium chloride, pH8.3) 20 ml로 수세하여 상기에서 준비된 항체가 잘 결합하도록 컬럼(column)을 준비하였다. 준비된 컬럼 출구(column out-let)를 막고 준비된 2종의 항체 용액을 각각의 컬럼(column)에 넣은 뒤 컬럼 입구(column in-let)를 막아 상온에서 4시간 동안 반응 하였다. Resin과 반응하여 결합하지 않은 여분의
- 25 항체를 제거하기 위하여 수세 버퍼 (20mM Sodium acetate, 0.5M Sodium chloride, pH5.4) 20 ml을 흘려 주어 컬럼(column)을 세척하고, Resin에

잔존하는 반응기를 제거하기 위해 blocking buffer (0.1M ethanolamine, 0.5M sodium chloride, pH8.3) 50 ml을 흘려 주었다. 준비된 2종의 컬럼(column)은 보전 버퍼 (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.02 % sodium azide, pH8.0)을 20 ml 흘려 준 뒤 사용 전까지 냉장 보관 하였다.

- 5 준비된 column은 FPLC (Acta FPLC)에 연결하여 Resin에 결합된 항체가 항원을 인지하여 항원을 분리 할 수 있도록 준비하였다. 폐선암 A549 세포주 용해물은 FPLC에 연결된 컬럼에 주입 (loading)되었으며 4B4 및 27B6 단클론 항체가 인지하는 항원의 원료로 사용되었다. 항원분리는 방법은 평형 (equilibrium), 원료 주입 (sample loading), 세척 (washing), 10 2차 세척(second washing), 용출(elution)의 4단계로 이루어 졌다. 평형 및 세척 버퍼는 0.5% Tween-80, 20 mM Sodium phosphate, 150 mM sodium chloride pH 7.4이며, 평형에는 10 ml, 세척에는 20 ml이 각각 사용되었다. 용출 버퍼(elution buffer)는 0.3 M Glycine, 0.1 M sucrose, 0.1 M Mannitol, 1.0 M urea, 0.5% Tween-80, pH3.0 용액 20ml이 사용되었다. 2차 15 세척 용액 (second washing)은 용출 버퍼를 세척 버퍼에 25% 비율로 혼합한 혼합액을 사용하였다. 항원 분리 과정에서 얻어진 용출액 (eluated solution) 20ml에 TCA 5ml을 첨가하여 30 분간 냉장보관 하고 이후 원심분리하여 침전물은 얻고 아세톤으로 2회 추가 세척하였다. 최종 얻어진 침전물은 1X SDS-PAGE Sample buffer에 현탁하여 전기영동을 수행하고 20 코마지 염색을 실시하였다. 상기 기술한 바와 같이 4B4 및 27B6 항체로 각각 제작한 컬럼으로 최종 분리 정제된 항원은 도 6과 같다. 도 6에서, 4B4 및 27B6 단클론 항체로 제작한 칼럼으로 폐선암 A549 세포주 용해물에서 각각의 항원을 분리정제 하여 얻은 시료를 전기영동으로 확인한 결과이다.

25

6-2: 4B4 및 27B6 단클론 항원 동정

4B4 및 27B6 단클론 항체를 결합시켜 제작한 resin으로 분리 정제된 항원은 도 7과 같이 확인되었다. 화살표로 표시된 약 58 kDa 주요 단백질 밴드 2종은 서울의약연구소에 동정 의뢰되었다. 동정은 In-Gel

digestion으로 펩타이드를 준비하고, LC-MS/MS로 분석하여 얻어진 결과를 PLGS (Waters)와 MASCOT (Matrix Science)로 프로세싱하여 완료되었다. 일련의 분석방법은 다음과 같다.

- Gel 상태의 단백질은 100% ACN (Acetonitrile)으로 탈수하고 Speedvac을 이용하여 완전히 건조 되었다. 건조된 상태에서 트립신 (trypsin)을 첨가하여 15분간 digestion 하였다. 시료는 60% ACN, 0.1% TFA로 추출하여 Speedvac으로 농축하였다. 시료를 5% CAN, 0.2% TFA (Trifluoroacetic acid) 용액 20ul에 녹여 LC-MS/MS로 분석하였다. LC column는 nanoACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μ m, 300 Å, 2.1mm x 150mm I.D.)가 사용되었으며, 이동상 버퍼 A (0.1% TFA in 100% DW)를 이동상 버퍼 B(0.1% TFA in 100% ACN)로 점진적 교체 방법 (gradient elution)을 사용해 펩타이드를 분리하였다. MS 검출기는 ESI positive, Surver sacn mode를 사용하였다. 이후 얻어진 결과는 PLGS 및 MASCOT로 프로세싱하였다. 상기와 같은 일련의 분석으로 하기 표 과 같이 최종 동정 결과를 획득하여 하기 표 8에 나타냈다.

【표 8】

항체	No.	Description	mW(Da)	pI(pH)
4B4	1	Actin cytoplasmic 1	41739	5.15
4B4	2	Carbonic anhydrase 12	39426	6.79
4B4	3	Keratin type I cytoskeletal 9	62026	4.96
4B4	4	Serum albumin	68647	5.68
4B4	5	Trypsin	24393	6.91
4B4	6	Actin 3	41813	5.01
4B4	7	Actin 1	41648	5.24
27B6	1	Carbonic anhydrase12	39426	6.79
27B6	2	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	58470	7.96
27B6	3	Actin cytoskeletal 1	41814	5.24
27B6	4	Retinal dehydrogenase 1	42327	5.08
27B6	5	Hemoglobin subunit beta 1	15830	7.5

27B6	6	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	42122	5.88
27B6	7	Protein disulfide isomerase	57146	5.98
27B6	8	Serum albumin	68647	5.68
27B6	9	Trypsin	24393	6.91
27B6	10	Actin gamma	41580	5.33

분석된 결과 중 Carbonic anhydrase 12는 기대한 바와 같이 4B4 및 27B6 단클론 항체로 정제한 항원에서 공통적으로 동정되었으며 세포 표면에 존재하는 단백질로 알려져 있음을 확인하였다. 기타 다른 단백질들은 세포 내부에 존재하는 단백질이기 때문에 4B4와 27B6 단클론 항체의 항원이 될 수 없으며, 불완전한 분리 정제 과정에서 포함된 불순물로 파악된다.

27B6에서 분리된 펩타이드 서열은 QFLLTNGHSVK(서열번호 22), WTYFGPDGENSWSK(서열번호 23), GQEAFVPGFNIEELLPER(서열번호 24) 및 YKGQEAFVPGFNIEELLPER(서열번호 25)의 4 종 이고, 4B4에서 분리된 펩타이드 서열은 QFLLTNGHSVK(서열번호 22), EMINNFR(서열번호 26), GVIYKPAK(서열번호 27)의 3종이다. 이중 QFLLTNGHSVK 서열은 4B4 및 27B6에서 공통적으로 분석되었다. 도 8은 Carbonic anhydrase 12 precursor isoform 1 아미노산 서열이며 굵은 글씨로 분석된 펩타이드 서열을 표시하였다. 도 8은 분리정제된 항원을 LC-MS/MS로 분석하여 동정된 단백질 목록이다. 표 9는 실시예 6에 따라 Carbonic anhydrase 12 isoform 1의 단백질 서열에, LC-MS/MS로 검출된 항원 펩타이드 단편을 토대로 분석한 결과 27B6 및 4B4항체가 인지하는 항원이 Carbonic anhydrase 12 isoform1임을 표시한 것이다.

【표 9】

CA12 isoform 1	MPRRSLHAAVLLLVLKEQPSSPAPVNGSKWTFYFGPDGENS WSKKYPSCGGLLQSPIDLHSDILQYDASLTPLEFQGYNLSANKQ FLLTNNGHHSVKNLPSDMHIQGLQSRYSATQLHLHWGNPND PHGSEHTVSGQHFAAELHIVHYNSDLYPDASTASNKSEGLAVL AVLIEMGSFNPSYDKIFSHLQHVKYKGQEAFFVPGFNIEELLPER TAEYYRYRGSLLTPPCNPTVLWTVFRNPVQISQEQLLALETALYC THMDDPSPREMINNFRQVQKFDERLVYTSFSQVQVCTAAGLS LGILSLALAGILGICIVVVSIVLFRRKSIKKGDNKGVIYKPATKM ETEAHA	
4B4 인지항원 펩타이드 단편	QFLLTNNGHSVK	EMINNFR GVIYKPATK
27B6 인지항원 펩타이드 단편	QFLLTNNGHSVK	WTFYFGPDGENSWSK YKGQEAFFVPGFNIEELLPER GQEAFFVPGFNIEELLPER

6-3: 4B4 및 27B6 단클론 항원 검정 (ELISA)

- LC-MS/MS에서 얻어진 항원 동정 결과를 검정하기 위하여 재조합
 5 단백질 Carbonic anhydrase 12 (R&D systems)에 대한 4B4 및 27B6 단클론 항체의 반응성을 ELISA 및 Western blotting assay로 확인하였다.

- Maxisrop ELISA plate에 well당 재조합 단백질 CA XII을 100ng 넣어
 37℃에서 한 시간 반응시켜 항원을 코팅한 뒤, 1x blocking 용액(sigma)을
 10 well 당 200ul 넣고 37℃에서 한 시간 반응시켜 블로킹하였다. 상기 준비된
 플레이트에 4B4, 27B6, 항 CA XII 단클론 항체 (R&D Systems) 및 PBS
 100ul을 넣은 후 37℃에서 한 시간 반응시키고 PBS로 수세하여 결합하지
 않는 항체는 제거하였다. 이후 Goat anti-Mouse IgG-HRP(Jackson)을
 희석하여 넣어주고 30 분간 반응시킨 후 PBS로 수세한 뒤 TMB 용액을 well
 15 당 50ul씩 넣어 10분간 반응시킨 후 황산 50ul를 넣어 반응을 중지시키고
 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 재조합 단백질 Carbonic anhydrase 12에
 대하여 27B6 단클론 항체의 반응성은 다소 낮으나 4B4, 27B6, anti-CA XII

단클론 항체 (R&D systems) 모두 도 7과 같이 반응성을 나타내었다.

도 7은 4B4 및 27B6 단클론 항체에 대한 항원이 Carbonic anhydrase 12라는 것을 ELISA assay로 검증한 결과이다.

5 6-4: 4B4 및 27B6 단클론 항원 검정 (western blotting)

상기 실험에서 4B4 및 27B6 단클론 항체가 Carbonic anhydrase 12을 항원으로 인지한다는 것을 보여 주었으나, western blotting으로 한번 더 검정하였다. 재조합 단백질 Carbonic anhydrase 12을 3분간 끓인 후 8% separating sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에 loading하여 전기 영동을 실시하였다. 이를 니트로셀룰로오스 막에 electrophoretic transfer시킨 후 5% skim milk(sigma) 용액으로 블로킹하고 각각 4B4, 27B6, 항-CA XII 단클론 항체 (R&D Systems)를 결합시킨 후 (27B6: 1,2 lane, 4B4: 3,4 lane, 항-CA XII 단클론 항체: 5,6 lane), 세척 버퍼 (0.1% tween-20 in PBS)로 세 번 세척한 후 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma, Saint Louis, USA)을 결합시켰다. 상기 니트로셀룰로오스 막을 세척 버퍼로 세척한 후 enhanced chemiluminescence detection system (ECL, Amersham, Sweden)로 밴드를 확인하여 그 결과를 도 8 에 기재하였다. 도 8은 4B4 및 27B6 단클론 항체에 대한 항원이 Carbonic anhydrase 12라는 것을 Western blotting assay로 검증한 결과이다. 4B4, 27B6, Anti-CA XII 단클론 항체 (R&D Systems) 모두 40 kDa에 달하는 재조합 CA XII를 대한 반응성을 나타내었다.

6-5: 4B4 및 27B6 단클론 항원 검정 (Sandwich ELISA)

상기 ELISA와 WB에서 4B4 및 27B6 단클론 항체가 Carbonic anhydrase 12을 항원으로 인지한다는 것을 증명하였으나, 상대적으로 27B6 단클론 항체는 상대적으로 반응성이 낮다. 이를 보완하기 위하여 Sandwich ELISA를 아래와 같이 수행하였다. Maxisrop ELISA plate에 well당 chimeric 4B4 또는 chimeric 27B6 단클론 항체를 well 당 100ng 넣어 37℃에서 한 시간 반응시켜 항체를 코팅한 뒤, 1x blocking 용액(sigma)을 well 당 200ul

- 넣고 37℃에서 한 시간 반응시켜 블로킹하였다. 재조합 단백질 Carbonic anhydrase 12을 100 ng/ml에서부터 2배씩 희석하여 각각의 well에 넣어 주고 37℃에서 한 시간 반응시킨 뒤 PBS로 수세하여 결합하지 않는 항원을 제거하였다. 이후 chimeric 27B6가 코팅된 well에는 4B4 단클론 항체를, Chimeric 4B4가 코팅된 well에는 27B6 단클론 항체를 well 당 100 ng을 넣고 37℃에서 한 시간 반응시킨 뒤 PBS로 수세하여 결합하지 않는 항체를 제거하였다. 이후 Goat anti-Mouse IgG-HRP(Jackson)을 희석하여 넣어주고 30 분 반응시킨 후 PBS로 수세한 뒤 TMB 용액을 well 당 50ul씩 넣어 10분간 반응시킨 후 황산 50ul를 넣어 반응을 중지시키고 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 코팅 항체 (Capture antibody)로 Chimeric 27B6를 사용하고 검출 항체 (Detector antibody)로 4B4를 사용하였을 때 재조합 단백질 Carbonic anhydrase 12에 대한 높은 반응성이 표 10와 같이 확인되었다. 따라서 4B4 및 27B6 단클론 항체 모두 Carbonic anhydrase 12을 항원으로 인지함을 증명하였다.
- 하기 표 10는 27B6 및 4B4 단클론 항체를 Capture/Detector 항체로 조합하여 Sandwich ELISA assay로 구현하고, Carbonic anhydrase 12를 27B6와 4B4 단클론 항체가 동시에 인지하고 있음을 검증한 결과이다.

【표 10】

Capture antibody	Chimeric 27B6	Chimeric 4B4
Detector antibody	4B4 mAb	27B6 mAb
CA12 100ng/ml	1.653	0.021
CA12 50ng/ml	1.349	0.016
CA12 25ng/ml	0.954	0.016
CA12 12.5ng/ml	0.634	0.011
CA12 6.25ng/ml	0.351	0.009
CA12 3.13ng/ml	0.193	0.008
blank	0.064	0.007
blank	0.055	0.008

<실시예 7> Epitope mapping

에피토프(epitope)을 검증하기 위하여 도 13에 기재한 바와 같이 하기 실시에서 결정된 에피토프 부위를 포함하거나 포함하지 않는 재조합 항원을 제작하여 실시예 1 및 3에서 각각 얻은 마우스 27B6 단클론항체 및 4B4 단클론 항체에 대한 면역반응을 실시하였다.

7-1: CA XII mutant 재조합 유전자 제조 및 발현

pSec-Tag-CA XII full-hFc 재조합 유전자를 이용하여 제한효소 BamHI과 HindIII를 이용해 CA-XII mutant 재조합 유전자를 만들었다. CA-XII 항원의 전체 염기서열과 hFc가 결합된 유전자를 pSec-Tag에 삽입함으로써 CA-XII 전체 발현 hFc 융합 단백질을 제조하였으며, 도 13과 같이, N 말단부터 아미노산 300번까지의 deletion mutant-hFc를 제조하였다.

상기 CA XII full-hFc 및 5종의 deletion mutant-hFc 가 삽입된 pSec-Tag 벡터를 ViaFect(Promega사)을 이용하여 CHO 세포에 삽입함으로써 형질전환하였다. 보다 구체적으로 상기 각 유전자 및 ViaFect complex을 하루 전날 플레이팅하여 새로운 배지로 갈아준 CHO 세포에 뿌리고 48시간 동안 배양하였다. 상기 형질감염한지 이틀 후 배양 상등액을 수확하여 human Fc(hFc)를 검출하는 sandwich ELISA를 이용해 발현여부를 확인하였다.

7-2: 단클론 항체의 에피토프(epitope) 검증

본 발명의 단클론 항체의 CA-XII에 대한 에피토프를 검증하기 위해, anti-human Ig 항체 (Jackson Laboratory사)를 well당 50ng 넣어 37℃에서 한 시간 반응시켜 capture 항체로서 코팅하고, 1xblocking 용액(sigma)을 웰당 200ul 넣고 37℃에서 한 시간 반응시켜 블로킹하였다. 상기 준비된 플레이트에 제조된 CA XII full-hFc 및 5 종의 deletion mutant-hFc 의 배양 상등액을 웰당 100ul씩 넣은 후 37℃에서 한 시간 반응시키고 PBS로 수세하여 결합하지 않는 항체는 제거하였다. 이에 anti-mouse Ig, Fc specific-HRP(Jackson Laboratory사)을 희석하여 넣어주고 30분 간 반응시킨 후 PBS로 수세한 뒤 TMB 용액을 웰당 50ul씩 넣어 10분간 반응시킨 후 황산 50ul를 넣어 반응을 중지시키고 450nm에서 흡광도를

측정하였다. 상기 배양 상층액에 CA XII mutant-hFc 단백질이 존재함을 확인하기 위해, 대조군으로 anti-human Ig 항체를 이용하여 Capture & detect Sandwich ELISA를 수행하고 상기 실험 결과를 도 9에 기재하였다.

도 9에 나타난 바와 같이, CA-XII의 N-말단에서부터 25번
5 아미노산에서 57번 아미노산으로 이루어진 단편으로서 non-catalytic domain으로 확인되었다. 따라서, CA-XII의 catalytic domain에는 결합하지 않으며 이에 CA-XII 효소활성을 저해하지 않는 것으로 보인다.

구체적으로, 상기 실험결과에서 절단방법으로 확인한 27B6 항체의 항원결합부위는 서열번호 2의 APVNGSKWTYFGPD (서열번호 5의 25번째
10 아미노산 내지 38번 아미노산으로 구성됨)이며, CA XII의 3차원적 결정 구조에 근거하여 다시 확인한 바람직한 항원결합부위는 서열번호 2의 아미노산 서열 중에서 7개 아미노산으로 구성된 서열번호 1의 WTYFGPD이다(서열번호 5의 32번째 아미노산 내지 38번 아미노산으로 구성됨). 또한 상기 실험결과에서 절단방법으로 확인한 4B4 항체의
15 항원결합부위는 서열번호 4의 GENSWSKYPSCGGLLQSP(서열번호 5의 39번째 아미노산 내지 57번 아미노산으로 구성됨)이며, CA XII의 3차원적 결정 구조에 근거하여 다시 확인한 바람직한 항원결합부위는 서열번호 4의 아미노산 서열 중에서 14개 아미노산으로 구성된 서열번호 3의 GENSWSKYPSCGG이다(서열번호 5의 39번째 아미노산 내지 52번 아미노산으로
20 구성됨).

<실시예 8> 고형암에서의 키메릭 항체의 치료효과 (CDC)

8-1: 폐선암 세포주에서 CDC효과

폐선암 세포주인 A549 cell을 96웰(well) 플레이트에 에
25 5×10^3 cells/well로 분주한 후 37°C CO₂ incubator에서 20-24시간 배양한다. 각 웰(well)의 배양 배지를 제거한 후 우태혈청이 포함되지 않은 RPMI 배지에 정제한 키메릭 27B6 항체를 최종 농도 10ug/ml이 되도록 10%의 human serum을 섞어 혼합액을 만든 뒤 각 well에 100ul씩 분주하였다.

키메릭 4B4 항체도 동일한 방법을 사용하였다. 37°C CO₂

incubator에서 3hr 배양 후 Ez-CyTox agent (DOGEN, KOREA)를 웰(well) 당 10ul씩 첨가하였다. 37℃ CO2 incubator에서 3hr 30분 배양 후 플레이트 리더기(plate reader)를 이용하여 OD 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 10에 나타냈으며, 도 10는 27B6항체의 보체 의존성 세포독성 효과를 나타내는 도면이다.

도 10에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 실시예 2 및 4에서 각각 얻은 키메릭27B6 및 키메릭4B4 단클론 항체가 보체 의존성 세포독성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

10 8-2: 삼중음성유방암에서 CDC효과

상기 <실시예 8-1>과 실질적으로 동일한 방법으로 치료효과를 평가하나, 다만 표적세포로 A549세포주 대신에 삼중음성유방암 세포주 MDAMB-231를 수행하여 OD450nm에서 흡광도를 측정하여 하기 표 11에 나타냈다. 표 11은 실시예 8에 따라 4B4 키메릭 항체가 삼중음성유방암에서 보체 의존성 세포독성을 나타냄을 확인한 결과이다.

【표 11】

sample	cytotoxicity(%)
No treat	0.0
5% HS	(12.7)
5% NHS+4B4 1ng/ml	76.5
5% NHS+4B4 10ng/ml	86.3
5% NHS+4B4 100ng/ml	83.4
5% NHS+4B4 1000ng/ml	75.7
5% NHS+4B4 10000ng/ml	83.7
4B4+5% NHS+CVF 50ug	83.9
4B4+5% NHS+CVF 100ug	80.7

상기 표 11에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 27B6 단클론항체가 폐선암에서 보체 의존성 세포 독성 작용을 나타냄을 확인할 수 있었다.

<실시예 9> 고형암에서의 키메릭 항체의 치료효과 (ADCC)

9-1: 항체의존성 세포독성 검사(ADCC- LDH assay)

효과기 세포(effector cell)준비를 위해서, 사람의 혈액을 채취하여 피콜(ficoll)용액을 첨가 한 후 (혈액:ficoll =1:2) 2000rpm에 20분간 원심분리해서 PBMC(Peripheral Blood Mononuclear Cell)를 얻었다. 얻은 PBMC를 5% FBS 첨가 RPMI 배지에서 37℃로 보관하였다. 항체 의존성 세포독성 검사는 LDH assay 방법과 Luciferase assay 방법을 이용하여 실험하였다.

표적세포로 다양한 고형암 세포주로서 HT29(대장암), A549(폐선암), NCI-H460(폐선암), MCF7(유방암) 세포를 1×10^4 cells/well로 96웰 플레이트에 준비한 후 37℃ CO₂ incubator에서 18-20시간 배양한다. 각 웰(well)의 배양액을 모두 제거한 후 5% 우태혈청이 포함된 배양배지에 키메릭 27B6항체를 0 μ g/mL, 0.1 μ g/mL, 1 μ g/mL이 되도록 첨가하여 준비하고, 이를 배양액을 제거한 플레이트에 100ul씩 분주한 후 37℃ 인큐베이터에서 30분간 반응시켰다. 이후 준비된 효과기 세포를 각 well당 5×10^5 (표적세포의 50배)가 되도록 넣어주고 24 시간 37℃ CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 양성대조군으로는 용해 버퍼(lysis buffer)를 넣고 37℃에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양한 후에 2500rpm에서 5분간 원심분리해서 상층액만 수득한 후 표적세포로부터 용해되어 나온 LDH(lactate dehydrogenase)를 측정해서 세포 용해 정도를 계산하였다(Promega assay kit). 그 결과 도 11에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 27B6 단클론 항체가 다양한 고형암에서 항체 의존성 세포독성 작용을 나타냄을 확인할 수 있었다(도 11). 도 11는 27B6항체의 항체 의존성 세포독성 효과 확인한 결과이다.

25

9-2: 삼중 음성 유방암에서 항체의존성 세포독성 검사(ADCC-LDH assay)

효과기 세포는 상기 9-1의 방법과 동일한 방법으로 준비하고 항체 의존성 세포독성 검사를 수행하였다.

27B6 항체는 유방암의 분류 중 현재 치료제가 개발되지 않은 삼중음성유방암 세포주인 MDAMB-231, MDAMB-468, MDAMB-453, BT-20 세포주에서 높은 항체 의존성 세포독성 작용을 나타냄을 확인할 수 있었다(도 12). 도 12은 27B6 항체의 삼중음성유방암 세포주에서의 항체 의존성 세포독성 효과 확인한 결과이다.

<실시에 10> 고형암에서의 defucosylation 키메라 항체의 치료효과(ADCC)

10-1: defucosylated Chimeric 27B6항체의 ADCC 효능확인(Colon, lung, breast cancer)

항체 단백질의 defucosylation을 유도하기 위해, 실시예 2에 따른 27B6와 실시예 4에 따른 4B4 키메라 항체 세포주의 배양시 defucosylation을 유도하는 약물인 kifunensine을 100ng/ml로 배양액에 첨가하여 배양한 후 정제하여 defucosylation되지 않은 항체와의 ADCC 효과를 비교하였다. Colon, lung, breast 암에서, kifunensine 처리 ADCC 강화 chimeric 27B6항체의 ADCC 효능확인하였다.

그 결과, 도 13에서 보는 바와 같이 kifunensine을 처리하여 defucosylation을 유도한 항체를 다양한 고형암 세포주에 처리했을 때 항체 의존성 세포독성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 도 13은 Defucosylated 27B6 키메라 항체의 항체 의존성 세포독성 검사결과이다.

10-2: defucosylated Chimeric 27B6항체의 ADCC 효능확인- 삼중음성 유방암

Luciferase ADCC assay 방법을 이용하여 삼중음성 유방암 세포주인 MDAMB231과 HER2수용체 양성인 유방암 세포주 SK-BR3의 항체 의존성 세포독성효과를 살펴 보았을 때 역시 kifunensine을 처리하여 defucosylation을 유도한 항체를 처리했을 때 kifunensine을 처리하지 않은 항체보다 항체 의존성 세포독성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 14). 도 14은 Luciferase assay를 이용한 Defucosylated 27B6,

4B4 키메라 항체의 항체 의존성 세포독성 검사를 나타낸다.

구체적으로, 표적세포로 유방암 세포주인 MDAMB231과 SK-BR3를 96well plate에 1.25×10^4 cells/well로 plating 후 37°C CO₂ incubator에서 20-24시간 배양한다. 각 웰(well)의 배양액을 제거한 후 low IgG FBS 4%가 포함되어 있는 RPMI를 세포가 플레이팅되어 있는 well에 25ul씩 첨가한다. 27B6, 4B4 항체를 최대 10ug/ml에서 3-fold로 희석하여 최저 약 1.2ng/ml까지 low IgG FBS 4%가 포함되어 있는 RPMI를 사용하여 희석한 항체시료를 준비한다. 준비된 각각의 항체시료를 해당 well에 25 ul씩 첨가한 후 plate의 뚜껑을 닫고 클린 벤치안에서 유지시켰다. 배양하고 있던 ADCC reporter cell(ADCC Reporter Bioassay, Promega) 을 harvest 한 후 low IgG FBS 4%가 포함되어 있는 RPMI로 3×10^6 cells/ml이 되게 현탁 한다. 각 well에 ADCC reporter cell 현탁액을 25 ul씩 첨가한 후 37°C CO₂ incubator에서 24시간 배양한다. 플레이트를 꺼내기 전 미리 얼려져 있는 luciferase substrate를 중탕기에 녹여 준비해둔다. 플레이트를 꺼내 실온에서 15분 방치 후 luciferase substrate를 각 well당 75ul씩 첨가한 후 암실에서 30분간 반응시킨 후 luminometer를 이용하여 발광도를 측정하였다. 상기 Luciferase assay를 이용한 Defucosylated 27B6, 4B4 키메라 항체의 항체 의존성 세포독성 검사 결과를 도 14에 나타냈다.

도 14에서 보는 바와 같이, kifunensine을 처리하여 defucosylation을 유도한 키메라 27B6 또는 4B4항체를 MDAMB231, SK-BR-3 각각에 처리했을 때 항체 의존성 세포독성이 증가하는 것을 확인하였다.

<실시예 11> 마우스 실험모델에서의 27B6, 4B4항체의 치료효과

11-1: 세포주 확립

사람의 유방암 동물 모델은 삼중음성 유방암 (triple negative breast cancer) 세포주인 MDA-MB-231과 MDA-MB-453 세포주로 확립하였다. 먼저, MDA-MB-231과 MDA-MB-453 세포를 1.5×10^8 (in RPMI : Matrigel mixture)으로 준비한 뒤 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 접종하고 대조군, 시험군으로 무작위 배정한다.

도 15는 동물실험에 사용한 MDA-MB231 세포에 대한 실시예 2의 키메릭 27B6, 실시예 4의 키메릭 4B4 항체의 세포 표면 결합을 추가 확인한 것이며, 도 16은 이를 이용한 동물실험에 대한 결과로서, 항체 투여에 의해 MDA-MB231 세포주에 의해 생성된 암의 성장이 저해되며 크기가 감소되는 결과이다.

시험물질은 27B6 fucose 키메릭항체, 27B6 defucose 키메릭항체, 4B4 fucose 키메릭 항체 4B4 defucose 키메릭 항체이며, 유방암 세포를 접종하고 3일 뒤부터 마우스 한 마리 당 12mg/kg의 용량을 복강 내로 투여하였다. 시험물질의 투여횟수는 주 2회 투여로 3주간 투여하고 종양 크기 주 2회 치료제 투여 전에 측정한다. Anti-CA XII antibodies의 유방암에 대한 유효성은 다음 식 $(a \times b)/2$, (a는 짧은직경, b는 긴직경)으로 계산하여 부피로 환산된 결과로 비교한다. 실시예 20-1의 부피 계산식과 동일하다.

[수학식]

부피 계산식 (부피= $(a \times b)/2$, a는 짧은직경, b는 긴직경)

11-2: 삼중음성 유방암에 대한 항 CA-XII antibodies의 유효성 평가

삼중음성 유방암 특이 발현되는 CA XII 에피토프를 표적으로 삼중음성 유방암에 대한 키메릭4B4 항체의 유효성을 평가하였다(도 17).

4B4를 투여한 유방암의 부피가 억제되는 것을 확인 했고, fucose 항체보다 defucose항체가 성장 억제 효능이 우수했다. 4B4 fucose 항체의 유방암의 성장 억제 효능은 MDA-MB-231과 MDA-MB-453 두 종양에서 확인되었고, 특히, MDA-MB-453 모델의 경우 21일째부터 종양이 더 이상 자라지 않는 완전관해 상태를 보였다 (도 17). 도 17은 삼중음성 유방암에 대한 4B4 항체의 유효성 결과이다.

<실시예 12> 항체 투여에 의한 세포 생존에의 영향 확인

실시예 4의 키메릭4B4 항체를 이용하여 세포 생존에 미치는 영향을 확인하였다. 항원 CA XII 양성 암세포에 항체 투여 시, 세포 성장 및

생존에 영향을 미치는 지를 확인하기 위하여 96 웰 flat bottom plate에 cell을 3×10^4 cells/well로 전날 분주하였다(10%RPMI). 24hr 후 RPMI 제거하고 항체를 포함한 부피가 100ul 되도록 새로운 5% RPMI를 분주하였다. 24시간 후 CytoTox 96(상표명) Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega, Cat.# G1780)를 well 당 50ul씩 분주하고 30분 동안 RT에서 반응한 후 spectrophotometer로 세포의 활성도 측정하였다. MDA-MB231 세포에 항체 투여 후, 24시간 경과 뒤 세포 활성도를 측정하였다.

상기 측정결과를 도 18에 나타냈으며, 항체 투여에 의한 세포 활성도의 촉진 또는 저해 현상은 나타나지 않았으며, CA XII 효소 저해 없으며 종양세포의 성장에 무영향을 나타낸다. 따라서, 본 발명에 따른 항체는 면역 시스템으로 통한 ADCC, CDC로 항종양 활성을 나타냈다.

A549 에 항체 투여 후, 24시간, 48시간, 72시간 경과 뒤 세포 활성도를 측정하였음. 항체를 투여하지 않은 경우에 비교하여 세포 활성도의 변화를 크게 나타나지 않았다. 도 19 및 도 20는 4B4 항체 단독의 직접적인 결합은 암세포 성장에 영향을 주지 않음을 나타낸 결과이다.

항 CA-XII 항체로서 키메릭4B4항체 자체의 세포 결합만으로는 세포 성장에 영향을 끼치지 않았다. 이와 같은 이유는 키메릭4B4 항체의 경우, CA-XII 항원의 N-말단 비 효소 부위 (N-terminal non-enzymatic region)에 결합하기 때문에, CA-XII 효소 활성에는 영향을 미치지 않기 때문으로 보인다.

<실시예 13> 항체 및 Radiotherapy 병용에 따른 치료 효과 평가

본 발명에 따른 항체와 방사선 요법을 함께 처리할 경우 항암 효과가 증대되는 지 확인하였다.

구체적으로, 본 발명에 따른 실시예 2의 키메릭 27B6 항체와 함께, 각각 cisplatin 5ug/ml 처리, 2 Gy 방사선 조사, 또는 4 Gy 방사선 조사를 수행한 후에, A549 세포에서의 CA XII 발현 정도의 변화를 유세포 분석기로 확인하였다. 그 결과 cisplatin 처리 및 방사선 조사 후 CA XII 항원의 세포 표면 발현이 증가되는 것으로 확인되었으며, 방사선 4 Gy 조사 시

가장 높은 발현 양상을 보였다. 이는 방사선 조사와 본 발명에 따른 CA XII 항체의 병용투여로 암세포 성장 억제에 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 제기한다(도 20의 상단 그래프).

이에, 병용 처리에 대한 암세포 사멸효과를 검증하기 위해, 도 20
5 아래 그래프와 같이, 27B6 항체와 방사선 조사를 병용 처리 한 후, A549 암세포주의 세포 사멸효과를 MTT assay로 측정하였다 도 20의 아래 그래프는 27B6 항체와 방사선 치료의 병용효과를 나타낸 결과이다. 도 20에 나타낸 바와 같이, 항체 단독 처리 또는 항체에 대한 음성 대조군으로서 isotype control 항체와 방사선 조사 병용 처리와 비교하여, 27B6와 방사선
10 조사 병용 처리 시, 높은 비율로 암세포를 사멸시키는 결과를 확인하였다.

<실시예 14> 항-CA-XII 키메라 항체의 인간화

14-1: 인간화 가변 도메인의 구축(DNP004 scFv form 선택)

<실시예 4>에서 얻은 full IgG형태의 4B4 키메라 항체를 주형으로
15 디에이치랩 소유 Phage display 기술로 antibody screening을 위하여 scFv형태로 전환하였다. 이를 위해 키메라 4B4항체의 variable region을 E.coli codon으로 바꾸고 VL과 VH를 PCR로 연결하여 scFv gene을 제작하였다. VL과 VH의 순서 및 linker의 길이를 조합하여 여러 가지 constructs를 제작한 후 phagemid vector에 ligation하였다.ligation한
20 plasmid vector는 항원인 CA XII와 결합력 분석을 통해 결합력이 가장 높은 DNP004 scFv의 VH-long linker-VL 형태를 선택하여 mutagenesis template로 사용하였다.

14-2:서브 라이브러리 제작 및 스크리닝

25 디에치랩사의 노하우를 통하여 variable region 전체 또는 부분에 대해 random mutation sublibrary 또는 position specific mutation sub-library를 총 11종 제작하였다. 제작된 Sub-library종류는 다음과 같다:

(1)Random mutation sub-library: VL 1종, VH 1종, VH&VL 2종

(2)Position specific mutation sub-library: LCDR 3종, HCDR 3종,

VH&VL 1종

상기 제작한 11종의 서브 라이브러리를 대상으로 CA XII에 대한 bio-panning을 수행하였다. 1차 스크리닝을 통해 VL부분에 signal이 높은 clone 552개를 선정한 후, 2차 스크리닝을 통해 mother clone의 signal보다 높은 clone 78개를 선별하였다. 이 후 염기서열을 확인하여 염기서열이 서로 다른 총 32개 clone을 선별하였다.

선정된 32개 clone들을 ELISA방법으로 CA XII에 대한 결합력을 재확인하여, ELISA signal이 mother clone인 4B4 키메릭 항체와 대비하여 1.5배 이상인 clone들 10종(clone ID 1, 2, 4, 5, 8, 15, 24, 25, 26, 28)을 선정하였고, 이들의 CDR의 서열 분석 결과 LCDR1 및 LCDR 2 부분에 변이가 있음을 확인하였다(도 22).

그런 후에, LCDR1 및 LCDR2 부분을 hot-spot으로 판단하여 상기 10종(clone ID: 1, 2, 4, 5, 8, 15, 24, 25, 26, 28), 그리고 추가적으로 LCDR2부분에 변이가 있는 4종 (clone ID: 11, 22, 19, 30)을 선별하여 full IgG 전환[LK sun, P Curtis, Chimeric antibody with human constant regions and mouse variable regions directed against carcinoma-associated antigen 17-1A, Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jan;84(1):214-8]을 하였다(도 21 및 도 22). 하지만 full IgG로 전환한 클론들 14종 중 Low expression등의 이유로 clone ID: 4, 5, 24, 및 28은 향후 물질 테스트 실험에서 제외하였다. 상기 10종의 선택된 클론의 변이 부위를 하기 표 12에 정리한다.

【표 12】

클론 ID	Sub-library		Mutation position
	random	selected	
#1	0		VL-CDR1, VL-CDR2
#2	0		VL-CDR2
#4	0		VL-FR1
#5		0	VL-CDR1, VL-CDR2
#8		0	VL-CDR2

#15		0	VL-CDR2
#24		0	VL-CDR2
#25	0		VL-CDR2
#26	0		VL-CDR1, VL-FR1
#28		0	VL-FR1

14-3: 인간화 라이브러리의 형질감염 및 IgG의 배양 및 측정

CHO 세포를 96웰 플레이트에 접종하고, 인간화 클론들의 미니프랩한 DNA로 형질 감염시켰다. 자세한 실험방법은 아래와 같다.

- 5 먼저 CHO 세포주를 형질전환하기 12시간 전에 6-웰 플레이트에 1×10^5 cells/ml 농도로 접종하고 5%우태혈청이 포함된 DMEM 3ml를 넣어 37°C, 5% CO₂ 조건에서 12시간 동안 배양 후 상기에서 제조된 10종의 Full IgG DNA를 ViaFect reagent 키트(Promega, USA)를 이용하여 준비된 CHO세포에 형질전환하였다. 세포 배양물 상층액을 형질감염 48시간 후 수집하고, 각
- 10 인간화 클론 및 대조군의 IgG 항체의 반응성을 ELISA로 확인하였다.

- Maxisrop ELISA plate에 well당 재조합 단백질 CA XII을 100ng 넣어 37°C에서 한 시간 반응시켜 항원을 코팅한 뒤, 1x blocking 용액(sigma)을 well 당 200ul 넣고 37°C에서 한 시간 반응시켜 블로킹하였다. 상기 준비된 플레이트에 4B4, 27B6, 항 CA XII 단클론 항체 (R&D Systems) 및 PBS
- 15 100ul을 넣은 후 37°C에서 한 시간 반응시키고 PBS로 수세하여 결합하지 않는 항체는 제거하였다. 이후 Goat anti-Human IgG-HRP(Jackson)을 희석하여 넣어주고 30 분간 반응시킨 후 PBS로 수세한 뒤 TMB 용액을 well 당 50ul씩 넣어 10분간 반응시킨 후 황산 50ul를 넣어 반응을 중지시키고 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

20

14-4:ELISA 를 이용한 인간화 항체 후보군 항원 친화력 테스트

항원 CA-XII에 인간화 클론의 결합을 디에이치랩에서 제공된 프로토콜 및 항원을 이용하여 평행 시험하였다. 활성 (친화력)을 각 클론에 대해 계산하고, 동일한 플레이트 상에서 양성 대조군 (키메라 클론

4B4)의 활성과 비교하였다. 10종의 variants(clone ID 1, 2, 4, 5, 8, 15, 24, 25, 26, 28)의 항원 결합력은 mother clone(4B4 키메라)에 비해 크게 높지 않은 것으로 확인되었으나, ELISA상으로 예상되는 mother clone의 affinity는 약 $KD\ 10^{-10}M$ 수준으로 보이며 이는 상당히 높은 수준으로, 10종의 후보항체의 항원 결합력이 mother clone에 미치지 않더라도 그 결합력이 낮은 것은 아니라고 판단된다(도 23 및 도 24).

<실시예 15> 인간화 항체 CDR 서열/ 항체 sequence

15-1: 항-DNP004 인간화 항체 유전자 서열 선정

10 DNP004 인간화 항체 유전자는 CA-XII에 특이적으로 결합하는 마우스 단클론 항체 4B4 (하이브리도마 기탁번호: KCLRF-BP-00279)의 경쇄 및 중쇄 가변영역 유전자를 주형으로 인간화 항체 제작을 진행하되, 앞서 디에치랩사의 In silico노하우를 통하여 variable region 전체 또는 부분에 대해 random mutation sublibrary 또는 position specific mutation sub-

library를 총 10종을 제작하였다.

이렇게 제작된 library를 이용하여 phage display 방법으로 총 552개의 개별적인 clone들을 screening하여 이들 중 mother clone보다 높은 signal을 보인 clone 78개를 선별하였다. 염기서열 확인 결과 총 32개의 서로 다른 clone을 선별하였다. 32종의 CA XII에 대한 결합력을 재확인한 결과 ELISA signal이 mother clone 대비 1.5 배 이상인 clone들 10종이 확인되었고 주로 LCDR1, 2 부분에 mutation이 있음이 확인되었다. 따라서, LCDR1, 2 부분을 hot-spot으로 판단하여 10종을 선별하고, 추가적으로 LCDR2부분에 mutation이 있는 4종 (11, 22, 19, 30)을 선별하여 full IgG1 전환을 하였다. 이렇게 준비된 full IgG 14종 중 Low expression등의 이유로 clone ID 4, 5, 24, 28을 제외한 10종을 발현/정제 후 ELISA를

진행하여 최종 10 종을 선별하였다.

최종적으로는 마우스 단클론 항체 4B4와 가장 유사한 인간화 항체 #8번의 항체 후보를 선정하였다. 각 후보항체들은 시퀀싱을 통해 인간화 항체 유전자를 확인하였으며, 분석된 DNP004항체의 중쇄 및 경쇄 가변영역

서열은 다음과 같다(표 13, 표 14). 하기 표 13에 나타난 바와 같이, 중쇄 가변영역의 CDR은 동일하거나 일부가 다르지만, 경쇄 가변영역의 CDR 서열은 상이할 수 있다. 하기 서열번호 15, 16, 28, 32 내지 42에서 진하게 표시한 아미노산은 변형된 것을 나타낸다.

5 【표 13】

Clone ID no.	CDR1	서열 번호	CDR2	서열 번호	CDR3	서열 번호
V _H -chimeric	GYSYTDYN	14	IDPANGDT	15	<u>A</u> RPIYYGAYWYFDV	16
V _H -humanized	GYSYTDYN	14	IDPANGDT	15	<u>S</u> RPIYYGAYWYFDV	28
V _L -chimeric	KSLHLSNGNTY	17	RMS	18	MQHLEYPFT	19
V _L -humanized 일반식	ASS <u>X</u> ₁ VTY	29	<u>X</u> ₂ TS <u>X</u> ₃ <u>X</u> ₄ <u>X</u> ₅	30	QQWSSNPLT	31
#1-V _L	ASSPVTY	32	ATSSLAP	34	QQWSSNPLT	31
#2-V _L	ASSSVTY	33	ATSSLVS	35	QQWSSNPLT	31
#8-V _L	ASSSVTY	33	GTSRLVS	36	QQWSSNPLT	31
#11-V _L	ASSSVTY	33	ATSHLVS	37	QQWSSNPLT	31
#15-V _L	ASSSVTY	33	<u>G</u> TSQLVS	38	QQWSSNPLT	31
#19-V _L	ASSSVTY	33	<u>R</u> TSDLIS	39	QQWSSNPLT	31
#22-V _L	ASSSVTY	33	ATSELMs	40	QQWSSNPLT	31
#25-V _L	ASSSVTY	33	<u>G</u> TSMLAS	41	QQWSSNPLT	31
#26-V _L	ASSPVTY	32	ATSSLAS	42	QQWSSNPLT	31
#30-V _L	ASSSVTY	33	ATSSLVS	35	QQWSSNPLT	31

【표 14】

Frame work #1 of V _H -humanized	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	43
Frame work #2 of V _H -humanized	IYVVRQAPGKGLEWVG	44
Frame work #3 of V _H -humanized	TYNQKFGRATISVDKSKNTAYLQMNSRAEDTAVYYC	45
Frame work #4 of V _H -humanized	WGQGTLLTVSS	46
Frame work #1 of V _L -humanized	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR	47
Frame work #3 of V _L -humanized	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	51
Frame work #4 of V _L -humanized	FGQGTKVEIK	52
Frame work #2 of V _L -humanized 일반식	MHWY <u>X</u> ₆ QKPGKAP <u>X</u> ₇ PWIIY	48
humanized	(X ₆ = Q or H; H ₇ =R or K)	

	#26-V _L	MHWYQQKPGKAPRPWYIY	49
	#30-V _L	MHWYHQKPGKAPKPWYIY	50

- 하기 표 15에서, 상기 선정된 클론의 중쇄 및 경쇄 가변영역 서열을 표시하였으며, 모두 중쇄 가변영역은 동일하고(서열번호 53), 경쇄 가변영역을 상이하며(서열번호 54 내지 63), 밑줄로 표시한 서열 부분이 CDR 서열에 해당한다.

【표 15】

Clone no.	ID	아미노산 서열	서열 번호
V _H		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYTDYNIYWRQAPGKGLEWVGYPIDPANGDTTYNQKF KGRATISVDKSKNTAVLQMNSLRAEDTAVYYCSRPIYGYWYFDVWGQGLTVTVSS	53
#1-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSPVTYMHWYQQKPGKAPKPWYIATSSLAPGVPSRFSGS GSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK	54
#2-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVTYMHWYQQKPGKAPKPWYIATSSLVSGVPSRFSGS GSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK	55
#8-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVTYMHWYQQKPGKAPKPWYIGTSRLVSGVPSRFSGS GSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK	56
#11-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVTYMHWYQQKPGKAPKPWYIATSHLVSGVPSRFSGS GSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK	57
#15-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVTYMHWYQQKPGKAPKPWYIGTSQLVSGVPSRFSGS GSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK	58
#19-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVTYMHWYQQKPGKAPKPWYIRTSDLISGVPSRFSGS GSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK	59
#22-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVTYMHWYQQKPGKAPKPWYIATSELMMSGVPSRFSGS GSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK	60
#25-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVTYMHWYQQKPGKAPKPWYIGTSMLASGVPSRFSGS GSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK	61
#26-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSPVTYMHWYQQKPGKAPRPWYIATSSLASGVPSRFSGS GSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK	62
#30-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVTYMHWYHQKPGKAPKPWYIATSSLVSGVPSRFSGS GSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK	63

15-2: 인간화 항체 제조

상기 제작된 항- CA XII 인간화 항체 DNP004의 아미노산 서열을 기초로, 인간화 항체를 제작하였다.

항- CA-XII 인간화 항체의 발현을 위하여, 중쇄 발현용 플라스미드와
5 경쇄 발현용 플라스미드를 각각 제작하였다. 중쇄 발현용 플라스미드는 pcDNA3.4 (Invitrogen 사) 벡터를 사용하였고, 경쇄 발현용 플라스미드는 pOptiVEC (Invitrogen 사) 벡터를 사용하였다.

추가적인 아미노산 삽입 없이 항체 각각의 가변영역 코딩 cDNA와 불변영역 코딩 cDNA를 연속적인 아미노산 서열로서 발현되도록 하기 위하여,
10 상기 클로닝한 가변영역의 코딩 염기서열과 알려진 human IgG1 불변영역(중쇄) 및 kappa 불변영역(경쇄) 코딩 염기서열을 연결한 유전자 조각 각각을 합성(Bioneer 사)하였다. 이와 같이 합성한 중쇄 및 경쇄 발현 유전자는 제한 효소 Xho I 과 Sal I으로 자른 후, 중쇄 유전자 조각은 pcDNA3.4 벡터에, 경쇄 유전자 조각은 pOptiVec 벡터에 각각
15 ligation 하여 완전한 항체 발현용 플라스미드를 제작하였다 (pcDNA3.4-4B4중쇄 발현 플라스미드 및 pOptiVEC-4B4경쇄 발현 플라스미드).

상기 제작된 pcDNA3.4-4B4 중쇄 발현 플라스미드와 pOptiVEC-4B4 경쇄 발현 플라스미드를 CHO세포 유래인 DG44세포(Invitrogen)에 transfection시켜 형질전환 과정을 수행하였다.

20 우선 transfection 3일전에 부유상태의 DG44 세포를 5%FBS가 포함된 MEMa 배지에 적응시킴으로서 부착상태 세포로 변환시켜 형질전환 효율을 높일 수 있게 적응시켰다. 형질전환은 ViaFect transfection reagent(Promega, Cat.#: E4981)를 사용하여 6well plate에서 수행하였다. 형질전환 하루 전날 1×10^5 cells/well의 농도로 계대 배양하여 부착상태로
25 적응된 DG44세포를 준비하였고, 형질전환에 사용된 DNA의 양은 pOptiVEC-4B4 경쇄 발현 플라스미드와 pcDNA3.4-4B4 중쇄 발현 플라스미드 각각 3ug, 1ug 씩 3: 1 비율의 조합으로 사용하였다. 형질전환은 48시간동안 수행하였다. 형질전환된 세포군을 분석하기 위하여 유세포분석기(flow cytometer) 을 이용하였다.

도 25은 인간화 항체 DNP004의 CA-XII 양성 삼중음성유방암 세포주 MDAMB-231에서의 결합 확인을 나타내는 것이다.

<실시예 16> 항체 후보군 물성 평가

- 5 인간화 항체 변이체의 발현 및 물리적 특성을 비교 평가하기 위하여 SDS-PAGE 분석, Size exclusion chromatography, Melting temperature, ANS 반응성 등을 비교 평가하였다.

16-1: 항체 후보군- 발현량 분석

- 10 발현양 및 Protein A 정제에 의한 침전 발생 여부를 확인하기 위하여 8종 변이체 제조합 벡터를 HEK293F에 도입하여 일시적 형질전환을 유도하였다.

- 15 각각의 배양액 300mL을 protein A(GE Helthcare, Cat. No.11-0034-93)에 주입하고 용출버퍼(20 mM citric buffer pH3.0)을 사용하여 정제 하였다. 획득한 항체를 인산염 완충식염수로 투석하고 투석 전후 정량을 실시하여 손실 여부를 확인하였다. 발현량은 1.0 ~ 10.0 ug/mL 범위로 매우 많은 차이를 나타내었으며 25, 26번 변이체에서 높은 발현율을 확인할 수 있었다(표 16).

【표 16】

클론 번호	투석 이전 발현량 (mg) [단위 부피당 발현량]	투석 이후 발현량(mg)
인간화 항체 변이체 #1	0.6 [2.0 ug/mL]	0.6
인간화 항체 변이체 #2	2.5 [8.33 ug/mL]	2.5
인간화 항체 변이체 #8	1.5 [5.0 ug/mL]	1.2
인간화 항체 변이체 #11	1.5 [5.0 ug/mL]	1.3
인간화 항체 변이체 #15	0.3 [1.0 ug/mL]	0.3
인간화 항체 변이체 #19	1.2 [4.0 ug/mL]	1.0
인간화 항체 변이체 #22	0.5 [1.67 ug/mL]	0.5
인간화 항체 변이체 #25	2.7 [9.0 ug/mL]	2.7
인간화 항체 변이체 #26	3.0 [10.0 ug/mL]	3.0

인간화 항체 변이체 #30	1.5 [5.0 ug/mL]	1.5
----------------	-----------------	-----

16-2: 항체 후보군에 대한 SDS-PAGE 분석

인간화 항체 변이체들의 중쇄/경쇄 결합 완전성, 중쇄 및 경쇄의 단일성등을 평가하기 위하여 SDS-PAGE 분석을 실시하였다.

- 5 비환원 분석 조건에서는 항체 5 ug을 환원 분석에서는 항체 10 ug을 2X Laemmli sample buffer(Bioread, Cat. No.:161-0737)에 혼합 한 뒤 100° C에서 5분간 끓여 주고 ini-PROTEAN TGX gel(Bio-Rad, Cat. No.: 456-1083)에 시료를 load하였다. 150V에서 1시간 동안 전기영동을 실시하고 SimplyBlue Safestain(Invitrogen, Cat. No.: LC6060)으로 2시간 동안
- 10 염색하고 증류수로 탈염하였다. 인간화 항체 변이체 8종 중에서 클론#15번 변이체의 경우 경쇄 염색이 불분명하였으나 이외의 변이체 7종에서는 이상 없음을 확인하였다(도 26).

- 도 26는 항체 후보군의 SDS-PAGE를 이용한 물성 분석한 결과를 보여주는 사진이다. 인간화 항체 변이체 8종 중에서 15번 변이체의 경우
- 15 경쇄 염색이 불분명하였으나 이외의 변이체 7종에서는 이상 없음을 확인하였다(도 26).

16-3: 항체 후보군에 대한 SE-HPLC 분석

- 순도 평가를 위하여 Size exclusion-chromatography 분석을
- 20 실시하였다.

- 각각의 항체를 인산염완충식염수로 희석하여 1.0 mg/mL로 준비하고 평형버퍼(0.1M sodium phosphate, 0.1M sodium chloride pH7.0)로 평형화한 TSKgel G3000SWXL(TOSO)에 20 uL 주입하였다. 0.5 mL/min 유속으로 평형버퍼를 40분 동안 흘려주면서 용출되는 단백질을 280 nm 파장으로
- 25 검출하였다. 검출된 피크를 자동적분으로 적분하여 각각의 피크에 대한 면적을 계산하였고, 주피크의 면적비를 백분율로 기술하였다.

대부분의 변이체들의 주피크 면적비는 95% 이상의 순도를 나타내었으나 변이체 #11, 26번의 경우 94.3%, 94.1% 순도로 상대적으로

다소 낮게 평가 되었다(표 17).

【표 17】

클론 번호	Retention time(min)	Main peak Area(%)
키메릭 항체(4B4)	15.998	98.3402
인간화 항체 변이체 #1	16.366	95.325
인간화 항체 변이체 #2	16.326	95.0894
인간화 항체 변이체 #8	16.332	95.1814
인간화 항체 변이체 #11	16.409	94.3005
인간화 항체 변이체 #15	16.307	96.8589
인간화 항체 변이체 #19	16.263	97.4621
인간화 항체 변이체 #22	16.158	96.7872
인간화 항체 변이체 #25	16.329	95.3279
인간화 항체 변이체 #26	16.361	94.1417
인간화 항체 변이체 #30	16.326	95.735

16-4: 항체 후보군- Melting temperature (T_m) 분석

- 5 견고성(robustness) 비교 평가를 위하여 인간화 항체 변이체들의 Melting temperature를 측정하였다.

항체 변이체 0.44 µg에 Protein thermal shift dye와 buffer(Invitrogen, Cat. No.: 4462263)을 제조사 매뉴얼에 따라 첨가하여 혼합액 20µL을 제조하여 Protein Thermal Shift™ Software v1.0이 탑재된
 10 Real time PCR에 주입하였다. 0.05 °C/sec 속도로 25° C부터 95 °C까지 연속적으로 온도를 증가시키면서 Protein thermal shift dye와 항체간의 결합에 의하여 방출되는 형광값을 검출하였다. 시험완료 후 ViiA (상표명)
 7 Software로 Boltzmann fitting을 구현하고 각각의 항체에 대한 melting temperature(T_m)를 계산하였다. 8번 변이체의 경우 T_m 71.41 °C 가장
 15 견고한 항체로 평가되었다. T_m과 순도간의 상관관계를 확인하기 위하여 각각의 변이체를 62 °C 고온조건에서 3시간 방치한 뒤 Size exclusion chromatography 분석을 실시하고 주피크의 면적비를 계산하였다.

변이체 8번의 경우 62°C 고온조건에서 가장 많은 주피크 비율을 나타내었으며, T_m 분석 값과 동일하게 가장 견고한 변이체로 측정되었다(표

18).

【표 18】

클론번호	Melting temperature (° C)	Main peak Area(%)
인간화 항체 변이체 #2	69.96	89.534
인간화 항체 변이체 #8	71.41	94.684
인간화 항체 변이체 #19	66.93	83.662
인간화 항체 변이체 #22	68.59	NA
인간화 항체 변이체 #30	70.01	88.852

16-5: CA XII 양성세포주 결합력 평가

- 5 CA XII 항원을 발현하는 MDAMB231 유방암 세포주 10% heat inactivated FBS가 첨가된 RPMI 1640(GIBCO, invitrogen)에서 배양한 뒤 Trypsine-EDTA(Invitrogen)으로 탈착 한 뒤 인산염완충식염수 넣고 원심분리하여 세척하고 2×10^6 cells/tube로 분주하였다.

- 10 인간화 항체 변이체를 1.0 ug/mL 농도가 되도록 각각의 tube에 넣어 주고 냉장에서 30분 반응하였다. 인산염완충식염수를 넣고 원심분리하여 세척하고 FITC 표지 2차 항체 Goat anti-Mouse IgG(H+L)-FITC(다이노너)을 넣어 냉장에서 20분 반응하였다. 인산염완충식염수로 한 번 더 원심분리하여 세척하고 1% formaldehyde가 첨가된 인산염 완충식염수로 세포를 부유하여 유세포분석기(Stratedigm, S1000EXi)로 형광을 분석하였다.

- 15 MDAMB231 세포주에 결합하는 4B4 키메라 항체의 Mean Fluorescence Intensity(MFI)을 기준으로 변이체들의 결합력을 백분율로 도 28과 같이 나타내었다. 모든 변이체 모두 90% 이상의 상대적 결합력을 보였으며, 변이체 8, 11, 15 및 26번은 99%의 상대적 결합력을 나타내어 키메라 항체와 거의 차이가 없었다(도 27).

20

<실시예 17> 다양한 세포주에서 인간화 항체 발현 분석17-1: 다양한 세포주에서 항체 발현

KCLB(Korean Cell Line Bank)와 SNU(Seoul National University)를 통해 확보한 다양한 암 세포주에서의 인간화 항체 (DNP004) 항체의 결합 여부를 유세포 분석기(flow cytometry)로 확인하였다. 구체적으로 암세포주는 KCLB(Korean Cell Line Bank)와 SNU(Seoul National University)를 통해 얻었으며 LNCap, MCF-7, Huh7, Hs-578T 는 10% heat inactivated fetal bovine serum(FBS; GIBCO, invitrogen)가 첨가된 Dubco's MEM(GIBCO, invitrogen) 배지를 A549, NCI-H460, DLD-1, HT-29, LS174T, PC-3, SNU638, SNU719, MKN45, NCI-N87, SK-BR3, MDA-MB231, MDA-MB453은 10% heatinactivated FBS이 첨가된 RPMI 1640(GIBCO, invitrogen) 배지를 이용해 37℃에서 5%CO2상태의 배양기를 이용해 배양하였다. 또한 Hep3B.1-7, PLC/PRF/5은 10% heat inactivated fetal bovine serum(FBS; GIBCO, invitrogen)가 첨가된 Eagle's MEM(GIBCO, invitrogen) 배지를, KATO III는 20% heat inactivated fetal bovine serum(FBS; GIBCO, invitrogen)가 첨가된 IMDM(GIBCO, invitrogen) 배지가 첨가된 Medium 이용해 37℃에서 5% CO2. 상태의 배양기를 이용해 배양하였다.

상기 배양된 암세포주에 본 발명의 인간화 항체 (DNP004)를 각각 넣어 4℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 수세하고, FITC-conjugated goat anti-Huma IgG (DiNona Inc, Korea)를 넣어 4℃에서 15분간 배양하였다. 다시 PBS로 수세한 후 FACScaliber(Becton Dickinson, USA)로 분석하여 그 결과를 아래에 기재하였다(표19). 하기 표 19는 다양한 고형암 세포주에서 carbonic anhydrase 12항원에 대한 발현 양상을 나타낸다. 표 19에서 DNP004양성 세포의 퍼센트는 FACS분석법으로 분석하였으며, 실험대상 5000개 세포 중에서 DNP004항체와 결합하는 세포의 수를 %로 계산하여, -는 양성 세포수가 10% 미만, +은 양성 세포수가 10~30%범위, ++은 양성 세포수가 30~70%범위이고, +++은 양성 세포수가 70~100%로 지정하였다

【표 19】

Origin	Cell line	4B4 chimeric	DNP004
Lung	A549 TA	+++	+++
	NCI-H460	++	++

Colon	DLD-1	-	+
	HT-29	+	+++
	LS174T	+++	+++
Gastric	SNU 638	-	+
	SNU719	++	++
	KATO III	-	+++
	MKN 45	+++	+++
Liver	Huh-7	++	+++
	Hep3B.1-7	+	+
	PLC/PRF/5	+++	+++
Prostate	LNCap	+	-
Kidney	786-0	+++	+++
Breast	MCF-7	+	++
	SK-BR3	+++	++
	MDAMB231	+++	+++
	MDAMB453	++	+++
	Hs-578T	-	++
PBMC	Lymphocyte	-	-
	Monocyte	-	-
	Granulocyte	-	-

- 상기 표 19에 기재한 바와 같이, 같은 origin의 세포라도 세포주 구축시 Tissue 소스가 다르기 때문에 세포 종류에 따라 양성반응의 정도는 차이가 날 수 있으나, 본 발명의 인간화 항체 DNP004는 다양한 종류의
- 5 폐선암, 대장암, 위암, 간암 및 유방암 세포주에서 결합정도의 차이는 보이지만 양성반응을 나타내었으며, 전립선 암에서는 음성반응을 나타냄을 확인하였다. 반면 말초혈액유래 림프구와 단핵구, 과립구에는 모두 음성인 반응을 보이는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 본 발명의 인간화 항체 DNP004가 양성반응을 나타내는 고형암을 적응증으로 하는 치료제로서
- 10 사용할 수 있음을 나타낸 것이다.

17-2: 다양한 유형의 유방암세포에서 발현양상

DNP004항체는 ER,PR뿐만 아니라 HER2 positive인 Breast cancer cell에서도 모두 양성 반응을 보인다. 따라서, 삼중음성 유방암(Triple negative breast cancer) 뿐만 아니라, 다양한 유형의 유방암 치료제로도 쓰일 수 있다. 세가지 서로 다른 표현형의 유방암 세포주에서의 DNP004

5 인간화 항체의 결합 여부를 유세포 분석기(flow cytometry)로 확인하고, chimeric 4B4와 결합정도의 차이를 비교하였다.

구체적으로, MDAMB-231 및MDAMB453, MCF-7, SK-BR-3 세포주는 상기 <실시예5-2>와 동일한 방법으로 배양하였다. 상기 배양된 암세포주에 DNP004 인간화 항체를 각각 넣어 4℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS로

10 수세하고, FITC-conjugated goat anti- Human IgG(DiNona Inc, Korea)를 넣어 4℃에서 15분간 배양하였다. 다시 PBS로 수세한 후 FACS caliber(Becton Dickinson, USA)로 분석하여 그 결과를 도28 및 도29에 기재하였다.

도28 및 도29는 다양한 유형의 유방암 세포에서 DNP004 인간화

15 항체의 carbonic anhydrase 12항원에 대한 결합 양상 확인한 결과이다. 따라서, 본 발명에 따른 DNP004 인간화 항체는 ER,PR뿐만 아니라 HER2 양성 유방암 세포에서도 모두양성 반응을 보이므로, 삼중음성 유방암(Triple negative breast cancer)뿐만 아니라 다양한 유형의 유방암에서도 치료제로 쓰일 수 있다.

20

<실시예18> 다양한 고형암에 대한 인간화 항체의 치료효과(ADCC)

다양한 고형암에서 항체의존성 세포독성(ADCC)을 Luciferase assay 으로 평가하였다. 표적세포로 유방암 세포주인 MDAMB-231과 MDAMB-453, MCF7, SK-BR3, 폐암 세포주인 A549, 간암 세포주인 Huh7과 HEP3B, 위암

25 세포주인 KATO III, SNU719, MKN-45를 96-well plate에 1.25×10^4 cells/well로 plating 후 37℃ CO₂ incubator에서 20-24시간 배양한다. 각 웰(well)의 배양액을 제거한 후 low IgG FBS 4%가 포함되어 있는 RPMI를 플레이팅되어 있는 well에 25ul씩 첨가한다. 실시예 15에 의한 DNP004 인간화 항체를 최대 10ug/ml에서 3-fold로 희석하여 최저 약 1.2ng/ml까지

low IgG FBS 4%가 포함되어 있는 RPMI를 사용하여 희석한 항체시료를 준비한다. 준비된 각각의 항체시료를 해당 well에 각 농도에 맞게 첨가한 후 plate의 뚜껑을 닫고 클린 벤치안에서 유지시켰다. 배양하고 있던 ADCC reporter cell(ADCC Reporter Bi 5 oassay, Promega) 을 harvest 한 후 low IgG FBS 4%가 포함되어 있는 RPMI로 3×10^6 cells/ml이 되게 현탁하였다. 각 well에 ADCC reporter cell 현탁액을 25 ul씩 첨가한 후 37°C CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다.

플레이트를 꺼내기 전 미리 열려져 있는 luciferase substrate를 중탕기에 녹여 준비해둔다. 플레이트를 꺼내 실온에서 15분 방치 후 luciferase substrate를 각 well당 75ul씩 첨가한 후 암실에서 30분간 반응시킨 후 luminometer를 이용하여 발광도를 측정하였다.

도 30는 DNP004 인간화 항체의 유방암 세포주에서의 항체 의존성 세포독성 효과 확인 결과이고, 도 31은 DNP004 인간화 항체의 폐암 세포주 A549에서의 항체 의존성 세포독성 효과 확인 결과이고, 도 32은 DNP004 인간화 항체의 간암 세포주 Huh7과 HEP3B 에서의 항체 의존성 세포독성 효과를 확인 결과이고, 도 33은 DNP004 인간화 항체의 위암 세포주 KATO III, SNU719, MKN-45에서의 항체 의존성 세포독성 효과를 확인 결과를 나타낸다.

따라서, 본 발명에 따른 DNP004 인간화 항체는 DNP004항원 (CA XII, Carbonic anhydrase XII)이 발현되는 다양한 유형의 고형암 세포에서 항체 의존성 세포독성 효과에 의한 세포사멸기전이 있음을 입증하였다.

<실시예 19> 마우스 실험모델을 이용한 인간화 항체의 치료효과 평가

19-1: 유방암 동물모델/ 단일 농도의 항체 투여군 실험

사람의 유방암 동물 모델은 삼중음성 유방암 (triple negative breast cancer) 세포주인 MDA-MB-453 세포주로 확립하였다. 먼저, 1.5×10^7 세포수의 MDA-MB-453 세포를 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 접종하고, 종양형성과 성장을 관찰하였으며, 종양 크기는 하기 수학적식에 의해 계산하였다.

(부피=(a x b)/2, a는 짧은직경, b는 긴직경)

종양의 크기가 $100 \text{ mm}^3 \pm 20$ 에 도달했을 때, 마우스를 무작위적으로 대조군 그룹 (5 마리) 과 처리군 그룹(5 마리) 으로 분리하고, 처리군 그룹에 DNP004 인간화 항체는 10 mg/kg 양을 마우스 꼬리 정맥으로 투여하였다. 이 후, 종양은 실험 기간 동안 3-4 일 간격으로 일주일에 2 회 측정하고, 종양 성장곡선은 항체 투여시작일로부터 실험 종료 시점까지 하였으며, 상기 결과의 평균값을 도 34a 에 나타냈다. 따라서, 인간화 항체 투여군은 대부분의 종양 성장이 억제되는 결과를 보였다 (도 34).

19-2: 유방암 동물모델/ 복수의 농도의 항체 투여군 실험

10 상기 실시예 19-1 과 동일한 유방암 동물모델을 이용하여, DNP004 인간화 항체를 다양한 농도로 투여하는 실험을 진행하였다.

구체적으로, 4 mg/kg , 8 mg/kg , 16 mg/kg , 32 mg/kg 로서 4 가지 농도로 투여한 항체 투여군(그룹)을 각 그룹 당 5 마리씩 실험을 진행하였다. 16 mg/kg 용량의 항체 투여군에서는 부분적인 종양 억제 효과를 보여 전체적으로 용량과 비례적으로 종양 억제 효과를 보이지는 않았지만, 종양 성장이 완전히 억제되는 완전 관해(complete remission) 상태의 결과는 항체 투여 용량이 높을수록, 증가하는 경향을 보였다 (도 35, 표 20).

【표 20】

MDAMB453(Triple negative breast cancer) Xenograft model		
DNP004 투여 dose 별 Group	mouse#	Mass size(mm^3)
1 (Control)	191	333
	211	429
	190	91
	197	211
	198	143
2 (DNP004 4 mg/kg)	236	161
	210	155
	227	53
	192	0 (complete remission)

	215	0
3 (DNP004 8 mg/kg)	201	213
	214	182
	189	0 (complete remission)
	196	0 (complete remission)
	228	0 (complete remission)
4 (DNP004 16 mg/kg)	224	333
	217	486
	195	0 (complete remission)
	206	135
	205	0 (complete remission)
5 (DNP004 32 mg/kg)	222	0 (complete remission)
	234	175
	209	0 (complete remission)
	200	0 (complete remission)
	188	0 (complete remission)

19-3: 신장암 동물모델/ 단일 농도의 항체 투여군 실험

인간화 항체(DNP004)의 타깃 항원(CA-XII)이 높게 발현되는 신장암 (Renal cell cancer) 세포주인 786-0 세포를 이용하여, 마우스 동물모델
5 확립 및 항 종양 효과를 확인하였다(도 36).

구체적으로, 누드 마우스에 1.5×10^7 세포수의 786-0 세포주를 피하 주사하였다. 그러나, 이 실험 세트의 경우 종양 형성은 위 유방암 세포주의 경우와 달리 매우 늦게 이뤄졌으며, 약 70 일 이후 종양 형성을 확인하였다. 상기 종양 형성이 확인된 처치군 그룹에 DNP004 인간화 항체는 32
10 mg/kg 양을 마우스 꼬리 정맥으로 투여하였다. 이 후, 종양은 실험 기간 동안 3-4 일 간격으로 일주일에 2 회 측정하고, 종양 성장곡선은 항체 투여시작일로부터 실험 종료 시점까지 하였으며, 대조군 3 마리 대비 DNP004 인간화 항체 투여군 8 마리의 개별 마우스의 평균 종양 성장 곡선을 도 36에 나타냈다.

따라서, 유방암뿐만 아니라 신장암에서도 DNP004 인간화 항체의 항암효과를 확인하였다.

특허결차상 미생물 기탁의 승인에 관한 부다페스트 조약

국제용 양식

수 신: 송형근

마포트라펠린스 1505 15F

마포구 도화동

서울, 대한민국

이건 문서의 아랫부분에 기재된

국제기탁기관에 의해

조약 7.1에 따라 발행된

원기탁에 관한 접수

I. 미생물의 명칭	
기탁자에 의해 주어진 명칭: 4B4-3-13	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: ICLRF-BF-00279
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상 위치	
상기 I에 표시된 미생물에 다음을 첨부하였다. (X) 과학적 성질 (X) 분류학상 위치 (적용대상에 체크할 것)	
III. 수령 및 수탁	
본 국제기탁기관은 상기 I.에 표시된 미생물을 수탁받고 2012년 2월 14일 (원기탁 일자)* 수령하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명 칭 : 한국세포주연구재단 주 소 : 서울시 종로구 연건동 28 서울대학교 압연연구소 (우) 110-744 대한민국	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가지거나 권한을 부여받은 담당자의 날인: 날짜: 2012년 02월 20일

* 조약 6.4(d)는, 국제기탁기관의 지위를 획득한 날; 국제기탁기관의 지위를 획득한 이후에 부다페스트 조약국 이외에서 행해진 기탁을 부다페스트 조약에 의한 기탁으로 전환한 경우에는 국제기탁기관이 접수한 날로 적용한다.

FORM BP/4

단일 페이지

**특허절차상 미생물 기탁의
승인에 관한 부다페스트 조약**

국제용 양식

수 신: 송형근

마포트라펠린스 1505 15F
마포구 도화동
서울, 대한민국

이건 문서의 아랫부분에 기재된
국제기탁기관에 의해
조약 7.1에 따라 발행된
원기탁에 관한 접수

I. 미생물의 명칭	
기탁자에 의해 주어진 명칭: 27B6-4-19	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: XCLBF-B-00280
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상 위치	
상기 I에 표시된 미생물에 다음을 첨부하였다. ☒ (X) 과학적 성질 ☒ (X) 분류학상 위치 (적용대상에 체크할 것)	
III. 수령 및 수탁	
본 국제기탁기관은 상기 I.에 표시된 미생물을 수탁받고 2012년 2월 14일 (원기탁 일자) 수령하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명 칭 : 한국세포주연구재단 주 소 : 서울시 종로구 연건동 28 서울대학교 암연구소 (우) 110-744 대한민국	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가지거나 권한을 부여받은 담당자의 날인: 날짜: 2012년 02월 20일

* 조약 6.4(d)는, 국제기탁기관의 지위를 획득한 날, 국제기탁기관의 지위를 획득한 이후에 부다페스트 조약국 이외에서 행해진 기탁을 부다페스트 조약에 의한 기탁으로 전환한 경우에는 국제기탁기관이 접수한 날로 적용한다.

FORM BP/4

단일 페이지